

Vorkommen von Infektionen mit *Mycoplasma hyopneumoniae* im Saugferkelalter und deren Weiterverbreitung in nachgelagerten Produktionsstufen

von Pauline Susanne Sabina Deffner

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

Vorkommen von Infektionen mit
Mycoplasma hyopneumoniae im Saugferkelalter und
deren Weiterverbreitung in nachgelagerten
Produktionsstufen

von Pauline Susanne Sabina Deffner

aus München

München 2020

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. Mathias
Ritzmann

Mitbetreuung durch: Dr. Matthias Eddicks

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Mathias Ritzmann

Korreferent: Priv.-Doz. Dr. Karin Schwaiger

Tag der Promotion: 8. Februar 2020

Meiner Familie

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG.....	1
II.	LITERATURÜBERSICHT	3
1.	<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	3
1.1.	Taxonomie	3
1.2.	Morphologie	3
1.3.	Epidemiologie	4
1.3.1.	Herdenprävalenz.....	4
1.3.2.	Prävalenz bei Saugferkeln	5
1.3.3.	Übertragungswege und Infektionsquellen.....	7
1.4.	Pathogenese	10
1.5.	Klinisches Erscheinungsbild.....	12
1.6.	Pathologische Veränderungen des Lungengewebes.....	14
1.7.	Diagnostik von <i>M. hyopneumoniae</i> assoziierten Krankheitsbildern	16
1.7.1.	Hustenindex.....	16
1.7.2.	Lungenläsionen am Schlachthof.....	17
1.7.3.	Labordiagnostische Untersuchungsmethoden	18
1.7.3.1.	Kultureller Nachweis von <i>M. hyopneumoniae</i>	18
1.7.3.2.	Immunhistochemie (IHC), Immunfluoreszenz (IF) und In-situ- Hybridisierung (ISH).....	19
1.7.3.3.	PCR	20
1.7.3.4.	Serologische Untersuchung.....	23
1.8.	Therapie.....	25
2.	Prävention und Kontrolle.....	27
2.1.	Vakzination	27
2.2.	Einfluss von Management und Haltungsbedingungen	30
2.3.	Eradikation.....	31
III.	MATERIAL UND METHODEN	35
1.	Ziel der Untersuchung	35
2.	Versuchsbetriebe	36
2.1.	Einschlusskriterien	36

2.2.	Lungenuntersuchungen am Schlachthof	37
3.	Versuchstiere.....	38
4.	Probenentnahme	39
4.1.	Probengewinnung Sauen.....	39
4.2.	Probengewinnung Ferkel.....	40
4.3.	Gewinnung der SammelSpeichelproben bei Absetzferkeln und Mastschweinen (6./12./16./20. Lebenswoche).....	41
5.	Fragebogen.....	42
6.	Probenbearbeitung.....	42
6.1.	Erregernachweis.....	42
6.2.	Direkter Erregernachweis aus Larynx- und Tracheobronchialtupfern	43
6.2.1.	Extraktion der Mycoplasma hyopneumoniae-DNA.....	43
6.2.2.	PCR	43
6.3.	Direkter Erregernachweis aus SammelSpeichelproben	44
6.3.1.	Extraktion der Mycoplasma hyopneumoniae-DNA.....	44
6.3.2.	PCR	44
6.4.	Indirekter Erregernachweis	45
6.5.	Hustenindex.....	46
7.	Statistik	47
IV.	ERGEBNISSE	49
1.	Pre - Screening der Bestände.....	49
2.	Labordiagnostik.....	51
2.1.	Serologie.....	51
2.1.1.	Assoziation zwischen serologischen Ergebnissen von Sau und Ferkeln	52
2.1.2.	ELISA Ergebnisse im Zusammenhang mit der Parität	53
2.1.3.	ELISA Ergebnisse in Zusammenhang mit <i>M. hyopneumoniae</i> Impfstatus der Sau	55
2.1.4.	EP-Läsionen in Abhängigkeit von ELISA Ergebnissen	57
2.1.5.	ELISA Ergebnisse im Zusammenhang mit dem Husten-Index.....	59

2.2.	Molekularbiologische Untersuchung von Larynxtupfern und Tracheobronchialtupfern mittels real-time PCR	61
2.2.1.	Zusammenhang zwischen PCR Ergebnissen von Sauen und Ferkeln	62
2.2.2.	Zusammenhang zwischen Ergebnissen der real-time PCR und des ELISAs	62
2.2.3.	Ergebnisse der real-time PCR in Zusammenhang mit der Parität	63
2.2.4.	Ergebnisse der real-time PCR nach Impfstaus der Sau bezüglich <i>M. hyopneumoniae</i>	64
2.2.5.	real-time PCR Ergebnisse im Zusammenhang mit dem EP Index.....	64
2.2.6.	Ergebnisse der PCR im Zusammenhang mit dem Husten-Index (HI).....	65
2.3.	Molekularbiologische Untersuchung von oral fluids (OFs) mittels real-time PCR.....	65
V.	DISKUSSION	69
1.	Serologie	69
2.	Direkter Erregernachweis bei Muttersauen und Saugferkeln.....	72
3.	Zusammenhang zwischen serologischen und molekularbiologischen Ergebnissen bei Sauen und Ferkeln	75
4.	EP-Index und Laborergebnisse	77
5.	Parität und Laborergebnisse	79
6.	Einfluss des Impfstatus der Sauen auf die Laborergebnisse	81
7.	Hustenindex und Laborergebnisse	83
8.	Molekularbiologische Untersuchung von oral fluids	85
VI.	ZUSAMMENFASSUNG	91
VII.	SUMMARY	93

VIII.	TABELLENVERZEICHNIS	95
IX.	ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	97
X.	LITERATURVERZEICHNIS	99
XI.	DANKSAGUNG.....	127

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AK	Antikörper
A.	<i>Actionobacillus</i>
APP	<i>Actionobacillus pleuropneumoniae</i>
AIAO	all-in, all-out
BAL	bronchioalveoläre Lavage
BALF	bronchioalveoläre Lavageflüssigkeit
BALT	bronchus-associated lymphoid tissue
Ct	cycle treshold
DNA	Desoxyribonukleinsäure
d.p.i.	days post infection
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbant Assay
EP	Enzootische Pneumonie
<i>H. parasuis</i>	<i>Haemophilus (jetzt: Glässerella) parasuis</i>
HI	Hustenindex
HRP	horseradish peroxidase (Meerrettichperoxidase)
i.m.	intramuskulär
IAV	Influenza-A-Virus
IF	Immunofluoreszenz
IFN	Interferon
IgG	Immunglobulin G
IHC	Immunhistochemie
IL	Interleukin
ISH	In-situ-Hybridisierung

LaT	Larynxtupfer
LT	Lebenstag
LW	Lebenswoche
<i>M.</i>	<i>Mycoplasma</i>
MD	Median
MEW	medicated early weaning
MIC	minimal inhibitory concentration (minimale Hemmstoff-Konzentration)
MIRD	<i>Mycoplasma</i> induced Respiratory Disease
MW	Mittelwert
nc	Negativkontrolle
nm	Nanometer
nPCR	nested polymerase chain reaction
NT	Nasentupfer
OD	optische Dichte
OF	oral fluid
<i>P. multocida</i>	<i>Pasteurella multocida</i>
p.e.	post expositionem
p.i.	post infectionem
p.m.	post mortem
p.o.	per os
PBS	phosphate buffered saline (phosphatgepufferte Salzlösung)
pc	Positivkontrolle
PCR	polymerase chain reaction

PCV2	porcines Circovirus Typ 2
PMWS	post-weaning multisystemic wasting syndrome
PRDC	porcine respiratory disease complex
PRRSV	Porzines reproduktives und respiratorisches Syndrom Virus
qPCR	quantitative PCR
RNA	Ribonukleinsäure
<i>S. suis</i>	<i>Streptococcus suis</i>
SD	Standardabweichung
TBLF	tracheobronchiale Lavageflüssigkeit
TBS	tracheobronchial swab (Tracheobronchialtupfer)

I. EINLEITUNG

Mycoplasma (M.) hyopneumoniae ist das ätiologische Agens der Enzootischen Pneumonie (EP) der Schweine und ist maßgeblich an der Entstehung des porcine respiratory disease complex (PRDC) beteiligt (PIETERS & MAES, 2019). Der Erreger besiedelt und schädigt das zilienbesetzte respiratorische Epithel der luftleitenden Wege (BLANCHARD et al., 1992), moduliert das Immunsystem (SHEN et al., 2017) und erleichtert somit sekundären Erregern ein Eindringen und eine Proliferation in der Lunge. Die EP zeichnet sich durch hohe Morbidität, geringe Mortalität und ihren chronischen Charakter aus und führt zu beachtlichen wirtschaftlichen Einbußen (PIETERS & MAES, 2019).

Die Impfung gegen *Mycoplasma hyopneumoniae* gilt neben der Optimierung von Haltung und Management, als eine wichtige Maßnahme zur Kontrolle der EP als Faktorenerkrankung (MAES et al., 2008). Während Impfungen der Sauen unter Feldbedingungen seltener angewandt werden (GARZA-MORENO et al., 2018), wird die einmalige oder zweimalige Impfung im Saugferkelalter häufig praktiziert (MAES et al., 2018). Ferkel können sich schon in der ersten Lebenswoche mit *Mycoplasma hyopneumoniae* infizieren (SIBILA et al., 2007b). Die Übertragung des Erregers findet hauptsächlich über direkten nasalen Kontakt statt (PIETERS & MAES, 2019). Ferkel von Muttersauen, die *Mycoplasma hyopneumoniae* während der Säugezeit auf ihre Nachkommen übertragen (CALSAMIGLIA & PIJOAN, 2000), gelten als hauptsächliche Initiatoren für die Weiterverbreitung des Erregers in Aufzucht und Mast (FANO et al., 2007; NATHUES et al., 2013b).

Ziel dieser Untersuchung ist es, die Prävalenz von *Mycoplasma hyopneumoniae* bei Saugferkeln im Alter von drei Wochen zu bestimmen und mögliche Assoziationen zwischen dem Grad der Besiedelung der Ferkel und der Muttersauen darzustellen. Des Weiteren soll untersucht werden, ob Rückschlüsse von dem Grad der Besiedelung von Sauen oder Ferkeln auf den Gesundheitsstatus von Mastschweinen und auf die Nachweisrate von *Mycoplasma hyopneumoniae* in oral fluid samples in

Aufzucht und Mast sowie auf Lungenläsionen am Schlachthof gezogen werden können. Dafür wurden serologische und molekularbiologische Untersuchungen durchgeführt sowie Hustenindices und EP-Indices am Schlachthof erhoben.

II. LITERATURÜBERSICHT

1. *Mycoplasma hyopneumoniae*

1.1. Taxonomie

Mykoplasmen gehören zu den zellwandlosen Bakterien und werden zum Stamm der Tenericutes gerechnet (SELBITZ, 2015). Dort zählen sie zur Klasse der Mollicutes, die sich in vier Ordnungen unterteilt (SELBITZ, 2015). Die Gattung *Mycoplasma* ist der Familie der Mycoplasmataceae in der Ordnung Mycoplasmatales zuzuordnen (VALENTIN-WEIGAND, 2015). Ihr gehören die medizinisch wichtigsten Vertreter der zellwandlosen Bakterien an, für die eine ausgeprägte Wirtsanpassung typisch ist (SELBITZ, 2015; VALENTIN-WEIGAND, 2015). Neben *Mycoplasma hyopneumoniae* (*M. hyopneumoniae*), welches von großer wirtschaftlicher Bedeutung für die Schweineindustrie ist, zählen *Mycoplasma hyorhinitis*, *Mycoplasma hyosynoviae* und *Mycoplasma suis* zu den für Schweine pathogenen Mykoplasmen (THACKER & MINION, 2012).

1.2. Morphologie

Wegen ihrer geringen Größe von 400 bis 1200nm (TAJIMA & YAGIHASHI, 1982) sind Mykoplasmen in der Lage Bakterienfilter bis 450nm zu passieren (DREXLER & UPHOFF, 2002). Aufgrund des kleinen Genoms von nur 580–1350kBp haben Mykoplasmen eine eingeschränkte Stoffwechselkapazität, wodurch nur eine kommensale oder parasitäre Lebensweise möglich ist (SELBITZ, 2015). Mykoplasmen entbehren einer Zellwand und sind deshalb unempfindlich gegenüber zellwandwirksamen Antibiotika (MAES et al., 1996). Umgeben sind sie nur von einer Zytoplasmamembran, die eine dreifache laminaire Struktur besitzt (SELBITZ, 2015). Bedingt durch das Fehlen einer starren Zellwand besitzen sie ein pleomorphes Erscheinungsbild, das von kugel- und birnenförmigen, bis zu verzweigten oder helikalen Formen reicht (SELBITZ, 2015). Auf der Außenseite der Zytoplasmamembran finden sich radiär angeordnet eine Vielzahl von Fibrillen, die eine Bindung an das Wirtsepithel ermöglichen (TAJIMA & YAGIHASHI, 1982).

1.3. Epidemiologie

Mycoplasma hyopneumoniae ist weltweit ubiquitär in der Hausschweinpopulation verbreitet (PIETERS & MAES, 2019). Nach aerogener Infektion kolonisiert *M. hyopneumoniae* die Zelloberflächen der bronchopulmonalen Atemwege und schädigt dabei die Zilien (SELBITZ, 2015). Es ist der Verursacher der Enzootischen Pneumonie (EP) und steigert als Mitverursacher des porcine respiratory disease complex (PRDC) die Ausprägung von Atemwegserkrankungen, die primär von viralen Pathogenen hervorgerufen werden (THACKER & MINION, 2012).

1.3.1. Herdenprävalenz

Mycoplasma hyopneumoniae ist in der deutschen Schweinepopulation endemisch verbreitet (GROSSE BEILAGE et al., 2013). Der Anteil infizierter Herden wird auf über 90% geschätzt (GROSSE BEILAGE et al., 2013). In einer Studie zur Seroprävalenz in deutschen Sauenbeständen wurden insgesamt 2578 Sauen aus 67 verschiedenen Betrieben in Nordwestdeutschland untersucht. Dabei stellten sich insgesamt 65% dieser Tiere mittels Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) als *M. hyopneumoniae* seropositiv dar, wobei in jedem Bestand mindestens 14% seropositive Sauen detektiert wurden (GROSSE BEILAGE et al., 2009). In Untersuchungen, die Schweinebestände mit Husten im Aufzucht- und Mastalter in ganz Europa miteinschlossen, wurden Saugferkel im Alter von 21±3 Tagen mittels Nasentupfern beprobt (VILLARREAL et al., 2010). In 68% der Bestände wurde mittels polymerase chain reaction (PCR) mindestens eine *M. hyopneumoniae* positive Probe detektiert, in 32% der Bestände wurde bei mindestens 10% der beprobten Tiere *M. hyopneumoniae* mittels PCR im Nasentupfer nachgewiesen (VILLARREAL et al., 2010). In einer Studie von NATHUES et al. (2013a) wurden 125 Bestände randomisiert untersucht. Dabei konnten mittels PCR aus Nasentupfern in 36,8% (46/125) der in Nordwestdeutschland untersuchten Bestände *M. hyopneumoniae* positive Ferkel im Alter von 18 bis 24 Tagen detektiert werden (NATHUES et al., 2013a). Eine geringere Prävalenz geben MOORKAMP et al. (2009) an. In 50 vorausgewählten Betrieben, mit chronisch respiratorischen Anzeichen, wurden hustende Ferkel im Alter von 3-6 Wochen mittels Bronchoalveolärer Lavage (BAL)

untersucht. In 28% der Bestände war mindestens ein *M. hyopneumoniae* positives Ferkel zu identifizieren (MOORKAMP et al., 2009). Bei Untersuchungen zur Seroprävalenz am Ende der Mast, wurden in 88% der Betriebe mittels ELISA Antikörper gegen *M. hyopneumoniae* nachgewiesen (MAES et al., 1999b).

1.3.2. Prävalenz bei Saugferkeln

Klinische Anzeichen einer enzootischen Pneumonie treten meist erst in der Mast auf (PIETERS & MAES, 2019), Infektionen mit *M. hyopneumoniae* sind aber ab der ersten Lebenswoche möglich (SIBILA et al., 2007b). Die Häufigkeit des Vorkommens von Besiedelungen mit dem Erreger vor dem Absetzen wurde in verschiedenen Studien untersucht:

In einer retrospektiven Studie, die Lungengewebe post mortem (p.m.) mittels PCR auf das Vorkommen von *M. hyopneumoniae* DNA untersuchte, konnte eine Prävalenz von 2% bei Saugferkeln und 9,3% bei Absetzferkeln ermittelt werden (NATHUES et al., 2010). Ähnliche Prävalenzen von 3,6% (NATHUES et al., 2013b), bzw. 3,9% (NATHUES et al., 2013a) konnten in anschließenden PCR Untersuchungen aus Nasentupfern dargestellt werden. Diese Ergebnisse decken sich mit SIBILA et al. (2007b), welche bei 1,5% der Ferkel am 7. LT sowie bei 3,8% der Ferkel am 21. LT *M. hyopneumoniae* mittels PCR aus Nasentupfern nachweisen können.

Zu höheren Prävalenzen gelangten MOORKAMP et al. (2009) in Beständen mit endemischer Hustenproblematik: die gewonnene BAL-Flüssigkeit von Saug- und Absetzferkeln wurde mittels PCR auf das Vorkommen von *M. hyopneumoniae* untersucht. Durchschnittlich waren 11,2% der Ferkel im Alter von 3-6 Wochen und 12,3% der Saugferkel *M. hyopneumoniae* positiv (MOORKAMP et al., 2009). Bei der Untersuchung der BALF von 54 Ferkeln zwischen 3 und 7,5 kg Lebendgewicht mittels PCR, stellten sich 13% als *M. hyopneumoniae* positiv dar (PALZER, 2006). In einem Versuch, in dem Sauen gegen *M. hyopneumoniae* geimpft wurden, waren bis zu 13,2% der Ferkel zum Zeitpunkt des Absetzens *M. hyopneumoniae* positiv (RUIZ et al., 2003). In einem Betrieb mit diagnostizierter Mykoplasmenproblematik lag der Anteil *M. hyopneumoniae* positiver

Ferkel bei 7,7% bis 9,6% (CALSAMIGLIA & PIJOAN, 2000). Dass europaweit Infektionen im Saugferkelalter vorkommen, konnten VILLARREAL et al. (2010) darstellen: Bei 10,7% der untersuchten Tiere waren *M. hyopneumoniae* spezifische Genomfragmente mittels nested PCR (nPCR) in Nasentupfern nachweisbar. Ergebnisse von FANO et al. (2007) zur Prävalenz von *M. hyopneumoniae* in Nasentupfern von Absetzferkeln stellten sich mittels nPCR als sehr variabel dar und umfassten Werte von 0% bis 51,8%.

In Tabelle 1 sind die bisher in Studien bestimmten Prävalenzen von *M. hyopneumoniae* im Saugferkelalter im Vergleich dargestellt.

Tabelle 1: Übersicht über Studien zur Prävalenzbestimmung von *M. hyopneumoniae* im Saugferkelalter mittels PCR

Autor	Land	Nachweis- methode	Alter der Ferkel bei Beprobung	Anzahl der Betrie- be	Stich- proben - umfang	Präva- lenz	Anmerkung/ Einschlusskriterien
CALSAMIGLIA und PIJOAN (2000)	USA	NT	Ø 17. LT	1	255	7,7- 9,6%	Vorberichtliche <i>M. hyopneumo- niae</i> Problematik
RUIZ et al. (2003)	USA	NT	19. LT	1	296	2,6- 13,2%	Impfversuch
PALZER (2006)	DEU	BAL	3-7,5kg LGW	k.A.	54	13%	Patienten LMU Klinik f. Schweine
FANO et al. (2007)	USA	NT	18. LT	3	780	0 - 51,8%	Absetzalter Kolonisation mehr als 5%
SIBILA et al. (2007b)	ESP	NT	3. LW	1	507	3,8%	EP Problematik in Endmast
MOORKAMP et al. (2009)	DEU	BAL	3. LW	50	500	12,3%	Chronische Hustensympto- matik
VILLARREAL et al. (2010)	EU	NT	21.LT ± 3d	52	1555	10,7%	<i>M. hyopneumo- niae</i> assoziierte resp. Probleme
NATHUES et al. (2010)	DEU	Lung- enge- webe	Saug- ferkel	k.A.	201	2,0%	Auf <i>M. hyopneumo- niae</i> untersucht
FABLET et al. (2012a)	FRA	TBS	4.LW	125	1250	14,1%	Bestände mit unterschiedlich hohen EP und Pleuritis Befunden
NATHUES et al. (2013a)	DEU	NT	Ø 21,8. LT	125	2500	3,9%	keine Vorauswahl
NATHUES et al. (2013b)	DEU	NT	Ø 24,8. LT	3	1127	3,6%	3/20 Ferkel PCR positiv
VANGROENWEG HE et al. (2015)	BEL/ NLD	TBS	3.-5.LW	176	3168	7,1%	Kein Husten in den letzten 4 Monaten

1.3.3. Übertragungswege und Infektionsquellen

M. hyopneumoniae kann sowohl aerogen (FANO et al., 2005), als auch über direkten Kontakt oder Tröpfcheninfektion übertragen werden (MAES et al., 1996). Die Möglichkeit einer intrauterinen Übertragung ist bis zum heutigen Zeitpunkt nicht bekannt (PIETERS & MAES, 2019). Ferkel können sich ab der ersten Lebenswoche infizieren (SIBILA et al., 2007b). Direkter nasaler Kontakt zwischen den Tieren stellt den hauptsächlichen Übertragungsweg für *M. hyopneumoniae* dar (PIETERS & MAES, 2019) und kann sowohl horizontal zwischen infizierten und naiven Tieren (MORRIS et al., 1995a) als auch vertikal von der Muttersau auf ihre Ferkel (MAES et al., 1996) stattfinden. Der enge nasale Kontakt zwischen Sau und Ferkel ermöglicht eine Übertragung der Erreger auf die Nachkommen und eine Aufrechterhaltung der Infektion im Bestand (CALSAMIGLIA & PIJOAN, 2000). Vertikale Übertragung von infizierten Sauen auf ihre Nachkommen wurde als entscheidender Risikofaktor für das Vorkommen von *M. hyopneumoniae* Infektionen im Absetzalter identifiziert (PIETERS et al., 2014). Dabei erhöht jeder zusätzliche Tag bei der Muttersau das Risiko für eine spätere EP-Erkrankung in der Mast signifikant (NATHUES et al., 2012a). Werden die Eckzähne der Ferkel geschliffen, hohe Temperaturen im Ferkelnest eingehalten sowie Eisen im Saugferkelalter zweimal appliziert, können signifikant weniger *M. hyopneumoniae* positive Ferkel zum Zeitpunkt des Absetzens festgestellt werden (NATHUES et al., 2013b).

Infizierte Sauen können den Erreger an neueingegliederte naive Jungsauen übertragen (PIETERS et al., 2006). Insbesondere Jungsauen bzw. Sauen mit niedrigen Paritäten haben niedrige Antikörpertiter und scheiden vermehrt *M. hyopneumoniae* aus (MAES et al., 1996; CALSAMIGLIA & PIJOAN, 2000). So ist die Wahrscheinlichkeit einer Übertragung von *M. hyopneumoniae* vom Muttertier auf die Ferkel bei Jungsauen und Sauen niedriger Paritäten höher (FANO et al., 2006). Eine Studie aus Thailand zeigt ebenso eine Tendenz zur vermehrten Ausscheidung von *M. hyopneumoniae* durch Jungsauen auf (BOONSOONGNERN et al., 2012): es wurden bei Ferkeln von Sauen der ersten Parität höhere Prävalenzen von *M. hyopneumoniae* in Nasentupfern

nachgewiesen, als bei Ferkeln von älteren Sauen. PIETERS et al. (2014) stellen im Gegensatz dazu bei Untersuchungen in Sauenbeständen in den USA keine Korrelation zwischen Parität der Sau und Besiedelung der Ferkel fest. In einer Studie von CALSAMIGLIA und PIJOAN (2000) sank zwar der Anteil von Sauen, bei denen mittels nPCR *M. hyopneumoniae* in Nasentupfern nachgewiesen wurde von 52% (1. Parität) auf 35% (5.-8. Parität), dennoch müssen auch noch Sauen bis zur 7. Parität als Ausscheider und somit potentielle Quelle der Übertragung auf die eigenen Ferkel gesehen werden.

Der Zukauf von subklinisch infizierten oder seronegativen, aber mit *M. hyopneumoniae* besiedelten Jungsauen oder Ebern kann zur Einschleppung neuer *M. hyopneumoniae* Stämme und so zur Destabilisierung der Herdenimmunität führen (GROSSE BEILAGE et al., 2009). Dementsprechend hoch ist der Stellenwert einer adäquaten Akklimatisation der Jungsauen (MOORKAMP et al., 2009; NATHUES et al., 2012a; NATHUES et al., 2013a; PIETERS et al., 2014). Hierbei zeigte sich, dass neben der Impfung gegen alle wichtigen Erreger von Atemwegserkrankungen, der direkte Kontakt zu lebenden Tieren des Bestandes und nicht nur zu Fäkalien und Nachgeburten als entscheidend für die Entwicklung einer Immunität gegen *M. hyopneumoniae* anzusehen ist (NATHUES et al., 2012a).

Eine horizontale Übertragung findet vorwiegend unter Buchtengenossen, sowie in kontinuierlichen Belegungssystemen von älteren auf jüngere Tiere, statt (SIBILA et al., 2009). Auch zeitlich begrenzter Kontakt von wenigen Minuten bis Stunden zwischen Masttieren unterschiedlichen Alters, zum Beispiel beim Umstallen, reicht zur horizontalen Übertragung von *M. hyopneumoniae* aus (NATHUES et al., 2012a).

Durch die Muttersau infizierte Ferkel können *M. hyopneumoniae* auf die anderen Ferkel des Wurfes übertragen und sind die hauptsächlichen Initiatoren für die Weiterverbreitung des Erregers während Aufzucht und Mast (FANO et al., 2007; THACKER & MINION, 2012; NATHUES et al., 2013b). Grundsätzlich gilt der nasale Kontakt als langsamer Übertragungsweg (THACKER & MINION, 2012). Eine experimentelle

Studie von MEYNS et al. (2004) zeigt, dass ein *M. hyopneumoniae* infiziertes, abgesetztes Ferkel ca. sechs Wochen benötigt, um ein weiteres Tier in der Aufzucht anstecken zu können (Reproduktionszahl $R= 1,16$). In einer zweiten experimentellen Studie wurden deutlich höhere Reproduktionszahlen während der 6-wöchigen Aufzuchtphase festgestellt: bei geimpften Tieren betrug $R= 2,38$, bei ungeimpften Tieren stellte sich die Weiterverbreitung schneller dar ($R= 3,51$) (MEYNS et al., 2006). Im Feldversuch von VILLARREAL et al. (2011) hingegen wurde *M. hyopneumoniae* langsamer übertragen ($R= 0,71$ bei geimpften Tieren bzw. $R= 0,56$ bei ungeimpften Tieren).

FANO et al. (2005) stellten fest, dass auch eine indirekte Übertragung von *M. hyopneumoniae* innerhalb einer Population möglich ist: Tiere, die keinen direkten Kontakt zu experimentell mit *M. hyopneumoniae* infizierten Tieren hatten, zeigten, ebenso wie direkte Kontakttiere, eine Serokonversion. Experimentell konnten CARDONA et al. (2005) *M. hyopneumoniae* mittels nPCR aus Luftproben nachweisen, die 150m vom Ort der Dispersion entfernt gewonnen wurden. Nach experimenteller Infektion von Mastschweinen konnten OTAKE et al. (2010) in Luftproben in einer Entfernung bis zu 9,2 km vom Versuchsbetrieb, *M. hyopneumoniae* spezifische Genomfragmente mittels PCR nachweisen.

Infizierte Tiere können zu asymptomatischen Trägern werden und somit über einen langen Zeitraum ein Infektionsrisiko für empfängliche Tiere darstellen (PIETERS et al., 2009). Nach experimenteller Infektion konnte der Erreger in Untersuchungen von FANO et al. (2005) noch 185 Tage post infectionem (p.i.) mittels PCR in Bronchialtupfern am Schlachthof nachgewiesen werden. Ergebnisse einer Infektionsstudie von PIETERS et al. (2009) zeigen eine Persistenz von *M. hyopneumoniae* sogar über 200 Tage p.i. und die Möglichkeit experimentell infizierter Tiere mit ihnen in Kontakt stehende Sentineltiere sowohl 80 als auch 200 d.p.i. zu infizieren. 254 Tage p.i. war *M. hyopneumoniae* allerdings nicht mehr mittels nPCR in Bronchialtupfern nachweisbar (PIETERS et al., 2009).

1.4. Pathogenese

Die Pathogenese einer von *M. hyopneumoniae* verursachten Pneumonie ist ein komplexes Zusammenspiel aus einer chronischen Besiedelung des Atemwegsepithels, der Stimulation des Immunsystems, der Unterdrückung sowie Modulation des angeborenen und erworbenen Immunsystems und der Interaktion mit anderen infektiösen Organismen (PIETERS & MAES, 2019).

Hauptsächlich wird *M. hyopneumoniae* auf der mukosalen Oberfläche der Trachea, Bronchien und Bronchiolen gefunden (BLANCHARD et al., 1992). Dort beginnt die Kolonisation mit der Anheftung der Bakterien an die Zilien der Epithelzellen der Atemwege (BLANCHARD et al., 1992; ZIELINSKI & ROSS, 1993; SARRADELL et al., 2003). Das Anheften führt zunächst zu einer Ziliostase sowie zur Verklumpung der Zilien und schließlich zum Verlust der Zilien und des Epithels (BLANCHARD et al., 1992; DEBEY & ROSS, 1994; SARRADELL et al., 2003). Es kommt zur Bildung eines einschichtigen, flachen Ersatzepithels (DEBEY & ROSS, 1994) sowie zu Veränderung der Sekretzusammensetzung der Becherzellen durch Beeinträchtigung ihrer Funktionstätigkeit (DEBEY et al., 1992). Für den Vorgang der Anheftung an die Zilien wird das Adhäsin P97 hauptsächlich verantwortlich gemacht (HSU & MINION, 1998).

Der Verlust der Zilien führt zu einer verminderten Effektivität der mukoziliären Clearance. SHEN et al. (2017) zeigen, dass eine *M. hyopneumoniae* Infektion das adaptive zell-medierte Immunsystem schädigt und somit zu einer Modulation des Immunsystems fähig ist. Die Anzahl der dendritischen antigenpräsentierenden Zellen in der Nasenhöhle war 28 Tage nach einer experimentellen Infektion verringert und in Folge dessen reduzierte sich auch die Einwanderung der T-Zellen (SHEN et al., 2017). Zelltrümmer und einwandernde Pathogene, meist Kommensalen aus dem oberen Respirationstrakt, können nicht mehr ausreichend durch das Flimmerepithel abtransportiert werden (PIETERS & MAES, 2019). So können sekundär vor allem Bakterien wie *P. multocida*, *S. suis*, *H. parasuis* und *A. pleuropneumoniae* ungehindert in die tieferen Strukturen des Atmungsapparates eindringen und sich dort vermehren und zur Bronchopneumonie führen (THACKER & MINION, 2012). Die

Entwicklung einer Pneumonie und der Grad ihrer Schwere ist von der Anzahl der Organismen, die den Respirationstrakt besiedeln, der Virulenz des Stammes und den sich anheftenden Sekundärerregern abhängig (PIETERS & MAES, 2019) sowie von bestehenden Umwelt- und Haltungsbedingungen (STÄRK, 2000).

Das wirtseigene Immunsystem kann als hauptverantwortlich für die Entzündungsreaktion und die Veränderungen im Lungengewebe angesehen werden (THACKER & MINION, 2012; MAES et al., 2018). Bei einer Infektion mit *M. hyopneumoniae* werden vermehrt proinflammatorische Zytokine im Lungengewebe oder in der Bronchioalveolären Lavage-Flüssigkeit (BALF) gefunden; besondere Bedeutung kommt der Aktivierung der Makrophagen durch *M. hyopneumoniae* zu, die dann unter anderem vermehrt Interleukin (IL)1, IL6, IL8 und Tumornekrosefaktor α produzieren (SYROVETS et al., 2001; CHOI et al., 2006; LORENZO et al., 2006; AHN et al., 2009; REDONDO et al., 2009).

Zusätzlich konnte ein Zusammenhang zwischen der Besiedelung der Lunge mit *M. hyopneumoniae*, dem Vorkommen von proinflammatorischen Zytokinen und dem Vorhandensein von aktivem Plasmin dargestellt werden (WOOLLEY et al., 2013). Plasmin ist eine Serinprotease und hat, neben vielen anderen Funktionen, eine wichtige Rolle bei der Einwanderung von Entzündungszellen, insbesondere bei der Makrophagenaktivierung (GONG et al., 2008). Des Weiteren nimmt es Einfluss auf die Monozytenaktivierung (SYROVETS et al., 1997) und die Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen (SYROVETS et al., 2001; LI et al., 2007). Deshalb kann man davon ausgehen, dass es eine bedeutende Rolle in der Pathogenität von *M. hyopneumoniae* spielt (WOOLLEY et al., 2013).

1.5. Klinisches Erscheinungsbild

Schweine aller Altersklassen sind empfänglich für *M. hyopneumoniae* Infektionen, vorrangig treten sie aber bei Läufer- und Mastschweinen sowie jungen Zuchttieren auf (SIBILA et al., 2009; THACKER & MINION, 2012; GROSSE BEILAGE et al., 2013). Eine Monoinfektion mit *Mycoplasma hyopneumoniae* hat in der Regel einen subklinischen Verlauf ohne oder mit nur leichten klinischen Anzeichen und wird als Mykoplasmenpneumonie bezeichnet (THACKER & MINION, 2012). Die Erkrankung zeichnet sich durch eine hohe Morbidität und geringe Mortalität aus. Der Grad der Ausprägung der klinischen Anzeichen ist abhängig von der Virulenz des *M. hyopneumoniae* Stammes, dem Infektionsdruck, der Beteiligung von Sekundärerregern sowie von Umwelteinflüssen (VICCA et al., 2003; SIBILA et al., 2009; THACKER & MINION, 2012). Sind weitere bakterielle Organismen, wie *Pasteurella multocida*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Haemophilus parasuis* oder *Streptococcus suis* beteiligt, spricht man von *Enzootischer Pneumonie* (EP). Der Begriff des *porcine respiratory disease complex* (PRDC) umfasst eine zusätzliche Besiedelung mit viralen Pathogenen, hauptsächlich Porzines Circovirus Typ 2 (PCV2), Porzines reproduktives und respiratorisches Syndrom Virus (PRRSV) und Influenza-A-Virus (IAV) (THACKER & MINION, 2012). Erste klinische Anzeichen werden in Feldstudien ab 14 Tagen nach der Infektion sichtbar, während in experimentellen Infektionsversuchen erste Krankheitsanzeichen schon 6-9 Tage p.i. auftraten (SØRENSEN et al., 1997; VICCA et al., 2003; FANO et al., 2004; LE CARROU et al., 2006). Sie äußern sich in mildem, trockenem und nicht produktivem Husten, der über Wochen und Monate anhalten kann und besonders nach dem Auftreiben der Tiere auftritt (SIBILA et al., 2009; THACKER & MINION, 2012; SELBITZ, 2015). Husten tritt meist erst bei wenigen Tieren auf, um sich anschließend langsam immer weiter auszubreiten (SIBILA et al., 2009). Außerdem werden reduzierte tägliche Zunahmen und verminderte Futterverwertungsraten beobachtet (MAES et al., 1996). Eine zusätzliche Infektion mit weiteren Pathogenen verkompliziert den Krankheitsverlauf, die infizierten Tiere zeigen produktiven Husten, hohes Fieber und Dyspnoe sowie eine erhöhte Mortalität (MAES et al., 1996).

Eine experimentelle Infektion mit *M. hyopneumoniae* und *P. multocida* führte bei den Studientieren zu einer höheren Körpertemperatur, schwererem Husten, stärkerer Atemnot sowie größeren exsudativen Lungenläsionen, als bei Kontrolltieren, die allein mit *M. hyopneumoniae* inokuliert wurden (CIPRIÁN et al., 1988). Eine weitere Infektionsstudie zeigte ebenfalls deutlich stärkere klinische Krankheitsausprägungen und eine höhere Mortalität bei Tieren, auf deren *M. hyopneumoniae* Inokulation vier Wochen später eine Infektion mit APP folgte, als bei Tieren mit Monoinfektionen (MAROIS et al., 2009). Die Interaktion zwischen *M. hyopneumoniae* und viralen Pathogenen ist je nach Virus unterschiedlich und führt somit auch zu variablen Krankheitsverläufen (THACKER et al., 2001). So konnten THACKER et al. (1999) in einem Infektionsversuch darstellen, dass PRRSV induzierte Pneumonien durch eine gleichzeitige Besiedelung mit *M. hyopneumoniae* potenziert werden. Bei einer Infektion mit IAV und 21 Tage später mit *M. hyopneumoniae* zeigte sich zwar eine stärker ausgeprägte klinische Erkrankung, aber keine signifikante Veränderung der IAV-Erkrankung durch Interaktion mit *M. hyopneumoniae* (THACKER et al., 2001). Bei einer zeitgleichen Infektion mit *M. hyopneumoniae* und PCV2 scheint es keine Interaktionen zwischen den beiden Erregern zu geben (SIBILA et al., 2012). Jedoch zeigte eine Untersuchung von OPRIESSNIG et al. (2004), in der die *M. hyopneumoniae* Infektion zwei Wochen vor der PCV2 Infektion stattfand, dass eine duale Infektion mit *M. hyopneumoniae* die PCV2 assoziierten Läsionen in Lungen- und lymphoiden Gewebe potenziert, die Menge von PCV2 Antigenen erhöht, die Infektionsdauer verlängert sowie das Auftreten des post-weaning multisystemic wasting Syndroms (PMWS) begünstigt.

Unter Miteinbeziehung von Umweltfaktoren, die das Krankheitsgeschehen beeinflussen, wird von *Mycoplasma induced Respiratory Disease* (MIRD) gesprochen (SELBITZ, 2015). In einem Review von STÄRK (2000) sind Untersuchungen und Ergebnisse zum Einfluss von Umweltfaktoren auf respiratorische Erkrankungen zusammengefasst. Hierzu gehören Zukauf, Herdengröße, Besatzdichte, Stallbau, Hygienemanagement, Belüftung,

Herdengesundheit und viele andere Faktoren, deren einzelner Einfluss auf das Krankheitsgeschehen meist noch unklar ist (STÄRK, 2000).

1.6. Pathologische Veränderungen des Lungengewebes

Im akuten Fall einer Mykoplasmosose liegt eine diffuse interstitielle Pneumonie vor (WEISS & ROLAND, 2007). Makroskopisch lassen sich cranio-ventrale oder diffuse Veränderungen an der Lunge erkennen. In den betroffenen Lungenarealen ist das Lungengewebe verdichtet und verliert die Fähigkeit zur Retraktion. Zusätzlich ist ein Lungenödem erkennbar (THACKER & MINION, 2012). Bei chronischen Formen, die in der Regel mit Sekundärerregern infiziert sind (EP), finden sich herdförmige Bronchopneumonien mit multilobulären Atelektasen und Emphysemen (WEISS & ROLAND, 2007). Typisch für eine EP sind lila-grau konsolidierte Bereiche, die vor allem im cranio-ventralen Teil der Lunge mit lobulärer Zeichnung auftreten (THACKER & MINION, 2012).

Betroffen können einzelne Läppchen im Spitzenlappen sein, eine flächige Ausbreitung auf Spitzen-, Mittel- und Hauptlappen ist aber auch möglich (GROSSE BEILAGE et al., 2013). Handelt es sich um eine unkomplizierte Infektion, sind nur geringe Teile der Lunge betroffen, das Lungenparenchym ist farblich homogen und katarrhalisches Exsudat tritt, nach Anschneiden der Lungenoberfläche, bei Druck auf das Gewebe aus den Luftwegen aus (THACKER & MINION, 2012). Bei Beteiligung von bakteriellen Sekundärerregern sind vermehrte Anteile der Lunge betroffen, die Alveolen sind geweitet und mit Exsudat angefüllt, wodurch sich das Lungengewicht erhöht (THACKER & MINION, 2012). Liegen konsolidierte dunklere Läppchen, direkt neben hellrosa, emphysematösen Läppchen, erhält die Lunge eine schachbrettartige Musterung (GROSSE BEILAGE et al., 2013). Auch nach Abklingen der Krankheitssymptome, sind abgeheilte Läsionen im Lungengewebe bis zu 4 Monate nach Infektion erkennbar (KOBISCH et al., 1993), insbesondere stellen sich das interlobuläre Gewebe verdickt sowie die Lungenlymphknoten vergrößert und derb dar (THACKER & MINION, 2012).

Mikroskopisch fallen nur bei subakuten bis chronischen *M. hyopneumoniae* Infektionen Veränderungen auf (THACKER & MINION,

2012). Eine *M. hyopneumoniae* Infektion führt, bei Verkomplizierung durch Sekundärerreger zu einer katarrhalisch- (eitrig-) interstitiellen Bronchopneumonie (SARRADELL et al., 2003). Zentraler histologischer Befund ist hierbei die Hyperplasie des bronchusassoziierten lymphatischen Gewebes (BALT). Dort finden sich überwiegend Makrophagen, aber auch B- und T-Lymphozyten sowie dendritische Zellen und Plasmazellen (SARRADELL et al., 2003; VRANCKX et al., 2012). Bei einer schwerwiegenden EP werden massive Ansammlungen lymphoider Zellen um die Bronchien, die Bronchiolen und auch die Blutgefäße festgestellt, verdickte Alveolarsepten mit Lymphozyteneinlagerungen, vermehrte Sekretion der Becherzellen, Obliteration der Bronchienlumina und teilweise atelektatische Alveolen werden beschrieben (BASKERVILLE, 1972; SARRADELL et al., 2003; THACKER, 2004). Im Lumen der luftleitenden Wege und der Alveolen findet sich Sekret, neutrophile Granulozyten und mononukleäre Zellen. Lymphoide Ansammlungen können die Lumina von außen verengen (REDONDO et al., 2009). Abheilende Läsionen zeichnen sich durch kollabierte und emphysematöse Alveolen, lymphoide Knötchen und Fibrose in peribronchialen Regionen aus (THACKER & MINION, 2012).

Sowohl die makroskopischen als auch die mikroskopischen Veränderungen können die Verdachtsdiagnose einer *Mycoplasma hyopneumoniae* Infektion bzw. EP stützen, sind aber zu unspezifisch zur Stellung einer eindeutigen Diagnose, da sich durch andere Pathogene verursachte Pneumonien ähnlich darstellen können (THACKER & MINION, 2012). Deshalb müssen andere respiratorische Pathogene, sowohl bakterielle, aber auch virale, wie IAV, ausgeschlossen werden (THACKER, 2004).

1.7. Diagnostik von *M. hyopneumoniae* assoziierten Krankheitsbildern

Klinische Anzeichen, typische Herdenepidemiologie und Lungenläsionen können zu einer ersten Verdachtsdiagnose führen, jedoch ist eine abschließende Diagnose nur mit Hilfe von Laboruntersuchungen möglich (THACKER & MINION, 2012; MAES et al., 2018). Eine akkurate und gründliche Diagnose der enzootischen Pneumonie sollte auf der Kombination verschiedener diagnostischer Methoden beruhen (NATHUES et al., 2012a; HILLEN et al., 2014).

1.7.1. Hustenindex

Trockener, abgehackter Husten vor allem beim Auftreiben kann zu einer ersten Verdachtsdiagnose führen, ist aber nicht spezifisch für eine *M. hyopneumoniae* Infektion und kann ebenso bei anderen Erregern, die den Atemtrakt besiedeln, auftreten (THACKER & MINION, 2012). Die Bestimmung eines Hustenindex wurde schon in verschiedensten Studien zu *Mycoplasma hyopneumoniae* genutzt (MAES et al., 1999a; THACKER et al., 2001; VICCA et al., 2003; MAROIS et al., 2007; NATHUES et al., 2012b; GASPARINI BARALDI et al., 2017).

In einer Studie von MORRIS et al. (1995b) wurden die Studientiere einmal pro Woche für 30 Sekunden in Bewegung gehalten und anschließend das Auftreten von Husten dokumentiert. Es wurden signifikant höhere Lungenscores am Schlachthof erhoben, wenn das erste Auftreten von Husten nicht länger als 30 Tage vor Schlachtung stattfand, als bei Schweinen mit einer längeren Zeitspanne zwischen Beginn des Hustens und dem Schlachttermin (MORRIS et al., 1995b). Bei seroepidemiologischen Untersuchungen zum Vorkommen von *M. hyopneumoniae* in geschlossenen Beständen, zeigte sich ein zeitgleiches Auftreten von ersten hustenden und ersten serokonvertierten Tieren und anschließend ein zeitgleicher proportionaler Anstieg von Husten und dem Anteil serokonvertierter Schweine (LEON et al., 2001). Für die Beurteilung des Infektionsstatus einer Tiergruppe in Bezug auf *M. hyopneumoniae* erscheint LEON et al. (2001) der Hustenindex somit als guter Indikator.

In einer Studie von NATHUES et al. (2012b) wurde evaluiert, ob ein Zusammenhang zwischen Hustenindex und *M. hyopneumoniae* Nachweis aus BAL Flüssigkeit mittels PCR bzw. Serologie besteht. Bei einem Hustenindex von über 2,5 bei Masttieren eines Bestandes, war die Nachweisrate von *M. hyopneumoniae* im Bestand sowohl mittels PCR, als auch mittels ELISA über 50% erhöht (NATHUES et al., 2012b). Auch in Untersuchungen von LUEHRS et al. (2017) konnte ein Zusammenhang zwischen der *M. hyopneumoniae* Prävalenz bei Masttieren und einem Hustenscore dargestellt werden. In 20 deutschen schweinehaltenden Beständen wurde ein durchschnittlicher Hustenscore von 2,9 und eine durchschnittliche Prävalenz von 78,3% von *M. hyopneumoniae* im Lungengewebe mittels PCR erhoben, während in 10 Schweizer Beständen der durchschnittlicher Hustenscore bei 0,9 und die Prävalenz bei 0% lag (LUEHRS et al., 2017). Somit stellt sich die quantitative Erfassung des Vorkommens von Husten in Kombination mit anderen diagnostischen Möglichkeiten als eine nützliche Erweiterung der EP-Diagnostik auf Herdenebene dar (NATHUES et al., 2012b).

1.7.2. Lungenläsionen am Schlachthof

Pneumonien gehören zu den häufigsten Lungenveränderungen, die an Schlachthöfen festgestellt werden (FABLET et al., 2012a). Bei Untersuchungen von mehr als 10.000 Lungen an Schlachthöfen in Spanien, konnten bei 56% cranioventrale Konsolidierungen der Lunge (EP-assoziiertes Läsionen) festgestellt werden (FRAILE et al., 2010). Mittlerweile wurden viele verschiedene Scores zur Beurteilung der Lungenläsionen entwickelt (HANNAN et al., 1982; MADEC & KOBISCH, 1982; MORRISON et al., 1985; STRAW et al., 1986). In einer Studie, welche die verschiedenen Scoring Systeme im Hinblick auf die Erfassung *M. hyopneumoniae* relevanter Läsionen vergleicht, konnte eine hohe Korrelation bei der Erfassung der Lungenläsionen und ihrer Quantifizierung mit den verschiedenen Scoring- Systemen festgestellt werden (GARCIA-MORANTE et al., 2016a).

Um sich ein genaues Bild über das Vorkommen von Pneumonien im Bestand machen zu können muss eine adäquate Anzahl von Lungen in die Untersuchungen miteinbezogen werden. DAVIES et al. (1995) empfehlen

eine Untersuchung von mindestens 30 Lungen, um verlässliche Prävalenzen zu erhalten.

Ein Nachteil bei der Beurteilung der Schlachtlungen besteht darin, dass keine retrospektiven Aussagen getroffen werden können, da das Verfahren auf die Beurteilung von chronischen Lungenläsionen am Ende der Produktionsperiode limitiert ist und keine Informationen über das Ausmaß an Lungenveränderungen weder in der Aufzucht, noch in einem Großteil der Mast liefern kann (NOYES et al., 1990). Lungenläsionen können also wieder abgeheilt sein, bis es zu einer Untersuchung am Schlachthof kommt (WALLGREN et al., 1994). In Übereinstimmung damit wurden in einer Studie bei Tieren, die innerhalb von 30 Tagen vor dem Schlachtttermin anfangen zu husten, signifikant höhere Lungenscores erfasst, als bei Tieren, bei denen die Zeitspanne zwischen Auftreten des Hustens und Schlachtttermin länger war (MORRIS et al., 1995b).

Des Weiteren sind EP-ähnliche Läsionen nicht pathognomonisch für *M. hyopneumoniae* und können auch durch andere Erreger wie IAV verursacht werden (THACKER et al., 2001). Dennoch konnte eine positive Assoziation zwischen Lungen mit cranioventral konsolidierten Arealen und sowohl der Seroprävalenz von *M. hyopneumoniae* (MERIALDI et al., 2012), als auch dem direkten Nachweis des Erregers aus der Lunge dargestellt werden (MOORKAMP et al., 2008).

Trotzdem limitieren die geringe Spezifität der Läsionen und die hohe Subjektivität bei der Beurteilung das Lungenscoring am Schlachthof in seiner Aussagekräftigkeit, sodass weitere diagnostische Möglichkeiten ausgeschöpft werden müssen (SIBILA et al., 2009).

1.7.3. Labordiagnostische Untersuchungsmethoden

1.7.3.1. Kultureller Nachweis von *M. hyopneumoniae*

Der kulturelle Nachweis von *M. hyopneumoniae* im Lungengewebe gilt noch immer als Goldstandard, obwohl er nicht standardmäßig zur Diagnostik verwendet wird (PIETERS & MAES, 2019). Die Isolation und die Anzucht des Erregers ist schwierig und zeitaufwändig, da spezielle Kulturmedien notwendig sind (THACKER, 2004) und für das Wachstum von *M. hyopneumoniae* 4-8 Wochen veranschlagt werden müssen (FRIIS,

1975). Zusätzlich besteht das Risiko, dass schneller wachsende Mykoplasmen, wie *M. hyorhinis* oder *M. flocculare*, oder andere Bakterien *M. hyopneumoniae* bei der Kultivierung überwuchern (MAES et al., 1996; THACKER, 2004). Es gibt allerdings Bemühungen, den Nachweis mittels Kultur zu verbessern; Erfolge erzielten dabei unter anderen COOK et al. (2016), die das Wachstum von *M. hyorhinis* verhindern konnten, indem dem Nährmedium das Antibiotikum Kanamycin zugesetzt wurde, gegen welches *M. hyopneumoniae* Resistenzen aufweist.

1.7.3.2. Immunhistochemie (IHC), Immunofluoreszenz (IF) und In-situ-Hybridisierung (ISH)

IHC und IF stellen Methoden des direkten Nachweises von Antigen, ISH von Nukleinsäuren aus dem Epithel der luftleitenden Wege oder dem Lungengewebe selbst dar (PIETERS & MAES, 2019). Diese Methoden haben aber den Nachteil, dass sie nur am toten Tier durchführbar sind (SIBILA et al., 2009). Sowohl die IHC als auch die IF detektieren mit Hilfe von Anti-*M. hyopneumoniae* Antikörpern das Antigen des Erregers auf der Oberfläche des respiratorischen Epithels in gefrorenen oder fixierten Gewebeschnitten des Untersuchungsmaterials, die ISH weist spezifische Nukleinsäuren in fixierten Gewebeschnitten nach (PIETERS & MAES, 2019). Alle drei Methoden benötigen intaktes Flimmerepithel, jedoch können sowohl postmortale Degeneration von Zellen, als auch der Brühvorgang beim Schlachten, das Flimmerepithel schädigen und so zu falsch negativen Ergebnissen führen (PIETERS & MAES, 2019). Ebenso besteht durch die Verwendung sehr kleiner Gewebeproben die Gefahr von Probenmaterial ohne Flimmerepithel und somit weiteren falsch negativen Ergebnissen (THACKER, 2004; CAI et al., 2007).

MOORKAMP et al. (2010) untersuchten die Eignung der IHC als Alternative bzw. Ergänzung zu anderen Tests. Die IHC mit monoklonalen Antikörpern stellte sich hierbei als gute zusätzliche Untersuchungsmethode dar, jedoch nicht als Alternative zur PCR, da in 17 mittels nested PCR (nPCR) positive Proben bei Untersuchung mittels IHC als negativ galten.

1.7.3.3. PCR

Die PCR stellt eine Methode des direkten Erregernachweises dar, bei der Nukleinsäuresequenzen vervielfältigt und anschließend die Amplifikationsprodukte sichtbar gemacht werden (AMTSBERG et al., 2015). Der direkte Nachweis von *M. hyopneumoniae* mittels PCR erweist sich in experimentellen Studien sowie im Feldversuch als sensitive und spezifische Nachweismethode (BLANCHARD et al., 1996; BAUMEISTER et al., 1998). Die genetische Heterogenität von *M. hyopneumoniae* kann allerdings zu falsch negativen Ergebnissen in der PCR führen (STAKENBORG et al., 2005; MAYOR et al., 2007).

Eine höhere Sensitivität, um auch eine sehr geringe Anzahl von Organismen zu detektieren, bietet die nested PCR (nPCR) (CALSAMIGLIA et al., 1999; KURTH et al., 2002). Statt wie bei der PCR ein Primer-Set zu verwenden, kommen bei der nPCR zwei verschiedene Primer-Sets hintereinander zum Einsatz (BEJ et al., 1991). Somit können Kreuzreaktionen mit anderen Mykoplasmenspezies vermieden werden (CALSAMIGLIA et al., 1999), allerdings birgt die hohe Empfindlichkeit des Testverfahrens die Gefahr von falsch positiven Proben durch Umweltkontamination, sowohl während der Probenentnahme, als auch bei der Verarbeitung im Labor (CALSAMIGLIA et al., 1999; KURTH et al., 2002). Bestätigt wird die hohe Sensitivität durch Untersuchungen von STÄRK et al. (1998), welche mittels nPCR *M. hyopneumoniae* in Luftproben nachweisen konnten.

Als Weiterentwicklung der konventionellen PCR, ist die real-time PCR in der Lage zeitgleich zur Amplifizierung, die vervielfältigten Nukleinsäuresequenzen auch zu quantifizieren und mittels Fluoreszenz sichtbar zu machen (AMTSBERG et al., 2015). Das hat zum Vorteil, dass schneller quantitative Ergebnisse verfügbar sind und sich die Gefahr der Kreuzkontamination im Labor verringert, da die Proben nach der PCR nicht noch einmal bearbeitet werden müssen (VALASEK & REPA, 2005). Es wurden verschiedene real-time PCRs für den *M. hyopneumoniae* Nachweis entwickelt, die alle eine hohe Spezifität besitzen (DUBOSSON et al., 2004; STRAIT et al., 2008). Aufgrund der Variabilität des *M. hyopneumoniae* Genoms (VICCA et al., 2003; STAKENBORG et al.,

2005), kann es durch die Verwendung von nur einer Zielsequenz zu falsch negativen Ergebnissen kommen (MAROIS et al., 2010). Mit einer multiplex real-time PCR, die drei Primer-Sets gleichzeitig einsetzt, sollen Kreuzreaktionen mit anderen Mykoplasmenarten und falsch negative Ergebnisse aufgrund der Variabilität des Erregers vermieden werden (MAROIS et al., 2010).

Mittels PCR können eine Vielzahl an verschiedenen Probenmaterialien auf *M. hyopneumoniae* untersucht werden: dazu gehören Nasentupfer (NT), Tonsillentupfer, Larynxtupfer (LaT), oral fluids (OF), Tracheobronchialtupfer (TBS) sowie bronchioalveoläre Lavageflüssigkeit (BALF). Post mortem gibt es zusätzlich die Möglichkeit Lungengewebe zu untersuchen (BLANCHARD et al., 1996; BAUMEISTER et al., 1998; CALSAMIGLIA et al., 1999; MAROIS et al., 2007; MOORKAMP et al., 2008; HERNANDEZ-GARCIA et al., 2017; PIETERS et al., 2017). Die verschiedenen Probenmaterialien wurden in zahlreichen Studien hinsichtlich der Verlässlichkeit des Nachweises von *M. hyopneumoniae* mittels PCR verglichen: Grundsätzlich waren sowohl in experimentellen, als auch in Feldstudien Proben, die aus tieferen Regionen des Atemtraktes stammten, wie BAL und TBS, den Untersuchungen des Materials aus Nasentupfern oder Maulhöhle deutlich überlegen (KURTH et al., 2002; MAROIS et al., 2007; FABLET et al., 2010; MAROIS et al., 2010; RAWAL et al., 2018). Im Infektionsversuch erwiesen sich TBS und tracheobronchiale Lavageflüssigkeit (TBLF) als sehr viel geeigneter zur Detektion von *M. hyopneumoniae* mittels PCR als NT oder Tonsillentupfer (MAROIS et al., 2007). So konnte in NT von 14% und in Tonsillentupfern von 37% der untersuchten Schweine *M. hyopneumoniae* spezifische DNA-Fragmente nachgewiesen werden; dagegen wurde in 63% bzw. 76% der TBS bzw. TBLF der Erreger molekularbiologisch nachgewiesen (MAROIS et al., 2007). Auch unter Feldbedingungen stellte sich 60,0% der Tracheobronchialtupfer untersuchter Tiere mittels PCR *M. hyopneumoniae* positiv dar, während in NT derselben Tiere zu 13,3% der Erreger nachgewiesen werden konnte (FABLET et al., 2010).

In aktuelleren Untersuchungen stellte sich auch der Larynxtupfer als geeignetes Probenmaterial zur Detektion von *M. hyopneumoniae* mittels

PCR dar (PIETERS et al., 2017). Insbesondere scheinen Larynxtupfer bei der Detektion von frühen Infektionsstadien anderen Probenmaterialien überlegen zu sein: in einem Infektionsversuch konnten durch Larynxtupfer schon fünf Tage p.i. bei signifikant mehr Tieren *M. hyopneumoniae* Antigen nachgewiesen werden als bei einer Probenentnahme mittels NT und TBLF (PIETERS et al., 2017). In Untersuchungen von GARCIA-MORANTE et al. (2016b), denen ebenfalls ein Infektionsversuch zugrunde liegt, konnte eine 77%ige Übereinstimmung zwischen der Untersuchungen der LaT ante mortem und des Lungengewebes post mortem mittels PCR ermittelt werden.

Die diagnostische Nutzung von oral fluids stellt eine nicht invasive und somit auch tierfreundliche Möglichkeit der Probengewinnung dar (PRICKETT & ZIMMERMAN, 2010) und wird immer häufiger genutzt. Allein in drei diagnostischen Veterinärlaboren in den USA stieg die Zahl der eingesendeten OFs von 21.000 im Jahr 2010 auf 370.000 im Jahr 2016 (BJUSTROM-KRAFT et al., 2018). Oral fluids sind definiert als die Flüssigkeit, die durch Verwendung von absorptiven Materialien in der Mundhöhle gesammelt werden können (ATKINSON et al., 1993). Sie stellen eine einfache Methode zur Beprobung sowohl von Einzeltieren als auch von Tiergruppen mittels Sammelspeichelprobe dar. Der dabei gesammelte Speichel setzt sich hauptsächlich aus der Flüssigkeit der Speicheldrüsen, aber auch aus gingivaler Sulcusflüssigkeit, mucosalen Transsudaten, bronchialen und nasalen Sekreten, Serum- und Blutbestandteilen von oralen Wunden, Bakterien, Viren und Nahrungsbestandteilen zusammen (GREABU et al., 2009). Bei Untersuchungen auf das Vorkommen von Erregern, die am PRDC beteiligt sind, erwiesen sich OFs im Hinblick sowohl auf PCV2 als auch PRRSV und IAV in mehreren Studien als zuverlässig (PRICKETT et al., 2011; RAMIREZ et al., 2012; HERNANDEZ-GARCIA et al., 2017). Allerdings war der Nachweis von *M. hyopneumoniae* in oral fluids in einem Infektionsversuch von ROOS et al. (2016) nur an einem von fünf Beprobungszeitpunkten möglich, wohingegen der Erreger mittels Larynxtupfer zu vier der fünf Zeitpunkten mittels PCR nachgewiesen werden konnte. Im Feldversuch stellte sich die Gewinnung von OFs zur Bestätigung des Vorkommens von

M. hyopneumoniae im Bestand als nützlich dar, allerdings deuteten Tiergruppen, deren OFs bei frühen Untersuchungszeitpunkten einen positiven Erregernachweis und in späteren einen Negativen erhielten, auf eine geringe Sensitivität des Testverfahrens hin (HERNANDEZ-GARCIA et al., 2017). Auch in Untersuchungen von PIETERS et al. (2017) und ARSENAKIS et al. (2019) stellte sich der Nachweis von *M. hyopneumoniae* mittels OFs als weniger sensitiv dar.

1.7.3.4. Serologische Untersuchung

Der Enzyme-linked Immunsorbent Assay (ELISA) ist das gebräuchlichste Nachweisverfahren für die Detektion von Antikörpern (AMTSBERG et al., 2015). Der ELISA gilt als einfache, schnelle, automatisierte und somit kostengünstige Methode, die nützliche Informationen über das Vorhandensein von maternalen oder erworbenen Antikörpern (AK) liefert, sowie über die Zeitspanne, die das Tier zur Serokonversion benötigt (SIBILA et al., 2009). Allerdings ist es bis jetzt nicht möglich mittels ELISA zwischen Impfantikörpern, maternal oder nach einer initialen Infektion erworbenen Antikörpern zu unterscheiden (MAES et al., 2018).

In den USA werden zurzeit vor allem drei ELISA-Testsysteme zur Diagnostik eingesetzt: zwei indirekte sowie ein blocking-ELISA (SIBILA et al., 2009). Die vorhandenen ELISAs zeichnen sich durch eine hohe Spezifität aus (ERLANDSON et al., 2005). Bei der Sensitivität wurden Unterschiede zwischen den verschiedenen ELISAs dargestellt (AMERIMAHABADI et al., 2005; ERLANDSON et al., 2005). Bei ERLANDSON et al. (2005) wurden zwei indirekte und ein blocking-ELISA verglichen. Insgesamt wurden nur zwischen 35% und 49% der experimentell infizierten Tiere als seropositiv erkannt und somit die Sensitivität aller untersuchten Testsysteme als niedrig eingestuft, wobei der blocking-ELISA noch die meisten infizierten Tiere als seropositiv detektierte (ERLANDSON et al., 2005). In neueren Untersuchungen, die ebenfalls zwei indirekte und einen blocking-ELISA vergleichen, konnten keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Detektion von IgG-Antikörpern festgestellt werden (PIETERS et al., 2017). Allerdings besaßen alle drei Testsysteme insbesondere in der frühen Infektionsphase eine geringe Sensitivität, sodass die Serologie als diagnostisches Mittel bevorzugt in

späteren Infektionsstadien bzw. in Kombination mit anderen Untersuchungsmethoden angewendet werden sollte (PIETERS et al., 2017).

Die Interpretation der serologischen Ergebnisse wird aufgrund der zeitlichen Variabilität des Auftretens von *M. hyopneumoniae* Antikörpern erschwert (THACKER, 2004). In einer experimentellen Studie von SØRENSEN et al. (1997) wurde eine Serokonversion acht Tage p.i. bei ersten Tieren festgestellt, in weiteren Infektionsversuchen waren AK-Titer nach zehn Tagen (SHELDRAKE et al., 1990) bzw. 2-4 Wochen p.i. nachzuweisen (KOBISCH et al., 1993; MAROIS et al., 2007). Unter natürlichen Bedingungen findet die Serokonversion später statt: MORRIS et al. (1995a) detektierten im Feldversuch einzelne Tiere mit *M. hyopneumoniae*-AK 21 Tage post expositionem (p.e.), der Großteil serokonvertierte aber erst nach 11 Wochen. Auch ANDREASEN et al. (2000) und VICCA et al. (2002) zeigten in Feldstudien, dass die Serokonversion vor allem zwischen Ende der Aufzucht und Anfang der Mast stattfindet. SIBILA et al. (2009) führen die verzögerte Serokonversion auf die Tatsache zurück, dass *M. hyopneumoniae* die Zilien im oberen Respirationstrakt befällt und somit möglicherweise die Antigenpräsentation und somit auch die Serokonversion deutlich langsamer verläuft, als bei invasiven Erregern. Somit ist eine Einzeltierdiagnostik mittels ELISA nicht aussagekräftig, auf Herdenebene können serologische Untersuchungen allerdings als Screening infizierter Herden oder zur Überprüfung einer Impfantwort nützlich sein (MAES et al., 1996). Die Antikörpertiter im Serum korrelieren nicht mit dem Grad der klinischen Protektion, sodass sie keinen nützlichen prognostischen Indikator für den Grad der Protektion darstellen (DJORDJEVIC et al., 1997; MAES et al., 1998).

Um eine genauere Aussage über den *M. hyopneumoniae* Infektionsstatus der Herde zu erlangen, kann die Verwendung mehrerer ELISA Essays zu einer höheren Sensitivität führen (ERLANDSON et al., 2005) oder die Durchführung eines Westernblot Immunoassays zur Bestätigung herangezogen werden (AMERI-MAHABADI et al., 2006).

1.8. Therapie

Da *M. hyopneumoniae* keine Zellwand besitzt, können keine Antibiotika, deren Wirkung auf der Beeinflussung der Zellwandsynthese basieren (wie β -Laktam-Antibiotika, Polymixin, Erythromycin, Trimethoprim, etc.), zur Therapie verwendet werden (PIETERS & MAES, 2019). Am häufigsten werden zur Therapie von *M. hyopneumoniae* Infektionen Tetrazykline oder Makrolide eingesetzt, aber auch Lincosamide, Pleuromutiline, Fluorochinolone, Florfenicole und Aminoglycoside werden angewandt (MAES et al., 2008; PIETERS & MAES, 2019). Da eine *M. hyopneumoniae* Infektion nahezu immer durch Sekundärerreger verkompliziert wird, müssen Antibiotika oder Kombinationen von Antibiotika, die auch gegen sekundäre Bakterien wirken, eingesetzt werden (MAES et al., 2008).

In vitro wurde die Wirksamkeit vieler Antibiotika gegen *M. hyopneumoniae* nachgewiesen (YAMAMOTO et al., 1986; HANNAN et al., 1989; HANNAN et al., 1997a; HANNAN et al., 1997b). Allerdings ist die Übertragbarkeit der Ergebnisse von in vitro Studien auf Bedingungen im Feld fraglich, denn um effektiv gegen den Erreger vorgehen zu können muss das verwendete Antibiotikum signifikante Konzentrationen im Mukus und den Sekreten des Respirationstrakts erreichen (THACKER & MINION, 2012).

In einem Infektionsversuch wurde Schweinen nach dem ersten Auftreten von klinischen Anzeichen ab Tag 12 p.i. über 21 Tage Tylosin oral verabreicht (VICCA et al., 2005). Dies führte zu einer geringeren klinischen Ausprägung sowie zu einem geringeren Ausmaß der Läsionen in den Lungen. Die Prävalenz von *M. hyopneumoniae* konnte aber nicht reduziert werden (VICCA et al., 2005). THACKER et al. (2006) untersuchten die Wirksamkeit von Chlortetrazyklin ab dem Auftreten klinischer Anzeichen nach experimenteller Infektion. Sowohl die Schwere der Pneumonie, als auch die Anzahl der *M. hyopneumoniae* Organismen konnte bei einer Medikation über 14 Tage verringert werden (THACKER et al., 2006). Unter Feldbedingungen konnte eine orale Verabreichung von Chlortetrazyklin über 14 Tage mit einer einwöchigen Therapiepause zwischen den beiden Wochen das Vorkommen von Lungenläsionen deutlicher reduzieren als eine dreiwöchige Gabe von Tylosin p.o. (DEL POZO SACRISTÁN et al.,

2012b). In weiteren Untersuchungen von DEL POZO SACRISTÁN et al. (2012a) wurden experimentell infizierte Versuchstiere 14 Tage p.i. bei Auftreten erster klinischer Anzeichen mit einmaliger Gabe von Florfenicol intramuskulär (i.m.) behandelt. Die einmalige Behandlung konnte die klinische Ausprägung jedoch nur für wenige Tage reduzieren und hatte keinen signifikant positiven Einfluss auf das Vorkommen von Lungenläsionen (DEL POZO SACRISTÁN et al., 2012a). Eine Gabe von Marbofloxacin i.m. an drei aufeinander folgenden Tagen reduzierte zwar die Lungenläsionen, jedoch nicht die klinischen Anzeichen einer *M. hyopneumoniae* Infektion (LE CARROU et al., 2006). Antibiotika können also bei einer Infektion mit *M. hyopneumoniae* helfen die Erkrankung zu kontrollieren und die klinische Ausprägung abzuschwächen, aber es wird weder eine Eliminierung des Erregers aus dem Atemtrakt erreicht, noch werden bestehende Läsionen dadurch geheilt (MAES et al., 1996). Zudem kommt es häufig zum wiederholten Auftreten klinischer Anzeichen einer Infektion nach Beendigung der Medikation (MAES et al., 2008).

Neben der natürlichen Resistenz gegen Antibiotika, die Einfluss auf die Zellwandsynthese nehmen, gibt es Berichte von erworbenen Resistenzen. INAMOTO et al. (1994) stellten eine Abnahme der Empfindlichkeit von Mykoplasmen gegenüber Chlortetrazyklinen fest. Bei der Untersuchung von 21 Feldisolaten wurden in vitro Resistenzen gegenüber Fluorochinolonen bei fünf Isolaten sowie gegenüber Makroliden und Lincosamiden bei einem weiteren Isolat festgestellt (VICCA et al., 2004). Auch in neueren Untersuchungen von Feldisolaten deuteten erhöhte minimale Hemmstoff-Konzentrations-(MIC) Werte für Tylosin und Spiramycin bei in Spanien isolierten Stämmen auf eine erhöhte Resistenzlage hin (TAVÍO et al., 2014). Bei thailändischen Feldisolaten wurden Resistenzen gegen Enrofloxacin, Makrolide und Lincosamin ermittelt sowie eine verminderte Empfindlichkeit gegenüber Chlortetrazyklinen festgestellt (THONGKAMKON et al., 2013). In einer in vitro Studie von KLEIN et al. (2017) wurden 50 *M. hyopneumoniae* Feldisolate aus Europa auf Resistenzen gegenüber verschiedener Antibiotika getestet; die bestimmten MIC Werte bewegten sich alle in einer Range unter 2mg/L (KLEIN et al., 2017). Somit scheinen erworbene

Resistenzen gegen *M. hyopneumoniae* gegenwärtig kein größeres Problem bei der Behandlung von Mykoplasmeninfektionen darzustellen (PIETERS & MAES, 2019).

2. Prävention und Kontrolle

Die Kontrolle von *Mycoplasma hyopneumoniae* Infektionen kann durch eine Optimierung von Managementfaktoren und Haltungsbedingungen, den Einsatz von antimikrobiellen Wirkstoffen und nicht zuletzt durch Impfungen erreicht werden (MAES et al., 2008).

2.1. Vakzination

Kommerziell erhältliche Vakzine bestehen meist aus inaktivierten, adjuvans-basierten Präparaten aus ganzen Zellen, die den Tieren intramuskulär verabreicht werden (MAES et al., 2008; PAUL-EHRLICH-INSTITUT, 2019). Verschiedene Vakzinationsstrategien, abhängig von der Betriebsart, dem Produktionssystem, dem Management, den Infektionsmustern und der Umsetzbarkeit durch den Landwirt, werden aktuell angewandt (MAES et al., 2018). Da Infektionen mit *M. hyopneumoniae* schon in den ersten Lebenswochen auftreten können (VICCA et al., 2002; SIBILA et al., 2007b), wird am häufigsten eine einmalige bzw. zweimalige Impfung im Saugferkelalter praktiziert (MAES et al., 2018). Sowohl one-shot, als auch two-shot Impfungen im Saugferkelalter haben sich in zahlreichen Studien als wirksam erwiesen (MAES et al., 1998; THACKER et al., 1998; MAES et al., 1999a; POMMIER et al., 2000; DAWSON et al., 2002; BACCARO et al., 2006; SIBILA et al., 2007a; VILLARREAL et al., 2011; WILSON et al., 2012; BEFFORT et al., 2017; MICHIELS et al., 2017).

Allerdings sind Impfstoffe nur teilweise in der Lage eine Protektion gegen *M. hyopneumoniae* zu vermitteln (THACKER et al., 1998) und schützen das Einzeltier nicht vor einer Infektion (MAES et al., 1999a; PIETERS et al., 2010; VILLARREAL et al., 2011). Die Elimination des Pathogens aus dem Respirationstrakt ist durch die Impfung nicht möglich (MEYNS et al., 2006; REYNOLDS et al., 2009) und es kann keine signifikante Reduktion der Erregerübertragung durch Vakzination erreicht werden (MEYNS et al., 2006; PIETERS et al., 2010; VILLARREAL et al., 2011).

Die positiven Effekte der Impfung sind somit weniger im vollständigen Schutz vor der Infektion mit *M. hyopneumoniae*, sondern vor allem in der Reduzierung von Lungenläsionen, Verbesserung der täglichen Zunahmen zusammen mit einer günstigeren Futtermittelverwertung und verringertem klinischen Erscheinungsbild zu sehen (MAES et al., 1998; THACKER et al., 1998; BACCARO et al., 2006; SIBILA et al., 2007b; DEL POZO SACRISTÁN et al., 2014). Zusätzlich konnte in einer Studie von MICHIELS et al. (2017), welche die Effektivität einer one-shot Vakzine untersuchten, bei geimpften Tieren eine signifikant geringere Menge an *M. hyopneumoniae* DNA als bei den ungeimpften Kontrolltieren in der BAL-Flüssigkeit mittels qPCR nachgewiesen werden. Eine Reduzierung der Erregermenge im Respirationstrakt durch Einsatz von Vakzinen wurde auch in Untersuchungen von VRANCKX et al. (2012) und WOOLLEY et al. (2014) dargestellt. Des Weiteren wurde bei histologischen Untersuchungen im BALT geimpfter Tieren eine reduzierte Makrophageninfiltration festgestellt (VRANCKX et al., 2012).

Besondere Bedeutung kommt auch der Terminierung der Impfung zu, da spätestens zwei Wochen vor dem geschätzten Infektionszeitpunkt eine Immunisierung stattfinden sollte (ROOF et al., 2001). Aufgrund der schon früh auftretenden Infektionen wird am häufigsten eine Impfung während der Säugezeit praktiziert, obwohl der Einfluss von maternalen Antikörpern auf die Bildung von Impf-Antikörpern als Antwort auf eine Impfung noch nicht definitiv geklärt ist und Wechselwirkungen nicht ausgeschlossen werden können (MAES et al., 2008). In Anwesenheit von hohen maternalen Antikörpertitern scheint eine reduzierte Antikörperbildung nach Vakzination stattzufinden (HODGINS et al., 2004; BANDRICK et al., 2014), die Ausbildung einer zell-mediierten Immunantwort in Folge der Impfung wird durch maternale Antikörper aber nicht negativ beeinflusst (BANDRICK et al., 2014). Bei Untersuchungen von MARTELLI et al. (2006) waren keine Unterschiede in der Immunantwort nach Vakzination zwischen Tieren, die in An- bzw. Abwesenheit maternaler Antikörper geimpft wurden, feststellbar. Auch REYNOLDS et al. (2009) können unabhängig davon, ob Tiere in der ersten Lebenswoche in An- bzw. Abwesenheit von maternalen Antikörpern geimpft wurden, in beiden

Untersuchungsgruppen eine signifikante Reduktion der Ausbreitung von Lungenläsionen darstellen.

Aufgrund des reduzierten Arbeitsaufwandes, werden Ferkel häufig zum Zeitpunkt des Absetzens geimpft, dies wird allerdings nicht empfohlen: die erhöhte Stresssituation durch die Doppelbelastung aus Absetzen und Impfung, kann zu einer Immunsuppression führen und somit Einfluss auf den Impferfolg nehmen (CHASE & LUNNEY, 2019). In Übereinstimmung damit konnten im Vergleich mit Ferkeln, die zum Zeitpunkt des Absetzens geimpft wurden, tendenziell weniger makroskopische Lungenläsionen und eine geringere Anzahl *M. hyopneumoniae* Genomfragmente in der BAL nachgewiesen werden sowie höhere tägliche Zunahmen verzeichnet werden, wenn die Ferkelimpfung vor dem Absetzen stattfand (ARSENAKIS et al., 2016; ARSENAKIS et al., 2017).

Eine gleichzeitige Impfung gegen *M. hyopneumoniae* und PRRSV erzielt ähnliche Ergebnisse wie Einzelimpfungen (DREXLER et al., 2010). In Untersuchungen von BOURRY et al. (2015) wurde der simultanen Impfung von PRRSV und *M. hyopneumoniae* sogar eine höhere Effektivität als den Einzelimpfungen zugesprochen. Auch eine simultane Impfung von *M. hyopneumoniae* mit PCV2 erziele gute Ergebnisse, vermeidet Stresssituationen für die Ferkel und erspart dem Landwirt zusätzliche Arbeitsschritte (HERBICH et al., 2013; KAALBERG et al., 2017). In neueren Untersuchungen führten Kombinationsimpfung von *M. hyopneumoniae* und PCV2 zu deutlich höheren Tageszunahmen, verringerter Mastdauer und weniger Lungenläsionen (TZIKA et al., 2015; TASSIS et al., 2017; DUIVON et al., 2018).

Obwohl auch in einer Studie von PIETERS et al. (2014) das Ausscheiden von *M. hyopneumoniae* durch das Muttertier als signifikanter Risikofaktor für die Wahrscheinlichkeit der Besiedelung der Ferkel zum Zeitpunkt des Absetzens dargestellt wird, wird bis heute eine Impfung der Sauen gegen *M. hyopneumoniae* vor der Abferkelung sehr wenig praktiziert (PIETERS & MAES, 2019). Im Gegensatz zu der Vielzahl an Studien, die sich mit der Effektivität und Sicherheit der Ferkelimpfung gegen *M. hyopneumoniae* befassen, gibt es nur wenige Untersuchungen zur Vakzination von Sauen. Eine Impfung der Sauen zum Ende der Tragezeit hat zum Ziel, sowohl die

Übertragung von *M. hyopneumoniae* vom Muttertier auf ihren Nachwuchs zu minimieren, als auch die Ferkel durch maternale Antikörper vor einer Infektion möglichst gut zu schützen (MAES et al., 2008). Eine Sauenimpfung fünf und drei Wochen vor dem Abferkeln führte zu signifikant weniger positiven Nasentupfern bei den Ferkeln zum Zeitpunkt des Absetzens (RUIZ et al., 2003). Eine signifikante Verringerung der Besiedelung der Ferkel geimpfter Sauen konnte in Untersuchungen von SIBILA et al. (2008) zwar nicht beobachtet werden, allerdings war der Anteil seropositiver Tiere in der Impfgruppe deutlich höher als in der Kontrollgruppe. Zudem waren signifikant weniger EP Läsionen am Schlachthof zu erkennen. Aktuelle Untersuchungen von ARSENAKIS et al. (2019) konnten signifikant weniger seropositive Ferkel zum Zeitpunkt des Absetzens bei ungeimpften Sauen nachweisen, als bei den Ferkeln geimpfter Sauen. Zusätzlich stellten sich Tiere aus einem der beiden Studienbestände, die zum Zeitpunkt des Absetzens seronegativ waren, signifikant häufiger mittels nPCR aus Larynxtupfern positiv dar und zeigten deutlichere EP-Läsionen an Schlachthof als seropositive Tiere (ARSENAKIS et al., 2019). PIETERS et al. (2014) sehen Kontrollmechanismen zur Verringerung der Prävalenz bei Sauen, wie eine sachgemäße Eingliederung von Jungsauen sowie Sauen-Medikation und Sauen-Impfungen als Basis für eine erfolgreiche Kontrolle von *Mycoplasma hyopneumoniae* im gesamten Bestand.

2.2. Einfluss von Management und Haltungsbedingungen

Grundlagen einer effektiven Prävention und Kontrolle von *M. hyopneumoniae* und, damit verbunden, von Enzootischer Pneumonie und PRDC, sind die Schaffung und Einhaltung von optimalen Umweltbedingungen (THACKER & MINION, 2012). Dazu zählen unter anderem die Sicherung von Luftqualität, Belüftung und angemessenen Temperaturen im Stall sowie die Vermeidung von Überbelegung (MAES et al., 2008).

Häufiger Zukauf ist ein Risikofaktor für das Auftreten von Pneumonien (MEYNS et al., 2011). So haben geschlossene Betriebe ein deutlich geringeres Risiko für den Eintrag von Atemwegserkrankungen, als reine Mastbetriebe, die Tiere von eventuell mehreren Ferkelerzeugern beziehen

(STÄRK, 2000). Aber auch der Zukauf von naiven oder subklinisch infizierten Jungsauen bzw. von Ebern kann zu einer Destabilisation der Herdenimmunität bzw. zu einer vermehrten Prävalenz von *M. hyopneumoniae* Infektionen führen (GROSSE BEILAGE et al., 2009; NATHUES et al., 2012a). Dementsprechend hoch ist der Stellenwert einer adäquaten Akklimation, die auch den Kontakt zu lebenden Tieren des Bestandes miteinschließt (NATHUES et al., 2012a), denn bei Sauen konnte der Erreger auch über 200 Tage nach Infektion noch im Respirationstrakt nachgewiesen werden (PIETERS et al., 2009).

Allgemein als eine der wichtigsten innerbetrieblichen Präventionsmaßnahmen anerkannt, ist die Einhaltung eines All-in, All-out (AIAO) Prinzips (MAES et al., 2008; GROSSE BEILAGE et al., 2009). Durch die strikte Einhaltung können alle Abteile vor der Neubelegung gereinigt und so der Übertragungszyklus von älteren auf jüngere Tiere unterbrochen werden (MAES et al., 2008). Eine inkonsequente Durchführung des AIAO birgt ein hohes Risiko, denn auch nur kurze Kontakte von wenigen Minuten bis Stunden zwischen Masttieren unterschiedlichen Alters während des Umstallens sind als Risiko anzusehen (NATHUES et al., 2012a). Auch bei Untersuchungen in 67 Beständen in Nord-Westdeutschland zur Identifikation von Risikofaktoren stellte sich ein AIAO System als gute Präventionsmaßnahme dar (GROSSE BEILAGE et al., 2009). Ebenfalls wirken sich ein einwöchiger oder dreiwöchiger Produktionsrhythmus im Vergleich zu Abferkelungen alle 2 Wochen, günstig im Hinblick auf die Prävalenz bei Zuchtsauen aus (GROSSE BEILAGE et al., 2009).

Präventive Maßnahmen bei Saugferkeln stellten das Schleifen der Eckzähne sowie die zwei- statt einmalige Injektion von Eisen im Ferkelalter dar (NATHUES et al., 2013b).

2.3. Eradikation

Eradikationsprogramme wurden vor allem in Dänemark, Finnland und in der Schweiz angewandt (MAES et al., 2008), aber auch in den USA nehmen die Bemühungen, *M. hyopneumoniae* aus den Beständen zu eliminieren, zu (MAES et al., 2018).

Verschiedenste Eradikationsprogramme wurden beschrieben und in

einem Review von HOLST et al. (2015) zusammengefasst. Als konsequenteste Methode ist die vollständige Depopulation und Repopulation zu sehen, bei der die Herde neu mit *M. hyopneumoniae* freien Tieren aufgebaut wird und somit die Möglichkeit besteht, auch weitere Erreger vollständig zu eliminieren (YESKE, 2007). Eine Eradikation ist allerdings auch ohne vollständige Depopulation möglich: In der Schweiz wurde erfolgreich ein Programm, welches eine partielle Depopulation im Sinne eines 10 Monate langen Zeitraumes ohne Ferkel und Jungsauen umfasst und einer 14-tägigen antibiotischen Behandlung der restlichen Tiere miteinschließt, angewandt (ZIMMERMANN et al., 1989). Die Durchführung entweder einer totalen oder der beschriebenen partiellen Depopulation, je nach Bestand, konnte in der Schweiz im Zeitraum von 1996 bis 2004 die Inzidenz für EP Läsionen von 3,3% auf 0,5% reduzieren und es traten im Jahr 2005 insgesamt nur noch 22 Fälle von EP auf (STÄRK et al., 2007). Weitere Eradikationsstrategien, wie Herdenschließungen und Medikationsprogramme, wurden von diesem Schweizer System abgeleitet (HOLST et al., 2015). In einem reinen Mastbetrieb war es möglich, durch die Einstellung ausschließlich *M. hyopneumoniae* freier, geimpfter Tiere bei gleichzeitiger antibiotischer Behandlung, der schon vorhandenen Tiere, und der Durchführung eines strikten Rein-Raus-Verfahrens mit voneinander getrennten Lüftungen in den verschiedenen Abteilen, *M. hyopneumoniae* erfolgreich zu tilgen (HEINONEN et al., 2011).

Eine Methode, die vor allem in den USA angewandt wurde, stellt das medicated early weaning (MEW) dar (ALEXANDER et al., 1980). Hierbei wurden den Sauen während der späten Trächtigkeit und der gesamten Säugephase hohe Dosen Tiamulin und Trimethoprim verabreicht, die Ferkel am 5. LT abgesetzt, in gesonderte Aufzuchtbuchten verbracht und ab dem 10. LT ebenfalls antibiotisch behandelt (ALEXANDER et al., 1980). Ein erfolgreiches MEW wurde auch von DEE (1994) beschrieben. Hierbei wurden die Ferkel vom ersten LT bis zum Absetzen am 14. LT mit Oxytetracyclin behandelt und erhielten bis sieben Tage nach dem Absetzen Trimethoprim über das Trinkwasser. Die Sauen wurden nicht in die Behandlung miteinbezogen (DEE, 1994).

Trotz einiger unternommener Bemühungen *Mycoplasma hyopneumoniae*

aus Beständen zu eliminieren, ist die Gefahr der Reinfektion hoch (THACKER & MINION, 2012). Von 3983 Beständen, die am Schweizer Eradiaktionsprogramm von 1996 bis 1999 teilnahmen, waren im Jahr 2000 107 (2,6%), reinfiziert (HEGE et al., 2002). Auch MAES et al. (2008) beschreiben jährliche Reinfektionsraten bis 10%. Als Risikofaktoren wurden in der Schweiz gemeinsame Aufzucht- und Mastbetriebe, die Nähe zu anderen infizierten Beständen und zu Parklätzen, an denen Tiertransporte Aufenthalte haben, eingestuft (HEGE et al., 2002).

III. MATERIAL UND METHODEN

Die Studie wurde in insgesamt zehn schweinehaltenden Betrieben, in fünf Bundesländern durchgeführt. Die Probenentnahme an diesen Betrieben fand im Zeitraum vom Juli bis November 2018 statt. Es handelte sich jeweils um einen einmaligen Bestandsbesuch mit der Entnahme von Proben. Das Tierversuchsvorhaben wurde in jedem beteiligten Bundesland eigens angezeigt. Nachfolgend sind tabellarisch alle gestellten Tierversuchsanzeigen zusammengefasst.

Tabelle 2: Auflistung aller beteiligten Bundesländer und Aktenzeichen der Tierversuchsanzeigen sowie Genehmigungsdatum

Bundesland	Zuständige Behörde	Aktenzeichen	Datum der Genehmigung
Bayern	Regierung von Oberbayern	ROB-55.2-2532.Vet_03-18-43	05.06.2018
	Regierung von Unterfranken	RUF-55.2.2-2532-2-742-4	26.06.2018
Baden-Württemberg	Regierungspräsidium Tübingen	35//9185.82-4	03.07.2018
	Regierungspräsidium Stuttgart	35-9185.82/0352	26.06.2018
Nordrhein-Westfalen	Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz	81-02.05.40.18.056	07.06.2018
Niedersachsen	Niedersächsisches Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit	33.19-42502-05-18A303	28.05.2018
Schleswig-Holstein	Ministerium für Energiewende, Landwirtschaft, Umwelt, Natur und Digitalisierung	V244-23216/2018	11.05.2018

1. Ziel der Untersuchung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, in vorausgewählten Beständen mit mittleren und hohen EP-Scores am Schlachthof das Vorkommen von *M. hyopneumoniae* bei Saugferkeln im Alter von drei Wochen zu untersuchen und dabei folgende Hypothesen zu überprüfen:

- Anhand von Literaturdaten wird davon ausgegangen, dass frühe Infektionen mit *M. hyopneumoniae* im Saugferkelalter in deutschen schweinehaltenden Beständen häufig auftreten.
- Basierend auf der Annahme, dass die Impfung von bereits infizierten Ferkeln zu einem reduzierten Impferfolg führt, sind in Beständen, in denen bei noch nicht gegen *M. hyopneumoniae* geimpften Ferkeln in der 3. Lebenswoche *M. hyopneumoniae* DNA nachgewiesen wird, höhere Hustenindices in der Mast sowie am Schlachthof höhere Lungenscores zu erwarten, als bei Beständen mit *M. hyopneumoniae* negativen Ferkeln.

2. Versuchsbetriebe

Die Studie sollte als Querschnittsstudie einen Eindruck über das Vorkommen früher Infektionen mit *M. hyopneumoniae* in betroffenen Beständen in Deutschland schaffen. Auf Grundlage der Viehzahlen des statistischen Bundesamtes wurden Betriebe in den fünf Bundesländern mit den meisten schweinehaltenden Betrieben in Deutschland in die Untersuchungen miteinbezogen (STATISTISCHES BUNDESAMT, 2017). Die zu untersuchenden Betriebe verteilten sich auf die Bundesländer Bayern, Baden-Württemberg, Nordrhein-Westfalen, Niedersachsen und Schleswig-Holstein.

2.1. Einschlusskriterien

Eine Vorauswahl an Betrieben wurde durch die Erfüllung von Einschlusskriterien getroffen. Das Auftreten von Husten im Bestand oder schon bestehende *M. hyopneumoniae* Nachweise galten als Voraussetzung. Um die Verbreitung des Erregers auch in der Aufzucht und Mast weiterverfolgen zu können, wurden nur geschlossene Bestände, Bestände mit Teilmast, bzw. Ferkelerzeuger und Mäster mit bestehender 1:1 Anbindung in die Vorauswahl miteinbezogen. Eine Impfung gegen *M. hyopneumoniae* durfte nur als one-shot Präparat eingesetzt werden und die Impfung selbst auch nicht vor dem 21. LT durchgeführt werden. Abferkelgruppen von mindestens zehn Sauen wurden in die Einschlusskriterien mitaufgenommen, um den gewünschten

Probenumfang in einem Bestandsbesuch abdecken zu können. Der Einsatz von Mykoplasmen-wirksamen Antibiotika in der Abferkelung führte zum Ausschluss von der Studie.

2.2. Lungenuntersuchungen am Schlachthof

Schlachtpartien der vorausgewählten, potentiellen Studienbetriebe wurden von Mitarbeitern der Firma CEVA Tiergesundheit an Schlachthöfen auf das Vorkommen von Bronchopneumonien untersucht. Dies erfolgte während des laufenden Schlachtvorgangs. Es wurden pro Betrieb mindestens 49 Lungen in Hinblick auf das Vorkommen EP-assoziierter Läsionen bewertet. Die Klassifikation EP-assoziierter Läsionen basiert dabei auf der Methode von MADEC und KOBISCH (1982). Hierbei werden pro Lungenlappen Scores von 0–4 für die Veränderungen vergeben, wobei somit jede Lunge einen EP-Wert zwischen 0 und 28 erreichen kann. Die Vorgehensweise bei der Untersuchung der Lungenläsionen ist bei CVJETKOVIĆ et al. (2018) beschrieben. Die Befundung wurde mit Hilfe des Softwaretools Ceva Lung Program® (Ceva Santé Animale, Libourne, Frankreich) aufgezeichnet.

Tabelle 3: Beurteilung der Veränderungen je Lungenlappen nach MADEC und KOBISCH (1982)

Score (Punkte)	Prozentual veränderter Anteil
0	Keine Veränderungen
1	1-25%
2	26-50%
3	51-75%
4	76-100%

Der EP-Index des Bestandes kann aus den EP-Werten der einzelnen Lungen wie folgt errechnet werden:

$$\text{EP-Index} = \frac{\sum \text{EP Werte aller gescorten Lungen}}{\sum \text{gescorte Lungen}}$$

Dieser galt als Basis für die anschließende Betriebsauswahl. Es sollten 5 Betriebe mit mittleren EP-Indices zwischen 2,5 und 4,5 eingeschlossen werden sowie 5 Betriebe mit hohen EP-Indices über 5.

Insgesamt wurden Lungen von Tieren aus 18 verschiedenen Beständen untersucht und mittels EP-Indices klassifiziert. Dabei erhielt man Werte zwischen 0,05 und 3,43. Aufgrund der wenigen hohen EP-Indices wurden auch Betriebe mit niedrigeren Werten eingeschlossen. Eine Übersicht über die an der Studie teilnehmenden Betriebe ist in Tabelle 4 dargestellt.

Tabelle 4: In die Studie eingeschlossene Betriebe, mit Verteilung auf Bundesländer, Betriebsart, Größe des Betriebes, *M. hyopneumoniae* Impfung bei Sauen und Produktionsrhythmus

Betrieb	Bundesland	Betriebsart	Sauenanzahl	Impfung Sau <i>M. hyopneumoniae</i>	Produktionsrhythmus
1	Bayern	2	200	nein	4 Wochen
2	Bayern	1	200	nein	5 Wochen
3	Nordrhein-Westfalen	3	500	ja	3 Wochen
4	Niedersachsen	3	350	nein	2 Wochen
5	Baden-Württemberg	2	360	nein	1 Woche
6	Schleswig-Holstein	1	160	ja	1 Woche
7	Niedersachsen	1	180	nein	3 Wochen
8	Baden-Württemberg	2	120	nein	3 Wochen
9	Nordrhein-Westfalen	1	350	nein	2 Wochen
10	Bayern	2	250	nein	1 Woche

Betriebsart: 1=geschlossen, 2=Teilmast, 3=1:1 Anbindung

3. Versuchstiere

Insgesamt wurden auf 10 deutschen schweinehaltenden Betrieben 100 Sauen und 500 Ferkel untersucht. Pro Betrieb wurden 10 Sauen unterschiedlicher Paritäten in der Abferkelung in die Studie miteinbezogen. Darunter sollten sich, wenn möglich, 5 Tiere der ersten Parität befinden. Die Auswahl der Sauen erfolgte zufällig. Um dies zu gewährleisten, wurde beim Betreten der Abferkelabteile immer bei der ersten Abferkelbucht auf der rechten Seite mit der Beprobung begonnen und anschließend gegen den Uhrzeigersinn mit der darauffolgenden Bucht fortgefahren.

Je fünf Ferkel der untersuchten Sauen wurden ebenfalls in die Studie miteingeschlossen. Die Auswahl dieser erfolgte, unabhängig vom Geschlecht, indem alle Ferkel kurzzeitig im Ferkelnest mittels Treibbrett fixiert und daraufhin fünf zufällig herausgegriffen wurden. Wie durch die Tierversuchsanzeige vorgegeben, wurden nur gesunde Tiere in die Studie aufgenommen, Ferkel mit reduziertem Allgemeinbefinden wurden ausgeschlossen. Die Probenentnahme wurde so terminiert, dass die zu beprobenden Ferkel zu diesem Zeitpunkt ein Alter von 21 ± 3 LT aufwiesen und noch nicht gegen *M. hyopneumoniae* geimpft waren.

Zusätzlich wurden SammelSpeichelproben bei weiteren Tieren im Alter von ca. 6, 12, 16 und 20 Lebenswochen gewonnen. Pro Altersgruppe sollten 10 SammelSpeichelproben von ca. je 20-25 Tieren gewonnen werden. Es konnten so ca. 200 Tiere je Altersstufe miterfasst werden. Dabei wurden Tiergruppen buchtenweise zufällig ausgewählt. Dies geschah auf die gleiche Weise wie im Abferkelstall; bei Betreten eines Mastabteiles wurde mit der Beprobung der Bucht zur rechten Seite begonnen und gegen den Uhrzeigersinn mit weiteren Buchten bis zum Erreichen des vollständigen Stichprobenumfangs fortgefahren.

4. Probenentnahme

Bei allen gewonnenen Proben handelte es sich um einmalige Probeentnahmen. Bei Sauen wurde sowohl ein Larynxtupfer (LaT) entnommen, als auch eine Blutprobe gewonnen. Alle Ferkel wurden zuerst mittels Tracheobronchialtupfer (TBS) beprobt, daraufhin wurde eine Blutprobe entnommen. Tiere in Aufzucht und Mast wurden mittels Kastricken buchtenweise untersucht.

4.1. Probengewinnung Sauen

Die Sauen wurden im Kastenstand von einer Hilfsperson mittels Oberkieferschlinge fixiert. Anschließend wurde ein Maulkeil zwischen Ober- und Unterkiefer eingeführt. Somit wurde die Sicht auf die Larynxregion verbessert und ein Abbeißen des Tupfers bei der Entnahme verhindert. Durch dessen runde Öffnung in der Mitte konnte die durchführende Person den Tupfer (Eydam-Tupfersystem, lange Ausführung, Erich Eydam KG, Kiel Deutschland) bis zum Larynx

vorschieben. Dort erfolgte die Tupferentnahme mittels drehender Bewegungen. Eine Stimmveränderung bei der Entnahme wurde als korrekter Sitz gewertet. Anschließend wurde die Spitze des Katheters (ca. 4-5 cm) abgeschnitten und in ein steriles Probenröhrchen (Fassungsvermögen 10 ml) zusammen mit 1 ml Phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) (Gibco™ PBS, pH 7.4, Gibco™, Paisley, Großbritannien) verbracht.

Für die Blutentnahme wurde die Fixation mittels Oberkieferschlinge nicht mehr benötigt, das Tier wurde durch ruhige Ansprache und Berührungen im Kastenstand abgelenkt. Nur in Ausnahmefällen bei besonders aggressiven Tieren, kam es zur Fixation mittels Oberkieferschlinge durch eine Hilfsperson. Die Entnahme erfolgte aus der rechten *Vena jugularis externa* mittels steriler Einmalkanülen (1,2x100 mm SUPRA®, Erhardt-Söhne GmbH, Geislingen, Deutschland) und Serummonovetten (Primavette® V Serum, 10 ml, KABE Labrotechnik GmbH, Nümbrecht-Elsenroth, Deutschland) unter Aspiration.

4.2. Probengewinnung Ferkel

Ferkel wurden für die Probenentnahme zuerst von einer Hilfsperson unter dem Arm fixiert. Hierbei wurden die Vordergliedmaßen mit beiden Händen oberhalb des Karpalgelenks festgehalten, um die Tiere zur Probenentnahme möglichst ruhig halten zu können. Ein Maulkeil wurde zwischen Ober- und Unterkiefer eingelegt. Dieser verhinderte, dass die Tiere den Katheter abbeißen und verschlucken konnten und ermöglichte der durchführenden Person den Kopf des Tieres zur Entnahme des Tracheobronchialtupfers zu überstrecken. Verwendet wurde ein steriler weicher Kunststoff-Absaugkatheter der Größe 8 oder 10, je nach Größe des Tieres (DCT-Nelaton-Katheter 40 cm, servoprax GmbH, Wesel, Deutschland), der zwischen den Stäben des Maulkeiles zuerst bis zur Epiglottis vorgeschoben wurde. Die weitere Entnahme erfolgte wie bei FABLET et al. (2010) beschrieben. Während der Phase der Inspiration wurde der Katheter unter drehenden Bewegungen bis zur *Bifurcatio tracheae* vorgeschoben. Das Auslösen eines Hustenreizes wurde als korrekter Sitz des Katheters und erfolgreiche Probenentnahme gewertet. Direkt darauf wurde der Katheter wieder zurückgezogen, die Spitze (ca. 4-

5 cm) mit einer Schere abgeschnitten und in ein Probenröhrchen mit 1 ml PBS (Gibco™ PBS, pH 7.4, Gibco™, Paisley, Großbritannien) überführt.

Das Tier wurde direkt anschließend von der Hilfsperson in Rückenlage verbracht, der Kopf des Tieres von der durchführenden Person fixiert und 8 ml Blut aus der rechten *Vena cava cranialis* gewonnen. Dazu wurden sterile Einmalkanülen der Größe 0,9x40 mm (Sterican, Braun AG, Melsungen) und individuell beschriftete Serummonovetten (Primavette® V, 10 ml, KABE Labortechnik GmbH, Nürmbrecht) verwendet.

4.3. Gewinnung der Sammelspeichelproben bei Absetzferkeln und Mastschweinen (6./12./16./20. Lebenswoche)

Speichelproben bei Absetzferkeln und Mastschweinen wurden mittels Kaustricken aus Baumwolle (Oral Fluid Sample Collection Accessory Kit 5 Count, IDEXX, Westbrook, Maine, USA) gewonnen. Die Stricke wurden so in den Buchten befestigt, dass sie frei in den Buchten hingen und von allen Seiten für die Tiere zugänglich waren. Die Aufhängung erfolgte möglichst von Futterplatz und Tränken entfernt, um weitere Verschmutzung zu vermeiden. Das untere Ende des Kaustrickes befand sich in etwa auf Schulterhöhe der Tiere.

Abhängig von der Buchtengröße wurden die Stricke aufgeteilt. Befanden sich 25 oder weniger Tiere in einer Bucht, genügte ein Kaustrick, bei größeren Buchten wurden für maximal weitere 25 Tiere einen zusätzlichen Kaustrick benötigt. Pro Altersklasse wurden, wenn möglich 10 Sammelspeichelproben genommen. Zur Gewinnung von genügend Speichel wurden die Stricke für 20-30 Minuten in den Buchten belassen. Anschließend wurde die gewonnene Flüssigkeit aus den Seilen einzeln in die im Probenkit enthaltenen Plastiktüten ausgedrückt und je in einen der mitgelieferten Auffangbehälter aus Plastik überführt. Bedingt durch zu kleine Tierzahlen, bzw. das Abreißen der Kaustricke in der Bucht und der dadurch entstehenden Verschmutzung, konnten nicht immer 10 Sammelspeichelproben je Altersklasse gewonnen werden.

5. Fragebogen

Anschließend an die Probengewinnung wurden anhand eines Fragebogens im Gespräch mit dem Landwirt Leistungsdaten, Daten zur Betriebsstruktur, zum Management und zur Tiergesundheit erhoben.

6. Probenbearbeitung

Alle Proben direkt nach der Gewinnung in einer transportablen Kühlbox auf 7°C gekühlt. Die weitere Bearbeitung der Proben erfolgte im Labor der Klinik für Schweine.

Die gewonnenen Blutproben wurden im Labor der Klinik für Schweine (Ludwig-Maximilians-Universität München, Oberschleißheim) für 10 min bei 20°C und 1560g zentrifugiert (Rotanta 460R Zentrifuge, Andreas Hettich® GmbH & Co.KG, Tuttlingen, Deutschland). Anschließend wurde der Serumüberstand in drei 1,5 ml Reaktionsgefäße (1,5 ml safe-lock Tubes, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) abpipettiert und bis zur endgültigen Analyse bei -20°C in der Klinik für Schweine eingefroren.

Die oral fluids wurden ebenso bei 20°C und 1560g zentrifugiert, um Futterpartikel und andere Verunreinigungen möglichst von der Flüssigkeit zu trennen. Der Überstand wurde in 1,5 ml Reaktionsgefäße (1,5 ml safe-lock Tubes, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) pipettiert und bis zur weiteren Untersuchung bei -80°C in der Klinik für Schweine gelagert.

Eine weitere Bearbeitung der in PBS Medium überführten Larynx- und Tracheobronchialtupfer war nicht nötig. Diese wurden wie die Blutproben bei -20°C bis zur weiteren Untersuchung eingefroren.

6.1. Erregernachweis

Die weiteren Untersuchungen von Serum und Larynx- bzw. Tracheobronchialtupfern wurden am IZSLER (Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna) in Reggio Emilia, Italien, durchgeführt. Untersuchungen der oral fluids fanden bei Ceva-Phylaxia Veterinary Biologicals Co. Ltd. in Ungarn statt. Dafür wurden alle Serumproben sowie Larynx- und Tracheobronchialtupfer bzw. oral fluids auf Trockeneis per Overnight-Express verschickt.

6.2. Direkter Erregernachweis aus Larynx- und Tracheobronchialtupfern

Larynxtupfer und Tracheobronchialtupfer wurden auf das Vorkommen von *M. hyopneumoniae* DNA mittels PCR untersucht. Dafür wurden die Tracheobronchialtupfer der Ferkel zuerst in Pools von je fünf Proben untersucht. Stellte sich ein Pool als positiv dar, wurden alle fünf Einzelproben noch einmal mittels PCR getestet. Die Larynxtupfer der Sauen wurden von Anfang an einzeln untersucht.

6.2.1. Extraktion der *Mycoplasma hyopneumoniae*-DNA

1 ml der Ausgangssuspension (Probe in PBS) wurde bei 12 000g und 4°C für 20 Minuten zentrifugiert.

6.2.2. PCR

Der Nachweis von *M. hyopneumoniae* spezifischen Genomsequenzen erfolgte nach dem von MAROIS et al. (2010) beschriebenen Protokoll mittels einer Real Time TaqMan PCR (real-time PCR). Als Mastermix wurde der GoTaq® Probe qPCR Master Mix (PROMEGA Corporation, Madison, USA) verwendet. Je Reaktion wurden Mastermix, Primer, Sonde und Probenmaterial in eine Vertiefung der Mikrotiterplatte pipettiert. Für die Amplifikation der DNA Fragmente wurde das CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, Inc. Life Science Research, California, USA) zusammen mit der CFX Manager 3.1 Software (Bio-Rad Laboratories, Inc. Life Science Research, California, USA) verwendet und die real-time PCR wurde nach in Tabelle 5 aufgeführtem Temperaturprotokoll durchgeführt.

Tabelle 5: Temperaturprotokoll der real-time PCR nach MAROIS et al. (2010)

Zyklen	Aktivität	Temperatur	Zeit
1x	Denaturierung	95°C	3 min
40x	Denaturierung	95°C	15 sec
40x	Anlagerung & Elongation	60°C	60 sec

Mithilfe der durchgeführten PCR konnte ein Fragment des p102 Genes detektiert werden. Die verwendeten Primer und TaqMan Sonden sind in Tabelle 6 aufgeführt.

Tabelle 6: verwendete Primer für real-time PCR nach MAROIS et al. (2010)

Primer/ Sonde	Sequenz
P102 Vorwärtsprimer	GTCAAAGTCAAAGTCAGCAAAC
P102 Rückwärtsprimer	AGCTGTTCAAATGCTTGTCC
P102 Sonde	Cy5†-ACCAGTTTCCACTTCATCGCCTCA-BHQ2

6.3. Direkter Erregernachweis aus Sammelspeichelproben

6.3.1. Extraktion der *Mycoplasma hyopneumoniae*-DNA

Zur Isolation der *M. hyopneumoniae* DNA aus den oral fluids wurden das QIAamp DANN Mini Kit, QIAamp 96 DNA Blood Kit oder das QIAamp 96 DNA QIAcube HT Kit verwendet (QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland).

6.3.2. PCR

Der Nachweis von *M. hyopneumoniae* spezifischen Genomsequenzen erfolgte nach dem von STRAIT et al. (2008) beschriebenen Protokoll mittels real-time PCR. Als Mastermix wurde der RotorGene Probe real-time PCR Master Mix (QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland) verwendet. Je Reaktion wurden Mastermix, Primer, Sonde und Probenmaterial in eine Vertiefung der Mikrotiterplatte pipettiert. Für die Amplifikation der DNA Fragmente wurde der Rotor-Gene Q PCR Cycler (QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland) verwendet und die PCR wurde nach dem in Tabelle 7 aufgeführtem Temperaturprotokoll durchgeführt.

Tabelle 7: Temperaturprotokoll der real-time PCR nach STRAIT et al. (2008)

Zyklen	Aktivität	Temperatur	Zeit
1x	Denaturierung	50°C	2 min
1x	Denaturierung	95°C	10 min
40x	Denaturierung	95°C	15 sec
40x	Anlagerung & Elongation	60°C	60 sec

Mithilfe der durchgeführten PCR konnte ein Fragment des p97 Genes detektiert werden. Die verwendeten Primer und Sonden sind in Tabelle 8 aufgeführt.

Tabelle 8: verwendete Primer für real-time PCR nach STRAIT et al. (2008)

Primer/ Sonde	Sequenz
P97 Vorwärtsprimer	CCAGAACCAAATTCCTTCGCTG
P97 Rückwärtsprimer	ACTGGCTGAACTTCATCTGGGCTA
P97 Sonde	FAM-AGCAGATCTTAGTCAAAGTGCCCGTG-BHQ1

6.4. Indirekter Erregernachweis

Das Serum von Sauen und Saugferkeln wurde mittels ELISA auf Antikörper gegen *M. hyopneumoniae* untersucht. Dafür wurde das Testkit ID Screen® *Mycoplasma hyopneumoniae* Indirect ELISA (ID.vet Innovative Diagnostics, Grabels, Frankreich) verwendet. Hierbei handelt es sich um einen indirekten ELISA, der eine semiquantitative Auswertung erlaubt.

Die Proben sowie eine Negativ- und eine Positivkontrolle werden hierfür auf die mit einem *M. hyopneumoniae* Antigen vorbeschichtete Mikrotiterplatte aufgetragen. Falls Antikörper im Serum vorhanden sind, bilden sie während der Inkubationszeit Antigen-Antikörper-Komplexe mit dem Antigen der Mikrotiterplatte. Bei den anschließenden drei Waschvorgängen werden ungebundene Antikörper entfernt. Durch die Zugabe von horseradish peroxidase (HRP), einem speziesspezifischen Konjugat, entstehen Antigen-Antikörper-Konjugat-Komplexe. Nach erneuter Inkubation und weiteren Waschvorgängen, die ungebundenes, überschüssiges HRP entfernen, wird als Substrat Tetramethylbenzidin (TMB) hinzugefügt. Dieses Enzymsubstrat wird von gebundenem Konjugat in einen Farbstoff umgewandelt. Es kommt zu einem Farbumschlag nach blau, der nach Zugabe der Stopp-Lösung gelb wird. Die Intensität der Farbreaktion ist proportional zur Menge der Antikörper in der Probe. Sind keine Antikörper vorhanden, tritt keinerlei Farbreaktion auf.

Anschließend kann die Mikrotiterplatte bei einer Wellenlänge von 450 nm ausgelesen werden. Gemessen wird hierbei die optische Dichte (OD) der jeweiligen Probe sowie der Positiv- (pc) und der Negativkontrolle (nc). Für jede Probe kann, basierend auf nachfolgender Formel, ein S/P ratio berechnet werden:

$$S/P = \frac{OD_{\text{sample}} - OD_{\text{nc}}}{OD_{\text{pc}} - OD_{\text{nc}}}$$

Eine Probe gilt als positiv, wenn das Verhältnis der Probe zur Positivkontrolle (S/P) > 0,4 beträgt. Treten Werte zwischen 0,3 und 0,4 auf ist das Ergebnis zweifelhaft, bei Messungen von < 0,3 ist die Probe als negativ zu werten.

6.5. Hustenindex

Respiratorische Anzeichen im Bestand wurden anhand eines Hustenindex in der Mast erfasst. Dabei wurde wie bei NATHUES et al. (2012b) beschrieben vorgegangen. Es wurden Tiere mit einem Alter von 18 Lebenswochen oder älter zur Bestimmung des Hustenindex herangezogen. Mindestens 20 Tiere von einer oder zwei benachbarten Buchten wurden aufgetrieben und durch Rufen und Klatschen zur Bewegung angehalten. Daraufhin wurde die Anzahl der Hustenstöße über 3 Minuten ausgezählt, wobei erneutes Husten des gleichen Schweines als weiterer Hustenstoß gezählt wurde, soweit dazwischen ein mindestens 10 Sekunden langes hustenfreies Intervall lag. Dieses Vorgehen wurde nach einer Minute Pause wiederholt. Mit einer zweiten Gruppe ≥ 20 Tieren aus demselben Stallabteil aber aus anderen Buchten wurde auf gleiche Weise verfahren.

Anschließend konnte daraus der mittlere Hustenindex errechnet werden:

$$HI = \frac{\text{Anzahl gezählter Hustenstöße}}{\text{Anzahl untersuchter Tiere} * \text{Untersuchungszeit (min)}} * 100$$

7. Statistik

Die Datenerfassung und Diagrammerstellung wurde mit Hilfe des Tabellenkalkulationsprogrammes Excel® 2010 (Microsoft Office, Fa. Microsoft, Redmond, USA), die statistische Auswertung mit der Statistiksoftware IBM SPSS® Statistics Version 25.0 (Fa. IBM Corp., Armonk, USA) durchgeführt.

Ein statistisches Gutachten lag als Grundlage für die Berechnung der erforderlichen Tierzahlen pro Betrieb vor. Zur Bestimmung der Stichprobengröße wurde in Anlehnung an (CANNON & ROE, 1982) eine hypergeometrische Verteilung verwendet. Als mittlere *M. hyopneumoniae* Prävalenz bei Sauen wurden 25% angenommen. Ausgehend von einer mittleren Anzahl an 20 Sauen in einer Abferkelgruppe mussten mindestens 9 Tiere beprobt werden, um keines der kranken Tiere zu finden und dabei höchstens einen Fehler von 5% zu machen. Da ein Dropout von etwa 5% zu erwarten ist, wurde 1 Reserve-Tier benötigt. Daher waren insgesamt 10 Tiere nötig. Ausgehend von einer mittleren Anzahl an 120 Saugferkeln in einer Altersgruppe und von einer Prävalenz von 5% mussten mindestens 47 Tiere beprobt werden, um keines der kranken Tiere zu finden und dabei höchstens einen Fehler von 5% zu machen. Da ein Dropout von etwa 5% zu erwarten ist, wurden 3 Reserve-Tiere benötigt. Daher waren insgesamt 50 Tiere nötig.

Für alle quantitativen Parameter wurde im Rahmen der deskriptiven Statistik das arithmetische Mittel (MW), der Median (MD), die Varianz, die Standardabweichung (SD) sowie das Minimum (Min) und Maximum (Max) berechnet. Anschließend erfolgte mittels Kolmogorov-Smirnov-Test eine Überprüfung der Daten auf Normalverteilung. Dies war Grundlage der Auswahl geeigneter weiterführender statistischer Testverfahren. Bei allen Berechnungen lag das Signifikanzniveau bei 5% ($p \leq 0,05$), das Konfidenzintervall betrug 95%.

Als abhängige Variablen galten die binären Variablen „seropositiv“ (ja/nein) und „molekularbiologischer Nachweis“ (ja/nein). Um mögliche Zusammenhänge zwischen den Ergebnissen der serologischen bzw. molekularbiologischen Untersuchungen auf *M. hyopneumoniae* und den

unabhängigen Faktoren (EP-Index über/unter Mittelwert, Husten-Index über/unter Median, *M. hyopneumoniae* Impfung Muttertier ja/nein, Jungsau ja/nein) zu evaluieren, wurden diese mittels Chi²-Test nach Pearson auf Bestands- und auf Einzeltierebene untersucht.

Für den Vergleich der Mittelwerte der S/P ratios seropositiver Sauen bzw. Ferkel in den Gruppen (EP-Index über/unter Mittelwert, HI über/unter Median, *M. hyopneumoniae* Impfung der Sau ja/nein, Jungsau ja/nein) wurde der Mann-Whitney-U-Test durchgeführt.

Mögliche Korrelationen wurden mit Hilfe der Spearman-Rho-Korrelation berechnet.

IV. ERGEBNISSE

Proben wurden von 100 Sauen und 500 Ferkeln gewonnen. Zwei der Serumproben der Ferkel waren im Labor nicht auswertbar, da die Proben auf dem Transport ausgelaufen waren. Von den 500 beprobten Ferkeln waren 261 (52,2%) männlich und 239 (47,8%) weiblich. Alle Ferkel waren zum Zeitpunkt der Beprobung noch nicht gegen *M. hyopneumoniae* geimpft. Die Probenentnahme fand zwischen dem 18. und 24. Lebenstag statt, das mediane Alter betrug 20 Tage (MW 20,24; SD: 1,841).

1. Pre - Screening der Bestände

Für jeden potentiellen Studienbetrieb wurde anhand einer Schlachtpartie am Schlachthof ein Lungenscore erhoben (EP-Index). Die Befundung erfolgte wie bei MADEC und KOBISCH (1982) beschrieben. Die Größe der Schlachtpartie und somit die Anzahl der Lungen, die zur Erstellung eines Scores herangezogen wurden, variierte von 49 bis 174. Im Mittel wurden 122 Lungen pro Bestand untersucht. Insgesamt erfolgte eine Beurteilung der Lungen von Tieren aus 18 Beständen. Es sollten fünf Betriebe mit mittleren EP Indices zwischen 2,5 und 4,5 eingeschlossen werden sowie fünf Betriebe mit hohen EP-Indices ≥ 5 . Aufgrund niedrigerer EP-Indices als erwartet (siehe Tabelle 9), wurden auch Betriebe mit EP-Indices $\leq 2,5$ eingeschlossen. In Tabelle 9 sind Ergebnisse aller durchgeführten Lungenuntersuchungen am Schlachthof dargestellt. Die Teilnahme an der Studie erfolgte auf freiwilliger Basis. Bestände, die anschließend in die Studie eingeschlossen wurden, sind grau hinterlegt.

Tabelle 9: Am Schlachthof erhobene EP-Indices der 18 untersuchten Bestände, Anzahl der jeweils untersuchten Schlachtlungen sowie Datum des Scorings und Herkunft der Schlachtpartie

Scoring Nr.	EP-Index	Anzahl untersuchter Lungen	Datum Lungen-scoring	Bundesland	Betrieb Nr. Studie
1	0,68	96	20.06.2018	Bayern	1
2	1,27	95	22.06.2018	Bayern	2
3	0,1	105	02.07.2018	Bayern	
4	1,1	188	16.07.2018	Bayern	
5	0,48	85	16.07.2018	Bayern	
6	2,55	49	11.10.2018	Bayern	10
7	3,43	101	01.06.2018	Baden-Württemberg	5
8	3,15	92	05.07.2018	Baden-Württemberg	8
9	0,7	69	13.07.2018	Baden-Württemberg	
10	1,89	160	08.05.2018	Nordrhein-Westfalen	3
11	0,12	135	18.05.2018	Nordrhein-Westfalen	
12	0,81	146	16.08.2018	Nordrhein-Westfalen	
13	0,15	154	27.08.2018	Nordrhein-Westfalen	9
14	1,84	174	05.07.2018	Niedersachsen	4
15	1,27	146	27.08.2018	Niedersachsen	7
16	0,3	174	31.08.2018	Niedersachsen	
17	0,4	119	25.06.2018	Schleswig-Holstein	
18	1,20	102	04.07.2018	Schleswig-Holstein	6

Die EP-Indices der 10 zur Teilnahme an der Studie ausgewählten Bestände, nahmen Werte zwischen 0,15 und 3,43 ein, der Mittelwert betrug 1,74 (Median 1,56, SD 1,05). Der Besuch des Bestandes erfolgte im Mittel 55,6 Tage nach der Erhebung des EP-Indices (Min. 7d, Max. 110d) nach Beurteilung der Lungen am Schlachthof).

2. Labordiagnostik

2.1. Serologie

Auf 9 von 10 Beständen (90%) konnten spezifische IgG-Antikörper gegen *M. hyopneumoniae* nachgewiesen werden. In 8 von 10 (80%) Beständen war mindestens eine Sau mittels ELISA seropositiv. Antikörper gegen *M. hyopneumoniae* konnten bei Ferkeln in 9 von 10 (90%) Herkünften nachgewiesen werden. In 61 von 100 untersuchten Würfen (61%) war mindestens eines der fünf beprobten Ferkel seropositiv. Die Anzahl seropositiver Sauen, Ferkel und Würfe pro Bestand ist in Tabelle 10 dargestellt.

Tabelle 10: Anteil *M. hyopneumoniae* seropositiver Sauen, Ferkel und Würfe pro Bestand innerhalb der untersuchten Studienpopulation

Bestand	seropositive Sauen	seropositive Ferkel	seropositive Würfe
1	0/10 (0%)	0/48* (0%)	0 (0%)
2	0/10 (0%)	1/50 (2%)	1/10 (10%)
3	8/10 (80%)	31/50 (62%)	10/10 (100%)
4	8/10 (80%)	32/50 (64%)	9/10 (90%)
5	6/10 (60%)	31/50 (62%)	9/10 (90%)
6	9/10 (90%)	44/50 (88%)	10/10 (100%)
7	4/10 (40%)	20/50 (40%)	5/10 (50%)
8	2/10 (20%)	4/50 (8%)	1/10 (10%)
9	10/10 (100%)	42/50 (84%)	9/10 (90%)
10	7/10 (70%)	31/50 (62%)	7/10 (70%)
Σ	54/100 (54%)	236/498 (47,4%)	61/100 (61%)

* Blutproben von zwei Ferkeln in Bestand 1 waren im Labor nicht auswertbar

Die Höhe der Antikörpertiter wurde semiquantitativ ausgewertet und als Verhältnis der Probe zur Positivkontrolle (S/P ratio) angegeben. Die S/P ratios nahmen Werte zwischen 0 und 2,28 an. Minimale und maximale S/P ratios sowie Mittelwert, Median und Standardabweichung sind in Tabelle 11 aufgelistet. Der cut-off lag bei S/P ratio 0,4. Alle Werte darüber galten als positives Ergebnis.

Tabelle 11: Mittelwert, Median, Minimum und Maximum sowie Standardabweichung der S/P ratios bei Sauen (normalverteilt) und Ferkeln (nicht normalverteilt)

Tiergruppe	MW	MD	Min	Max	SD
Sauen insg (n= 100)	0,591	0,505	0	2,00	0,445
Sauen ELISA pos (n= 54)	0,909	0,860	0,41	2,00	0,370
Ferkel insg (n= 498)	0,536	0,370	0	2,28	0,457
Ferkel ELISA pos (n= 236)	0,921	0,850	0,41	2,28	0,385

2.1.1. Assoziation zwischen serologischen Ergebnissen von Sau und Ferkeln

Insgesamt stammten 270 der 500 untersuchten Ferkel (54,2%) von seropositiven Sauen (n= 54). Antikörper gegen *M. hyopneumoniae* konnten bei 212/270 (78,5%) dieser Ferkel mittels ELISA nachgewiesen werden. Bei den 228 Ferkeln, die von seronegativen Sauen (n= 46) stammten, wurden bei 24 (10,5%) spezifische Antikörper gegen *M. hyopneumoniae* detektiert. Der Anteil seropositiver Ferkel unterschied sich hinsichtlich ihrer Abstammung von seropositiven oder seronegativen Sauen im Chi²-Test signifikant ($p < 0,001$).

Bei Betrachtung der Höhe der S/P ratios aller Sauen und Ferkel konnte mittels Spearman- ρ Korrelation für nicht normalverteilte Daten eine Korrelation zwischen der Höhe der Antikörpertiter von Sauen und den zugehörigen Ferkeln von $\rho = 0,786$ ermittelt werden ($p < 0,001$). Bei Berechnung der Korrelation der S/P ratios von Sauen und Ferkeln für die einzelnen Bestände variierte der Korrelationskoeffizient von $\rho = -0,003$ bis $\rho = 0,893$. Die Korrelationskoeffizienten sowie die Signifikanzniveaus für die einzelnen Bestände sind in Tabelle 12 aufgelistet.

Tabelle 12: Korrelation der Antikörpertiter von Sauen und zugehörigen Ferkel je Bestand

Betrieb	Korrelationskoeffizient ρ	p-Wert
1	0,670	< 0,001
2	0,398	0,004
3	-0,003	0,985
4	0,656	< 0,001
5	0,695	< 0,001
6	0,743	< 0,001
7	0,852	< 0,001
8	0,687	< 0,001
9	0,666	< 0,001
10	0,893	< 0,001
Σ	0,786	< 0,001

2.1.2. ELISA Ergebnisse im Zusammenhang mit der Parität

Für diese und alle weiteren Berechnungen im Zusammenhang mit den ELISA Ergebnissen wurde Bestand 1 ausgeschlossen, weil er wegen des fehlenden Nachweises von Antikörpern mittels ELISA sowie von spezifischen *M. hyopneumoniae* Genomfragmenten mittels PCR, als *M. hyopneumoniae* unverdächtig eingestuft wurde.

Die Parität der Sauen variierte von der 1. Parität bis zur 12. Parität und betrug im Median 2,50 (MW 3,56, SD 2,72). Von den insgesamt 90 untersuchten Sauen waren 29 (32,2%) Jungsauen und 61 (67,8%) gehörten der zweiten oder einer höheren Parität an (Altsauen). Von den insgesamt 29 Jungsauen stellten sich mittels ELISA 17 (58,6%) seropositiv dar. Bei Altsauen waren zu 60,7% (37 von 61) spezifische Antikörper gegen *M. hyopneumoniae* nachweisbar. Der Unterschied bezüglich des Anteiles seropositiver Sauen zwischen Sauen der ersten Parität und Sauen höherer Paritäten war nicht signifikant ($p= 0,854$).

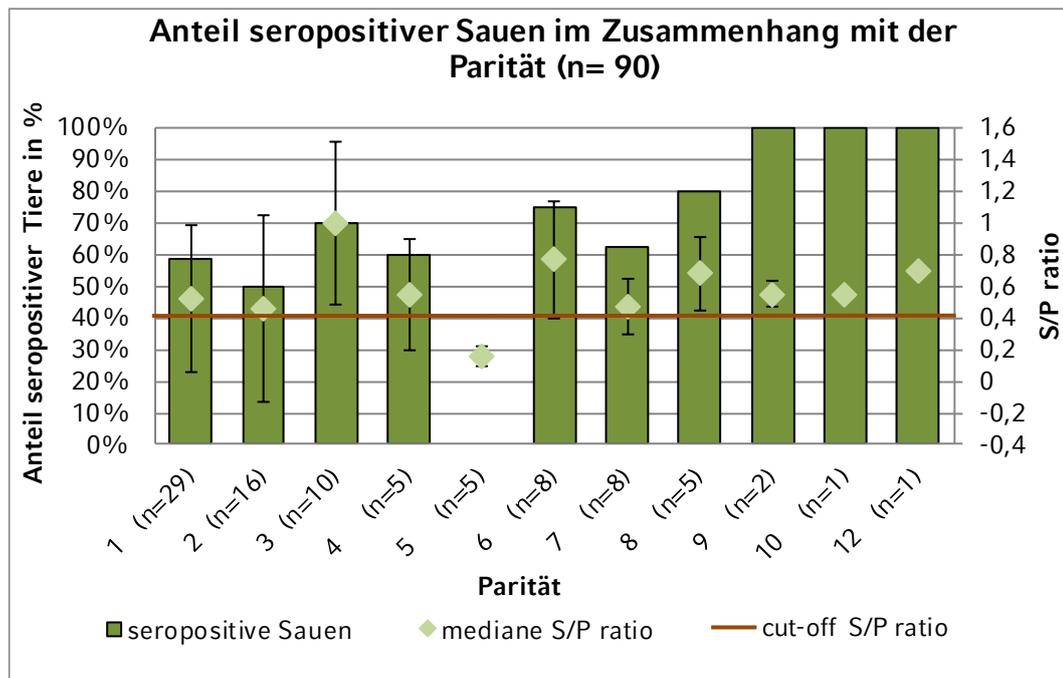


Abbildung 1: Anteil seropositiver Sauen und deren mediane S/P ratios mit Standardabweichung im Zusammenhang mit der Parität

Bei ausschließlicher Betrachtung der Bestände, die ihre Sauen nicht gegen *M. hyopneumoniae* impften, waren 14/25 (56,0%) Jungsauen und 23/45 (51,1%) der Muttertiere der 2. oder höheren Parität seropositiv.

In 19/29 Würfen (65,5%) primiparer Sauen konnte mindestens ein seropositives Ferkel nachgewiesen werden, in den 61 untersuchten Würfen von Altsauen wurden 42 (68,9%) als positiv eingestuft.

Primiparen Sauen konnten 145 der 450 Ferkelblutproben (32,2%) zugeordnet werden. In 77/145 (53,1%) dieser Ferkel-Serumproben wurden Antikörper gegen *M. hyopneumoniae* mittels ELISA nachgewiesen. 159/305 (52,1%) Ferkel von Sauen mit höherer Parität waren seropositiv. Das Vorkommen seropositiver Ferkel unterschied sich hinsichtlich des Status des Muttertieres als Jung- oder Altsau nicht signifikant ($p = 0,847$). Der Anteil seropositiver Ferkel in Zusammenhang mit der Parität des Muttertieres, ist in Abbildung 2 graphisch dargestellt.

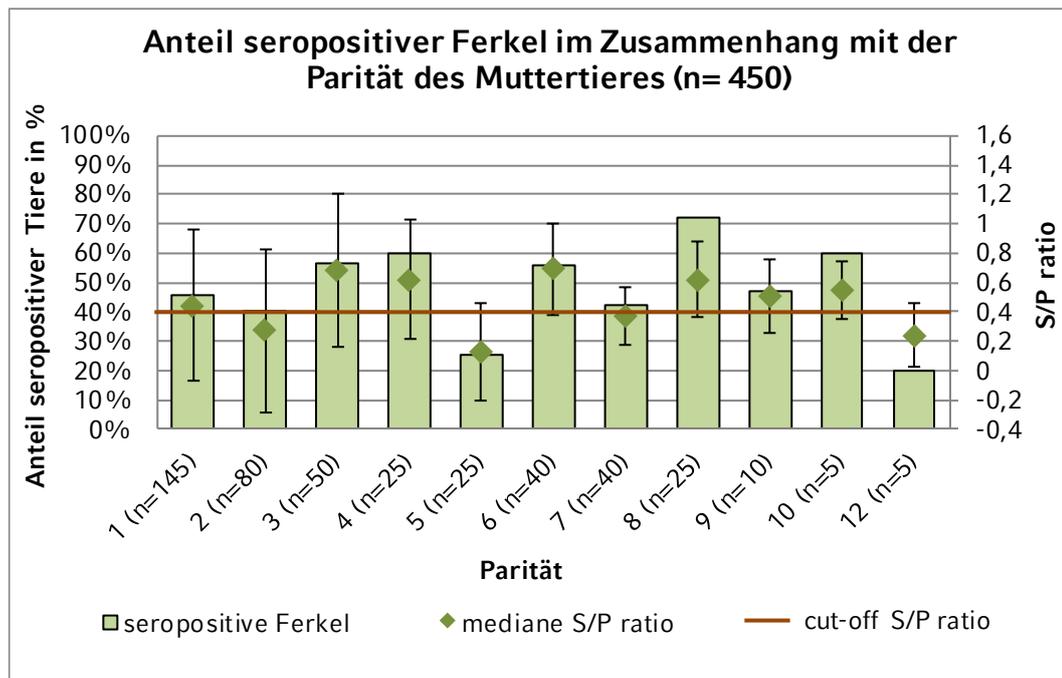


Abbildung 2: Anteil seropositiver Ferkel, medianer S/P Wert und Standardabweichung in Zusammenhang mit der Parität des Muttertieres

2.1.3. ELISA Ergebnisse in Zusammenhang mit *M. hyopneumoniae* Impfstatus der Sau

Eine Impfung der Sauen gegen *M. hyopneumoniae* fand in 2 von 9 (22,2%) Beständen statt. Betrieb 3 impfte zugekaufte Jungsauen im Zuge der Akklimation, Betrieb 6 führte sowohl eine Impfung der Tiere im Zuge der Akklimation, als auch regelmäßig produktionsorientiert durch. Aus den 7 Beständen ohne Muttertierimpfung waren 37 von 70 Sauen (52,9%) seropositiv. Davon unterschied sich der Anteil seropositiver Muttertiere aus den zwei Impfbeständen signifikant ($p= 0,010$): spezifische IgG-Antikörper gegen *M. hyopneumoniae* waren bei 17 von 20 (85%) untersuchten Muttersauen mittels ELISA nachweisbar.

Der Einfluss der Muttertierimpfung gegen *M. hyopneumoniae* im Hinblick auf den Nachweis von Antikörpern gegen *M. hyopneumoniae* mittels ELISA aus Serumproben der Ferkel stellte sich im Chi²-Test ebenfalls als signifikant dar ($p < 0,001$). In Impfbetrieben waren 75 von 100 Ferkeln (75%) seropositiv, in Beständen die keine Vakzination der Muttertiere durchführten lag der Anteil seropositiver Ferkel bei 161 von 350 (46,0%). In den zwei Impfbetrieben war mindestens ein seropositives Ferkel in jedem der 20 Würfe (100%) zu finden, in den restlichen sieben Beständen

ohne Muttertierimpfung verteilten sich seropositive Ferkel dagegen auf 41 von 70 (58,6%) Würfen. Der Anteil seropositiver Ferkel von seropositiven Sauen aus nicht-Impfbeständen lag bei 79,5%, der Anteil seropositiver Ferkel von seropositiven Sauen aus Impfbeständen bei 76,5%. Dieser Unterschied war nicht signifikant.

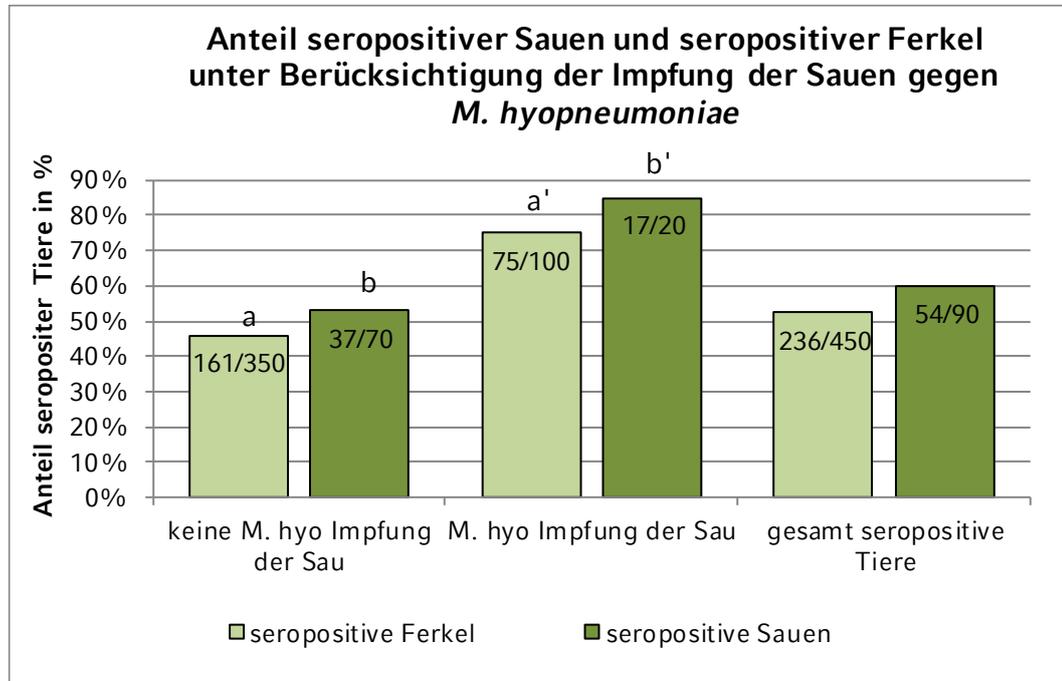


Abbildung 3: Vorkommen seropositiver Sauen bzw. Ferkel in Abhängigkeit vom Impfstatus der Muttersau bezüglich *M. hyopneumoniae*. aa': $p < 0,001$; bb': $p = 0,010$

Minimale und maximale S/P ratios sowie Mittelwert und Median sind in Tabelle 13 vergleichend für *M. hyopneumoniae* geimpfte und nicht geimpfte Sauen sowie für Ferkel von Beständen mit oder ohne *M. hyopneumoniae* Impfung der Muttertiere, aufgelistet.

Tabelle 13: Mittelwert, Median, Minimum, Maximum, und Standardabweichung der S/P ratios geimpfter und ungeimpfter Sauen sowie von Ferkeln, die von Beständen mit bzw. ohne Muttertierimpfung gegen *M. hyopneumoniae* stammen

Tiergruppe	MW	MD	Min	Max	SD
Muttertiere mit <i>M. hyopneumoniae</i> Impfung	0,704	0,615	0	1,70	0,428
Muttertiere ohne <i>M. hyopneumoniae</i> Impfung	0,615	0,510	0,08	2,00	0,453
Ferkel von Beständen mit <i>M. hyopneumoniae</i> Impfung bei Sauen	0,793*	0,660	0,06	1,76	0,467
Ferkel von Beständen ohne <i>M. hyopneumoniae</i> Impfung bei Sauen	0,514*	0,355	0	2,28	0,444

*Signifikanzniveau $p < 0,001$

Der Unterschied bezüglich der Höhe der S/P ratios von Muttertieren mit bzw. ohne Impfung gegen *M. hyopneumoniae* stellte sich als nicht signifikant dar. Die medianen S/P ratios der Ferkel von Beständen mit und ohne *M. hyopneumoniae* Impfung der Sauen unterschieden sich im Mann-Whitney-U-Test signifikant ($p < 0,001$). Dies galt gleichermaßen für Ferkel von Altsauen ($p < 0,001$) sowie von Jungsauen ($p = 0,044$).

2.1.4. EP-Läsionen in Abhängigkeit von ELISA Ergebnissen

Lungen von Endmasttieren aller Bestände wurden vor Einschluss in die Studie am Schlachthof auf EP-Läsionen untersucht. Die Klassifikation der Läsionen basierte auf der Methode von MADEC und KOBISCH (1982). Die erhobenen EP Indices nahmen Werte zwischen 0,15 und 3,43 ein, der Mittelwert betrug 1,86 (MD:1,84; SD: 1,041). Die Verteilung seropositiver Sauen und Ferkel Hinblick auf die zuvor erhobenen EP-Läsionen am Schlachthof ist in Abbildung 4 zusammengefasst.

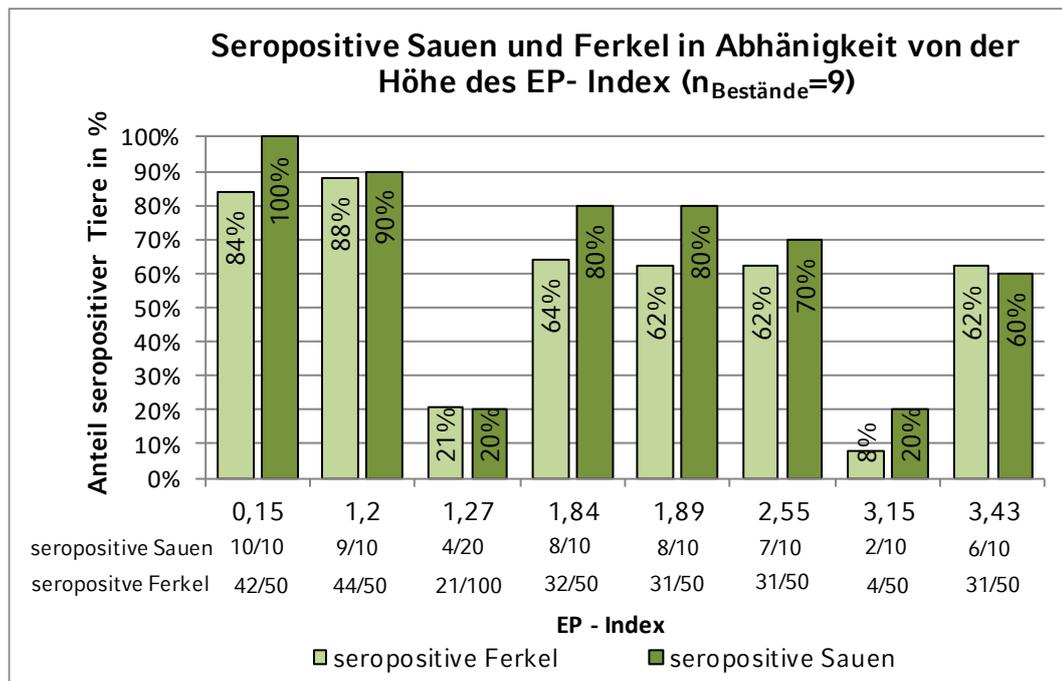


Abbildung 4: Anteil seropositiver Tiere im Zusammenhang mit der Höhe des EP-Index

Die an Schlachtlungen ermittelten Indices stellten sich als normalverteilt dar. Bei 31/50 (62,0%) Sauen konnten S/P ratios über dem cut-off von 0,4 nachgewiesen werden, wenn der EP-Index über dem Mittelwert lag. Somit konnten dort anteilig mehr seropositive Sauen detektiert werden, als in Betrieben mit EP-Index $\leq 1,86$, bei denen 23/40 (57,5%) Sauen seropositiv waren. Lag der EP-Index unter dem Mittelwert, waren bei 139/250 (55,6%) Ferkeln Antikörper gegen *M. hyopneumoniae* nachweisbar, bei Werten darüber waren 97/200 (48,5%) der Ferkel seropositiv. Die Unterschiede des Anteiles seropositiver Sauen bzw. seropositiver Ferkel im Zusammenhang mit einem EP-Index über bzw. unter dem Median waren im Chi²-Test allerdings nicht signifikant (Sauen: $p= 0,665$, Ferkel: $p= 0,134$). Bei Untersuchung der EP-Indices auf Korrelation mit dem Anteil seropositiver Tiere, konnte weder bei Ferkeln noch bei Sauen ein signifikanter Zusammenhang zwischen EP-Index und Anteil der Tiere mit Antikörpern gegen *M. hyopneumoniae* festgestellt werden (siehe Tabelle 14).

Tabelle 14: Korrelation des EP-Index mit dem Anteil seropositiver Sauen und seropositiver Ferkel

Korrelation EP-Index mit	Korrelationskoeffizient ρ	Signifikanz p
Anteil seropositiver Sauen (%)	-0,462	0,210
Anteil seropositiver Ferkel (%)	-0,409	0,275

2.1.5. ELISA Ergebnisse im Zusammenhang mit dem Husten-Index

Während des Bestandsbesuches wurde bei Mastschweinen im Alter von 22-24 LW ein Hustenindex erhoben. Dazu wurden, wie bei NATHUES et al. (2012b) beschrieben, mindestens 20 Tiere von einer oder zwei benachbarten Buchten aufgetrieben und durch Rufen und Klatschen zur Bewegung angehalten. Daraufhin wurde die Anzahl der Hustenstöße über 3 Minuten ausgezählt. Dieses Vorgehen wurde nach einer Minute Pause wiederholt. Mit einer zweiten Gruppe ≥ 20 Tieren aus demselben Stallabteil aber aus anderen Buchten wurde auf gleiche Weise verfahren. Anschließend konnte der Hustenindex folgendermaßen berechnet werden:

$$HI = \frac{\text{Anzahl gezählter Hustenstöße}}{\text{Anzahl untersuchter Tiere} \cdot \text{Untersuchungszeit (min)}} \cdot 100$$

Dieser nahm Werte von 0,00 bis 2,60 an und lag Median bei 0,5 (MW: 1,00; SD: 1,05). Die Verteilung seropositiver Tiere im Hinblick auf die Höhe der erhobenen Hustenscores ist in Abbildung 5 dargestellt.

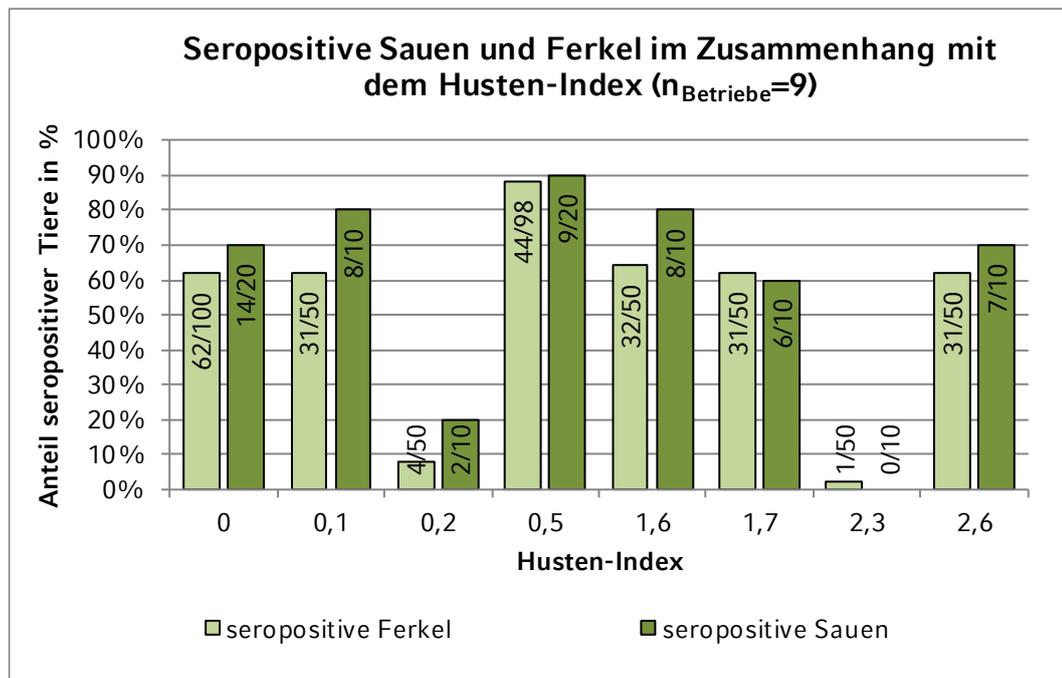


Abbildung 5: Anteil seropositiver Sauen und Ferkel in Abhängigkeit erhobener Husten-Indices

Die Tiere wurden anschließend in zwei Gruppen aufgeteilt: in Schweine, die aus Betrieben mit Hustenindices $\leq 0,5$ stammten und in Tiere, deren Bestände Hustenindices $> 0,5$ erreichten. Hierauf erfolgte eine Untersuchung, ob sich der Anteil seropositiver Tiere in den beiden Gruppen unterscheidet. Stammten sie von Beständen mit einem HI $\leq 0,5$ konnten numerisch bei mehr Sauen Antikörper gegen *M. hyopneumoniae* nachgewiesen werden, als in Beständen mit höherem HI. Bei Ferkeln waren tendenziell mehr seropositive Tiere in Beständen mit HI unter dem Median zu detektieren. Allerdings unterschied sich der Anteil seropositiver Tiere in den zwei gebildeten Gruppen weder bei Sauen noch bei Ferkeln signifikant. Die genaue Verteilung ist in Tabelle 15 zusammengefasst.

Tabelle 15: Verteilung *M. hyopneumoniae* seropositiver Tiere auf Bestände mit HI über bzw. unter dem Median

Tiergruppe	Hustenindex		p-Wert
	HI $\leq 0,5$	HI $> 0,5$	
seropositive Sauen	33/50 (66,0%)	21/40 (52,5%)	p= 0,194
seropositive Ferkel	141/250 (56,4%)	95/200 (47,5%)	p= 0,060

Ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Anteil seropositiver Sauen bzw. Ferkel und den Hustenindices konnte nicht dargestellt werden.

2.2. Molekularbiologische Untersuchung von Larynx tupfern und Tracheobronchial tupfern mittels real-time PCR

Für den direkten Erregernachweis von *M. hyopneumoniae* wurden Muttersauen mit Larynx tupfern beprobt und diese mittels real-time PCR untersucht. Je Sau erfolgte bei fünf Ferkeln die Probengewinnung mit Hilfe eines Tracheobronchial tupfers, der ebenso mittels real-time PCR auf *M. hyopneumoniae* spezifische Genomfragmente untersucht wurde. Von den 10 untersuchten Beständen, stellten sich 4 (40%) mittels real-time PCR *M. hyopneumoniae* positiv dar. *M. hyopneumoniae* positive Larynx tupfer von Muttersauen wurden in 3 von 10 (30%) Beständen nachgewiesen. Ferkel-Tracheobronchial tupfer mit Nachweis von *M. hyopneumoniae* spezifischen Genomfragmenten waren hingegen nur in einem Bestand zu detektieren (10%). In keinem Betrieb konnten *M. hyopneumoniae* positive Tupfer sowohl von Sauen, als auch von Ferkeln nachgewiesen werden. Innerhalb der untersuchten Herden ergab sich aus dem molekularbiologischen Nachweis von *M. hyopneumoniae* mittels real-time PCR auf Einzeltierebene eine Prävalenz von 4% in der untersuchten Sauenpopulation und 0,6% in der Ferkelpopulation. Die Verteilung der molekularbiologisch positiven Tiere ist in Tabelle 16 dargestellt.

Tabelle 16: Vorkommen mittels real-time PCR *M. hyopneumoniae* positiver LaT bei Sauen bzw. TBS bei Ferkeln

Bestand	positive Sauen	Ct-Wert	positive Ferkel	Ct-Wert
1	0/10 (0%)	/	0/50 (0%)	/
2	0/10 (0%)	/	0/50 (0%)	/
3	0/10 (0%)	/	0/50 (0%)	/
4	0/10 (0%)	/	0/50 (0%)	/
5	0/10 (0%)	/	0/50 (0%)	/
6	0/10 (0%)	/	0/50 (0%)	/
7	0/10 (0%)	/	3/50 (6%)	(39/37/38)
8	1/10 (10%)	34	0/50 (0%)	/
9	1/10 (10%)	33	0/50 (0%)	/
10	2/10 (20%)	36/34	0/50 (0%)	/
Σ	4/100 (4%)		3/500 (0,6%)	

In der folgenden Tabelle (Tabelle 17) sind Ct-Werte der Sauen und Ferkel mit molekularbiologischem Nachweis von *M. hyopneumoniae*, ihr serologischer Status sowie zusätzlich bei Ferkeln der serologische Status des Muttertieres aufgeführt.

Tabelle 17: Ct-Werte mittels real-time PCR *M. hyopneumoniae* positiver Larynx- bzw. Tracheobronchialtupfer und S/P ratios

Betrieb	Tier-ID	Ct-Wert PCR	S/P ratio ELISA Ferkel	S/P ratio ELISA Muttersau
7	Ferkel 2.1	39	0,87	1,20
7	Ferkel 7.3	37	0,51	0,38
7	Ferkel 10.1	38	0,27	0,28
8	Sau 3	34	0,20	/
9	Sau 3	33	0,98	/
10	Sau 4	36	1,80	/
10	Sau 5	34	1,44	/

2.2.1. Zusammenhang zwischen PCR Ergebnissen von Sauen und Ferkeln

Ferkel, in deren Tracheobronchialtupfer *M. hyopneumoniae* spezifische Genomfragmente mittels real-time PCR nachgewiesen wurden, stammten alle von einem Bestand (Nr. 7). In den Larynxtupfern der Muttersauen der drei *M. hyopneumoniae* positiven Ferkel konnte keine DNA des Erregers detektiert werden. Es konnte kein Zusammenhang zwischen dem molekularbiologischen Nachweis von *M. hyopneumoniae* aus Larynxtupfern der Sauen und aus den Tracheobronchialtupfern der Ferkel hergestellt werden.

2.2.2. Zusammenhang zwischen Ergebnissen der real-time PCR und des ELISAs

Alle vier Bestände mit Nachweis von *M. hyopneumoniae* DNA mittels real-time PCR waren auch serologisch mittels ELISA *M. hyopneumoniae* positiv. Der Unterschied hinsichtlich der Seroprävalenz zu den sechs mittels real-time PCR *M. hyopneumoniae* negativen Betrieben, von denen einer (16,7%) seronegativ und fünf (83,3%) seropositiv waren, war nicht signifikant.

Von den insgesamt vier Sauen mit direktem Nachweis von *M. hyopneumoniae* mittels real-time PCR im Larynxtupfer, waren drei (75%) seropositiv. Bei zwei der drei (66,7%) Ferkel mit Nachweis von *M. hyopneumoniae* DNA im Tracheobronchialtupfer, wurden mittels ELISA Antikörper gegen *M. hyopneumoniae* detektiert. Die Häufigkeitsverteilung von molekularbiologisch *M. hyopneumoniae* positiven Tieren unterschied sich in den Gruppen der seropositiven und seronegativen Tieren sowohl bei Sauen ($p= 0,390$) als auch bei Ferkeln ($p= 0,502$) nicht signifikant.

Bei Betrachtung des serologischen Status der Ferkel konnten bei 15/20 (75%) Ferkeln, von Sauen mit *M. hyopneumoniae* Nachweis mittels real-time PCR, Antikörper gegen *M. hyopneumoniae* nachgewiesen werden. Dies waren signifikant mehr als von Sauen, deren Tupfer *M. hyopneumoniae* negativ waren ($p= 0,012$). In diesem Fall waren 221/478 (46,2%) der Ferkel seropositiv.

2.2.3. Ergebnisse der real-time PCR in Zusammenhang mit der Parität

Für diese und alle weiteren Berechnungen im Zusammenhang mit den real-time PCR Ergebnissen wurde Bestand 1 ausgeschlossen, weil er wegen fehlendem Nachweis von Antikörpern und Genomfragmenten als *M. hyopneumoniae* unverdächtig galt.

In drei von 29 Larynxtupfern (10,3%) von Jungsauen konnten spezifische *M. hyopneumoniae* Genomfragmente mittels real-time PCR nachgewiesen werden. Bei Sauen der zweiten Parität und höher war ein Tupfer von 61 (1,1%) mittels real-time PCR *M. hyopneumoniae* positiv. Larynxtupfer von Jungsauen stellten sich tendentiell ($p= 0,061$) häufiger mittels real-time PCR *M. hyopneumoniae* positiv dar, als von Altsauen. Von insgesamt vier mittels real-time PCR *M. hyopneumoniae* positiven Larynxtupfern waren drei (75%) Sauen der ersten Parität zuzuordnen und einer einem Tier der 6. Parität (25%).

Zwei der mittels real-time PCR *M. hyopneumoniae* positiven Tracheobronchialtupfer (66,7%) stammten von Ferkeln, die Jungsauen zugeordnet werden konnten. Ein weiteres Ferkel (33,3%), mit

molekularbiologischem *M. hyopneumoniae* Nachweis im Tupfer, stammte von einer Altsau ab. Es konnte kein signifikanter Unterschied in der Häufigkeit des Nachweises real-time PCR positiver Tracheobronchialtupfer hinsichtlich der Abstammung der Ferkel von einer Sau der ersten oder höheren Parität festgestellt werden ($p=0,200$).

2.2.4. Ergebnisse der real-time PCR nach Impfstaus der Sau bezüglich *M. hyopneumoniae*

Alle 4 Betriebe, auf denen *M. hyopneumoniae* mittels real-time PCR in Tupfern nachgewiesen wurden, führten keine Sauenimpfung gegen den Erreger durch. Von den restlichen 5 Betrieben, ohne positive real-time PCR Befunde, impften 2 (40,0%) ihre Sauen gegen *M. hyopneumoniae*. Es konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Impfung der Sauen gegen *M. hyopneumoniae* und der Einordnung eines Bestandes als *M. hyopneumoniae* positiv oder negativ dargestellt werden ($p=0,151$).

2.2.5. real-time PCR Ergebnisse im Zusammenhang mit dem EP Index

Die EP-Indices stellten sich im Kolmogorov-Smirnov-Test als normalverteilt dar. Es wurde deshalb anschließend zwischen Betrieben mit EP-Index über bzw. unter dem Mittelwert von 1,86 unterschieden. Bei der Unterteilung der Betriebe war kein Unterschied hinsichtlich der Anzahl der real-time PCR positiven Betriebe zu erkennen. Je zwei Betriebe mit molekularbiologischem Nachweis von *M. hyopneumoniae* waren in beiden Gruppen vertreten.

Von insgesamt 90 Sauen kamen 40 (44,4%) aus Betrieben mit einem EP Index $> 1,86$. Unter diesen befanden sich 3/4 der Sauen (75%), an deren Larynxtupfern spezifische *M. hyopneumoniae* Genomfragmente mittels real-time PCR nachgewiesen werden konnten. Aus Beständen mit niedrigerem EP-Index als dem Mittelwert stammten 25% (1/4) der real-time PCR positiven Larynxtupfer der Sauen. Die Häufigkeitsverteilung der *M. hyopneumoniae* positiven real-time PCR Befunde unterschied sich zwischen den beiden Gruppen nicht signifikant ($p=0,208$).

Die drei mittels real-time PCR *M. hyopneumoniae* positiven Tracheobronchialtupfer (100%) der Ferkel stammten alle von einem

Bestand, dessen EP-Index unter 1,86 lag. In keinem Bestand mit EP Index über 1,86 konnte *M. hyopneumoniae* mittels real-time PCR in Tracheobronchialtupfern nachgewiesen werden. Es war kein signifikanter Unterschied in der Häufigkeit des direkten *M. hyopneumoniae* Nachweises aus Tracheobronchialtupfern in Bezug auf die Höhe des EP-Index zu sehen ($p=0,120$).

2.2.6. Ergebnisse der PCR im Zusammenhang mit dem Husten-Index (HI)

3 der 4 (75%) Betriebe mit direktem Erregernachweis aus Tupfern mittels real-time PCR hatten einen $HI \leq 0,5$. Der vierte Betrieb mit Nachweis von spezifischen *M. hyopneumoniae* Genomfragmenten hatte einen HI von 2,6. Ein signifikanter Zusammenhang konnte zwischen HI und molekularbiologisch *M. hyopneumoniae* positiven Betrieben nicht dargestellt werden. Die Verteilung der *M. hyopneumoniae* positiven Sauen und Ferkel ist in Tabelle 18 dargestellt.

Tabelle 18: Direkter Erregernachweis von *M. hyopneumoniae* mittels real-time PCR in Beständen mit HI über bzw. unter dem Median

Tier	Hustenindex		p-Wert
	$HI \leq 0,5$	$HI > 0,5$	
PCR positive Sauen	2/50 (4,0%)	2/40 (5,0%)	$p=0,819$
PCR positive Ferkel	3/250 (1,2%)	0/3 (0,0%)	$p=0,120$

2.3. Molekularbiologische Untersuchung von oral fluids (OFs) mittels real-time PCR

Unter Verwendung von Kaustricken wurden in allen Betrieben oral fluids bei Tieren in Aufzucht und Mast gewonnen. OFs wurden mittels real-time PCR auf das Vorkommen von *M. hyopneumoniae* spezifischen Genomfragmenten untersucht. Pro Altersgruppe wurden 10 Kaustricke in den Buchten aufgehängt. Durch zu starke Verschmutzung oder zu wenig Speichel an einzelnen Stricken konnten von insgesamt 400 Proben 348 ausgewertet werden. Diese verteilten sich auf Tiere der 6. ($n=89$), 12. ($n=89$), 16. ($n=86$) und 20. ($n=84$) Lebenswoche.

In neun von zehn Betrieben (90%) war mindestens eine Sammelspeichelprobe mittels real-time PCR als *M. hyopneumoniae* positiv. In insgesamt 40 (11,5%) von 348 OFs konnten spezifische *M. hyopneumoniae* Genomfragmente mittels real-time PCR detektiert werden, wobei positive Proben aus allen vier untersuchten Altersstufen stammten (siehe Abbildung 6 und Abbildung 7). Der Anteile positiver OFs der Bestände sind in Tabelle 19 dargestellt.

Tabelle 19: Nachweis von *M. hyopneumoniae* mittels real-time PCR in OFs von Tieren in Aufzucht und Mast

Bestand	Husten-Index	EP-Index	positive OFs
1	0,50	0,68	1/36 (2,8%)
2	2,2	1,27	7/36 (19,4%)
3	0,10	1,89	1/37 (2,7%)
4	1,60	1,84	8/37 (21,6%)
5	1,70	3,34	10/37 (27,0%)
6	0,50	1,20	4/33 (12,1%)
7	0,00	1,27	1/38 (2,6%)
8	0,20	3,15	6/32 (18,8%)
9	0,00	0,15	2/34 (5,9%)
10	2,6	2,55	0/28 (0%)
Σ			40/348 (11,5%)

Die Nachweishäufigkeit von *M. hyopneumoniae* mittels real-time PCR in den einzelnen Altersstufen ist in nachfolgender Grafik (Abbildung 6) für jeden Bestand dargestellt. Bestand 10 ist nicht abgebildet, da in keiner Sammelspeichelprobe spezifische Genomfragmente für *M. hyopneumoniae* nachgewiesen werden konnten.

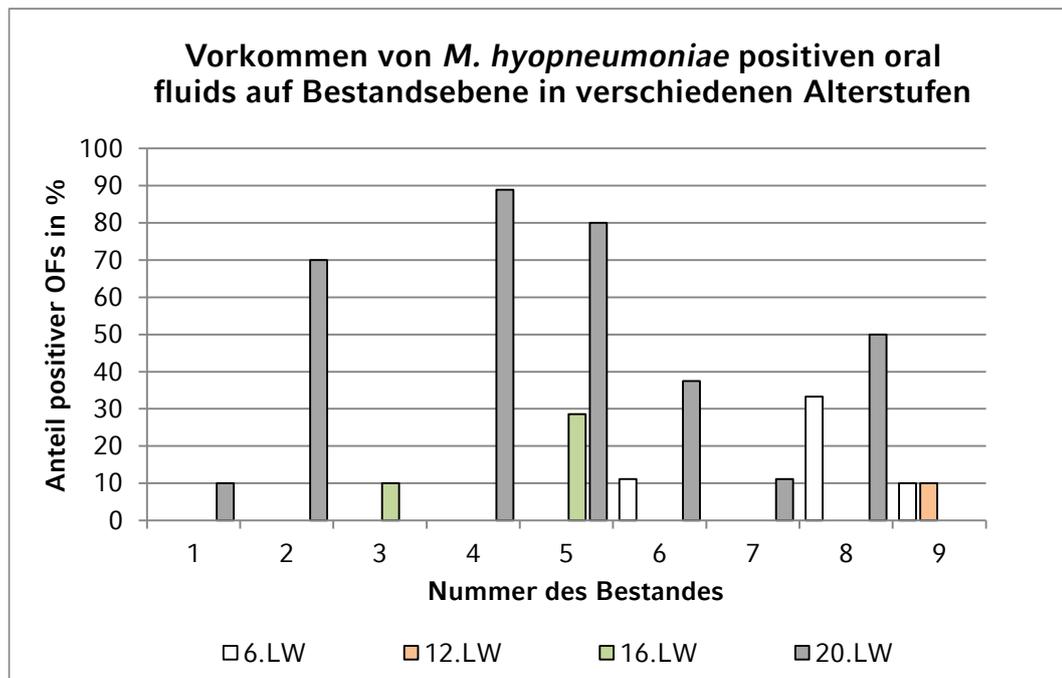


Abbildung 6: Untersuchung von Kastricken mittels real-time PCR auf das Vorkommen von *M. hyopneumoniae* im OFs von Aufzucht- und Masttieren. Darstellung positiver SammelSpeichelproben in der 6./12./16./20. Lebenswoche (LW) auf Bestandsebene.

Bei der Betrachtung der OFs unabhängig von der Bestandsherkunft, stellten sich in der 6. LW 5/89 (5,6%), in der 12. LW 1/89 (1,1%), in der 16. LW 3/86 (3,5%) und in der 20. LW 31/84 (36,9%) mittels real-time PCR als *M. hyopneumoniae* positiv dar. Der Anteil von OFs mit molekularbiologischem Nachweis von *M. hyopneumoniae* in der 20. LW war signifikant höher als in Proben aus 6./12. oder 16. LW ($p < 0,001$). Tendenziell stellten sich SammelSpeichelproben aus der 6. LW häufiger positiv dar, als in der 12. LW ($p = 0,097$). Das Vorkommen positiver OFs je Altersstufe ist in Abbildung 7 dargestellt.

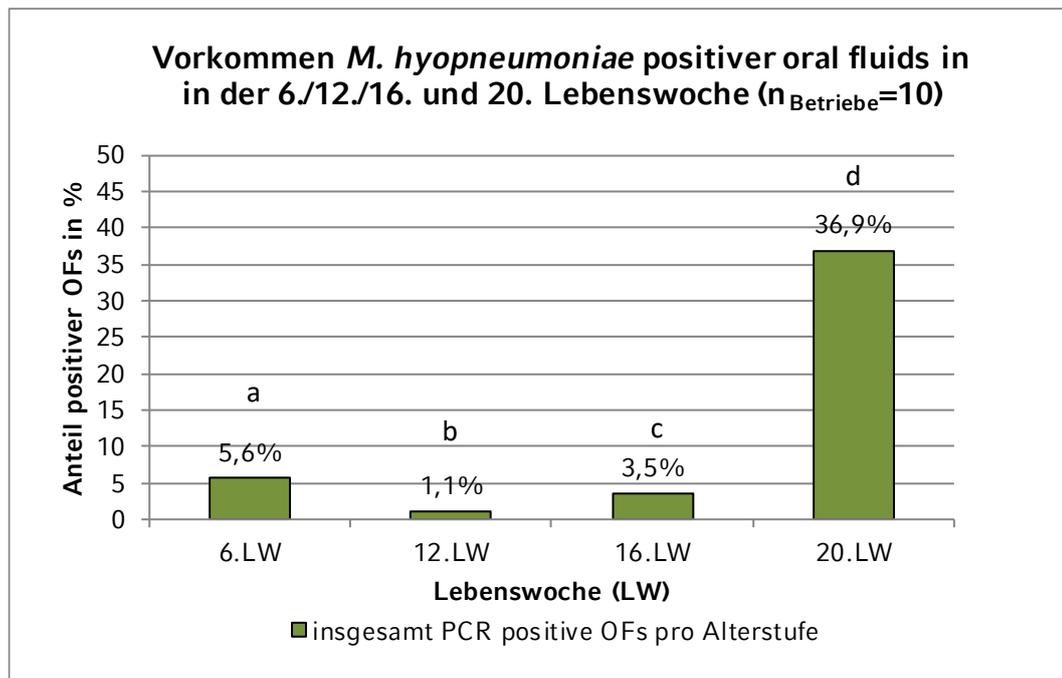


Abbildung 7: Darstellung des Anteiles mittels real-time PCR *M. hyopneumoniae* positiven oral fluids in den verschiedenen Altersstufen. ad, bd, cd: $p < 0,001$; ab: $p = 0,097$

Die Ct-Werte der mittels real-time PCR *M. hyopneumoniae* positiven OFs, stellten sich als normalverteilt dar und nahmen Werte zwischen 27,9 und 39,7 (MW: 34,35; SD: 2,34) an. Minima und Maxima sowie Mittelwerte und Standardabweichungen in den verschiedenen Altersklassen sind in Tabelle 20 zusammengefasst.

Tabelle 20: Mittelwerte, Minima, Maxima und Standardabweichungen der Ct-Werte der OFs aufgeteilt nach Altersklassen

LW	MW	Min	Max	SD
6	34,4	31,9	37,8	2,28
12	36,9	36,9	36,9	0
16	35,1	33,0	37,1	2,06
20	34,2	27,9	39,7	2,41

Bei der Untersuchung des prozentualen Anteils positiver OFs im Bestand im Zusammenhang mit den Husten- bzw. EP-Indices konnten keine signifikanten Korrelationen dargestellt werden.

V. DISKUSSION

1. Serologie

Der Anteil *M. hyopneumoniae* seropositiver Herden wird in Deutschland auf über 90% geschätzt (GROSSE BEILAGE et al., 2013). In Übereinstimmung damit waren in vorliegender Studie in 9 von 10 Beständen bei mindestens einem Tier spezifische IgG-Antikörper gegen *M. hyopneumoniae* mittels ELISA nachweisbar. Insgesamt waren 54% der Sauen und 47,7% der Ferkel seropositiv, die mittlere Prävalenz seropositiver Tiere pro Betrieb betrug 42% in der Sauen- und 47,2% in der Ferkelpopulation. Hingegen konnten GROSSE BEILAGE et al. (2009) in einer Querschnittsstudie bei der Untersuchung von Sauen aus 67 Beständen in Nordwestdeutschland bei 11% mehr Sauen *M. hyopneumoniae* Antikörper nachweisen. Von Bedeutung könnte hierbei der Zeitpunkt der Blutentnahme sein, da Serumantikörper der Sau um die Geburt signifikant sinken (NATHUES et al., 2013b) und über das Kolostrum an die Ferkel abgegeben werden (WALLGREN et al., 1998; RAUTIAINEN & WALLGREN, 2001). Dementsprechend konnten NATHUES et al. (2013b) 3 Wochen vor dem Abferkeltermin bei 77,7% der untersuchten Sauen Antikörper gegen *M. hyopneumoniae* nachweisen, nach der Abferkelung nur noch bei 53,2%. In weiteren Untersuchungen lag der Anteil seropositiver Sauen eine Woche p.p. noch deutlich niedriger (27,5%) (SIBILA et al., 2007b). Deshalb entnahmen GROSSE BEILAGE et al. (2009) Serumproben am 20.-90. Tag der Trächtigkeit, um eine Beeinflussung der Antikörpertiter durch die Abferkelung auszuschließen. Dagegen fand die Probenentnahme in vorliegender Studie ca. 20 Tage nach der Abferkelung statt, wodurch die geringeren Antikörpertiter im Serum erklärt werden können.

Am Tag der Probenentnahme hatten die Ferkel ein medianes Alter von 20 Tagen (SD: 1,84) und waren zu 47,4% seropositiv. Sehr wahrscheinlich waren nachgewiesene spezifische IgG-Antikörper gegen *M. hyopneumoniae* maternale Antikörper, da für diese eine Halbwertszeit von 15,8 Tagen beschrieben ist (MORRIS et al., 1994). Zwar wäre der

Nachweis von Antikörpern im Serum der Ferkel auch durch eine frühe Infektion mit *M. hyopneumoniae* erklärbar, da Muttersauen als wichtige Quelle der Übertragung des Erregers auf ihre Nachkommen angesehen werden (FANO et al., 2007), jedoch wurde in den 10 untersuchten Beständen mittels real-time PCR aus Tracheobronchialtupfern von Ferkeln nur in 0,6% der untersuchten Proben DNA des Erregers festgestellt. Zudem benötigten Tiere zur Serokonversion zwar in Infektionsversuchen teilweise nur 8 Tage (SØRENSEN et al., 1997), im Feldversuch konnten Antikörper als Antwort auf eine Infektion aber erst nach ca. 21 Tagen bei einzelnen Tieren nachgewiesen (MORRIS et al., 1995a).

Des Weiteren unterschied sich in vorliegender Studie der Anteil seropositiver Ferkel von seropositiven Muttertieren signifikant vom Anteil seropositiver Ferkel seronegativer Muttertiere ($p < 0,001$). Bei 78,5% der Ferkel von seropositiven Sauen waren spezifische IgG-Antikörper gegen *M. hyopneumoniae* nachweisbar, bei Ferkeln von seronegativen Muttertieren hingegen nur bei 10,5%. Untersuchungen von SIBILA et al. (2007b) kamen zu vergleichbaren Werten von 77,5% der seropositiven Ferkel mit Abstammung von seropositiven Sauen. Da es beim Schwein aufgrund der Placenta epitheliochorialis zu keiner diaplazentaren Übertragung von Antikörpern kommt, sind Ferkel im besonderen Maße auf die postpartale Aufnahme von Immunglobulinen mittels Kolostrums angewiesen (ROOKE & BLAND, 2002; HAMEISTER et al., 2010). Zum Zeitpunkt der Geburt können im Kolostrum der Sauen Antikörper in ähnlichen Konzentrationen detektiert werden wie vier Wochen a.p. im Serum (WALLGREN et al., 1998). Da nur Sauen Antikörper in das Kolostrum abgeben können, die einige Wochen vor der Geburt Antikörper gegen *M. hyopneumoniae* besaßen, und die Höhe der Antikörpertiter im Serum innerhalb von vier Wochen p.p. wieder 75% ihres Ausgangszustandes erreicht (WALLGREN et al., 1998), war der sehr viel höhere Anteil seropositiver Ferkel von seropositiven Sauen zu erwarten.

Allerdings stellte sich eine geringe Anzahl an Ferkeln trotz seronegativer Muttersauen mittels ELISA als seropositiv dar (24/288; 10,5%). Dieses Phänomen trat auch in Untersuchungen von SIBILA et al. (2007b) und RUIZ et al. (2003) auf und wurde auf die Durchführung von

Wurfausgleichen in allen teilnehmenden Beständen zurückgeführt. Da ein Ferkelversetzen in allen untersuchten Beständen der vorliegenden Arbeit praktiziert wurde, besteht die Möglichkeit, dass Ferkel bei ihrem seropositivem Muttertier Kolostrum aufnahmen, bevor sie anschließend zu einer anderen seronegativen Sau verbracht wurden. Allerdings kann dies nur vermutet werden, denn es sind keine Informationen darüber, welche Tiere versetzt wurden, vorhanden. Eine weitere Erklärung stellt die zuvor schon thematisierte Verringerung der Antikörperkonzentration im Serum der Sauen im Zeitraum um die Geburt dar, wodurch Antikörpertiter der Muttertiere, die kolostrale Antikörper an die Ferkel abgeben, unter der Nachweisgrenze liegen können (RAUTIAINEN & WALLGREN, 2001). Zwar konnten (WALLGREN et al., 1998) darstellen, dass die Antikörpertiter im Serum der Sauen bis 4 Wochen p.p. wieder auf 75% des Ausgangszustandes anstiegen, allerdings war in diesem Studienbetrieb der Infektionsdruck aufgrund einer akuten *M. hyopneumoniae* Infektion sehr hoch. In vorliegender Studie wird der Infektionsdruck unter Berücksichtigung der geringen Anzahl von direkten Erregernachweisen als gering eingeschätzt, womit eine langsamere Nachbildung und somit ein langsamerer Anstieg der Antikörper im Blut erklärt werden könnte, jedoch wurde dies nicht untersucht.

Die in vorliegender Arbeit festgestellten hohen Korrelationen der S/P ratios von Sauen und Ferkeln ($\rho = 0,786$; $p < 0,001$) in 8 von 10 Beständen, bestätigen den Zusammenhang zwischen der Höhe der Antikörpertiter bei Sauen und Ferkeln, wie schon von LEON et al. (2001) und YAGIHASHI et al. (1993) dargestellt. Dennoch ist es nicht möglich über den serologischen Status der Sau die Serumantikörperkonzentration der Ferkel vorhersagen zu können, da die Höhe der Antikörpertiter der Ferkel zusätzlich von externen Faktoren beeinflusst wird (MORRIS et al., 1994). In Übereinstimmung damit war in zwei Beständen (Nr. 1 und 3) der vorliegenden Untersuchung nur eine geringe ($\rho = 0,398$), bzw. keine Korrelation ($\rho = -0,003$) zwischen dem serologischen Status der Sauen und ihren Nachkommen nachweisbar. In diesen Beständen wurden vermehrt, wie schon zuvor beschrieben, seropositive Ferkel von seronegativen Sauen detektiert, aber auch seronegative Ferkel von seropositiven Sauen. Als

Erklärung hierfür sehen SIBILA et al. (2008) die schon erwähnte Halbwertszeit maternaler Antikörper, sodass im Alter von 3-4 Wochen von sehr niedrigen oder gar keinen vorhandenen Antikörpertitern mehr ausgegangen werden kann. Allerdings konnten WALLGREN et al. (1998) darstellen, dass die Dauer der maternalen Immunität von der Höhe des Antikörpertiters im Serum der Muttersau abhängt und konnten auch bei Ferkeln im Alter von 6,5 Wochen noch Antikörper nachweisen, wenn die Muttertiere vor der Abferkelung hohe Antikörpertiter besaßen. Große Würfe mit mehr Ferkeln als vorhanden Zitzen bei der Sau und einer daraus resultierenden zu geringen Kolostrumaufnahme vor allem der kleineren Ferkel des Wurfes (RAUTIAINEN & WALLGREN, 2001) oder ein postpartales Dysgalaktiesyndrom der Sau, das in den ersten Tagen nach dem Abferkeln zu einer verringerten Kolostrum- und Milchproduktion führt (FARMER et al., 2019), können die Aufnahme maternaler Antikörper zusätzlich beeinflussen. Dies könnte für die fehlende bzw. geringe Korrelation der S/P ratios von Sauen und Ferkeln in den zwei Beständen relevant gewesen sein, jedoch wurden in vorliegender Studie keine Daten hierzu erfasst.

2. Direkter Erregernachweis bei Muttersauen und Saugferkeln

Eine Vielzahl an Studien untersuchte in den letzten Jahren das Vorkommen von *M. hyopneumoniae* im Absetzalter. Die dabei in Europa ermittelten Herdenprävalenzen variieren zwischen 27% (VANGROENWEGHE et al., 2015), 28% (MOORKAMP et al., 2009), 33,6% (FABLET et al., 2012b) der untersuchten Bestände mit *M. hyopneumoniae* Nachweis mittels PCR und 36,8% bei der Untersuchung von 125 Beständen in Nordwestdeutschland (NATHUES et al., 2013a), bis hin zu 68% bei Untersuchung von Beständen in ganz Europa (VILLARREAL et al., 2010). Im Gegensatz dazu zeigte sich in vorliegender Untersuchung eine sehr viel geringere Nachweisrate im Saugferkelalter, als bis jetzt in Deutschland und anderen europäischen Ländern publiziert. Tracheobronchialtupfer, von Ferkeln in der dritten Lebenswoche gewonnen, die mittels real-time PCR *M. hyopneumoniae* positiv waren, konnten nur in 10% der Bestände detektiert werden. Der

Nachweis von positiven Larynx- und Tracheobronchialtupfern bei Sauen gelang in 40% der Bestände. Jedoch ist zu beachten, dass ein Teil der vorangegangenen Studien nur Bestände mit chronischer Hustenproblematik in die Untersuchungen miteinbezogen (MOORKAMP et al., 2009; VILLARREAL et al., 2010) bzw. die schwächsten Ferkel der Würfe beprobt wurden (NATHUES et al., 2013a), sodass ein Vergleich der Prävalenzen aufgrund der unterschiedlichen Ausgangsbedingungen schwierig ist. In vorliegender Studie wurden zwar auch gezielt Betriebe mit bestehender Hustensymptomatik eingeschlossen, allerdings wurden sowohl Bestände mit hohen als auch mittleren EP-Indices am Schlachthof zur Teilnahme ausgewählt. Des Weiteren wurden nur klinisch gesunde Ferkel in die Studie eingeschlossen, wodurch sich eine geringere Nachweisrate als bei der zufälligen Auswahl aus allen oder, wie bei NATHUES et al. (2013a), aus den schwächsten Tieren eines Wurfs erklären lässt. Zusätzlich wurden in zwei Studien Nasentupfer als Ausgangsmaterial für die Untersuchung mittels PCR gewählt (VILLARREAL et al., 2010; NATHUES et al., 2013a). Nasentupfer werden häufig eingesetzt, aufgrund ihrer einfachen Anwendung, jedoch stellen die Nasenhöhlen nicht den natürlichen Lebensraum des Erregers dar (MEYNS et al., 2004). Die Verwendung von NT erlaubt zwar die Feststellung einer Besiedelung mit *M. hyopneumoniae*, eine Infektion ist allerdings nur in Trachea und Bronchien nachzuweisen, da sich der Erreger dort vermehrt (BLANCHARD et al., 1992). Somit könnten die niedrigeren Nachweisraten in vorliegender Studie dadurch erklärt werden, dass durch die Verwendung von Larynx- bzw. Tracheobronchialtupfern nur infizierte Tiere detektiert, und Tiere, bei denen ausschließlich eine Besiedelung der Nasengänge stattfand, nicht miterfasst wurden. Allerdings konnten FABLET et al. (2012b) in ihren Untersuchungen, die (ähnlich wie in vorliegender Arbeit) Ferkel aus Beständen mit unterschiedlich hohen EP-Scores am Schlachthof in der vierten Lebenswoche mittels Tracheobronchialtupfer auf das Vorkommen von *M. hyopneumoniae* untersuchten eine Prävalenz von 33,6% feststellen.

Ebenso stellten sich die innerherdlichen Prävalenzen von *M. hyopneumoniae* mittels PCR-Nachweis in vorliegender Studie mit 0%-

20% (im Mittel 4%) bei Sauen und 0%-6% (im Mittel 0,6%) bei Ferkeln im Alter von 21 ± 3 Tagen im Vergleich zu vorausgegangenen Untersuchungen als deutlich niedriger dar. Allerdings unterscheiden sich auch bisher stattgefundene Untersuchungen in ihren Aussagen zur Prävalenz von *M. hyopneumoniae* im Saugferkelalter deutlich. So wurde in 176 unselektierten Beständen in Belgien und in den Niederlanden mittels Tracheobronchialtupfer 7,1% aller untersuchten Ferkel im Alter zwischen 3 und 5 Wochen als positiv detektiert (VANGROENWEGHE et al., 2015). In französischen Beständen wiesen FABLET et al. (2012b) in 14,1% aller TBS der untersuchten Ferkel mittels PCR *M. hyopneumoniae* in der vierten Lebenswoche nach. In Studien in Deutschland wurde sowohl von einem Nachweis von *M. hyopneumoniae* mittels PCR aus Lungengewebe in nur 2% aller Saugferkelproben berichtet (NATHUES et al., 2010), als auch von einer Prävalenz von 12,3% mittels BAL bei drei Wochen alten Tieren aus Beständen mit chronischer Hustenproblematik (MOORKAMP et al., 2009). In Untersuchungen mittels Nasentupfer wurden Prävalenzen von 3,6% bzw. 3,9% bei Ferkeln, die ca. 3 Wochen alt waren nachgewiesen (NATHUES et al., 2013b; NATHUES et al., 2013a). Ein molekularbiologischer Nachweis von *M. hyopneumoniae* war bei 22,3% der untersuchten Sauen möglich (NATHUES et al., 2013b). Da den in vorliegender Studie verwendeten Larynx- bzw. Tracheobronchialtupfern im direkten Vergleich eine deutlich höhere Sensitivität als Nasentupfern zugesprochen wird (MAROIS et al., 2007; FABLET et al., 2010; PIETERS et al., 2017), scheint das Vorkommen von frühen Infektionen mit *M. hyopneumoniae* im Saugferkelalter in untersuchten deutschen Beständen weniger relevant sein, als angenommen. Allerdings können aufgrund der geringen Anzahl an Studienbetrieben, anhand dieser Ergebnisse keine allgemeingültigen Angaben zu Prävalenzen gemacht werden und sie spiegeln nur die aktuelle Situation auf untersuchten Beständen wieder.

Des Weiteren konnte in vorliegender Untersuchung kein Zusammenhang zwischen dem direkten Nachweis von *M. hyopneumoniae* bei Muttersauen und dem Nachweis bei Ferkeln mittels PCR nachgewiesen werden. Es wurden in den Beständen positive Sauen oder positive Ferkel detektiert,

aber in keinem Fall Sauen und Ferkel mit molekularbiologischem Nachweis von *M. hyopneumoniae*, obwohl in vorangegangenen Studien von NATHUES et al. (2013b) und PIETERS et al. (2014) positive Assoziationen zwischen *M. hyopneumoniae* positiven Sauen und Ferkeln zum Zeitpunkt des Absetzens dargestellt werden konnten. Die Diskrepanz der Ergebnisse ist wahrscheinlich der geringen Probenanzahl sowie den insgesamt niedrigen Nachweisraten für *M. hyopneumoniae* mittels PCR in vorliegender Studie geschuldet.

3. Zusammenhang zwischen serologischen und molekularbiologischen Ergebnissen bei Sauen und Ferkeln

Ein Zusammenhang zwischen dem molekularbiologischen Nachweis von *M. hyopneumoniae* und den serologischen Ergebnissen drei Wochen p.p. konnte in vorliegender Untersuchung weder bei Sauen noch bei Saugferkeln hergestellt werden. Im Gegensatz dazu wiesen SIBILA et al. (2007b) *M. hyopneumoniae* spezifische Genomfragmente hauptsächlich bei seronegativen Ferkeln nach, bei RUIZ et al. (2003) waren alle Sauen und Ferkel mit Nachweis von *M. hyopneumoniae* mittels NT serologisch negativ. Ebenso stellen ARSENAKIS et al. (2019) sowohl signifikant mehr *M. hyopneumoniae* positive Ferkel mittels nPCR dar, als auch deutlich höhere Lungenläsionen nachfolgend am Schlachthof, wenn die Tiere zum Zeitpunkt des Absetzens mittels ELISA als seronegativ eingestuft wurden, als bei seropositiven Ferkeln. Im Kontrast dazu waren in vorliegender Studie numerisch mehr Ferkel (2/3) mit positivem Nachweis mittels PCR zum Zeitpunkt der Beprobung auch seropositiv, allerdings stellte sich dieser Unterschied nicht signifikant dar.

Des Weiteren stammten in eigenen Untersuchungen 2/3 der mittels PCR positiven Ferkel von seronegativen Sauen, allerdings stellte sich der Unterschied ebenfalls nicht signifikant dar. Damit verhalten sich die Ergebnisse vorliegender Arbeit konkordant zu einer vorangegangenen Studie, bei der der Großteil der nPCR positiven Ferkel von seronegativen Sauen abstammte (SIBILA et al., 2007b). SIBILA et al. (2007b) erklären das damit, dass Ferkel mit molekularbiologischem Nachweis von

M. hyopneumoniae von gerade infizierten Sauen abstammen, die aktiv den Erreger ausscheiden und noch nicht serokonvertiert sind. Eine weitere Möglichkeit der Erklärung besteht darin, dass seropositive Sauen im Zeitraum um die Geburt seronegativ werden (NATHUES et al., 2013b). Bedingt durch die Änderung des humoralen Immunstatus könnte es somit zu einer Reaktivierung und erneuten Ausscheidung von *M. hyopneumoniae* kommen. Eine Interpretation der Ergebnisse ist aufgrund der geringen Anzahl PCR positiver Tiere in vorliegender Arbeit allerdings schwierig, zumal in einer weiteren Untersuchung keinen Zusammenhang zwischen Seropositivität der Sauen und positiven PCR Befunden bei Ferkeln beobachtet werden konnte (NATHUES et al., 2013b). Auch Muttersauen mit positivem *M. hyopneumoniae*-Nachweis mittels PCR waren in vorliegender Arbeit zum Großteil (75%) seropositiv. Da keine der seropositiven und zugleich molekularbiologisch *M. hyopneumoniae* positiven Sauen aus einem Betrieb mit Muttertierimpfung stammte, sind detektierte Antikörper dieser Sauen vermutlich die Immunantwort auf eine Infektion mit *M. hyopneumoniae*.

Bei Betrachtung des serologischen Status der Ferkel konnten bei 15/20 (75%) Ferkeln, von Sauen mit *M. hyopneumoniae* Nachweis mittels real-time PCR, Antikörper gegen *M. hyopneumoniae* nachgewiesen werden. Dies waren signifikant mehr als von Sauen, deren Tupfer *M. hyopneumoniae* negativ waren ($p= 0,012$). Dieser Zusammenhang ist aber sehr wahrscheinlich nicht auf den molekularbiologischen Status der Sau zu beziehen, sondern kommt dadurch zustande, dass die Muttersauen, der 15 seropositiven Ferkel ebenfalls seropositiv waren und bei der Muttersau der fünf seronegativen Ferkel auch keine Antikörper gegen *M. hyopneumoniae* nachweisbar waren. Weil, wie schon zuvor erwähnt, Sauen Antikörper über das Kolostrum an ihre Ferkel abgeben (WALLGREN et al., 1998), kommt es zur Korrelation der Antikörpertiter von Sauen und ihren Ferkeln (LEON et al., 2001).

4. EP-Index und Laborergebnisse

Um das Vorkommen von *M. hyopneumoniae* bei Tieren im Alter von ungefähr drei Wochen darzustellen zu können, wurden gezielt Bestände mit Lungenbefunden am Schlachthof ausgewählt. Dazu wurden im Vorfeld an Schlachtpartien von 18 Beständen EP-Indices erhoben. Dabei wird das veränderte Lungengewebe quantifiziert, indem der prozentuale Anteil am Gesamtlungengewebe angegeben wird. Violette bis grau konsolidierte cranioventrale Lungenareale, gelten als die kennzeichnenden makroskopischen Veränderungen bei einer ezootischen Pneumonie (MAES et al., 2008). Jedoch ist zu beachten, dass bestimmte Lungenläsionen zwar typisch für enzootische Pneumonie (EP-like lesions), aber nicht pathognomonisch sind, da auch andere Organismen, wie z.B. IAV, ähnliche Läsionen verursachen können (THACKER et al., 2001).

EP-Läsionen wurden nach dem Score von MADEC und KOBISCH (1982) erhoben, wonach jeder Lungenlappen einzeln bewertet wird und eine Lunge letztendlich 0 (keine Veränderungen) bis 28 (gesamte Lunge verändert) Punkte je nach Schwere der Läsionen erreichen kann. Erhobene EP-Indices in dieser Studie nahmen Werte zwischen 0,15 und 3,43 an, im Mittel lagen sie bei 1,74 und somit im Vergleich mit anderen Studien deutlich niedriger. In Untersuchungen von LUEHRS et al. (2017) wurden EP-Indices für 1000 Lungen aus 20 deutschen Beständen, ebenfalls mit vorberichtlicher Hustenproblematik, erhoben und der Mittelwert erreichte einen Wert von 3,4. Auch in anderen europäischen Ländern lagen die durchschnittlichen EP-Scores höher als in unseren Untersuchungen: FRAILE et al. (2010) beschrieben ohne Vorauswahl auf Husten einen Durchschnittswert von 3,3 in 107 spanischen Beständen, FABLET et al. (2011) detektierte an französischen Schlachthöfen EP-Läsionen in 95% aller Herden, in 44,3% der untersuchten Herden wurden bei über 10% der Tiere EP-Scores über 12 erhoben. Der in unseren Untersuchungen erhaltene, vergleichbar niedrige mittlere EP-Score, könnte einer gewissen Vorselektion geschuldet sein, da die Studie auf freiwilliger Teilnahme der Bestände basierte, oder aber auch ein Indiz für eine allgemeine Verbesserung der Lungengesundheit von deutschen Mastschweinen in den letzten Jahren darstellen. Allerdings benötigen Lungenläsionen 8-12

Wochen bis zur vollständigen Abheilung (SØRENSEN et al., 1997), sodass Auswirkungen einer frühen Infektion in der Aufzucht oder am Anfang der Mastphase in untersuchten Beständen am Schlachthof nicht mehr nachweisbar wären (CALSAMIGLIA et al., 2000). Somit gilt die Erhebung eines EP-Index als wenig verlässlicher Indikator für die Bestimmung von An- oder Abwesenheit von Pneumonien während der gesamten Lebensspanne (SITJAR et al., 1996). Deshalb sind Schlussfolgerungen auf das Vorkommen von *M. hyopneumoniae* durch die alleinige Beurteilung von EP-Läsionen vorsichtig zu treffen und Aussagen können nur für die Beurteilung chronischer Lungenläsionen am Ende der Produktionsphase gemacht werden (NOYES et al., 1990). Eine Diagnose sollte auf dem Vorkommen von EP-like lesions zusammen mit weiteren *M. hyopneumoniae* Nachweismethoden basieren (SIBILA et al., 2009).

Zusammenhänge zwischen der Prävalenz von *M. hyopneumoniae* und EP-Läsionen wurde schon mehrmals untersucht; SITJAR et al. (1996) konnten mittels Röntgenuntersuchungen eine Assoziation zwischen dem Auftreten von Pneumonien und einer darauffolgenden Serokonversion zu Lebzeiten der Schweine darstellen. In zwei weiteren Studien konnte gezeigt werden, dass EP-Läsionen am Schlachthof umso geringer sind, je länger der Zeitpunkt der Serokonversion schon zurückliegt (SØRENSEN et al., 1997; ANDREASEN et al., 2001) Obwohl FANO et al. (2007) eine positive Korrelation zwischen *M. hyopneumoniae* Prävalenz im Absetzalter mittels PCR aus Nasentupfern und EP-assoziierten Läsionen am Schlachthof darstellen konnten, war dieser Zusammenhang in vorliegender Studie nicht darstellbar. Allerdings basieren die Ergebnisse von FANO et al. (2007) auf Verhältnissen aus einem Studienbestand mit getrennten Aufstallungssystemen und striktem AIAO-Prinzip, sodass die Übertagung auf andere Tiere mehr Zeit beansprucht und somit die klinischen Anzeichen der Pneumonie auch erst spät in der Mast zu sehen waren (FANO et al., 2007). Im Gegensatz zu genannten Untersuchungen konnten in vorliegender Arbeit bei der Untersuchung des Anteiles serologisch bzw. molekularbiologisch *M. hyopneumoniae* positiver Tiere im Zusammenhang mit dem EP-Index des Bestandes, keine signifikanten Unterschiede in Beständen mit EP-Index über bzw. unter dem Mittelwert

von 1,86 festgestellt werden. Dass es sich bei allen vorangegangenen Untersuchungen um longitudinale Studien handelte, bei denen Versuchstiere über ihre gesamte Lebenszeit bis zum Schlachthof untersucht wurden (SØRENSEN et al., 1997; ANDREASEN et al., 2001; FANO et al., 2007), könnte ausschlaggebend für diese Diskrepanz der Ergebnisse gewesen sein. In vorliegender Untersuchung hingegen wurden als erstes EP-Indices von einer unabhängigen Schlachtpartie bestimmt, um das Auftreten von EP-assoziierten Lungenläsionen in den Studienbeständen zu verifizieren. Untersucht wurden anschließend Muttersauen und deren Ferkel 3 Wochen post partum. Da auch Umweltbedingungen wie Jahreszeiten und Wetterverhältnisse (Kälte, Niederschlag, etc.) Infektionen mit *M. hyopneumoniae* begünstigen können (SEGALÉS et al., 2012), kann die fehlende zeitliche Übereinstimmung der Erhebung von Lungenläsionen und der Probenentnahme Sauen und Ferkeln ausschlaggebend für das Fehlen einer Korrelation gewesen sein.

5. Parität und Laborergebnisse

Der Einfluss der Parität auf das Vorkommen von *M. hyopneumoniae* in der Sauenpopulation wurde schon in einigen Studien untersucht, allerdings sind die Ergebnisse widersprüchlich: Primipare und Sauen niedriger Paritäten haben entweder niedrigere Antikörpertiter und scheinen den Erreger vermehrt auszuschleiden (MAES et al., 1996; CALSAMIGLIA & PIJOAN, 2000; FANO et al., 2006; BOONSOONGNERN et al., 2012) oder es können keine Unterschiede hinsichtlich der Seropositivität bei Sauen im Zusammenhang mit der Parität festgestellt werden (RUIZ et al., 2003; SIBILA et al., 2007b). In vorliegender Studie wurden Muttertiere der ersten bis zur zwölften Parität eingeschlossen, der Median betrug 2,5. Signifikante Unterschiede bei der Seroprävalenz in Abhängigkeit von der Parität, konnten auch in vorliegender Studie nicht festgestellt werden. Bei der Untersuchung der Blutproben waren Antikörper gegen *M. hyopneumoniae* bei 58,6% der Jungsauen nachweisbar und somit nur numerisch weniger als bei Altsauen (60,7%). Allerdings war in vorliegender Studie eine Tendenz zu häufigerem *M. hyopneumoniae* Nachweis mittels PCR bei Jungsauen zu erkennen, als bei Altsauen: 75%

der *M. hyopneumoniae* positiven Sauen waren der ersten Parität zuzuordnen, nur ein molekularbiologisch positives Muttertier (25%) gehörte der 6. Parität an ($p=0,061$). Diese Ergebnisse decken sich mit denen von CALSAMIGLIA und PIJOAN (2000), die Jungsauen als Hauptausscheider detektierten, allerdings auch Sauen bis zur 7. Parität als Ausscheider und potentielle Übertragungsquelle ansehen. Dies unterstreicht die Rolle der Jungsauen bei der Aufrechterhaltung des Infektionsdruckes im Bestand. Dennoch ist die Aussagekraft der Ergebnisse aus vorliegender Untersuchung aufgrund der sehr geringen Tierzahl (insgesamt 4 *M. hyopneumoniae* positive Sauen) vorsichtig zu beurteilen. Denn im Gegensatz zu den Ergebnissen von CALSAMIGLIA und PIJOAN (2000) und der Tendenz in vorliegender Arbeit, konnte in Untersuchungen von PIETERS et al. (2014) weder eine Korrelation zwischen Parität der Sau und ihrer Besiedelung festgestellt werden, noch zwischen Parität der Sau und der Besiedelung ihrer Ferkel. Ein signifikanter Zusammenhang zwischen Parität der Sau und Prävalenz von *M. hyopneumoniae* bei ihren Ferkeln konnte in eigenen Untersuchungen auch nicht dargestellt werden. Ferkel von Sauen erster Parität waren zu 53,1% seropositiv, stammten sie von Altsauen ab, waren 52,1% seropositiv. Im Gegensatz dazu konnten in Untersuchungen von SIBILA et al. (2007a), bei allen fünf untersuchten Sauen der ersten Parität nur seronegative Ferkel nachgewiesen werden. Es muss aber beachtet werden, dass alle untersuchten Sauen ebenfalls seronegativ waren, sodass dieser Zusammenhang auch auf die Korrelation der Antikörpertiter von Sau und Ferkeln zurückzuführen sein kann. Allerdings stammten in vorliegender Studie 2/3 der mittels PCR positiven Ferkel von Jungsauen ab ($p=0,200$). Diese Ergebnisse sind aber hinsichtlich der Aussagekraft aufgrund der geringen Nachweisrate von *M. hyopneumoniae* mittels PCR auch vorsichtig zu bewerten. Jedoch war, in Übereinstimmung mit der numerisch höheren Anzahl mittels PCR *M. hyopneumoniae* positiver Ferkel von Jungsauen in vorliegender Arbeit, in weiteren Studien in USA und Thailand der Anteil mittels PCR *M. hyopneumoniae* positiver Ferkel von Sauen der ersten oder 2. Parität signifikant höher, als von Sauen höherer Paritäten (FANO et al., 2006; BOONSOONGNERN et al., 2012).

Zusammenfassend sollte trotz widersprüchlicher Studienergebnisse die Rolle der Jungsauen in der Übertragung von *M. hyopneumoniae* auf die Ferkel nicht unterschätzt werden. Um diese möglichst gering zu halten besitzt die sorgfältige Akklimation der Jungsauen einen hohen Stellenwert (MOORKAMP et al., 2009; NATHUES et al., 2012a; PIETERS et al., 2014).

6. Einfluss des Impfstatus der Sauen auf die Laborergebnisse

Da Infektionen mit *M. hyopneumoniae* schon in den ersten Lebenswochen auftreten können (VICCA et al., 2002; SIBILA et al., 2007b), wird am häufigsten eine einmalige bzw. zweimalige Impfung im Saugferkelalter praktiziert (MAES et al., 2018). Die Ferkelimpfung reduziert das Vorkommen von Lungenläsionen, verbessert die täglichen Zunahmen und führt zu einer günstigeren Futtermittelverwertung sowie zu weniger klinischen Erscheinungen (MAES et al., 1998; THACKER et al., 1998; BACCARO et al., 2006; SIBILA et al., 2007b; DEL POZO SACRISTÁN et al., 2014). Allerdings eliminiert die Ferkelimpfung weder den Erreger aus dem Respirationstrakt (MEYNS et al., 2006; REYNOLDS et al., 2009), noch ist das Einzeltier vor einer Infektion geschützt (PIETERS et al., 2010; VILLARREAL et al., 2011). Eine zusätzliche Impfung der Muttertiere gegen *M. hyopneumoniae* soll helfen den Infektionsdruck in der Herde zu kontrollieren (ARSENAKIS et al., 2019), die Übertragung vom Muttertier auf ihre Nachkommen zu verringern und Ferkel durch maternale Antikörper möglichst gut vor Infektionen in den ersten Lebenswochen zu schützen (MAES et al., 2008).

In vorliegender Studie konnten in den beiden Impfbeständen sowohl signifikant mehr seropositive Sauen ($p=0,010$) als auch seropositive Ferkel ($p<0,001$) mittels ELISA nachgewiesen werden, als in Beständen ohne Sauenimpfung gegen *M. hyopneumoniae*. Diese Ergebnisse stimmen somit mit denen vorangegangener Untersuchungen von SIBILA et al. (2008) und GARZA-MORENO et al. (2019) überein. In weiteren Studien war ein Einfluss der Sauenimpfung auf die Kolonisation der Sauen selbst nicht darstellbar (CALSAMIGLIA & PIJOAN, 2000), die Anzahl mit

M. hyopneumoniae besiedelter Ferkel war allerdings bei Abstammung von geimpften Sauen sowohl bei der Beprobung zum Zeitpunkt des Absetzens mittels NT (RUIZ et al., 2003; SIBILA et al., 2008), als auch mittels LaT sieben Tage nach dem Absetzen ARSENAKIS et al. (2019), geringer. Zusätzlich zeigten Ferkel geimpfter Sauen signifikant weniger EP-assoziierte Lungenläsionen am Ende der Mast, als Ferkel ungeimpfter Sauen (SIBILA et al., 2008; ARSENAKIS et al., 2019). Im Gegensatz dazu unterschieden sich Ferkel geimpfter und ungeimpfter Sauen hinsichtlich ihrer Besiedelung mit *M. hyopneumoniae* weder in einer europaweiten Studie (VILLARREAL et al., 2010) bei Untersuchung mittels NT, noch in vorliegender Arbeit bei der Verwendung von TBS als Probenmaterial. Obwohl alle vier Bestände mit *M. hyopneumoniae* Nachweis mittels real-time PCR keine Sauenimpfung anwendeten, unterschieden sie sich von den restlichen fünf Beständen ohne *M. hyopneumoniae* Nachweis (2 Impfbetriebe) nicht signifikant ($p=0,151$). Jedoch besitzen diese Ergebnisse, aufgrund der geringen Anzahl an positiven Proben, eine geringe Aussagekraft.

Übereinstimmend mit Ergebnissen von ARSENAKIS et al. (2019) und BANDRICK et al. (2014) erreichten in vorliegender Studie die S/P ratios von Ferkeln aus Impfbeständen signifikant höhere Werte als in nicht Impfbeständen ($p < 0,001$). Durch die höheren S/P ratios im Absetzalter bei Tieren geimpfter Sauen, können maternal erworbene Antikörpertiter bei einer Halbwertszeit von 15,8 Tagen (MORRIS et al., 1994) länger nachgewiesen werden als bei Ferkeln von ungeimpften Sauen mit niedrigeren S/P ratios. Allerdings vermitteln kolostrale Antikörper nur einen partiellen Schutz vor Infektionen mit *M. hyopneumoniae* (HODGINS et al., 2004) und die Höhe der Antikörpertiter korreliert nicht mit dem Grad der Protektion (DJORDJEVIC et al., 1997). In Untersuchungen von MARTELLI et al. (2006) scheinen bestehende maternale Antikörper die Ausbildung einer Immunantwort nach der Ferkelimpfung nicht zu beeinflussen, hingegen zeigen Ferkel bei BANDRICK et al. (2014) und HODGINS et al. (2004) mit hohen maternalen AK-Titern keine Veränderung in der Höhe der Antikörpertiter nach Impfung. Allerdings konnte der Transfer von *M. hyopneumoniae* spezifischer zellulärer und

humoraler Immunität von immunisierten Sauen auf ihre Nachkommen nachgewiesen werden (BANDRICK et al., 2008). Die genaue Beeinflussung der Entwicklung des Immunsystems der Ferkel durch passiv erworbene zelluläre maternale Immunität ist allerdings noch bekannt (BANDRICK et al., 2008) und muss weiter untersucht werden.

7. Hustenindex und Laborergebnisse

In vorliegender Studie wurde bei Masttieren im Alter von 22-24 Wochen das Auftreten von Husten quantifiziert. Dafür wurde das von NATHUES et al. (2012b) beschriebene Vorgehen angewandt und die Anzahl der Hustenstöße pro Zeiteinheit in einen Score umgerechnet. Dieser nahm in den ausgewählten Studienbetrieben Werte von 0,0 bis 2,6 an und lag im Median bei 0,5. Damit stellte sich das Vorkommen von Husten deutlich niedriger als in Untersuchungen von NATHUES et al. (2012b) dar, der 59 Bestände in Nordwestdeutschland untersuchte und einen medianen Hustenindex von 2,4 erhob. Dieser Unterschied könnte der kleinen Probenanzahl von nur 10 Beständen in vorliegender Untersuchung geschuldet sein, oder zusammen mit relativ niedrigen EP-Indices für eine verbesserte Lungengesundheit in deutschen Beständen sprechen.

Des Weiteren konnten in vorliegender Studie in Beständen mit einem HI unter dem Median tendenziell mehr seropositive Ferkel drei Wochen p.p. ($p=0,060$) detektiert werden, als in Beständen mit höherem HI. Auch in der Sauenpopulation konnten in Beständen mit niedrigem HI mehr seropositive Tiere beobachtet werden, als in Beständen mit HI über dem Median, allerdings war dieser Unterschied nicht signifikant ($p=0,194$). Damit divergieren die eigenen Untersuchungsergebnisse von Aussagen vorangegangener Studien: Bei NATHUES et al. (2012b) lag der HI in Beständen mit über 50% seropositiven Endmastschweinen deutlich höher als in Beständen mit wenigen seropositiven Tieren. LEON et al. (2001) stellten ein zeitgleiches Auftreten von Husten und Serokonversion und einen parallelen Anstieg von HI und Antikörpertitern gegen *M. hyopneumoniae* fest. Von Bedeutung für die unterschiedlichen Ergebnisse können die verschiedenen Beprobungszeitpunkte sein. Bei NATHUES et al. (2012b) wurden Tiere in der Endmast serologisch

untersucht. Zu diesem Zeitpunkt detektierte Antikörper könnten Anzeichen für eine Immunantwort auf eine Feldinfektion sein (MAES et al., 2008). Dagegen sind in vorliegender Studie detektierte Antikörper gegen *M. hyopneumoniae* mit hoher Wahrscheinlichkeit noch über das Kolostrum aufgenommene maternale Antikörper. In vorangegangenen Untersuchungen konnten bei Tieren, die von geimpften Muttersauen stammten und somit ein höherer Prozentsatz der Ferkel maternal erworbene Antikörper besaß, am Schlachthof geringere Lungenläsionen nachgewiesen werden, als bei Tieren von ungeimpften Muttertieren (SIBILA et al., 2008). Somit kann man vermuten, dass eine maternal erworbene Immunität die Übertragung von *M. hyopneumoniae* im Saugferkelalter verlangsamt und sich positiv auf die klinischen Anzeichen einer *M. hyopneumoniae* Infektion auswirkt, sodass die Erregerlast in nachgelagerten Produktionsstufen verringert wird und dadurch auch weniger Husten in der Mast auftritt, im Gegensatz zu Beständen mit geringerer Übertragung von maternaler Immunität auf Saugferkel, in denen schon zu früheren Zeitpunkten mehr Zirkulation des Erregers stattfindet.

Zusätzlich stellen NATHUES et al. (2012b) eine starke positive Assoziation zwischen einem in der 18. Lebenswoche erhobenen Hustenindex und dem direkten *M. hyopneumoniae* Nachweis dar: Ist der Hustenindex hoch, werden bei über 50% der Tiere eines Bestandes mittels PCR *M. hyopneumoniae* aus BALF detektiert. Somit kann die quantitative Erfassung des Hustens die Diagnose einer *M. hyopneumoniae*-Infektion auf Herdenebene unterstützen (NATHUES et al., 2012b). In eigenen Untersuchungen konnte jedoch kein Zusammenhang zwischen einem direkten Erregernachweis aus LaT bzw. TBS und dem Hustenindex des Bestandes dargestellt werden. Gleiches gilt für die Untersuchung von OFs (siehe 8. Molekularbiologische Untersuchung von oral fluids). Grund dafür ist zum einen, die in vorliegender Studie geringe Anzahl an positiven Proben mittels PCR. Zum anderen wurden Hustenindices am Ende der Mast erhoben sowie zur selben Zeit LaT bei Sauen und TBS bei Ferkeln entnommen. Somit wurden in vorliegender Untersuchung unterschiedliche Tiere in verschiedenen Altersklassen untersucht,

während bei NATHUES et al. (2012b) die Tiere, die mittels HI klassifiziert wurden, zum selben Zeitpunkt auch mittels BALF untersucht wurden.

Somit scheint die Erhebung eines HI zur Einschätzung des Anteils mit *M. hyopneumoniae* infizierter Tiere eine einfache und für die Tiere stressfreie Methode darzustellen, allerdings können durch den erhobenen HI nur Rückschlüsse zum aktuellen Infektionsgeschehen der untersuchten Tiergruppe gezogen werden. Auch unter der Annahme, dass einzelne Tiere, die sich während der Säugezeit beim Muttertier infizieren, die eigentlichen Initiatoren der Weiterverbreitung der Erkrankung in Aufzucht und Mast darstellen (FANO et al., 2007; THACKER & MINION, 2012), kann von einem Hustenindex am Ende der Mastzeit nicht auf die Besiedelung im Absetzalter rückgeschlossen werden, da eine Infektion mit *M. hyopneumoniae* ein multifaktorielles Geschehen darstellt und die Schwere der Erkrankung und der Symptomatik von vielen Faktoren wie Sekundärinfektionen (THACKER et al., 2001), Virulenz des Stammes (VICCA et al., 2003), aber auch Umweltfaktoren (STÄRK, 2000) abhängig ist.

8. Molekularbiologische Untersuchung von oral fluids

Die Verwendung von OFs ermöglicht eine einfache Informationsbeschaffung zum Infektionsstatus auf Herdenebene (PRICKETT & ZIMMERMAN, 2010). Bei Untersuchungen auf das Vorkommen von Erregern, die am PRDC beteiligt sind, erwiesen sich OFs sowohl im Hinblick auf PCV2 als auch PRRSV und IAV in mehreren Studien als zuverlässig (PRICKETT et al., 2011; RAMIREZ et al., 2012; HERNANDEZ-GARCIA et al., 2017). In vorliegender Studie konnten in mindestens einer SammelSpeichelprobe in 90% der Bestände mittels real-time PCR das Vorkommen von *M. hyopneumoniae* nachgewiesen werden. In Übereinstimmung damit wiesen CHEONG et al. (2017) in 87,5% (49/56) der untersuchten koreanischen schweinehaltenden Bestände *M. hyopneumoniae* spezifische Genomfragmente in oral fluids mittels PCR nach. Dabei stellten sich insgesamt 67,8% aller OFs als positiv dar, während in vorliegender Untersuchung nur 11,5% aller Kaustricke *M. hyopneumoniae* positiv waren. Vergleichbare Studien aus Europa sind

nicht bekannt. Allerdings wurden OFs in Bezug auf ihren Nutzen zur Detektion von *M. hyopneumoniae* spezifischen Genomfragmenten in Infektionsstudien (ROOS et al., 2016; PIETERS et al., 2017) und in einer Feldstudie (HERNANDEZ-GARCIA et al., 2017) untersucht, wobei sich in allen Untersuchungen der Nachweis von *M. hyopneumoniae* DNA aus OFs als unbeständig und im Vergleich mit anderen Nachweismethoden weniger sensitiv darstellte. So war es möglich, dass sich Buchten, die zu einem früheren Zeitpunkt der Probenentnahme positiv waren, beim nächsten Beprobungszeitpunkt als negativ darstellten (HERNANDEZ-GARCIA et al., 2017). Ähnliche Beobachtungen konnten auch in vorliegender Studie gemacht werden, jedoch lag hier keine longitudinale Studie vor, sondern die Proben wurden am gleichen Tag in unterschiedlichen Altersklassen entnommen und lieferten einen aktuellen Querschnitt durch den Bestand. Der Nachweis innerhalb einer Bucht stellte sich in vorliegender Studie ebenfalls als unbeständig dar: in Buchten mit großer Tierzahl wurden mehrere Stricke aufgehängt. In manchen dieser Buchten waren gleichzeitig Stricke mit und ohne *M. hyopneumoniae* Nachweis zu finden. Diese Beobachtung stimmt ebenfalls mit Untersuchungen von HERNANDEZ-GARCIA et al. (2017) überein, die daraus die Schlussfolgerung ziehen, dass OFs bezüglich der Detektion von *M. hyopneumoniae* eine geringe Sensitivität besitzen und nur zur Bestätigung, aber nicht zum Ausschluss von *M. hyopneumoniae* im Bestand verwendet werden können. Allerdings kann man davon ausgehen, dass Organismen nur durch Aktion des Wirtes, wie zum Beispiel durch Husten oder Nießen, aus dem Respirationstrakt in den Speichel gelangen können (HARE, 1964) und somit der Nachweis von *M. hyopneumoniae* in oral fluids vom Auftreten klinischer Anzeichen abhängig sein könnte. Dadurch kann ein unbeständiger Nachweis von *M. hyopneumoniae* DNA in OFs erklärt werden, da nur bei Tieren mit klinischen Anzeichen (Husten) *M. hyopneumoniae* durch die Verwendung von OFs nachgewiesen werden kann. Da zusätzlich die Ausbreitung der Infektion sehr langsam verläuft (MEYNS et al., 2004; VILLARREAL et al., 2011), könnte somit bei Verwendung von OFs zum *M. hyopneumoniae* Nachweis das Auftreten unterschiedlicher Ergebnisse zu unterschiedlichen Beprobungszeitpunkten sowie bei zwei Sammelspeichelproben innerhalb

einer Bucht erklärt werden. Zusätzlich kann man annehmen, dass der Nachweis von Erregern aus OFs auch durch die unterschiedliche Interaktion der Tiere mit den Stricken beeinflusst wird. So sind kranke Tiere häufig ruhiger und interagieren vermutlich weniger mit den Kaustricken als gesunde Buchtengenossen. Jüngere Tiere, die gerade ins Flatdeck umgestallt wurden, zeigen oftmals noch ein geringeres Interesse an Beschäftigungsmaterial. Umso wichtiger stellt sich somit die Verwendung einer größeren Anzahl an Kaustricken und die Untersuchung mehrerer Buchten pro Altersgruppe dar um verlässliche Aussagen über die Zirkulation im Bestand treffen zu können (ARSENAKIS et al., 2019).

In vorliegender Untersuchung wurden schon in der 6. LW erste mittels real-time PCR *M. hyopneumoniae* positive OFs detektiert. Diese Beobachtung geht damit konform, dass Muttertiere eine wichtige Übertragungsquelle von *M. hyopneumoniae* auf ihre Nachkommen und ein geringe Anzahl infizierter Ferkel den Ausgangspunkt der Weiterverbreitung in Aufzucht und Mast darstellen (FANO et al., 2007; NATHUES et al., 2013b; PIETERS et al., 2014). Ein signifikanter Unterschied zwischen dem Anteil positiver Kaustricke in der 6. LW zum Anteil positiver Stricke mit 12 und 16 Wochen war in vorliegender Studie nicht darstellbar, allerdings stieg in der 20.LW der Anteil positiver OFs signifikant an. Diese Entwicklung ist in Übereinstimmung mit dem Anstieg positiver OFs ab der 17. LW in Untersuchungen von HERNANDEZ-GARCIA et al. (2017). Da vorrangig Masttiere klinische Anzeichen einer *M. hyopneumoniae* Infektion zeigen (SIBILA et al., 2009), und in 8 Beständen der vorliegenden Untersuchung Husten detektiert wurde sowie in 7 davon positive OFs im Alter von 20 Wochen nachweisbar waren, unterstützt dies die These, dass OFs eine probate Nachweismethode für *M. hyopneumoniae* darstellen, solange klinische Anzeichen zu sehen sind. Allerdings kann diese These mit den vorliegenden Ergebnissen nicht bestätigt werden, da ein Hustenindex nur bei Tieren der 20.-24. LW und nicht in weiteren Altersstufen erhoben wurde. Dass ein infiziertes Tier mehrere Wochen benötigt um ein weiteres anzustecken (MEYNS et al., 2004) und somit die Zahl der infizierten Tiere langsam ansteigt, wurde von CHEONG et al. (2017) durch die konstante Zunahme des Anteils positiver

Kaustricke von der 3. bis zur 26.LW bekräftigt. Eine kontinuierliche Zunahme positiver OFs über die verschiedenen Altersstufen konnte in vorliegender Studie nicht beobachtet werden. Die wahrscheinlichste Erklärung hierfür ist die Erhebung von Querschnittsdaten und das Fehlen einer Weiterverfolgung der gleichen Tiere in unterschiedlichen Altersstufen. Tiere stammten aus unterschiedlichen Durchgängen und waren somit unterschiedlichen Faktoren, die eine *M. hyopneumoniae* Infektion begünstigen können, ausgesetzt. Infektionen mit *M. hyopneumoniae* stellen multifaktorielle Geschehen dar und Infektionen und Symptomatik sind je nach bestehendem Infektionsdruck, Sekundärerregern und Umweltfaktoren sehr variabel (STÄRK, 2000; VICCA et al., 2003; SIBILA et al., 2009).

In vorliegender Arbeit konnten keine signifikanten Korrelationen zwischen dem prozentualen Anteil positiver OFs im Bestand und den Husten- bzw. EP-Indices dargestellt werden, dagegen konnten in Untersuchungen von HERNANDEZ-GARCIA et al. (2017) die Lungen mit den schwersten EP-Läsionen am Schlachthof tendenziell vermehrt Tieren aus Ställen mit einer höheren Anzahl an *M. hyopneumoniae* positiven OFs in der 19. und 20. LW zugeordnet werden. Obwohl EP-ähnliche Läsionen nicht pathognomonisch für *M. hyopneumoniae* sind und auch durch andere Erreger zu Tage treten können (THACKER et al., 2001), konnte eine positive Assoziation von Lungen mit kranioventral konsolidierten Arealen mit dem direkten Nachweis des Erregers aus der Lunge dargestellt werden (MOORKAMP et al., 2008).

Schon bestehende Untersuchungen zu einem Zusammenhang zwischen PCR Ergebnissen aus OFs und Hustenindex sind nicht bekannt. Ein hoher Hustenindex im Mastalter erhöht allerdings die Wahrscheinlichkeit für den Nachweis der Prävalenz von *M. hyopneumoniae* in der BALF mittels PCR um 50% (NATHUES et al., 2012b). Die geringe Spezifität der Läsionen und die hohe Subjektivität bei der Beurteilung des Lungenscorings am Schlachthof limitieren seine Aussagekräftigkeit (SIBILA et al., 2009). Somit sollte die Diagnose einer EP auf Herdenebene auf einer Kombination an diagnostischen Mitteln basieren (NATHUES et al., 2012b).

Die Untersuchung von oral fluids in der Endmast stellt bei Vorliegen von Husten eine sinnvolle Ergänzung des *M. hyopneumoniae* Monitorings dar. Die Gewinnung von oral fluids zusammen mit der Erhebung von Hustenindices auch in jüngeren Alterstufen könnte weitere Erkenntnisse zur Infektionsdynamik im Bestand liefern und sollte Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein. Durch eine Optimierung des Einsatzes von OFs zur *M. hyopneumoniae* Diagnostik wäre es möglich auf eine Vielzahl an Einzeltieruntersuchungen zu verzichten, wodurch der Arbeitsaufwand reduziert und den Tieren Stress (durch Manipulation und Entnahme von Blutproben, NT, TBS etc.) erspart werden könnte.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

In vorliegender Arbeit sollte das Vorkommen früher Infektionen von Saugferkeln mit *M. hyopneumoniae* und deren Weiterverbreitung in nachgelagerten Produktionsstufen untersucht werden. Die vorliegende Arbeit wurde als Querschnittsuntersuchung durchgeführt. Um gezielt Bestände mit *M. hyopneumoniae* Problematik auszuwählen, wurden vorab EP-Scores potentieller Studienbestände am Schlachthof erhoben. Anschließend wurden 10 Bestände mit hohen und mittleren EP-Scores in die Studie eingeschlossen.

Pro Bestand wurden zehn Sauen in der Abferkelung sowie je fünf ihrer Ferkel untersucht. Es wurden jeweils Blutproben gewonnen sowie bei Sauen Larynx- und bei Ferkeln Tracheobronchialtupfer entnommen. Zusätzlich wurden bei Tieren in der 6., 12., 16., und 20. Lebenswoche mittels Kaustricken oral fluids gewonnen. Die Serumproben wurden mittels ELISA auf das Vorkommen spezifischer IgG-Antikörper gegen *M. hyopneumoniae* untersucht. Des Weiteren wurden Larynx- und Tracheobronchialtupfer sowie oral fluids mittels real-time PCR auf das Vorkommen *M. hyopneumoniae* spezifischer Genomfragmente getestet.

In 9/10 (90%) Beständen konnten IgG-Antikörper gegen *M. hyopneumoniae* detektiert werden. Die Seroprävalenz bei Sauen lag bei 54/100 (54%), bei Ferkeln bei 236/498 (47,4%). Ferkel von seropositiven Sauen besaßen im Vergleich zu Ferkeln von seronegativen Sauen signifikant häufiger Antikörper gegen *M. hyopneumoniae*. Mit Ausnahme der Tiere von zwei Betrieben korrelierte auch die Höhe der S/P ratios von Sauen und Ferkeln. In jedem der zehn Bestände war *M. hyopneumoniae* DNA nachweisbar. Innerhalb der untersuchten Herden ergab sich aus dem molekularbiologischen Nachweis von *M. hyopneumoniae* mittels real-time PCR aus Larynx- bzw. Tracheobronchialtupfern auf Einzeltierebene eine Prävalenz von 4% in der untersuchten Sauenpopulation und 0,6% in der Ferkelpopulation. Positive oral fluids wurden in allen vier Altersstufen detektiert. Insgesamt waren in 40/348 (11,5%) oral fluids mittels real-time PCR *M. hyopneumoniae* spezifische Genomfragmente nachzuweisen.

Die Auswertung der labordiagnostischen Ergebnisse erfolgte unter Berücksichtigung der am Schlachthof erhobenen EP-Indices, der im Bestand erhobenen Hustenindices sowie der Parität und des Impfstatus der Sauen. In Beständen mit einem HI über dem Median stellten sich tendenziell mehr Ferkel seropositiv dar, als in Beständen mit hohem Hustenvorkommen in der Endmast. Wurde eine Sauenimpfung im Bestand gegen *M. hyopneumoniae* durchgeführt, konnten sowohl bei den Muttertieren selber, als auch bei ihren Ferkeln signifikant mehr seropositive Tiere detektiert werden. Ferkel dieser Betriebe zeigten im Vergleich zu Nicht-Impfbetrieben zudem auch signifikant höhere S/P ratios. Die Parität der Muttersauen hatte keinen signifikanten Einfluss auf den serologischen Status der Sauen und ihrer Ferkel. Allerdings konnte tendenziell häufiger bei Sauen der ersten Parität mittels Larynxstupfer *M. hyopneumoniae* DNA detektiert werden, als bei Sauen höherer Paritäten. Bei Untersuchung der oral fluids aus Aufzucht und Mast, wurden signifikant mehr *M. hyopneumoniae* DNA positive Proben bei Tieren der 20. LW festgestellt als in den Altersstufen darunter.

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass *M. hyopneumoniae* in allen untersuchten Beständen verbreitet ist, allerdings das Vorkommen von frühen Infektionen im Saugferkelalter deutlich geringer ist, als erwartet. Ein Zusammenhang zwischen der Besiedelung noch ungeimpfter Tiere im Saugferkelalter mit *M. hyopneumoniae* und der Höhe der Hustenindices in der Mast sowie der EP-Scores am Schlachthof war nicht darstellbar. Bei Vorkommen von Husten scheint die Gewinnung von oral fluids auf Buchtenebene zur *M. hyopneumoniae* Diagnostik geeignet zu sein, allerdings sollte dieser Zusammenhang noch weiter untersucht werden.

VII. SUMMARY

The objective of the present study was to evaluate the prevalence of early infections with *M. hyopneumoniae* in suckling piglets and their spread in subsequent production stages. A cross-sectional study was conducted. EP-scores of potential study farms were collected at the abattoir in advance to select farms with airway diseases related to *M. hyopneumoniae*. Subsequently ten farms with medium and high EP-scores were chosen for the participation in the study.

In the farrowing unit of each farm ten sows and five piglets per sow were examined. Blood samples of all study animals were taken and laryngeal-swabbing in sows and tracheobronchial-swabbing in piglets was performed. Additionally, oral fluids of pigs at the age of 6/12/16 and 20 weeks were collected using cotton ropes. Blood samples were examined by ELISA to detect IgG-antibody against *M. hyopneumoniae*, laryngeal- and tracheobronchial swabs as well as oral fluids were examined by PCR for the detection of genomic fragments of *M. hyopneumoniae*.

IgG-antibodies against *M. hyopneumoniae* were demonstrated in 9/10 (90%) farms. The prevalence in sows was 54% (54/100), in piglets 47.4% (236/498). Piglets originating from seropositive sows showed significantly more often antibodies against *M. hyopneumoniae* than piglets from seronegative sows. There was a correlation between S/P ratios from sows and the corresponding piglets except for two farms. *M. hyopneumoniae* DNA was detectable in all farms. At individual animal level within the investigated herds molecular biological detection of *M. hyopneumoniae* using real-time PCR from laryngeal and tracheobronchial swabs, revealed a prevalence of 4% and 0.6% in the population of sows and piglets, respectively. Positive oral fluids were detected in all four age groups. Altogether, *M. hyopneumoniae* specific genome fragments were present in 40/348 (11.5%) oral fluids by real-time PCR.

Laboratory diagnostic results were further evaluated, taking into account EP indices collected at the slaughterhouse, coughing indices calculated in-farm, as well as parity and vaccination status of sows. In farms with

coughing index above the median, more piglets tended to be seropositive than in farms with a high cough occurrence in finishing pigs. Significantly more seropositive animals could be detected in both, dams and their offspring, if sow vaccination against *M. hyopneumoniae* was carried out. Piglets from these farms also showed significantly higher S/P ratios compared to farms without sow-vaccination. Sow parity had no significant effect on the serological status of the sows and their piglets. However, there was a trend for detecting *M. hyopneumoniae* DNA more likely in sows of the first parity than in sows of higher parities using laryngeal swabs. When examining oral fluids from weaners and finishing pigs, significantly more *M. hyopneumoniae* DNA positive samples were detected in animals in the 20th week of life than in pigs of the younger age groups.

The results of this study confirm the appearance of *M. hyopneumoniae* in all study populations, but the occurrence of early infections in suckling pigs has minor significance than assumed. A correlation between the colonization of still unvaccinated animals with *M. hyopneumoniae* at the age of suckling and the level of coughing indices in fattening units as well as EP-scores at the slaughterhouse could not be demonstrated. In cases of coughing penwise collection of oral fluids seems to be appropriate for *M. hyopneumoniae* diagnostics, but further investigation is needed.

VIII. TABELLENVERZEICHNIS

<i>Tabelle 1: Übersicht über Studien zur Prävalenzbestimmung von M. hyopneumoniae im Saugferkelalter mittels PCR</i>	6
<i>Tabelle 2: Auflistung aller beteiligten Bundesländer und Aktenzeichen der Tierversuchsanzeigen sowie Genehmigungsdatum</i>	35
<i>Tabelle 3: Beurteilung der Veränderungen je Lungenlappen nach MADEC und KOBISCH (1982)</i>	37
<i>Tabelle 4: In die Studie eingeschlossene Betriebe, mit Verteilung auf Bundesländer, Betriebsart, Größe des Betriebes, M. hyopneumoniae Impfung bei Sauen und Produktionsrhythmus</i>	38
<i>Tabelle 5: Temperaturprotokoll der real-time PCR nach MAROIS et al. (2010)</i>	43
<i>Tabelle 6: verwendete Primer für real-time PCR nach MAROIS et al. (2010)</i>	44
<i>Tabelle 7: Temperaturprotokoll der real-time PCR nach STRAIT et al. (2008)</i>	44
<i>Tabelle 8: verwendete Primer für real-time PCR nach STRAIT et al. (2008)</i>	45
<i>Tabelle 9: Am Schlachthof erhobene EP-Indices der 18 untersuchten Bestände, Anzahl der jeweils untersuchten Schlachtlungen sowie Datum des Scorings und Herkunft der Schlachtpartie</i>	50
<i>Tabelle 10: Anteil M. hyopneumoniae seropositiver Sauen, Ferkel und Würfe pro Bestand innerhalb der untersuchten Studienpopulation</i>	51
<i>Tabelle 11: Mittelwert, Median, Minimum und Maximum sowie Standardabweichung der S/P ratios bei Sauen (normalverteilt) und Ferkeln (nicht normalverteilt)</i>	52
<i>Tabelle 12: Korrelation der Antikörpertiter von Sauen und zugehörigen Ferkel je Bestand</i>	53
<i>Tabelle 13: Mittelwert, Median, Minimum, Maximum, und Standardabweichung der S/P ratios geimpfter und ungeimpfter Sauen sowie von Ferkeln, die von Beständen mit bzw. ohne Muttertierimpfung gegen M. hyopneumoniae stammen</i>	57

<i>Tabelle 14: Korrelation des EP-Index mit dem Anteil seropositiver Sauen und seropositiver Ferkel</i>	59
<i>Tabelle 15: Verteilung M. hyopneumoniae seropositiver Tiere auf Bestände mit HI über bzw. unter dem Median</i>	60
<i>Tabelle 16: Vorkommen mittels real-time PCR M. hyopneumoniae positiver LaT bei Sauen bzw. TBS bei Ferkeln</i>	61
<i>Tabelle 17: Ct-Werte mittels real-time PCR M. hyopneumoniae positiver Larynx- bzw. Tracheobronchialtupfer und S/P ratios</i>	62
<i>Tabelle 18: Direkter Erregernachweis von M. hyopneumoniae mittels real-time PCR in Beständen mit HI über bzw. unter dem Median</i>	65
<i>Tabelle 19: Nachweis von M. hyopneumoniae mittels real-time PCR in OFs von Tieren in Aufzucht und Mast</i>	66
<i>Tabelle 20: Mittelwerte, Minima, Maxima und Standardabweichungen der Ct-Werte der OFs aufgeteilt nach Altersklassen</i>	68

IX. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

<i>Abbildung 1: Anteil seropositiver Sauen und deren mediane S/P ratios mit Standardabweichung im Zusammenhang mit der Parität.....</i>	<i>54</i>
<i>Abbildung 2: Anteil seropositiver Ferkel, medianer S/P Wert und Standardabweichung in Zusammenhang mit der Parität des Muttertieres</i>	<i>55</i>
<i>Abbildung 3: Vorkommen seropositiver Sauen bzw. Ferkel in Abhängigkeit vom Impfstatus der Muttersau bezüglich <i>M. hyopneumoniae</i>. aa': $p < 0,001$; bb': $p = 0,010$</i>	<i>56</i>
<i>Abbildung 4: Anteil seropositiver Tiere im Zusammenhang mit der Höhe des EP-Index.....</i>	<i>58</i>
<i>Abbildung 5: Anteil seropositiver Sauen und Ferkel in Abhängigkeit erhobener Husten-Indices</i>	<i>60</i>
<i>Abbildung 6: Untersuchung von Kaustricken mittels real-time PCR auf das Vorkommen von <i>M. hyopneumoniae</i> im OFs von Aufzucht- und Masttieren. Darstellung positiver Sammelspeichelproben in der 6./12./16./20. Lebenswoche (LW) auf Bestandsebene.....</i>	<i>67</i>
<i>Abbildung 7: Darstellung des Anteiles mittels real-time PCR <i>M. hyopneumoniae</i> positiven oral fluids in den verschiedenen Altersstufen. ad, bd, cd: $p < 0,001$; ab: $p = 0,097$</i>	<i>68</i>

X. LITERATURVERZEICHNIS

Ahn KK, Kwon D, Jung K, Ha Y, Seo MJ, Kim S-H, Kim M-Y, Cho K-D, Lee B-H, Chae C. Identification of Interleukin-1, Tumor Necrosis Factor-alpha and Interleukin-6 Expression in Lungs from Pigs Naturally Infected with *Mycoplasma hyopneumoniae* by In situ Hybridization. *J Vet Med Sci* 2009; 71: 441-445.

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.

Ameri-Mahabadi M, Zhou EM, Hsu WH. Comparison of two swine *Mycoplasma hyopneumoniae* enzyme-linked immunosorbent assays for detection of antibodies from vaccinated pigs and field serum samples. *J Vet Diagn Invest* 2005; 17: 61-64.

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

Amtsberg G, Beer M, Haas L, Versphol J. Infektionsdiagnostik. In: Tiermedizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre, 10 edn. Selbitz H-J, Truyen U, Valentin-Weigand P, eds. Stuttgart: Enke Verlag 2015: 62-94.

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

Andreasen M, Mousing J, 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.

Arsenakis I, Panzavolta L, Michiels A, Del Pozo Sacristán R, Boyen F, Haesebrouck F, Maes D. Efficacy of *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccination before and at weaning against experimental challenge infection in pigs. *BMC Vet Res* 2016; 12: 63-69.

Arsenakis I, Michiels A, Del Pozo Sacristán R, Boyen F, Haesebrouck F, Maes D. *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccination at or shortly before weaning under field conditions: a randomised efficacy trial. *Vet Rec* 2017; 181: 19-28.

Arsenakis I, Michiels A, Schagemann G, Gomez-Duran CO, Boyen F, Haesebrouck F, Maes D. Effects of pre-farrowing sow vaccination against *Mycoplasma hyopneumoniae* on offspring colonisation and lung lesions. *Vet Rec* 2019; 184: 222-231.

Atkinson J, Dawes C, Ericson T, Fox P, Gandara B, Malamud D, Mandel I, Navazesh M, Tabak L. Guidelines for saliva nomenclature and collection. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1993; 694, Issue 1.

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

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, Theis K, Molitor TW. Maternal immunity enhances *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccination induced cell-mediated immune responses in piglets. *BMC Vet Res* 2014; 10: 124-134.

Baskerville A. Development of the Early Lesions in Experimental Enzootic Pneumonia of Pigs: an Ultrastructural and Histological Study. *Res Vet Sci* 1972; 13: 570-586.

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.

Beffort L, Weiß C, Fiebig K, Jolie R, Ritzmann M, Eddicks M. Field study on the safety and efficacy of intradermal versus intramuscular vaccination against *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Vet Rec* 2017; 181: 348-354.

Bej AK, Mahbubani MH, Atlas RM. Amplification of Nucleic Acids by Polymerase Chain Reaction (PCR) and Other Methods and their Applications. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 1991; 26: 301-334.

Bjustrom-Kraft J, Christopher-Hennings J, Daly R. The use of oral fluid diagnostics in swine medicine. *J Swine Health Prod* 2018; 26: 262-269.

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

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

Boonsoongnern A, Jirawattanapong P, Lertwatcharasarakul P, Phatthanakunanan S, Poolperm P, Urairong S, Navasakuljinda W, Urairong K. The Prevalence of *Mycoplasma Hyopneumoniae* in Commercial Suckling Pigs in Thailand. *World J Vaccines* 2012; Vol.02 No.03: 161-163.

Bourry O, Fablet C, Simon G, Marois-Créhan C. Efficacy of combined vaccination against *Mycoplasma hyopneumoniae* and porcine reproductive and respiratory syndrome virus in dually infected pigs. *Vet Microbiol* 2015; 180: 230-236.

Cai HY, van Dreumel T, McEwen B, Hornby G, Bell-Rogers P, McRaid P, Josephson G, Maxie G. Application and Field Validation of a PCR Assay for the Detection of *Mycoplasma Hyopneumoniae* from Swine Lung Tissue Samples. *J Vet Diagn Invest* 2007; 19: 91-95.

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

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.

Cannon R, Roe R. In: *Livestock disease surveys: a field manual for veterinarians*, Canberra: Australian Bureau of Animal Health, Australian Government Publishing Service 1982: 1-35.

Cardona AC, Pijoan C, Dee SA. Assessing *Mycoplasma hyopneumoniae* aerosol movement at several distances. *Vet Rec* 2005; 156: 91-92.

Chase C, Lunney JK. Immune System. In: *Diseases of Swine*, 11 edn. Zimmerman JJ, Karriker LA, Ramirez A, Schwartz KJ, Stevenson GW, Zang J, eds.: John Wiley & Sons, Inc. 2019: 264-291.

Cheong Y, Oh C, Lee K, Cho K-h. Survey of porcine respiratory disease complex-associated pathogens among commercial pig farms in Korea via oral fluid method. *J Vet Sci* 2017; 18: 283-289.

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.

Ciprián A, Pijoan C, Cruz T, Camacho J, Tórtora J, Colmenares G, López-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.

Cook BS, Beddow JG, Manso-Silván L, Maglennon GA, Rycroft AN. Selective medium for culture of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Vet Microbiol* 2016; 195: 158-164.

Cvjetković V, Sipos S, Szabó I, Sipos W. Clinical efficacy of two vaccination strategies against *Mycoplasma hyopneumoniae* in a pig herd suffering from respiratory disease. *Porcine Health Manag* 2018; 4: 19-25.

Davies PR, Bahnson PB, Grass JJ, Marsh WE, Dial GD. Comparison of methods for measurement of enzootic pneumonia lesions in pigs. *Am J Vet Res* 1995; 56: 9-14.

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 M, Jacobson C, Ross R. 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 M, Ross R. Ciliostasis and loss of cilia induced by *Mycoplasma hyopneumoniae* in porcine tracheal organ cultures. *Infect Immun* 1994; 62: 5312-5318.

Dee SA. Apparent prevention of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in growing pigs with a low-cost modified medicated-early-weaning program. *J Swine Health Prod* 1994; 2: 7-12.

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

Del Pozo Sacristán R, Rodríguez AL, Sierens A, Vranckx K, Boyen F, Dereu A, Haesebrouck F, Maes DGD. Efficacy of in-feed medication with chlortetracycline in a farrow-to-finish herd against a clinical outbreak of respiratory disease in fattening pigs. *Vet Rec* 2012b; 171: 645-652.

Del Pozo Sacristán R, Sierens A, Marchioro SB, Vangroenweghe F, Jourquin J, Labarque G, Haesebrouck F, Maes D. Efficacy of early *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccination against mixed respiratory disease in older fattening pigs. *Vet Rec* 2014; 174: 197-203.

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.

Drexler CS, Witvliet MH, Raes M, van de Laar M, Eggen AAS, Thacker EL. Efficacy of combined porcine reproductive and respiratory syndrome virus and *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccination in piglets. *Vet Rec* 2010; 166: 70-74.

Drexler HG, Uphoff CC. Mycoplasma contamination of cell cultures: Incidence, sources, effects, detection, elimination, prevention. *Cytotechnology* 2002; 39: 75-90.

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

Duivon D, Correge I, Hemonic A, Rigaut M, Roudaut D, Jolie R. Field evaluation of piglet vaccination with a *Mycoplasma hyopneumoniae* bacterin as compared to a ready-to-use product including porcine circovirus 2 and *M. hyopneumoniae* in a conventional French farrow-to-finish farm. *Porcine Health Manag* 2018; 4: 4-11.

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

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

Fablet C, Dorenlor V, Eono F, Eveno E, Madec F, Rose N (2011). Prevalence of macroscopic lung lesions in slaughter pigs in France. XV. International Congress of the International Society for Animal Hygiene. Wien, Österreich. 47-49.

Fablet C, Marois C, Dorenlor V, Eono F, Eveno E, Jolly JP, Le Devendec L, Kobisch M, Madec F, Rose N. Bacterial pathogens associated with lung lesions in slaughter pigs from 125 herds. *Res Vet Sci* 2012a; 93: 627-630.

Fablet C, Marois-Créhan 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* 2012b; 157: 152-163.

Fano E, Pijoan C, Dee S (2004). Assessing the duration of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in gilts. 18th Cong Int Pig Vet Soc. Hamburg, Deutschland.

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

Fano E, Pijoan C, Dee S, Torremorell M (2006). Assessment of the effect of sow parity on the prevalence of *Mycoplasma hyopneumoniae* in piglets at weaning. 19th Cong Int Pig Vet Soc. Kopenhagen, Dänemark. 96.

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.

Farmer C, Maes D, Peltoniemi O. Mammary system. In: *Diseases of swine*, 11 edn. Zimmerman JJ, Karriker L, Ramirez A, Schwartz K, Stevenson G, Zhang J, eds.: John Wiley & Sons 2019: 313-338.

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

Friis N. Some recommendations concerning primary isolation of *Mycoplasma suis* pneumoniae and *Mycoplasma flocculare* a survey. *Nord Vet Med* 1975; 27: 337-339.

Garcia-Morante B, Segalés J, Fraile L, Pérez de Rozas A, Maiti H, Coll T, Sibila M. Assessment of *Mycoplasma hyopneumoniae*-induced Pneumonia using Different Lung Lesion Scoring Systems: a Comparative Review. *J Comp Pathol* 2016a; 154: 125-134.

Garcia-Morante B, Segalés J, López-Soria S, de Rozas AP, Maiti H, Coll T, Sibila M. Induction of mycoplasmal pneumonia in experimentally infected pigs by means of different inoculation routes. *Vet Res* 2016b; 47: 54-64.

Garza-Moreno L, Segalés J, Pieters M, Romagosa A, Sibila M. Acclimation strategies in gilts to control *Mycoplasma hyopneumoniae* infection. *Vet Microbiol* 2018; 219: 23-29.

Garza-Moreno L, Pieters M, López-Soria S, Carmona M, Krejci R, Segalés J, Sibila M. Comparison of vaccination protocols against *Mycoplasma hyopneumoniae* during the gilt acclimation period. *Vet Microbiol* 2019; 229: 7-13.

Gasparini Baraldi T, da Rocha Neves Cruz N, Dalla Costa F, Araujo D, Poor A, Ferreira Da Silva A, Panzardi A, De Oliveira LG (2017). Effects of sow and piglet vaccination against *Mycoplasma hyopneumoniae* on coughing index and pig lung lesions at slaughter. II Simpósio Internacional de Produção e Sanidade de Suínos. Sao Paulo, Brasilien. 134-137.

Gong Y, Hart E, Shchurin A, Hoover-Plow J. Inflammatory macrophage migration requires MMP-9 activation by plasminogen in mice. *J Clin Invest* 2008; 118: 3012-3024.

Greabu M, Battino M, Mohora M, Totan A, Didilescu A, Spinu T, Totan C, Miricescu D, Radulescu R. Saliva--a diagnostic window to the body, both in health and in disease. *J Med Life* 2009; 2: 124-132.

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. Grosse Beilage E, Wendt M, eds. Stuttgart: Eugen Ulmer 2013: 200-270.

Hameister T, Puppe B, Tuchscherer M, Kanitz E. Einfluss des Absetzalters von Ferkeln auf verhaltensbiologische und physiologische Reaktionen - eine Literaturübersicht. *Berl Münch Tierärztl Wochenschr* 2010; 123: 11-19.

Hannan PCT, Bhogal BS, Fish JP. Tylosin tartrate and tiamutilin effects on experimental piglet pneumonia induced with pneumonic pig lung homogenate containing mycoplasmas, bacteria and viruses. *Res Vet Sci* 1982; 33: 76-88.

Hannan PCT, O'Hanlon PJ, Rogers NH. In vitro evaluation of various quinolone antibacterial agents against veterinary mycoplasmas and porcine respiratory bacterial pathogens. *Res Vet Sci* 1989; 46: 202-211.

Hannan PCT, Windsor GD, de Jong A, Schmeer N, Stegemann M. Comparative susceptibilities of various animal-pathogenic mycoplasmas to fluoroquinolones. *Antimicrob Agents Chemother* 1997a; 41: 2037-2040.

Hannan PCT, Windsor HM, Ripley PH. In vitro susceptibilities of recent field isolates of *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Mycoplasma hyosynoviae* to valnemulin (Econor®), tiamulin and enrofloxacin and the in vitro development of resistance to certain antimicrobial agents in *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Res Vet Sci* 1997b; 63: 157-160.

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

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

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

Hernandez-Garcia J, Robben N, Magnee D, Eley T, Dennis I, Kayes SM, Thomson JR, Tucker AW. The use of oral fluids to monitor key pathogens in porcine respiratory disease complex. *Porcine Health Manag* 2017; 3: 7-19.

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

Hodgins DC, Shewen PE, Dewey CE. Influence of age and maternal antibodies on antibody responses of neonatal piglets vaccinated against *Mycoplasma hyopneumoniae*. *J Swine Health Prod* 2004; 12: 10-16.

Holst S, Yeske P, Pieters M. Elimination of *Mycoplasma hyopneumoniae* from breed-to-wean farms: A review of current protocols with emphasis on herd closure and medication. *J Swine Health Prod* 2015; 23: 321-330.

Hsu T, Minion FC. Identification of the Cilium Binding Epitope of the *Mycoplasma hyopneumoniae* P97 Adhesin. *Infect Immun* 1998; 66: 4762-4766.

Inamoto T, Takahashi H, Yamamoto K, Nakai Y, Ogimoto K. Antibiotic susceptibility of *Mycoplasma hyopneumoniae* isolated from swine. *J Vet Med Sci* 1994; 56: 393-394.

Kaalberg L, Geurts V, Jolie R. A field efficacy and safety trial in the Netherlands in pigs vaccinated at 3 weeks of age with a ready-to-use porcine circovirus type 2 and *Mycoplasma hyopneumoniae* combined vaccine. *Porcine Health Manag* 2017; 3: 23-29.

Klein U, de Jong A, Moyaert H, El Garch F, Leon R, Richard-Mazet A, Rose M, Maes D, Pridmore A, Thomson JR, Ayling RD. Antimicrobial susceptibility monitoring of *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Mycoplasma bovis* isolated in Europe. *Vet Microbiol* 2017; 204: 188-193.

Kobisch M, Blanchard B, Le Potier M. *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in pigs: duration of the disease and resistance to reinfection. *Vet Res* 1993; 24: 67-77.

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

Le Carrou J, Laurentie M, Kobisch M, Gautier-Bouchardon AV. Persistence of *Mycoplasma hyopneumoniae* in Experimentally Infected Pigs after Marbofloxacin Treatment and Detection of Mutations in the Gene. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50: 1959-1966.

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

Li Q, Laumonnier Y, Syrovets T, Simmet T. Plasmin triggers cytokine induction in human monocyte-derived macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; 27: 1383-1389.

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

Luehrs A, Siegenthaler S, Grützner N, grosse Beilage E, Kuhnert P, Nathues H. Occurrence of *Mycoplasma hyorhinis* infections in fattening pigs and association with clinical signs and pathological lesions of Enzootic Pneumonia. *Vet Microbiol* 2017; 203: 1-5.

Madec F, Kobisch M. Bilan lésionnel des poumons de porcs charcutiers à l'abattoir. *Journées de la Recherche Porcine* 1982; 14: 405-412.

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

Maes D, Deluyker H, Verdonck M, Castryck F, Miry C, Lein A, Vrijens B, de Kruif A. The Effect of Vaccination against *Mycoplasma hyopneumoniae* in Pig Herds with a Continuous Production System. *J Vet Med B* 1998; 45: 495-505.

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

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* 1999b; 46: 341-352.

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.

Maes D, Sibila M, Kuhnert P, Segalés J, Haesebrouck F, Pieters M. Update on *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in pigs: Knowledge gaps for improved disease control. *Transbound Emerg Dis* 2018; 65: 110-124.

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

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

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

Martelli P, Terreni M, Guazzetti S, Cavirani S. Antibody Response to *Mycoplasma hyopneumoniae* Infection in Vaccinated Pigs with or without Maternal Antibodies induced by Sow Vaccination. *J Vet Med B* 2006; 53: 229-233.

Mayor D, Zeeh F, Frey J, Kuhnert P. Diversity of *Mycoplasma hyopneumoniae* in pig farms revealed by direct molecular typing of clinical material. *Vet Res* 2007; 38: 391-398.

Meriardi G, Dottori M, Bonilauri P, Luppi A, Gozio S, Pozzi P, Spaggiari B, Martelli P. Survey of pleuritis and pulmonary lesions in pigs at abattoir with a focus on the extent of the condition and herd risk factors. *Vet J* 2012; 193: 234-239.

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

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

Meyns T, Van Steelant J, Rolly E, Dewulf J, Haesebrouck F, Maes D. A cross-sectional study of risk factors associated with pulmonary lesions in pigs at slaughter. *Vet J* 2011; 187: 388-392.

Michiels A, Arsenakis I, Boyen F, Krejci R, Haesebrouck F, Maes D. Efficacy of one dose vaccination against experimental infection with two *Mycoplasma hyopneumoniae* strains. *BMC Vet Res* 2017; 13: 274-283.

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

Moorkamp L, Hewicker-Trautwein M, Grosse Beilage E. Occurrence of *Mycoplasma hyopneumoniae* in coughing piglets (3–6 weeks of age) from 50 herds with a history of endemic respiratory disease. *Transbound Emerg Dis* 2009; 56: 54-56.

Moorkamp L, Grosse Beilage E, Hewicker-Trautwein M. Immunohistochemistry and polymerase chain reaction for detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in piglets. *Tierärztl Prax Ausg G* 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.

Morris CR, Gardner IA, Hietala SK, Carpenter TE, Anderson RJ, Parker KM. Seroepidemiologic study of natural transmission of *Mycoplasma hyopneumoniae* in a swine herd. *Prev Vet Med* 1995a; 21: 323-337.

Morris CR, Gardner IA, Hietala SK, Carpenter TE. Enzootic pneumonia: comparison of cough and lung lesions as predictors of weight gain in swine. *Can J Vet Res* 1995b; 59: 197-204.

Morrison RB, Pijoan C, Hilley HD, Rapp V. Microorganisms associated with pneumonia in slaughter weight swine. *Can J Comp Med* 1985; 49: 129-137.

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, Chang YM, Wieland B, Rechter G, Spargser J, Rosengarten R, Kreienbrock L, Grosse Beilage E. Herd level risk factors for the seropositivity to *Mycoplasma hyopneumoniae* and the occurrence of enzootic pneumonia among fattening pigs in areas of endemic infection and high pig density. *Transbound Emerg Dis* 2012a: 316-328.

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

Nathues H, Woeste H, Doehring S, Fahrion AS, Doherr MG, grosse Beilage E. Herd specific risk factors for *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in suckling pigs at the age of weaning. *Acta Vet Scand* 2013a; 55: 30-42.

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

Noyes EP, Feeney DA, Pijoan C. Comparison of the effect of pneumonia detected during lifetime with pneumonia detected at slaughter on growth in swine. *J Am Vet Med Assoc* 1990; 197: 1025-1029.

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. Keimspektrum und Erregerassoziationen bei gesunden und an Pneumonie erkrankten Schweinen. Diss. med. vet. 2006. Ludwig-Maximilians-Universität, München.

Paul-Ehrlich-Institut. Immunologische Tierarzneimittel für Schweine. 2019; 10.07.2019: <https://www.pei.de/DE/arzneimittel/impfstoff-impfstoffe-fuer-tiere/schweine/schweine-node.html>. 18.07.2019.

Pieters M, Fano E, Dee S, Pijoan C (2006). Transmission of *Mycoplasma hyopneumoniae* to vaccinated and unvaccinated replacement gilts from persistently infected pigs. 19th Cong Int Pig Vet Soc. Copenhagen, Dänemark. 102.

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

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

Pieters M, Cline GS, Payne BJ, Prado C, Ertl JR, Rendahl AK. Intra-farm risk factors for *Mycoplasma hyopneumoniae* colonization at weaning age. *Vet Microbiol* 2014; 172: 575-580.

Pieters M, Daniels J, Rovira A. Comparison of sample types and diagnostic methods for in vivo detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* during early stages of infection. *Vet Microbiol* 2017; 203: 103-109.

Pieters M, Maes D. Mycoplasmosis. In: *Diseases of Swine*, 11 edn. Zimmerman JJ, Karriker L, Ramirez A, Schwartz K, Stevenson G, Zhang J, eds.: John Wiley & Sons 2019: 863-883.

Pommier P, Keita A, Pagot E, Flochlay A. Field efficacy of a *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccine in the control of enzootic pneumonia in swine. *Rev Med Vet (Toulouse)* 2000; 151: 835-840.

Prickett JR, Zimmerman JJ. The development of oral fluid-based diagnostics and applications in veterinary medicine. *Anim Health Res Rev* 2010; 11: 207-216.

Prickett JR, Johnson J, Murtaugh MP, Puvanendiran S, Wang C, Zimmerman JJ, Opriessnig T. Prolonged detection of PCV2 and anti-PCV2 antibody in oral fluids following experimental inoculation. *Transbound Emerg Dis* 2011; 58: 121-127.

Ramirez A, Wang C, Prickett JR, Pogranichniy R, Yoon KJ, Main R, Johnson JK, Rademacher C, Hoogland M, Hoffmann P, Kurtz A, Kurtz E, Zimmerman JJ. Efficient surveillance of pig populations using oral fluids. *Prev Vet Med* 2012; 104: 292-300.

Rautiainen E, Wallgren P. Aspects of the Transmission of Protection against *Mycoplasma hyopneumoniae* from Sow to Offspring. *J Vet Med B* 2001; 48: 55-65.

Rawal G, Arruda P, Rademacher C. General overview of the detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* DNA by quantitative polymerase chain reaction in diagnostic cases submitted to the Iowa State University Veterinary Diagnostic Laboratory from 2004 to 2016. *J Swine Health Prod* 2018; 26: 309-315.

Redondo E, Masot AJ, Fernández A, Gázquez A. Histopathological and Immunohistochemical Findings in the Lungs of Pigs Infected Experimentally with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *J Comp Pathol* 2009; 140: 260-270.

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.

Roof M, Burkhart K, Zuckermann F (2001). Evaluation of the immune response and efficacy of 1 and 2 dose commercial *Mycoplasma hyopneumoniae* bacterins. 32nd Ann Meet Am Assoc Swine Vet. Nashville, Tennessee. 163-167.

Rooke JA, Bland IM. The acquisition of passive immunity in the new-born piglet. *Livest Prod Sci* 2002; 78: 13-23.

Roos LR, Fano E, Homwong N, Payne B, Pieters M. A model to investigate the optimal seeder-to-naïve ratio for successful natural *Mycoplasma hyopneumoniae* gilt exposure prior to entering the breeding herd. *Vet Microbiol* 2016; 184: 51-58.

Ruiz A, 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, Ramírez AS, Fernández A, Gómez-Villamandos JC, Jover A, Lorenzo H, Herráez P, Rodríguez F. A Morphologic and Immunohistochemical Study of the Bronchus-associated Lymphoid Tissue of Pigs Naturally Infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Vet Pathol* 2003; 40: 395-404.

Segalés J, Valero O, Espinal A, López-Soria S, Nofrarías 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 HJ. Zellwandlose Bakterien der Klasse Mollicutes. In: Tiermedizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre, 10 edn. Selbitz HJ, Truyen U, Valentin-Weignand P, eds. Stuttgart: Enke Verlag 2015: 315-324.

Sheldrake RF, Gardner IA, Saunders MM, Romalis LF. Serum antibody response to *Mycoplasma hyopneumoniae* measured by enzyme-linked immunosorbent assay after experimental and natural infection of pigs. *Aust Vet J* 1990; 67: 39-42.

Shen Y, Hu W, Wei Y, Feng Z, Yang Q. Effects of *Mycoplasma hyopneumoniae* on porcine nasal cavity dendritic cells. *Vet Microbiol* 2017; 198: 1-8.

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

Sibila M, Nofrarias M, Lopez-Soria S, Segales J, Riera P, Llopart D, Calsamiglia M. Exploratory field study on *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in suckling pigs. *Vet Microbiol* 2007b; 121: 352-356.

Sibila M, Bernal R, Torrents D, Riera P, Llopart D, Calsamiglia M, Segales J. Effect of sow vaccination against *Mycoplasma hyopneumoniae* on sow and piglet colonization and seroconversion, and pig lung lesions at slaughter. *Vet Microbiol* 2008; 127: 165-170.

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

Sibila M, Fort M, Nofrarías M, Pérez de Rozas A, Galindo-Cardiel I, Mateu E, Segalés J. Simultaneous Porcine Circovirus Type 2 and *Mycoplasma hyopneumoniae* Co-inoculation does not Potentiate Disease in Conventional Pigs. *J Comp Pathol* 2012; 147: 285-295.

Sitjar M, Noyes EP, Simon X, Pijoan C. Relationships among seroconversion to *Mycoplasma hyopneumoniae*, lung lesions, and production parameters in pigs. *J Swine Health Prod* 1996; 4: 273-277.

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.

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

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

Stärk KDC. Epidemiological Investigation of the Influence of Environmental Risk Factors on Respiratory Diseases in Swine- A Literature Review. *Vet J* 2000; 159: 37-56.

Stärk KDC, Miserez R, Siegmann S, Ochs H, Infanger P, Schmidt J. A successful national control programme for enzootic respiratory diseases in pigs in Switzerland. *Rev Sci Tech* 2007; 26: 595-606.

Statistisches Bundesamt (2017). Land- und Forstwirtschaft, Fischerei Viehbestand Vorbericht, Fachserie 3 Reihe 4.1.

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

Straw B, Backstrom L, Leman A. Examination of swine at slaughter. II. Findings at slaughter and their significance. *The Compendium on continuing education for the practicing veterinarian* 1986; 8: 106-112.

Syrovets T, Tippler B, Rieks M, Simmet T. Plasmin Is a Potent and Specific Chemoattractant for Human Peripheral Monocytes Acting Via a Cyclic Guanosine Monophosphate-Dependent Pathway. *Blood* 1997; 89: 4574-4583.

Syrovets T, Jendrach M, Rohwedder A, Schüle A, Simmet T. Plasmin-induced expression of cytokines and tissue factor in human monocytes involves AP-1 and IKK β -mediated NF- κ B activation. *Blood* 2001; 97: 3941-3950.

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

Tassis PD, Tsakmakidis I, Papatsiros VG, Koulialis D, Nell T, Brellou G, Tzika ED. A randomized controlled study on the efficacy of a novel combination vaccine against enzootic pneumonia (*Mycoplasma hyopneumoniae*) and porcine Circovirus type 2 (PCV2) in the presence of strong maternally derived PCV2 immunity in pigs. *BMC Vet Res* 2017; 13: 91-99.

Tavío M, Poveda C, Assunção P, Ramírez A, Poveda J. In vitro activity of tylvalosin against Spanish field strains of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Vet Rec* 2014; 175: 539-539.

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

Thacker EL, Halbur PG, Ross RF, Thanawongnuwech R, Thacker BJ. Mycoplasma hyopneumoniae potentiation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus-induced pneumonia. J Clin Microbiol 1999; 37: 620-627.

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

Thacker EL. Diagnosis of Mycoplasma hyopneumoniae. J Swine Health Prod 2004; 12: 252-254.

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

Thacker EL, Minion F. Mycoplasmosis. In: Diseases of Swine, 10 edn. Karriker LA, Zimmerman JJ, Ramirez A, Schwartz K, Stevenson G, eds. West Sussex: John Wiley & Sons, Inc. 2012: 779-797.

Thongkamkoon P, Narongsak W, Kobayashi H, Pathanasophon P, Kishima M, Yamamoto K. In Vitro Susceptibility of Mycoplasma hyopneumoniae Field Isolates and Occurrence of Fluoroquinolone, Macrolides and Lincomycin Resistance. J Vet Med Sci 2013; 75: 1067-1070.

Tzika ED, Tassis PD, Koulialis D, Papatsiros VG, Nell T, Brellou G, Tsakmakidis I. Field efficacy study of a novel ready-to-use vaccine against mycoplasma hyopneumoniae and porcine circovirus type 2 in a Greek farm. Porcine Health Manag 2015; 1: 15-21.

Valasek MA, Repa JJ. The power of real-time PCR. Adv Physiol Educ 2005; 29: 151-159.

Valentin-Weigand P. Allgemeine Bakteriologie, Grundlagen. In: Tiermedizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre, 10 edn. Selbitz H-J, Truyen U, Valentin-Weigand P, eds. Stuttgart: Enke Verlag 2015: 96-121.

Vangroenweghe F, Labarque G, Piepers S, Strutzberg-Minder K, Maes D. Mycoplasma hyopneumoniae infections in peri-weaned and post-weaned pigs in Belgium and The Netherlands: prevalence and associations with climatic conditions. *Vet J* 2015; 205: 93-97.

Vicca J, Maes D, Thermote L, Peeters J, Haesebrouck F, de Kruif A. Patterns of Mycoplasma hyopneumoniae Infections in Belgian Farrow-to-Finish Pig Herds with Diverging Disease-Course. *J Vet Med B* 2002; 49: 349-353.

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

Vicca J, Stakenborg T, Maes D, Butaye P, Peeters J, de Kruif A, Haesebrouck F. In Vitro Susceptibilities Mycoplasma hyopneumoniae Field Isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 4470-4472.

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

Villarreal I, Vranckx K, Duchateau L, Pasmans F, Haesebrouck F, Jensen J, Nanjiani I, Maes D. Early Mycoplasma hyopneumoniae infections in European suckling pigs in herds with respiratory problems: detection rate and risk factors. *Vet Med* 2010; 55: 318-324.

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* 2011; 188: 48-52.

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* 2012; 8: 24-30.

Wallgren P, Beskow P, Fellström C, Renström LHM. Porcine Lung Lesions at Slaughter and their Correlation to the Incidence of Infections by *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Actinobacillus pleuropneumoniae* during the Rearing Period. *J Vet Med B* 1994; 41: 441-452.

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.

Weiss E, Roland R. Atmungsorgane. In: *Grundriß der speziellen pathologischen Anatomie der Haustiere*, 6 edn. Dahme E, Weiss E, eds. Stuttgart: Georg Thieme Verlag 2007: 49-81.

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

Woolley 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.

Woolley LK, Fell SA, Gonsalves JR, Raymond BBA, Collins D, Kuit TA, Walker MJ, Djordjevic SP, Eamens GJ, Jenkins C. Evaluation of recombinant *Mycoplasma hyopneumoniae* P97/P102 paralogs formulated with selected adjuvants as vaccines against mycoplasmal pneumonia in pigs. *Vaccine* 2014; 32: 4333-4341.

Yagihashi T, Kazama S, Tajima M. Seroepidemiology of mycoplasmal pneumonia of swine in Japan as surveyed by an enzyme-linked immunosorbent assay. *Vet Microbiol* 1993; 34: 155-166.

Yamamoto K, Koshimizu K, Ogata M. In Vitro Susceptibility of *Mycoplasma hyopneumoniae* to Antibiotics. *Jpn J Vet Sci* 1986; 48: 1-5.

Yeske P (2007). *Mycoplasma* eradication strategies. Ann Meet Am Assoc Swine Vet. Orlando, USA. 367.

Zielinski GC, Ross R. 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; 131: 179-186, 191.

XI. DANKSAGUNG

An erster Stelle geht mein besonderer Dank an Professor Dr. Mathias Ritzmann für die Überlassung dieses spannenden und aktuellen Themas sowie der Ermöglichung der Mitarbeit an der Klinik für Schweine.

Ebenfalls bedanke ich mich bei meinem Betreuer Dr. med. vet. habil. Matthias Eddicks für die Inspirationen, Korrekturen und die lehrreichen und oftmals erheiternden Ausführungen.

Ein großes Dankeschön geht auch an alle Mitarbeiter und Doktoranden der Klinik für Schweine, auch die bereits ausgeschiedenen. Eure Mithilfe bei den vielen Studienfahrten war unentbehrlich. Danke, dass ihr nicht nur im Stall bei tropischen Temperaturen mit mir geschwitzt habt, sondern auch die langen Autofahrten dank euch nie langweilig wurden! Insbesondere bedanke ich mich bei Roland Maurer, der mit mir zusammen die Planung der Studie, die Organisation der Betriebe und jede Ausfahrt gemeistert hat. Wir waren ein super Team!

Vielen Dank auch an alle Tierärzte, die uns bei der Suche nach passenden Beständen unterstützt haben, sowie an alle Landwirte. Danke, für das entgegengebrachte Vertrauen und die Mithilfe, ohne die diese Studie nicht möglich gewesen wäre!

Bei der Firma CEVA Tiergesundheit möchte ich mich für die Bereitstellung der finanziellen Mittel für dieses Projekt sowie die Durchführung der Lungenuntersuchungen am Schlachthof bedanken. Besonderer Dank geht an Dr. Cvjetkovic, für deine tatkräftige Unterstützung bei vielen Beprobungsterminen!

Danke an meinen Freund David, für deine Unterstützung und auch deine Geduld, die ich bisweilen sehr strapaziert habe.

Meinen Eltern und Großeltern, die mir diesen Weg erst ermöglicht haben, danke ich für die immerwährende Unterstützung und das Vertrauen, das ihr in mich setzt. Danke für euren Zuspruch, wenn ich ihn am meisten brauchte!