

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

Vergleichende Untersuchung zum molekularbiologischen
Nachweis von *Lawsonia intracellularis* und
Brachyspira ssp. aus Sammelkotproben und Oral Fluid
Samples bei Mastschweinen

von Sigena Junker
aus Bad Mergentheim
München 2021

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: Priv.-Doz. 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: Univ.-Prof. Dr. Nicolai T. Siegel

Tag der Promotion: 06.02.2021

Meiner Familie

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG.....	1
II.	LITERATURÜBERSICHT	3
1.	Lawsonia intracellularis.....	3
1.1.	Historischer Überblick.....	3
1.2.	Morphologie und allgemeine Eigenschaften	3
1.3.	Epidemiologie	4
1.4.	Pathogenese	5
1.5.	Verlaufsformen einer Infektion mit <i>Lawsonia intracellularis</i>	5
1.5.1.	Subklinischer Verlauf.....	6
1.5.2.	Akuter Verlauf.....	6
1.5.3.	Chronischer Verlauf	6
1.6.	Diagnostik.....	7
1.6.1.	Makroskopische Untersuchung	7
1.6.2.	Histologische Untersuchung	7
1.6.3.	Serologie.....	8
1.6.4.	PCR	8
1.7.	Kontroll- und Präventionsmaßnahmen	9
1.8.	Wirtschaftliche Bedeutung	10
2.	Brachyspira ssp.....	11
2.1.	Historischer Überblick.....	11
2.2.	Morphologie und allgemeine Eigenschaften	12
2.3.	Epidemiologie	12
2.4.	Pathogenese	13
2.5.	Klinik.....	13
2.6.	Diagnostik.....	14
2.6.1.	Kultureller Nachweis von <i>Brachyspira ssp.</i>	15
2.6.2.	PCR	15
2.6.3.	Serologie.....	16
2.7.	Kontroll- und Präventionsmaßnahmen	16
2.8.	Wirtschaftliche Auswirkungen.....	17
3.	Gewinnung von Oral Fluid Samples beim Schwein.....	18

III.	MATERIAL UND METHODEN.....	19
1.	Zielsetzung.....	19
1.2.	Auswahl der Versuchsbetriebe.....	20
1.3.	Voruntersuchungen.....	20
1.4.	Allgemeine Daten zu den Versuchsbetrieben.....	20
2.	Beprobung.....	21
3.	Labordiagnostik.....	23
3.1.	Vorbereitung der Proben.....	23
3.2.	PCR.....	23
3.3.	Sensitivität und Spezifität.....	24
4.	Klinische Beobachtung.....	25
5.	Statistische Auswertung.....	25
IV.	ERGEBNISSE.....	27
1.	Ergebnisse der molekularbiologischen Voruntersuchungen....	27
2.	Ergebnisse der molekularbiologischen Untersuchungen	
	- Feldstudie	28
2.1.	Nachweis von <i>Lawsonia intracellularis</i> DNA.....	28
2.1.1.	Nachweis von <i>Lawsonia intracellularis</i> DNA in Betrieb A.....	30
2.1.2.	Nachweis von <i>Lawsonia intracellularis</i> DNA in Betrieb B.....	32
2.2.	Nachweis von <i>Brachyspira hyodysenteriae</i> DNA	35
2.3.	Nachweis von <i>Brachyspira pilosicoli</i> DNA	38
2.4.	Assoziation zwischen den untersuchten Sammelkotproben und Oral Fluid Samples.....	39
3.	Ergebnisse der klinischen Beobachtung.....	43
3.1.	Kotkonsistenz und Verschmutzung in Betrieb A.....	43
3.2.	Kotkonsistenz und Verschmutzung in Betrieb B.....	44
3.3.	Zusammenhang zwischen Kotkonsistenz und Erregermenge im Kot	46

V.	DISKUSSION	49
1.	Interpretation der Ergebnisse der molekularbiologischen Untersuchungen.....	49
2.	Assoziation zwischen den Ergebnissen der Sammelkotproben und Oral Fluid Samples.....	53
3.	Zusammenhang klinischer Durchfallerscheinungen mit den nachgewiesenen Erregermengen im Kot.....	55
4.	Möglichkeiten Monitoring – Ausblick.....	57
VI.	ZUSAMMENFASSUNG.....	61
VII.	SUMMARY	63
VIII.	TABELLENVERZEICHNIS	65
IX.	LITERATURVERZEICHNIS	68
X.	ANHANG.....	85
XI.	DANKSAGUNG.....	86

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

°C	Grad Celcius
µl	Mikroliter
µM	Mikromol
<i>B.</i>	<i>Brachyspira</i>
BAL	Bronchoalveolärlavage
<i>C.</i>	<i>Campylobacter</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
g	Gramm
IFAT	Indirect Immunofluorescent Antibody Test
IgA	Immunglobulin A
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IPMA	Immunoperoxidase Monolayer Assay
ISH	In Situ-Hybridisierung
<i>L.</i>	<i>Lawsonia</i>
LOD	Limit of Detection
LOQ	Limit of Quantitation
LW	Lebenswoche
mg	Milligramm
Min	Minuten
ml	Milliliter
<i>M.</i>	<i>Mycoplasma</i>
mM	Millimol
n	Anzahl
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
n.b.	nicht berechnet
n.d.	nicht detektiert

NE	Nekrotisierende Enteritis
OFS	Oral Fluid Sample
p	Signifikanzwert
PCR	Polymerase Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction)
PCV2	Porzines Circovirus Typ 2
p.i.	<i>post infectionem</i>
PIA	Porzine Intestinale Adenomatose
PHE	Porzine Hämorrhagische Enteritis
PIS	Porzine Intestinale Spirochätose
PPE	Porzine Proliferative Enteropathie
PRDC	Porcine respiratory disease complex
PRRSV	Porzines reproduktives und respiratorisches Syndrom Virus
qPCR	Quantitative Polymerase Kettenreaktion
R	Korrelationskoeffizient
RI	Regionale Ileitis
S.	Serpulina
SD	Standardabweichung
ssp.	Subspezies
T.	Treponema

I. EINLEITUNG

Die bakteriellen Durchfallerreger *Lawsonia (L.) intracellularis*, *Brachyspira (B.) hyodysenteriae* und *Brachyspira (B.) pilosicoli* gelten, sowohl bei Einzel- als auch bei Mischinfektionen, als bedeutende Ursache wirtschaftlicher Verluste in der modernen Schweinehaltung (HAMPSON und BURROUGH, 2019; VANNUCCI et al., 2019).

Seit einigen Jahren hat die Diagnostik von viralen und bakteriellen Erkrankungen des Schweines mithilfe von Oral Fluid Samples (OFS) deutlich an Bedeutung gewonnen (PRICKETT und ZIMMERMAN, 2010). Allerdings werden in der Literatur hauptsächlich Untersuchungen von atemwegsassoziierten Erregern mithilfe von OFS beschrieben, wohingegen kaum wissenschaftliche Arbeiten zur Diagnostik von Durchfallerkrankungen mittels OFS zu finden sind (PRICKETT und ZIMMERMAN, 2010; FRANA et al., 2014; BJUSTROM-KRAFT et al., 2018). Da die Übertragung von *L. intracellularis*, *B. hyodysenteriae* und *B. pilosicoli* ausschließlich auf fäkal-oralem Weg erfolgt, ist davon auszugehen, dass die genannten Erreger zumindest kurzzeitig in OFS zu finden sind (HAMPSON und BURROUGH, 2019; VANNUCCI et al., 2019).

In der vorliegenden Studie sollen zwei konventionelle niederbayerische Schweinemastbetriebe in einer explorativen Verlaufsuntersuchung dreimalig mittels Multiplex Realtime-PCR aus Sammelkotproben und aus mithilfe von Baumwoll-Kaustricken gewonnenen Oral Fluid Samples auf das Vorkommen und die Quantität von *L. intracellularis*-, *B. hyodysenteriae*-, und *B. pilosicoli*-Genomfragmenten untersucht werden. Zudem soll ein Vergleich der detektierten Erregermengen in den unterschiedlichen Probenmedien eine Aussage über die Eignung von Oral Fluid Samples (OFS) als diagnostisches Mittel im Hinblick auf die genannten bakteriellen Durchfallerreger treffen lassen.

Des Weiteren soll durch die Erfassung von Kotbeschaffenheit und Verschmutzungsgrad der beprobten Tiergruppen untersucht werden, ob sich daraus Rückschlüsse auf die detektierte Erregermenge ziehen lassen.

Es ist anzunehmen, dass sich mithilfe von Kaustricken gewonnene Oral Fluid Samples gut für einen Nachweis dieser Erreger eignen und hinsichtlich regelmäßiger Bestandsscreenings eine deutlich günstigere Alternative zu den bisher etablierten Diagnostikmedien darstellen.

II. LITERATURÜBERSICHT

1. *Lawsonia intracellularis*

1.1. Historischer Überblick

Bereits 1931 beschreiben BIESTER und SCHWARTE eine infektiöse Enteritis mit adenomartigen Verdickungen der Schleimhaut im Ileum und im oberen Abschnitt des Colons als porzine proliferative Enteropathie (PPE), ohne jedoch einen Erreger nachweisen zu können. Zunächst wird *Campylobacter ssp.* (*C. jejuni/coli*, *C. sputorum ss mucosalis*, *C. hyointestinalis*) als ätiologisches Agens vermutet, durch das PPE experimentell allerdings nicht reproduzierbar ist (GEBHART et al., 1983; LAWSON et al., 1985). Später erhält der Erreger der PPE vorübergehend den Namen „*campylobacter-like organism*“, bis eine genetische Diversität zu *Campylobacter ssp.* nachgewiesen und die neue Bezeichnung *Ileal Symbiont intracellularis* zugewiesen wird (LAWSON et al., 1985; GEBHART et al., 1993; JONES et al., 1993). 1993 gelingt es schließlich, den Erreger zu identifizieren und in Rattenenterozyten anzuzüchten (LAWSON et al.). Ebenfalls 1993 können MCORIST et al. durch die Reproduktion einer PPE mithilfe aus Zellkultur gewonnener Inokula des Erregers die Koch'schen Postulate erfüllen und beweisen somit, dass *Ileal Symbiont intracellularis* deren Erreger ist.

Die 16S rRNA von *Ileal Symbiont intracellularis* weist große Ähnlichkeit zu *Desulfovibrio desulfiricans* auf, ein schwefelreduzierendes Bakterium, welches in anaeroben Milieus zu finden ist (GEBHART et al., 1993).

1995 wird mit der neuen taxonomischen Einordnung innerhalb der Familie der Desulfovibrionaceae die bisherige Bezeichnung verworfen und der bis heute gültige Name *Lawsonia (L.) intracellularis* vorgeschlagen (MCORIST et al., 1995).

1.2. Morphologie und allgemeine Eigenschaften

L. intracellularis ist ein gramnegatives, mikroaerophiles, säurefestes Bakterium, welches eine gekrümmte oder gerade Stäbchenform aufweisen kann (LAWSON et al., 1993; MCORIST et al., 1995).

Es besitzt eine trilaminäre Hülle und ein unipolares Flagellum, das für eine aktive Bewegung in Richtung der Zielzellen sorgt, jedoch innerhalb von infizierten Wirtszellen nicht mehr nachweisbar ist (GEBHART et al., 1993; VANNUCCI et al., 2019). *L. intracellularis* ist dazu in der Lage, sich mithilfe von chemotaktischen Reizen aktiv auf seine Zielzellen, hauptsächlich die Enterozyten des terminalen Ileums, zuzubewegen (LAWSON und GEBHART, 2000). Aufgrund seines obligat intrazellulären Wachstums kann *L. intracellularis* nicht mit den üblichen bakteriologischen Methoden kultiviert werden (LAWSON et al., 1993).

1.3. Epidemiologie

L. intracellularis ist in über 90% der europäischen Schweinebestände endemisch und kommt weltweit in allen Schweine haltenden Nationen vor (CHOUET et al., 2003; WENDT et al., 2006; PARADIS et al., 2007; HOLYOAKE et al., 2010; ARNOLD et al., 2019). Auch in Wildschweinpopulationen kann *L. intracellularis* weltweit nachgewiesen werden (VANNUCCI et al., 2019). Die Prävalenz von *L. intracellularis* in deutschen Schweinebeständen wird 2019 mit 91,7% angegeben (ARNOLD et al., 2019).

Neben Schweinen kann *L. intracellularis* bei vielen anderen Spezies nachgewiesen werden, unter anderem bei Hamster, Pferd oder Weißwedelhirsch (MCORIST et al., 1989; DROLET et al., 1996; PUSTERLA und GEBHART, 2009). Lokalisation und histologische Ausprägung einer Infektion mit *L. intracellularis* variieren zwischen den unterschiedlichen betroffenen Spezies, allerdings kann in allen Fällen eine typische Proliferation der Enterozyten beobachtet werden (LEBLANC et al., 1993). Die Vermutung, dass *L. intracellularis* auch beim Menschen vorkommt und ursächlich an chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (Inflammatory Bowel Disease) wie Morbus Crohn oder Colitis ulcerosa beteiligt sein könnte, ist mittlerweile widerlegt (MICHALSKI et al., 2006; JACOBSON et al., 2007a).

1.4. Pathogenese

Eine Infektion mit *L. intracellularis* erfolgt nach heutigem Kenntnisstand ausschließlich fäkal-oral (JORDAN et al., 2004). Bei experimenteller oraler Inokulation weisen Schweine nach drei bis fünf Tagen eine Besiedelung der Epithelzellen mit *L. intracellularis* in den betroffenen Darmabschnitten auf (LAWSON und GEBHART, 2000; BOUTRUP et al., 2010; VANNUCCI und GEBHART, 2014). In den meisten Fällen ist das distale Ileum betroffen, pathologische Veränderungen werden außerdem bis zum ersten Drittel des proximalen Kolons und selten noch bis in weiter distal gelegene Darmabschnitte beschrieben (JENSEN et al., 2006; VANNUCCI et al., 2019). Infizierte Epithelzellen vermehren sich mit deutlich erhöhter Zellteilungsrate und Migration (MCORIST et al., 1996). Das für die PPE typische, als „gartenschlauchartig“ beschriebene makroskopische Bild resultiert aus einer hyperplastischen Proliferation unreifer Kryptzellen und deren Unfähigkeit, sich zu Becherzellen zu differenzieren (HUAN et al., 2017). Infolge dessen wird die Schleimschicht auf der Oberfläche des Darmepithels deutlich reduziert (HUAN et al., 2017). Im späteren Verlauf der Infektion kann *L. intracellularis* auch in Makrophagen der Lamina propria nachgewiesen werden (JENSEN et al., 2006; BOUTRUP et al., 2010).

Die Ausscheidung des Erregers im Kot beginnt sieben Tage *post infectionem* und kann bis zu 12 Wochen beobachtet werden (VANNUCCI et al., 2019). Klinische Anzeichen einer Durchfallerkrankung lassen sich ab neun Tagen nach oraler Erregeraufnahme beobachten und können bis zu drei Wochen anhalten (VANNUCCI et al., 2019).

1.5. Verlaufsformen einer Infektion mit *Lawsonia intracellularis*

In verschiedenen wissenschaftlichen Arbeiten wird davon ausgegangen, dass die aufgenommene Erregermenge den Grad der pathologischen und klinischen Veränderungen beeinflusst (COLLINS und LOVE, 2007; COLLINS und BARCHIA, 2014). Die unterschiedlichen Verlaufsformen können, abhängig vom Infektionsdruck und von Sekundärerregern, ineinander übergehen.

1.5.1. Subklinischer Verlauf

Eine Infektion mit *L. intracellularis* scheint in den häufigsten Fällen einen subklinischen Verlauf zu nehmen (BRANDT et al., 2010). Hier zeigen die infizierten Tiere keine klinischen Erscheinungen einer Durchfallerkrankung, jedoch sind sowohl spezifische mikroskopische als auch makroskopische Veränderungen der Darmschleimhaut zu finden, die unter anderem für verminderte Gewichtszunahmen verantwortlich sind (MCORIST et al., 2003; KROLL et al., 2005; SCHOLZ et al., 2008).

1.5.2. Akuter Verlauf

Die akute Form einer PPE wird als porcine hämorrhagische Enteropathie (PHE) bezeichnet und tritt hauptsächlich bei älteren Mastschweinen, Jungsauern und Jungebern auf (VANNUCCI et al., 2019). Die serösen Häute von Jejunum und Ileum sind stark ödematisiert, bei der Sektion sind Blutkoagel und Zelldedritus im Lumen des Ileums zu finden. Histologisch werden hochgradige Nekrosen der Enterozyten beschrieben (POHLENZ, 2005; MCORIST und GEBHART, 2012). Die erkrankten Tiere verenden meist aufgrund eines hypovolämischen Schocks perakut oder kommen aufgrund blutigen Durchfalls zum Festliegen mit Anämie (POHLENZ, 2005).

1.5.3. Chronischer Verlauf

Die häufigste Ausprägung eines chronischen Verlaufs ist die porcine Intestinale Adenomatose (PIA), die typischerweise nach Erregerkontakt im Ferkelalter auftritt (MCORIST et al., 2003). Als Erregerreservoir werden subklinisch infizierte Sauen vermutet (CHOUET et al., 2003; MCORIST et al., 2003). Die Schleimhaut des Ileums ist makroskopisch hinwindungsartig verdickt, histologisch sind je nach Schweregrad massenhaft unreife Enterozyten und kaum Becherzellen zu finden. Mukosa und Submukosa dieser Darmabschnitte sind ödematisiert und von Entzündungszellen infiltriert (MCORIST und GEBHART, 2012). Klinisch äußern sich diese pathologischen Veränderungen in leichten bis mittelschweren Durchfällen mit Kot von physiologischer Farbe ohne Blutbeimengungen, während die Futtermittelaufnahme der Tiere bei verminderten Gewichtszunahmen nur schwach reduziert ist oder

vollständig erhalten bleibt (MCORIST und GEBHART, 2012).

Weitere selten vorkommende Erscheinungsformen einer chronischen Infektion mit *L. intracellularis* sind die Regionale Ileitis (RI) und die Nekrotisierende Enteritis (NE) (VANNUCCI et al., 2019). Diese beiden Verlaufsformen, die bei allen Altersgruppen beobachtet werden können, äußern sich hauptsächlich durch Kümern, unspezifische Durchfälle und vereinzelt akute Todesfälle (POHLENZ, 2005). Das Risiko, an NE zu erkranken, scheint in schweinehaltenden Betrieben mit mangelhafter Hygiene erhöht zu sein, zusätzlich können sekundäre bakterielle Erreger den Verlauf der Erkrankung beeinflussen (VANNUCCI et al., 2019).

1.6. Diagnostik

Aufgrund der oben beschriebenen unterschiedlichen klinischen Ausprägungen und Schweregrade einer Infektion mit *L. intracellularis*, kann eine Diagnose nicht ausschließlich auf Basis des klinischen Bildes gestellt werden.

1.6.1. Makroskopische Untersuchung

Durch hyperplastische Proliferation der Epithelzellen, vergrößerte Krypten und fehlende Becherzellen ergibt sich eine für PPE typische hirnwindungsartige Verdickung der Darmwand sowie ein vergrößerter Durchmesser des Lumens, insbesondere im Ileum (MCORIST et al., 1996; VANNUCCI et al., 2019). Zusätzlich können in den betroffenen Darmabschnitten subseröse Ödeme vorhanden und die mesenterialen Lymphknoten vergrößert sein (HUERTA et al., 2003).

1.6.2. Histologische Untersuchung

Für die histologische Untersuchung auf *L. intracellularis* eignen sich verschiedene Färbemethoden: Hämatoxylin-Eosin-Färbung mit einer Sensitivität von 41%, modifizierte Ziehl-Neelsen-Färbung mit einer Sensitivität von 55% und Warthin-Starry-Färbung mit einer Sensitivität von 34%, allerdings sollten diese Methoden lediglich zur Bestätigung einer Diagnose herangezogen und durch einen direkten Erregernachweis ergänzt werden (DÜNSER et al., 2003; LADINIG et al., 2009).

1.6.3. Serologie

Ein Nachweis spezifischer Antikörper gegen *L. intracellularis* kann durch verschiedene serologische Methoden erbracht werden. Mittels Indirect Immunofluorescent Antibody Test (IFAT), Immunperoxidase Monolayer Assay (IPMA) oder Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) lassen sich mit hoher Sensitivität und Spezifität IgG, IgM sowie lokale IgA Antikörper detektieren (KNITTEL et al., 1998; GUEDES et al., 2002; KELLER et al., 2004; BOESEN et al., 2005).

Serologischen Testmethoden sollten insbesondere im Hinblick auf die möglicherweise intermittierende Erregerausscheidung von *L. intracellularis* im Rahmen einer vollständigen Diagnostik bei lebenden Tieren zusätzlich zu einem Antigennachweis und insbesondere zur Bestimmung des richtigen Impfzeitpunktes angewandt werden (KNITTEL et al., 1998; VANNUCCI et al., 2019).

1.6.4. PCR

Der Nachweis von *L. intracellularis* Genomfragmenten erfolgt üblicherweise mittels PCR aus Kotproben oder Darmschleimhaut des Ileums (JONES et al., 1993; JENSEN et al., 1998; LA et al., 2006; NATHUES et al., 2007). Da eine intermittierende Ausscheidung von *L. intracellularis* beschrieben ist, ist diese Methode besonders für akut klinisch erkrankte Tiere geeignet, während subklinisch erkrankte Tiere aufgrund der Ausscheidung geringer Erregermengen fälschlicherweise als negativ eingestuft werden könnten (GUEDES und GEBHART, 2003). Die Sensitivität und Spezifität unterschiedlicher PCR Protokolle kann erhebliche Unterschiede aufweisen (LADINIG et al., 2009; PEDERSEN et al., 2010).

Ein alleiniger Nachweis von Genomfragmenten lässt noch keine Aussage über den Gesundheitszustand der Tiere zu, da *L. intracellularis* den Gastrointestinaltrakt durchwandern kann, ohne eine Infektion auszulösen (PEDERSEN et al., 2012b). So weisen Tiere, aus deren Kot *L. intracellularis* detektiert wird, nicht immer pathologische Veränderungen im Ileum auf (LINDECORONA et al., 2002).

Mittels quantitativer Realtime-PCR (qPCR) lassen sich die Erregermengen im Probenmaterial bestimmen (NATHUES et al., 2009; WILLEMS und REINER, 2010).

Bei Tieren, die für eine PPE typische makroskopische Läsionen aufweisen, ist die im Kot ausgeschiedene Erregermenge höher, als bei Tieren ohne Läsionen (PEDERSEN et al., 2012b). Der Nachweis von *L. intracellularis* DNA ist kein Beweis einer Ileitis, Ileitis-assoziierte Läsionen korrelieren jedoch hochgradig mit der im Kot ausgeschiedenen Erregermenge (PEDERSEN et al., 2012b).

1.7. Kontroll- und Präventionsmaßnahmen

Zur antibiotischen Behandlung einer akuten PPE sind in Deutschland die Wirkstoffe Tamulin, Tylosin, Tylvalosin und Lincomycin zugelassen. Momentan stehen 17 Präparate zur Injektion oder oralen Medikation zur Verfügung, aus denen mithilfe eines Resistenztests das geeignete Präparat auszuwählen ist (VETERINÄRMEDIZINISCHER INFORMATIONSDIENST FÜR ARZNEIMITTELANWENDUNG, 2020). Ein Einfluss antibiotischer Wirkstoffe hinsichtlich der Serokonversion erkrankter Tiere scheint nicht gegeben (NATHUES, 2008).

Seit 2004 ist mit Enterisol® Ileitis (Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH) ein Impfstoff in Deutschland verfügbar, der ein vermehrungsfähiges Isolat von *L. intracellularis* (MS B3903) in lyophilisierter Form enthält und die wirtschaftlichen Schäden, insbesondere einer subklinischen Infektion mit *L. intracellularis*, reduzieren soll (KROLL et al., 2004). Eine Impfung mit Enterisol® Ileitis hat, anders als eine Behandlung mit antibiotischen Wirkstoffen, keinen Einfluss auf die Detektion von *L. intracellularis* mit den üblichen Testverfahren, allerdings kann der Impfstamm nicht vom *L. intracellularis* Wildtyp unterschieden werden (NATHUES, 2008).

2019 wird mit Porcilis® Lawsonia (MSD Animal Health) ein inaktivierter Impfstoff (*L. intracellularis* Stamm SPAH-08) zur Injektion in Deutschland zugelassen. Im Gegensatz zu einer Lebendvakzine, deren Anwendung nicht mit einer gleichzeitigen Verabreichung antimikrobieller Wirkstoffe kompatibel ist, können bei Anwendung des inaktivierten Impfstoffes

mehrere Impfungen und, falls nötig, Behandlungen mit antibiotischen Wirkstoffen gleichzeitig durchgeführt werden (JACOBS et al., 2019).

Managementfaktoren wie abteil- oder stallweise Rein-Raus-Belegung, Reinigung und eine geeignete Desinfektion sind Grundvoraussetzungen einer modernen Tierhaltung und in der Krankheitsbekämpfung unerlässlich (COLLINS et al., 2000). Für eine vollständige *L. intracellularis* Bestandssanierung raten COLLINS et al. (2000) zu folgendem Protokoll: gründliches Waschen der Stallungen mit heißem Wasser, um sämtliches organische Material abzuspuhlen. Darauf folgt eine Desinfektion auf Basis von Jod oder einer quaternären Ammoniumverbindung mit mindestens 30-minütiger Einwirkzeit (COLLINS et al., 2000). Nach nochmaligem gründlichen Waschen sollte der Stall für mindestens zwei Wochen leer stehen, bevor schlussendlich *L. intracellularis* negative Tiere eingestallt werden (COLLINS et al., 2000).

1.8. Wirtschaftliche Bedeutung

Bereits eine subklinische Infektion mit *L. intracellularis* geht mit reduzierter Futtermittelverwertung und daraus resultierend verminderten Zunahmen, einer längeren Mastdauer und einem höheren Futtermittelverbrauch einher (SCHOLZ et al., 2008). Neben verlängerter Mastdauer und somit auch evtl. höherer Belegdichte auf den betroffenen Betrieben kommt es in klinisch erkrankten Schweinebeständen auch zu höheren Tierarztkosten, einer steigenden Mortalitätsrate, und in Ferkelerzeugerbetrieben teilweise zu Fruchtbarkeitsproblemen der Sauen (MCORIST, 2005). Der finanzielle Verlust in an PPE erkrankten Beständen wird somit auf >100€ pro Sau und Jahr geschätzt (MCORIST, 2005). Es ist anzunehmen, dass *L. intracellularis* noch einen wesentlich höheren finanziellen Schaden weltweit verursacht, da in oben genannte Berechnungen nur Fälle einbezogen sind, in denen tatsächlich klinische Erkrankungen festgestellt werden können (MCORIST, 2005; VANNUCCI et al., 2019).

2. *Brachyspira* ssp.

Das zur Klasse der Spirochäten gehörende Genus *Brachyspira* umfasst neun bislang anerkannte Spezies, von denen sieben das Schwein als Wirtsspezies haben (HAMPSON und BURROUGH, 2019). Neben der als apathogen geltenden Spezies *B. innocens*, den vereinzelt eine leichte Colitis verursachenden *B. murdochii*, und *B. intermedia*, die häufig als Kommensale im Intestinaltrakt zu finden sind, gelten *B. hyodysenteriae*, *B. hampsonii*, *B. suanatina* und *B. pilosicoli* als pathogen für das Schwein (TROTT et al., 1996b; PASTER und DEWHIRST, 2000; HAMPSON und BURROUGH, 2019).

2.1. Historischer Überblick

Schon 1921 wird das Krankheitsbild der Dysenterie des Schweines (Schweinedysenterie) beschrieben, jedoch gelingt es erst 1971, einen auf Blutagar stark hämolysierenden bakteriellen Erreger, der aufgrund seines Phänotyps zunächst als *Treponema (T.) hyodysenteriae* bezeichnet wird, zu isolieren (TAYLOR und ALEXANDER, 1971; GLOCK und HARRIS, 1972). Einige Jahre später kann eine weitere *Treponema* Spezies aus gesunden Schweinen isoliert werden, die sich in Kultur von *T. hyodysenteriae* durch ihre schwache Hämolyse unterscheidet und als *T. innocens* bezeichnet wird (KINYON und HARRIS, 1979). Anfang der 1990er Jahre wird die Gattung aufgrund molekularbiologischer Unterschiede vom Genus *Treponema* getrennt und kurzfristig phylogenetisch der Gattung *Serpula* und später *Serpulina* zugeordnet (STANTON, 1992). Aufgrund besserer diagnostischer Möglichkeiten können weitere, schwach hämolysierende *Serpulina (S.)* ssp., identifiziert werden, von denen *S. pilosicoli* als ätiologischem Agens der porzinen intestinalen Spirochätose (PIS) ebenfalls Pathogenität zugesprochen wird (TROTT et al., 1996a; TROTT et al., 1996b). 1997 wird die Gattung schließlich endgültig in Folge ihrer 16S-rRNA Sequenzanalyse als *Brachyspira* ssp. benannt (OCHIAI et al., 1997). Seit einigen Jahren wird davon ausgegangen, dass die Dysenterie des Schweines nicht ausschließlich von *B. hyodysenteriae* verursacht wird, sondern auch durch andere stark hämolysierende Brachyspiren (*B. suanatina*,

B. hampsonii,) hervorgerufen werden kann (RÅSBÄCK et al., 2007; BURROUGH et al., 2012; CHANDER et al., 2012).

Im Folgenden soll aufgrund der Fragestellung der vorliegenden Arbeit lediglich auf *B. hyodysenteriae* und *B. pilosicoli* näher eingegangen werden.

2.2. Morphologie und allgemeine Eigenschaften

Brachyspira ssp. sind gramnegative, anaerobe, schraubenförmige Bakterien, die sich mithilfe von periplasmatischen Endoflagellen spiralartig in Flüssigkeiten fortbewegen können (HOLT, 1978; HAMPSON und BURROUGH, 2019). Trotz ihres primär anaeroben Stoffwechsels sind sie in der Lage, kurzfristig mithilfe der NADH Oxidase Sauerstoff zu verstoffwechseln (STANTON et al., 1999). Das Wachstum der Bakterienkulturen ist langsam, die Kolonien auf festen, bluthaltigen Nährböden sind transparent und bilden typischerweise je nach Spezies eine leichte (*B. pilosicoli*) bis vollständige (*B. hyodysenteriae*) Betahämolysezone aus (OCHIAI et al., 1997; RÅSBÄCK et al., 2007; HAMPSON und BURROUGH, 2019).

2.3. Epidemiologie

Die Dysenterie des Schweines gilt in vielen Schweine haltenden Nationen als endemisch, ebenso die porcine intestinale Spirochätose (HAMPSON und BURROUGH, 2019).

Schadnager, insbesondere Mäuse, die mit *B. hyodysenteriae* infiziert sind, stellen ein Risiko als Erregerreservoir dar, da der Erreger sowohl von Maus zu Maus als auch von Maus zu Schwein übertragen werden kann (JOENS, 1980).

Im Gegensatz zu den restlichen beim Schwein vorkommenden Brachyspirenspezies kann *B. pilosicoli* auch beim Menschen eine Infektion und Bakteriämie hervorrufen und gilt somit als Zoonoseerreger (LEE und HAMPSON, 1994; TRIVETT-MOORE et al., 1998; HAMPSON et al., 2006; PRIM et al., 2011). Humane Isolate von *B. pilosicoli* können laut SMITH (2005) wiederum eine Durchfallerkrankung beim Schwein hervorrufen. Eine von *B. pilosicoli* hervorgerufene intestinale

Spirochätose ist außerdem auch bei Geflügel, Hunden und weiteren Säugetierarten beschrieben (TRIVETT-MOORE et al., 1998; SHIVAPRASAD und DUHAMEL, 2005; HIDALGO et al., 2010).

2.4. Pathogenese

Nach der oralen Aufnahme von infiziertem Kot passieren *Brachyspira ssp.* unbeschadet Magen und Dünndarm, bevor sie, geleitet durch eine starke Chemotaxis für Muzine, die Schleimhaut von Zäkum und Kolon besiedeln (GIRARD et al., 1995; KENNEDY und YANCEY JR, 1996; HAMPSON und BURROUGH, 2019). Nach dem aktiven Eindringen der Erreger in Becherzellen steigt deren Schleimsekretion (POHLENZ et al., 1983). Typische Läsionen in den betroffenen Darmabschnitten sind Hyperämie und Ödeme der Darmwand, des Mesenteriums und der mesenterialen Lymphknoten (HAMPSON und BURROUGH, 2019). Diese Läsionen werden durch Hämolytine und Lipooligosaccharide verursacht (HALTER und JOENS, 1988; LYSONS et al., 1991).

Die Inkubationszeit kann, in Abhängigkeit von unterschiedlichen Faktoren wie Erregerdruck, Futterzusammensetzung und Stress, von wenigen Tagen bis zu mehreren Monaten variieren (JACOBSON et al., 2004; HAMPSON und BURROUGH, 2019). Die Erregerausscheidung beginnt bereits vor dem Auftreten klinischer Erscheinungen und kann intermittierend oder konstant über Monate anhalten (HAMPSON und BURROUGH, 2019).

Coinfektionen mit *Salmonella ssp.*, *L. intracellularis* oder dem porcinen Circovirus Typ 2 (PCV2) können das klinische Bild zudem erheblich verschlechtern (GIRARD et al., 1995; STEGE et al., 2000; HAMPSON und BURROUGH, 2019).

2.5. Klinik

Das typische klinische Erscheinungsbild einer Schweinedysenterie beinhaltet zu Anfang breiigen, gelb bis grau-braun verfärbten Kot, im weiteren Verlauf der Erkrankung mit Schleim, Blut und Fibrinfetzen einhergehend (POHLENZ et al., 1983; HAMPSON und BURROUGH, 2019). Die Rektaltemperatur der erkrankten Schweine kann für kurze Zeit

auf bis zu 40,6°C ansteigen, bleibt in den meisten Fällen jedoch im physiologischen Bereich (JACOBSON et al., 2007b). Der Verlauf und Schweregrad einer Schweinedysenterie wird durch verschiedene Stressoren wie Fütterung, Gruppengröße, Umstallung, Neugruppierungen, Coinfektionen und nicht zuletzt der Erregermenge von *B. hyodysenteriae* in der Umwelt maßgeblich beeinflusst (JACOBSON et al., 2004; HAMPSON und BURROUGH, 2019). In Tierbeständen, in denen *B. hyodysenteriae* endemisch ist, kann es zu zyklisch auftretenden, milden Ausbrüchen von Schweinedysenterie mit geringer Mortalität kommen (HAMPSON und BURROUGH, 2019). In Beständen mit Neuinfektionen naiver Tiere kann die Morbidität auf bis zu 90% und die Mortalität auf bis zu 30% steigen (HAMPSON und BURROUGH, 2019).

Der Verlauf einer porzinen intestinalen Spirochätose (PIS) geht gelegentlich mit breiig bis wässrigem, zementfarbenem Durchfall mit geringgradigen Schleimbeimengungen einher und ähnelt somit dem Verlauf einer milden Schweinedysenterie (GIRARD et al., 1995; TROTT et al., 1996b). Eine Differenzierung zwischen einer mild verlaufenden Dysenterie des Schweines und einer porzinen intestinalen Spirochätose ist aufgrund der ähnlichen klinischen Verläufe und pathologischen Veränderungen nicht ohne weiterführende labordiagnostische Untersuchungen möglich (HAMPSON und BURROUGH, 2019).

2.6. Diagnostik

Durch den Nachweis einer hohen Anzahl von Spirochäten mittels unspezifischer Färbung oder Dunkelfeldmikroskopie von Kot- oder Schleimhautausstrichen kann lediglich eine Verdachtsdiagnose gestellt werden (HAMPSON und BURROUGH, 2019). Eine sichere Erregerbestimmung kann nur mittels kulturellem Nachweis in Verbindung mit weiterführenden biochemischen Tests oder PCR gewährleistet werden (BURROUGH, 2017).

2.6.1. Kultureller Nachweis von *Brachyspira* spp.

Brachyspiren lassen sich unter anaeroben Bedingungen sowohl in flüssigen, als auch auf festen, bluthaltigen Nährmedien bei einer Temperatur von 38°C - 39°C kultivieren.

Geeignet sind z.B. Brain-Heart-Infusion-Boullion mit FSK-Zusatz, Trypticase-Soja-Agar mit 5% Schaf- oder Kälberblut oder Columbia Agar (CALDERARO et al., 2005). Zusätzlich werden dem Nährmedium antibakterielle Wirkstoffe, gegen die *Brachyspira* spp. eine intrinsische Resistenz besitzen (Spiramycin, Rifampicin, Colistin, Vancomycin, Spectinomycin), hinzugefügt, um eine bakterielle Begleitflora zu unterdrücken (KUNKLE und KINYON, 1988; CALDERARO et al., 2005).

BURROUGH et al. (2012) stellen eine starke Korrelation zwischen Hämolysegrad und Virulenz von unterschiedlichen *Brachyspira* spp. fest und schlussfolgern daraus, dass die Unterscheidung anhand des Hämolysegrades eine sensitivere Methode der Diagnostik darstellt als eine PCR. Während *B. hyodysenteriae* eine starke β -Hämolyse aufweist, zeigt *B. pilosicoli* nur eine leichte β -Hämolysezone (HAMPSON und BURROUGH, 2019).

2.6.2. PCR

Der Nachweis von *Brachyspira* spp. mittels PCR ist sowohl direkt aus Kot oder Darmschleimhaut, als auch aus Bakterienkulturen möglich (HAMPSON und BURROUGH, 2019). Im Gegensatz zu einer zeitaufwändigen Anzucht liefert eine direkte molekularbiologische Untersuchung mittels PCR aus Kot oder Darmschleimhaut wesentlich schneller Ergebnisse (HAMPSON und BURROUGH, 2019). Jedoch wird einer PCR direkt aus Kot eine geringere Sensitivität zugesprochen als einer PCR aus einer reinen Bakterienkultur (RÅSBÄCK et al., 2006; BURROUGH et al., 2012).

Als Target werden die ribosomalen RNA-Gene 16S rRNA und 23S rRNA, das *tlyA* Hämolysin-Gen oder das NADH-oxidase-Gen (*nox*-Gen) verwendet (LESER et al., 1997; ATYEO et al., 1998; FELLSTRÖM et al., 2001). Für den gleichzeitigen Nachweis mehrerer *Brachyspira* Spezies existieren verschiedene Duplex- bzw. Multiplex-PCRs (LA et al., 2003; LA et al., 2006; WILLEMS und REINER, 2010).

Bei latent infizierten oder mit antimikrobiellen Wirkstoffen behandelten Tieren besteht aufgrund geringer oder intermittierender Erregerausscheidung die Gefahr eines falsch negativen PCR-Ergebnisses (HAMPSON und BURROUGH, 2019).

2.6.3. Serologie

Serologische Diagnostikmethoden wie ELISA kommen in der Routine-Diagnostik von *Brachyspira ssp.* kaum zur Anwendung, da diese Tests nicht auf spezies-spezifischen Antikörpern basieren und somit eine geringe Sensitivität und Spezifität haben (HAMPSON und BURROUGH, 2019). Neben Serum kommt auch Fleischsaft als Testmedium für die Erhebung eines Schweinedysenterie-Herdenstatus in Frage (SONG et al., 2012).

2.7. Kontroll- und Präventionsmaßnahmen

Zur Behandlung von *Brachyspira ssp.* assoziierten Erkrankungen stehen mehrere antibiotische Wirkstoffe zur Verfügung, die aufgrund zunehmender Resistenzentwicklungen jedoch ausschließlich auf Basis eines Resistenztests anzuwenden sind (BURROUGH, 2017). Eine Therapie mit antimikrobiellen Wirkstoffen führt zwar zu einer Reduktion der Erregermenge sowie zu einer Verbesserung der klinischen Durchfallerscheinungen, allerdings lässt sich der Erreger dadurch nicht vollständig aus einem Tierbestand eliminieren (WALDMANN, 1992; TAKAYAMA et al., 2012; HAMPSON und BURROUGH, 2019).

Vor allem im Falle einer Neuinfektion eines naiven Tierbestandes mit Schweinedysenterie sind hierfür umfassende Sanierungsmaßnahmen notwendig, die unter anderem eine Reduktion des Tierbestandes, Antibiotikatherapie der verbleibenden Tiere, Einschränkungen des

Tierverkehrs, Gülledesinfektion und eine rigorose Schadnagerbekämpfung enthalten (KAMP et al.; JOENS und KINYON, 1982; BURROUGH, 2017; HAMPSON und BURROUGH, 2019).

Momentan existiert kein Impfstoff, der einen ausreichenden Schutz gegen eine Infektion bzw. klinische Erkrankung mit *Brachyspira ssp.* bieten kann (HAMPSON et al., 2019).

2.8. Wirtschaftliche Auswirkungen

In der Schweinemast zählt die Schweinedysenterie durch reduzierte Zunahmen, Behandlungskosten und Todesfälle zu den verlustreichsten Durchfallerkrankungen in Ländern mit hoher Schweinepopulation (WALDMANN und PLONAIT, 2004). Eine Sanierung nach einem Schweinedysenterie-Ausbruch ist mit erheblichen Kosten und großem Aufwand verbunden (CADETG et al., 2019).

3. Gewinnung von Oral Fluid Samples beim Schwein

Für die Gewinnung von Oral Fluid Samples wird ein gut flüssigkeitsabsorbierendes Material benötigt, welches nicht direkt von den zu beprobenden Tieren zerstört werden kann (OLSEN et al., 2013). Unbehandelte Baumwolle schneidet aufgrund ihrer guten Absorptionseigenschaft im Vergleich zu anderen Materialien am besten für den Zweck der Oral Fluid Sample Gewinnung ab (OLSEN et al.). Obwohl nahezu jede Altersgruppe mittels Kaustricken aus Baumwolle beprobt werden kann, ist diese Methode besonders bei Mastschweinen gut geeignet (HERNANDEZ-GARCIA et al., 2017). Durch ihre arttypische Neugier benagen Schweine ihnen unbekannte Gegenstände und befeuchten sie so mit Maulhöhlenflüssigkeit (Oral Fluids) (KITTAWORNRAT und ZIMMERMAN, 2011). Diese kann neben Speichel unter anderem aus Sputum aus dem Respirationstrakt, Resten von Nahrung, desquamierten Schleimhautzellen, Bakterien, Viren und Pilzen bestehen (KAUFMAN und LAMSTER, 2002).

Aktuell werden hauptsächlich Atemwegserkrankungen mittels OFS in der Routinediagnostik untersucht, so können unter anderem subklinische und klinische Fälle des porzinen respiratorischen Krankheitskomplexes (porcine respiratory disease complex, PRDC), verursacht vom porzinen reproduktiven und respiratorischen Syndrom Virus (PRRSV), *Mycoplasma (M.) hyopneumoniae*, porzinen Circovirus Typ 2 (PCV2) sowie Influenza Virus in OFS nachgewiesen werden (HERNANDEZ-GARCIA et al., 2017).

III. MATERIAL UND METHODEN

1. Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die Eignung von mittels Kaustricken gewonnenen Oral Fluid Samples zur Diagnostik der bakteriellen Durchfallerreger *Lawsonia intracellularis*, *Brachyspira hyodysenteriae* und *Brachyspira pilosicoli* zu überprüfen. In einer explorativen Verlaufsuntersuchung werden dreimalig im Abstand von jeweils vier Wochen hinweg Oral Fluid Samples, sowie den jeweiligen Tiergruppen entstammende Sammelkotproben mithilfe eines Multiplex Realtime-PCR Verfahrens auf Genomfragmente der oben genannten bakteriellen Durchfallerreger untersucht. Des Weiteren sollen die untersuchten Proben hinsichtlich ihrer Quantität beurteilt und verglichen werden. Zusätzlich soll mittels eines Kot Score Systems und des Verschmutzungsgrades der beprobten Tiere ein möglicher Zusammenhang zwischen Erregermenge und Kotbeschaffenheit untersucht werden.

Es sollen folgende Arbeitshypothesen überprüft werden:

1. Die bisherigen Probenmedien der Wahl zur Diagnostik von bakteriellen Durchfallerregern bei lebenden Mastschweinen sind Serum und Kot. Oral Fluid Samples enthalten aufgrund der natürlichen Verhaltensweisen des Schweines Kotbestandteile und können somit ebenfalls zum Erregernachweis herangezogen werden.
2. Vom Schweregrad des klinischen Bildes einer Erkrankung mit *L. intracellularis*, *B. hyodysenteriae* oder *B. pilosicoli* kann man in Form einer Erhebung der Kotkonsistenz und des Verschmutzungsgrades einer Tiergruppe Aufschluss über die ausgeschiedene Erregermenge erhalten.

1.2. Auswahl der Versuchsbetriebe

Die Auswahl der Betriebe erfolgte mithilfe der bestandsbetreuenden Tierärzte, die von den Mitarbeitern der Klinik für Schweine kontaktiert worden waren. Einschlusskriterien waren eine Gruppengröße von mindestens 200 Tieren derselben Altersgruppe, eine Aufstallung in Gruppen von höchstens 30 Tieren, sowie ein Nachweis von *L. intracellularis* Genomfragmenten oder Antikörpern im Rahmen der Diagnostik des bestandsbetreuenden Tierarztes. Die Impfung mit einer Lebendvakzine war kein Ausschlusskriterium. Ein positiver Befund von *B. hyodysenteriae* oder *B. pilosicoli* waren kein Kriterium.

1.3. Voruntersuchungen

Die Voruntersuchungen zur Auswahl der Betriebe erfolgten im Oktober 2019, hierfür wurden die Betriebe besucht und hinsichtlich der Durchführbarkeit des Studienaufbaus beurteilt.

Des Weiteren wurden pro Bestand 5 Sammelkotproben von Tieren der Anfangsmast gewonnen und zur Untersuchung an das Labor der Schweineklinik der Universität Gießen versandt.

1.4. Allgemeine Daten zu den Versuchsbetrieben

Betrieb A ist ein konventioneller Schweinemastbetrieb in Niederbayern mit 1340 Mastplätzen und einem gleichbleibenden Herkunftsbetrieb. Es werden jeweils 1320 Tiere einer Altersgruppe aufgestellt, in einer Bucht befinden sich maximal 28 Tiere. Die Einstallung erfolgt abteilweise, die Abteile werden zwischen den einzelnen Mastdurchgängen gründlich gereinigt und desinfiziert. Betrieb A ist durch die bestandsbetreuenden Tierärzte vor Studienbeginn sowohl serologisch als auch durch Nachweis von DNA mittels PCR im Kot positiv auf *L. intracellularis* getestet worden, *Brachyspira ssp.* wurden bislang nicht nachgewiesen. Eine Impfung mit Enterisol® Ileitis (Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH, Ingelheim am Rhein) wurde bis sechs Monate vor Versuchsbeginn am Erzeugerbetrieb durchgeführt. Die in die Studie eingeschlossenen Tiere wurden somit nicht gegen *L. intracellularis* geimpft. In der untersuchten Tiergruppe wurden mit Ausnahme von Einzeltierbehandlungen keine antibiotischen

Wirkstoffe eingesetzt.

Bei Betrieb B handelt es sich ebenfalls um einen niederbayerischen Schweinemastbetrieb. Dieser hat 400 Mastplätze bei unterschiedlich großen Buchten für 10 bis 20 Tiere. Es werden in unregelmäßigen Abständen ca. 250 Tiere von wechselnden Herkunftsbetrieben eingestallt. Die Belegung der Abteile erfolgt kontinuierlich, Reinigung und Desinfektion werden buchtenweise durchgeführt. Die für die vorliegende Studie beprobten Tiere stammen alle vom selben Erzeugerbetrieb; in diesem konnten vom bestandsbetreuenden Tierarzt sowohl *L. intracellularis*-DNA und Antikörper gegen *L. intracellularis*, als auch *B. hyodysenteriae*-DNA nachgewiesen werden. Eine orale Impfung der Tiere mit Enterisol® Ileitis (Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH, Ingelheim am Rhein) erfolgte am Erzeugerbetrieb direkt nach dem Absetzen im Alter zwischen drei und vier Wochen. Aufgrund von klinischen Durchfallerscheinungen wurden die in der Studie eingeschlossenen Tiere von Betrieb B in der 14. Lebenswoche mit Tiamulin (Denagard®, Elanco Animal Health Deutschland GmbH, Bad Homburg) behandelt.

2. Beprobung

In den teilnehmenden Schweinemastbeständen wurde eine Tiergruppe in der 12., 16. und 20. Lebenswoche beprobt. Die Probenentnahme erfolgte zu jedem Beprobungstermin nach derselben Vorgehensweise. Sämtliche Beprobungen wurden von der studierendurchführenden Person sowie ein bis zwei Hilfspersonen vorgenommen.

Die Probengefäße wurden vor dem jeweiligen Bestandsbesuch beschriftet und anhand eines Lageplans Buchten zugeordnet, um Verwechslungen auszuschließen (Lageplan siehe Anhang).

Für die Gewinnung von Oral Fluid Samples wurden die „Oral Fluid Sample Collection Accessory Kit“ von IDEXX (IDEXX, Scorpius 60 Building F Hoofddorp, 2132 LR, Niederlande) verwendet. Im Kit enthalten sind jeweils fünf Kaustricke aus unbehandelter Baumwolle, fünf

Probengefäße mit Schraubverschluss, Plastiktüten zum Auswringen der Kaustricke, Kabelbinder zur Befestigung in den Buchten und eine bebilderte Beprobungsanleitung sowie Einweghandschuhe. Um eine möglichst große Oberfläche zu schaffen wurden die Baumwollkaustricke im Vorfeld aus ihrer Verflechtung gelöst. Zur Anbringung in den Buchten wurden die im Sample Kit enthaltenen Kabelbinder verwendet. Die Anbringung sollte so erfolgen, dass die Enden der Stricke auf Schulterhöhe der Tiere hängen und möglichst von allen Seiten zugänglich sind. Die Stricke verblieben für 25-30 Minuten hängend in der Bucht. Danach wurde das mit Oral Fluids getränkte Ende abgeschnitten und mithilfe eines ebenfalls im Sample Kit enthaltenen Plastikbeutel in ein am Beutel befestigtes und bereits vorbeschriftetes Probengefäß ausgewrungen. Um Kreuzkontaminationen zu vermeiden, wurden nach jeder Bucht die Einmalhandschuhe gewechselt.

Zeitgleich zur Oral Fluid Gewinnung wurden Sammelkotproben aus den Buchten entnommen. Hierfür sollten pro Beprobungseinheit (20 Tiere) mindestens drei bis fünf quantitativ gleichwertige Proben von frisch abgesetztem Kot der jeweiligen Bucht gesammelt und in einem vorbeschrifteten Probengefäß mit Schraubverschluss vermischt werden. Es wurden Einmalhandschuhe verwendet und nach jeder Bucht gewechselt.

Außerdem wurde die Beschaffenheit des Kotes der beprobten Tiere unter Punkt 4 beschriebenem Score System klassifiziert sowie Verschmutzung der Tiere zum Zeitpunkt der Beprobung subjektiv als kaum, mäßig oder stark beurteilt.

3. Labordiagnostik

3.1. Vorbereitung der Proben

Nach der Probennahme wurden die Oral Fluid Proben kurz aufgeschüttelt und in zwei bis drei Reaktionsgefäße mit einem Fassungsvermögen von 1,5ml (Eppendorf®Safe-Lock Tubes, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) pipettiert. Diese, sowie die Sammelkotproben, wurden bis zum Versand bei -20°C gelagert. Nach Beendigung der letzten Probenentnahme wurden je eine Sammelkotprobe und eine Oral Fluid Probe pro Bucht und Beprobungszeitpunkt gekühlt an das Labor der Schweineklinik der Universität Gießen versandt.

3.2. PCR

Die Sammelkotproben und Oral Fluid Samples wurden im Labor der Schweineklinik der Universität Gießen molekularbiologisch untersucht. Es wurde eine Multiplex Realtime-PCR nach dem Protokoll von WILLEMS und REINER (2010) verwendet.

Die dafür nötige DNA-Extraktion aus den OFS und Sammelkotproben erfolgte mithilfe des kommerziellen QIAamp Viral RNA Mini kit (Qiagen N.V., Venlo, Niederlande). 300mg Kot bzw. 150 µl OFS wurden mit 560 µl AVL Lyse-Puffer gemischt und bei Raumtemperatur für mindestens 10 Minuten inkubiert. Nach dreiminütiger Zentrifugation bei 16 000 x g wurde der Überstand in Spin Säulen gegeben. Die extrahierte DNA wurde in 60 µl 1xTE Pufferlösung (10 mM Tris pH 8,0, 1 mM EDTA) gelöst und bis zur weiteren Bearbeitung bei -20°C aufbewahrt.

Pro PCR wurde ein Gesamtvolumen von je 25 µl, bestehend aus 12,5 µl Quantitect Multiplex Mastermix (Quiagen, Hilden, Deutschland), 0,1 µl je Primer und Sonde (endgültige Konzentration je 0,2 µM), 9,1 µl Wasser und 2,5 µl der extrahierten DNA in das 7300 Realtime-PCR System (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) gegeben. Die verwendeten Primer und Sonden sind in Tabelle 1 dargestellt.

Folgendes Temperaturprotokoll wurde angewandt: Polymeraseaktivierung bei 94°C für 15 Minuten, im Anschluss 40 Zyklen

mit einer Denaturierung (95°C für 60 Sekunden) und Annealing/Extension bei 60°C für 90 Sekunden.

Tabelle 1: Darstellung der Sequenzen der in der vorliegenden Studie verwendeten Primer und Sonden (WILLEMS und REINER, 2010).

Name	Sequenz (5'-3')	Amplikon [bp]
<i>Brachyspira hyodysenteriae</i>		
forward	GAC ATG ATG TTA CTA AAA TAG ACT GGG CT	120
reverse	CAG GCC AAG AAC CAG TAG CAA G	
Sonde	6-FAM-TTG AAG ACA CTT ACG ATA AAC MGB	
<i>Lawsonia intracellularis</i>		
forward	TCT CTG CTG CAT GTA ATG AAA TCA	72
reverse	CTC CTT GAA TAC AAT CCA CAA CAA A	
Sonde	VIC-AAA TGG AGA ACT CCT TGA TC- MGB	
<i>Brachyspira pilosicoli</i>		
forward	GAA GCT ATG CCT AGA GTT ATG GCT AAC	98
reverse	CCT AAA TGC AAT TCT ATA CCA GCA TC	
Sonde	NED-TTT TGA CAA AGA GAT TAC TGA TGA G-MGB	

3.3. Sensitivität und Spezifität

Die analytische Sensitivität der verwendeten Multiplex Realtime-PCR wird für *L. intracellularis* mit einem Limit of detection (LOD) von unter 10 DNA-Kopien, für *B. hyodysenteriae* mit einem LOD von unter 26 Kopien und für *B. pilosicoli* mit einem LOD von unter 14 Kopien angegeben. Das Limit of quantitation (LOQ) liegt bei 8×10^3 Zellen/g Kot. Die verwendeten Primer und Sonden für *B. hyodysenteriae* und *B. pilosicoli* sollen keine Reaktion mit anderen *Brachyspira* Spezies zeigen (WILLEMS und REINER, 2010).

4. Klinische Beobachtung

Zur Beurteilung eines möglichen akuten Durchfallgeschehens wurde ein Beschreibungsverfahren des Kotes mittels Scoresystem erstellt. Dieses umfasst drei Kategorien: ein Score der Kategorie 1 entspricht physiologischer Kotqualität, bei Mastschweinen im Alter von 12 bis 20 Wochen sollte der Kot geformt sein. Kot nach Score 2 ist ungeformt und breiig, weist aber keine Abweichungen der physiologischen Farbe auf. Score 3 umfasst wässrigen, flüssigen Kot oder extreme Farbabweichungen durch Blutbeimengung oder große Mengen von Schleim, schon bei einem dieser Merkmale wird ein Score von 3 zugeteilt.

Tabelle 2: Einteilung der Kotkonsistenz

Score	Kotbeschaffenheit
1	geformt
2	breiig
3	wässrig/blutig/schleimig

Darüber hinaus wurde noch der Grad der Verschmutzung aller Tiere einer Bucht erfasst und in wenig – mäßig – stark verschmutzt unterteilt.

5. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung und die Erstellung deskriptiver Grafiken erfolgte mithilfe der Programme IBM SPSS Statistics® (Version 26.0. IBM® SPSS Inc., Chicago, IL, USA) und Microsoft Excel® (2016, Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA).

Für die Deskriptive Auswertung wurden Minima und Maxima angegeben, sowie Mittelwert und Standardabweichung (SD) berechnet. Mittels Kreuztabellen wurden die Untersuchungsergebnisse ausgewertet,

mögliche Zusammenhänge nominaler Variablen wurden mithilfe des Chi-Quadrat-Tests nach Pearson ermittelt. Die Interrater-Reliabilität wurde durch die Berechnung von Cohens-Kappa dargestellt.

Die Prüfung der metrischen Daten auf Normalverteilung erfolgte mittels Kolmogorov-Smirnov-Test mit Signifikanzkorrektur nach Lilliefors. Mögliche Assoziationen zwischen nicht normalverteilten Daten wurden mithilfe einer Korrelation nach Spearman-Rho berechnet.

Mittels Kruskal-Wallis-Tests wurden mögliche signifikante Unterschiede zwischen den verwendeten Beprobungsmethoden und den klinischen Erscheinungen untersucht.

Für die statistischen Tests wurde ein Signifikanzniveau von $p=0,05$ bei einem Konfidenzintervall von 95% festgelegt.

IV. ERGEBNISSE

1. Ergebnisse der molekularbiologischen Voruntersuchungen

Zur Auswahl der Versuchsbetriebe wurden pro Betrieb fünf Sammelkotproben aus verschiedenen Altersgruppen entnommen und mittels oben beschriebener Multiplex Realtime-PCR nach WILLEMS und REINER (2010) untersucht. In Betrieb A konnte in 5/5 Sammelkotproben DNA von *L. intracellularis* nachgewiesen werden. Genomfragmente von *B. hyodysenteriae* und von *B. pilosicoli* wurden in 0/5 Sammelkotproben von Betrieb A nachgewiesen. Die Ergebnisse der mittels Multiplex Realtime PCR untersuchten Sammelkotproben von Betrieb A sind in Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 3: Darstellung der Multiplex Realtime-PCR Ergebnisse der Sammelkotproben aus Betrieb A – pre-screening (in Erreger pro g Kot).

Proben	<i>L. intracellularis</i>	<i>B. hyodysenteriae</i>	<i>B. pilosicoli</i>
1	2,08x10 ⁵	n.d.*	n.d.*
2	3,28x10 ⁷	n.d.*	n.d.*
3	2,24x10 ⁵	n.d.*	n.d.*
4	1,44x10 ⁵	n.d.*	n.d.*
5	9,60x10 ⁶	n.d.*	n.d.*

*n.d.: nicht detektiert

In Betrieb B konnten in 2/5 Sammelkotproben Genomfragmente von *L. intracellularis* und in 2/5 Sammelkotproben Genomfragmente von *B. hyodysenteriae* detektiert werden. DNA von *B. pilosicoli* wurde in Betrieb B nicht nachgewiesen. Die Ergebnisse der Voruntersuchung der Sammelkotproben aus Betrieb B sind in Tabelle 4 dargestellt.

Tabelle 4: Darstellung der Multiplex Realtime-PCR Ergebnisse der Sammelkotproben aus Betrieb B – pre-screening (in Erreger pro g Kot).

Proben	<i>L. intracellularis</i>	<i>B. hyodysenteriae</i>	<i>B. pilosicoli</i>
1	7,47x10 ⁴	n.d.*	n.d.*
2	n.d.*	5,72x10 ⁵	n.d.*
3	2,02x10 ⁴	n.d.*	n.d.*
4	n.d.*	n.d.*	n.d.*
5	n.d.*	2,51x10 ⁷	n.d.*

*n.d.: nicht detektiert

2. Ergebnisse der molekularbiologischen Untersuchungen - Feldstudie

Insgesamt konnten 66 von 66 Oral Fluid Proben sowie 66 von 66 Sammelkotproben ausgewertet werden. Die Proben wurden mithilfe einer Multiplex Realtime-PCR nach WILLEMS und REINER (2010) auf DNA von *L. intracellularis*, *B. hyodysenteriae* und *B. pilosicoli* untersucht. DNA von *L. intracellularis* konnte in beiden Betrieben nachgewiesen werden, während DNA von *B. hyodysenteriae* nur in einem (Betrieb B) und DNA von *B. pilosicoli* in keinem der untersuchten Betriebe detektiert wurde. Bei den im Folgenden angegebenen Erregermengen handelt es sich um Erreger/g Kot bzw. Erreger/ml OFS.

2.1. Nachweis von *Lawsonia intracellularis* DNA

Insgesamt konnte in 45,5% (30/66) der untersuchten Sammelkotproben DNA von *L. intracellularis* nachgewiesen werden, davon waren 20 positive Proben von Betrieb A, 10 positive Proben von Betrieb B. Minima, Maxima, Mittelwerte und Standardabweichungen aller Sammelkotproben, in denen DNA von *L. intracellularis* detektiert werden konnte, sind in Tabelle 5 für die jeweiligen Beprobungstermine dargestellt.

Tabelle 5: Auswertung aller *L. intracellularis* DNA positiven Sammelkotproben (LW=Lebenswoche, n=positiv/gesamt, SD=Standardabweichung).

LW	n positiv	Minimum	Maximum	Mittelwert	SD
12	15/22	$3,36 \times 10^2$	$2,04 \times 10^9$	$1,38 \times 10^8$	$5,27 \times 10^8$
16	14/22	$5,59 \times 10^2$	$4,30 \times 10^4$	$6,93 \times 10^3$	$1,16 \times 10^4$
20	1/22			$9,52 \times 10^2$	n.b.*

*nicht berechnet da nur ein positiver Wert vorlag.

In OFS konnten Genomfragmente von *L. intracellularis* in insgesamt 45,5% (30/66) der untersuchten Proben detektiert werden, davon waren 20 positive Proben von Betrieb A, 10 Proben von Betrieb B. Minima, Maxima, Mittelwerte und Standardabweichungen der in OFS detektierten Erregermengen von *L. intracellularis* nach beprobter Lebenswoche sind in Tabelle 6 dargestellt.

Tabelle 6: Auswertung aller *L. intracellularis* DNA positiven OFS (LW=Lebenswoche, n=positiv/gesamt, SD= Standardabweichung).

LW	n positiv	Minimum	Maximum	Mittelwert	SD
12	15/22	$7,71 \times 10^2$	$5,75 \times 10^5$	$1,22 \times 10^5$	$1,57 \times 10^5$
16	14/22	$8,34 \times 10^2$	$7,98 \times 10^4$	$1,24 \times 10^4$	$2,40 \times 10^4$
20	1/22			$9,52 \times 10^2$	n.b.*

*nicht berechnet da nur ein positiver Wert vorlag.

2.1.1. Nachweis von *Lawsonia intracellularis* DNA in Betrieb A

In Betrieb A war der Nachweis von *L. intracellularis* DNA in 55,6% (20/36) der untersuchten Sammelkotproben möglich. Minima, Maxima, Mittelwerte und Standardabweichungen der *L. intracellularis* DNA positiven Sammelkotproben in Betrieb A sind in Tabelle 7 dargestellt.

Tabelle 7: Auswertung der *L. intracellularis* DNA positiven Sammelkotproben, Betrieb A (LW=Lebenswoche, n=positiv/gesamt, SD=Standardabweichung).

LW	n positiv	Minimum	Maximum	Mittelwert	SD
12	12/12	5,03x10 ⁴	2,04x10 ⁹	1,72x10 ⁸	5,89x10 ⁸
16	7/12	8,34x10 ²	3,87x10 ³	1,94x10 ³	1,23x10 ³
20	1/12			9,52x10 ²	n.b.*

*nicht berechnet da nur ein Wert vorlag.

Der Nachweis von Genomfragmenten von *L. intracellularis* aus OFS gelang in Betrieb A bei 20/36 (55,6%) der untersuchten Proben. Minima, Maxima, Mittelwerte und Standardabweichungen der *L. intracellularis* positiven OFS in Betrieb A sind in Tabelle 8 nach Beprobungszeitpunkt dargestellt.

Tabelle 8: Auswertung der *L. intracellularis* positiven OFS Betrieb A (LW=Lebenswoche, n=positiv/gesamt, SD=Standardabweichung).

LW	n positiv	Minimum	Maximum	Mittelwert	SD
12	12/12	1,18x10 ⁴	5,75x10 ⁵	1,53x10 ⁵	1,62x10 ⁵
16	7/12	8,34x10 ²	3,87x10 ³	1,94x10 ³	1,23x10 ³
20	1/12			9,52x10 ²	n.b.*

*nicht berechnet da nur ein Wert vorlag.

Bei der Beprobung in Lebenswoche 12 konnte in allen beprobten Buchten DNA von *L. intracellularis* in den Sammelkotproben

nachgewiesen werden. In der 16. Lebenswoche war der Nachweis von *L. intracellularis* DNA im Kot in sieben von zwölf Buchten möglich, in der 20. Lebenswoche war die Sammelkotprobe einer Bucht *L. intracellularis* DNA positiv. Die Verteilung der Erregermenge in *L. intracellularis* DNA positiven Sammelkotproben in Betrieb A nach Bucht und Alter der Tiere ist in Tabelle 9 dargestellt.

Tabelle 9: Schematische Darstellung der Erregermenge (pro g Kot) von *L. intracellularis* im Kot nach Bucht und Alter der Tiere, Betrieb A.

	Bucht											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
12. LW	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
16. LW			■	■	■		■		■	■		■
20. LW					■							

Erregermenge in log2	0	1-3	4-6	7-9
----------------------	---	-----	-----	-----

Tabelle 10: Schematische Darstellung der Erregermenge (pro ml OFS) von *L. intracellularis* in OFS nach Bucht und Alter der Tiere, Betrieb A.

	Bucht											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
12. LW	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
16. LW			■	■	■		■		■	■		■
20. LW					■							

Erregermenge in log2	0	1-3	4-6	7-9
----------------------	---	-----	-----	-----

In allen Buchten, in denen *L. intracellularis* DNA in Betrieb A in Sammelkotproben detektiert werden konnte waren auch die OFS der jeweiligen Buchten *L. intracellularis* DNA positiv. Die Verteilung der Erregermengen in *L. intracellularis* positiven OFS in Betrieb A nach Bucht und Alter der Tiere ist in Tabelle 10 dargestellt. Bei einer Einteilung der detektierten Erregermengen in vier Gruppen nach log2 Stufen (siehe Legende) ergibt sich ein identisches Verteilungsmuster von *L. intracellularis* in Sammelkotproben und OFS in Betrieb A.

2.1.2. Nachweis von *Lawsonia intracellularis* DNA in Betrieb B

In Betrieb B konnte *L. intracellularis* DNA in 33,3% (10/30) der untersuchten Sammelkotproben nachgewiesen werden. Minima, Maxima, Mittelwerte und Standardabweichungen der *L. intracellularis* positiven Sammelkotproben in Betrieb B zum jeweiligen Beprobungszeitpunkt sind in Tabelle 11 dargestellt.

Tabelle 11: Auswertung der *L. intracellularis* DNA positiven Sammelkotproben, Betrieb B (LW=Lebenswoche, n=positiv/gesamt, SD=Standardabweichung).

LW	n positiv	Minimum	Maximum	Mittelwert	SD
12	3/10	$3,36 \times 10^2$	$3,01 \times 10^3$	$1,56 \times 10^3$	$1,35 \times 10^3$
16	7/10	$5,59 \times 10^2$	$4,30 \times 10^4$	$1,19 \times 10^4$	$1,53 \times 10^4$
20	0/10				

In OFS von Betrieb B konnte DNA von *L. intracellularis* in 33,3% (10/30) der untersuchten Proben detektiert werden. Die positiven Proben stammen aus Lebenswoche 12 und 16, in der 20. Lebenswoche waren sämtliche OFS *L. intracellularis* DNA negativ. Minima, Maxima, Mittelwerte und Standardabweichungen der *L. intracellularis* positiven OFS in Betrieb B sind in Tabelle 12 dargestellt.

Tabelle 12: Auswertung der *L. intracellularis* DNA positiven OFS, Betrieb B (LW=Lebenswoche, n=positiv/gesamt, SD= Standardabweichung).

LW	n positiv	Minimum	Maximum	Mittelwert	SD
12	3/10	$7,71 \times 10^2$	$5,17 \times 10^3$	$2,29 \times 10^3$	$2,49 \times 10^3$
16	7/10	$1,30 \times 10^3$	$7,98 \times 10^4$	$2,28 \times 10^4$	$3,15 \times 10^4$
20	0/10				

Die Verteilung der Erregermengen in *L. intracellularis* positiven Sammelkotproben in Betrieb B nach Bucht und Alter der Tiere ist in Tabelle 13 schematisch dargestellt. Die Verteilung der Erregermengen in OFS von Betrieb B ist in Tabelle 14 nach Bucht und Alter der Tiere aufgeführt.

Tabelle 13: Schematische Darstellung der Erregermenge (pro g Kot) von *L. intracellularis* im Kot nach Bucht und Alter der Tiere, Betrieb B.

	Bucht									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
12. LW										
16. LW										
20. LW										

Erregermenge in log2	0	1-3	4-6	7-9
----------------------	---	-----	-----	-----

Tabelle 14: Schematische Darstellung der Erregermenge (pro ml OFS) von *L. intracellularis* in OFS nach Bucht und Alter der Tiere, Betrieb B.

	Bucht									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
12. LW										
16. LW										
20. LW										

Erregermenge in log2	0	1-3	4-6	7-9
----------------------	---	-----	-----	-----

Bei einer Einteilung der detektierten Erregermengen in vier Gruppen nach log2 Stufen (siehe Legende) ergibt sich ein ähnliches Verteilungsmuster der *L. intracellularis* DNA positiven Sammelkotproben und OFS. In LW 12 gelingt der Nachweis von *L. intracellularis* DNA in Bucht 1 ausschließlich in OFS, in Bucht 7 ausschließlich in Sammelkot. In LW 16 sind in allen Buchten, in denen *L. intracellularis* in Sammelkotproben detektiert werden konnte auch in den OFS Genomfragmente von *L. intracellularis* zu finden. Zusätzlich kann in Bucht 6 ausschließlich in OFS DNA von *L. intracellularis* detektiert

werden während die zugehörige Sammelkotprobe *L. intracellularis* DNA-negativ ist.

2.2. Nachweis von *Brachyspira hyodysenteriae* DNA

DNA von *B. hyodysenteriae* konnte lediglich in Proben von Bestand B nachgewiesen werden. Insgesamt konnte DNA von *B. hyodysenteriae* in 4/30 (13,3%) Sammelkotproben und 7/30 (23,3%) OFS detektiert werden.

In der ersten Beprobung in LW 12 wurde in einer Bucht DNA von *B. hyodysenteriae* aus Sammelkot nachgewiesen, in der 16. Lebenswoche in drei Buchten, allerdings nicht mehr in der vormalig positiven Bucht. Bei der dritten Beprobung waren alle Sammelkotproben *B. hyodysenteriae* negativ. Minima, Maxima, Mittelwerte und Standardabweichungen der *B. hyodysenteriae* DNA positiven Sammelkotproben auf Betrieb B sind in Tabelle 15 dargestellt.

Tabelle 15: Auswertung der *B. hyodysenteriae* DNA positiven Sammelkotproben, Betrieb B (LW=Lebenswoche, n=positiv/gesamt, SD=Standardabweichung).

LW	n positiv	Minimum	Maximum	Mittelwert	SD
12	1/10			1,09x10 ⁴	n.b.*
16	3/10	5,88x10 ⁴	3,40x10 ⁵	1,64x10 ⁵	1,53x10 ⁵
20	0/10				

*nicht berechnet da nur ein bzw. kein positiver Wert.

Minima, Maxima, Mittelwerte und Standardabweichungen der OFS aus Betrieb B, in denen *B. hyodysenteriae* nachgewiesen werden konnte, sind in Tabelle 16 dargestellt.

Tabelle 16: Auswertung der *B. hyodysenteriae* DNA positiven OFS, Betrieb B (LW=Lebenswoche, n=positiv/gesamt, SD= Standardabweichung).

LW	n positiv	Minimum	Maximum	Mittelwert	SD
12	0/10				
16	3/10	8,83x10 ³	4,17x10 ⁴	2,06x10 ⁴	1,83x10 ⁴
20	4/10	4,08x10 ³	2,76x10 ⁴	1,19x10 ⁴	1,09x10 ⁴

Die Verteilung der Erregermenge der *B. hyodysenteriae* DNA positiven Sammelkotproben in Betrieb B nach Bucht und Alter der Tiere ist in Tabelle 17 schematisch dargestellt.

In OFS konnten in der ersten Beprobung in LW 12 keine Genomfragmente von *B. hyodysenteriae* detektiert werden. In der 16. Lebenswoche konnte in drei Buchten DNA von *B. hyodysenteriae* nachgewiesen werden, diese Buchten wiesen auch ein positives Ergebnis aus Sammelkotproben auf. In der letzten Beprobung in der 20. Lebenswoche konnte in vier Buchten DNA von *B. hyodysenteriae* in detektiert werden. Die Verteilung der Erregermenge in *B. hyodysenteriae* DNA positiven OFS in Betrieb B nach Bucht und Alter der Tiere ist in Tabelle 18 schematisch dargestellt.

Tabelle 17: Schematische Darstellung der Erregermenge (pro g Kot) von *B. hyodysenteriae* im Kot nach Alter und Bucht, Betrieb B.

	Bucht									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
12. LW										
16. LW										
20. LW										

Erregermenge in log2	0	1-3	4-6	7-9
----------------------	---	-----	-----	-----

Tabelle 18: Schematische Darstellung der Erregermenge (pro ml OFS) von *B. hyodysenteriae* in OFS nach Alter und Bucht, Betrieb B.

	Bucht									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
12. LW										
16. LW										
20. LW										

Erregermenge in log2	0	1-3	4-6	7-9
----------------------	---	-----	-----	-----

2.3. Nachweis von *Brachyspira pilosicoli* DNA

Weder in Betrieb A noch in Betrieb B konnten Genomfragmente von *B. pilosicoli* in den mittels Multiplex Realtime-PCR untersuchten Sammelkotproben und OFS nachgewiesen werden.

2.4. Assoziation zwischen den untersuchten Sammelkotproben und Oral Fluid Samples

Im Folgenden sind zunächst anhand von Kreuztabellen in Tabelle 19, Tabelle 20 und Tabelle 21 die Ergebnisse der molekularbiologischen Untersuchungen vergleichend nach dem jeweiligen Probenmaterial und dem Zeitpunkt der Beprobung dargestellt.

Tabelle 19: Nachweis von *L. intracellularis* DNA in Sammelkot und OFS, LW 12.

		Kot		gesamt
		positiv	negativ	
OFS	positiv	14	1	15
	negativ	1	6	7
gesamt		15	7	22

Tabelle 20: Nachweis von *L. intracellularis* DNA in Sammelkot und OFS, LW 16.

		Kot		gesamt
		positiv	negativ	
OFS	positiv	13	1	14
	negativ	1	7	8
gesamt		14	8	22

Tabelle 21: Nachweis von *L. intracellularis* DNA in Sammelkot und OFS, LW 20.

		Kot		gesamt
		positiv	negativ	
OFS	positiv	1	0	1
	negativ	0	21	21
gesamt		1	21	22

Die Interrater-Reliabilität der *L. intracellularis* DNA-Detektion für die beiden untersuchten Probenmaterialien Sammelkot und OFS ist mit einem Kappa-Wert von 0,878 nach LANDIS und KOCH (1977) als hoch einzustufen ($p < 0,001$).

Die Interrater-Reliabilität der *B. hyodysenteriae* DNA für die beiden untersuchten Probenmaterialien Sammelkot und OFS kann mit einem Kappa-Wert von 0,453 nach LANDIS und KOCH (1977) als moderat eingestuft werden ($p = 0,009$).

Für die Gesamtheit aller verglichenen Sammelkotproben und OFS beträgt die Interrater-Reliabilität $\text{Kappa} = 0,799$ und ist nach LANDIS und KOCH (1977) bei einer näherungsweise Signifikanz von $p < 0,001$ als hoch einzustufen. Dies bedeutet, dass die beiden Ergebnisse stark korrelieren und infolge dessen anzunehmen ist, dass sich OFS gut als diagnostisches Medium hinsichtlich der mittels Multiplex Realtime-PCR untersuchten Erreger eignet.

Die Berechnung der Korrelation zwischen allen per Multiplex Realtime-PCR auf Genomfragmente von *L. intracellularis* und *B. hyodysenteriae* untersuchten Sammelkotproben und OFS mittels Spearman-Rho-Korrelation für nicht normalverteilte Daten ergab für *L. intracellularis* einen Korrelationskoeffizienten von $R = 0,919$ ($p < 0,001$) (Tabelle 22).

Für *B. hyodysenteriae* konnte ein Korrelationskoeffizient nach Spearman-Rho von $R=0,558$ ($p<0,001$) berechnet werden (Tabelle 22).

Tabelle 22: Darstellung der aus den Ergebnissen der quantitativen PCR von beiden Betrieben zusammenfassend errechneten Korrelationskoeffizienten nach Spearman-Rho, Zusammenfassung aller Beprobungstermine (LW 12, LW 16, LW 20).

Korrelation nach Spearman-Rho	<i>L. intracellularis</i>	<i>B. hyodysenteriae</i>
Korrelationskoeffizient	,919*	,558*
Signifikanz	$P<0,001$	$p<0,001$
n	66	66

*Die Korrelation ist auf dem 0,01 Niveau signifikant (zweiseitig).

Bei getrennter Betrachtung der beiden Betriebe ergab sich für Betrieb A hinsichtlich der Untersuchung auf Genomfragmente von *L. intracellularis* eine signifikante Korrelation nach Spearman-Rho zwischen den nachgewiesenen Erregermengen der untersuchten Sammelkotproben und OFS von $R=0,994$ bei einem Signifikanzniveau von $p<0,001$. Da *B. hyodysenteriae* auf Betrieb A nicht nachgewiesen werden konnte wurde kein Korrelationskoeffizient berechnet.

Bei Betrieb B konnte ebenfalls eine signifikante Korrelation der Erregermengen zwischen den hinsichtlich *L. intracellularis* DNA untersuchten Sammelkotproben und OFS von $R=0,728$ ($p<0,001$) errechnet werden. Der nach Spearman-Rho berechnete Korrelationskoeffizient R für den Nachweis von *B. hyodysenteriae* DNA in Betrieb B betrug $R=0,540$ ($p=0,002$).

Die Korrelationskoeffizienten sowie die zugehörigen Signifikanzniveaus für die einzelnen Betriebe und Erreger sind in Tabelle 23 aufgelistet.

Tabelle 23: Korrelation der Ergebnisse der quantitativen PCR für *L. intracellularis* und *B. hyodysenteriae* aus Sammelkotproben und zugehörigen OFS je Bestand.

Betrieb	Erreger	Korrelationskoeffizient ρ	p-Wert
A	<i>L. intracellularis</i>	0,994	<0,001
	<i>B. hyodysenteriae</i>	n.b.*	n.b.*
B	<i>L. intracellularis</i>	0,728	<0,001
	<i>B. hyodysenteriae</i>	0,540	0,002

*nicht berechnet, da *B. hyodysenteriae* in Betrieb A nicht nachgewiesen werden konnte.

3. Ergebnisse der klinischen Beobachtung

Es wurden zu jedem Beprobungszeitpunkt (LW 12, LW 16, LW 20) für jede beprobte Bucht ein Kot-Score sowie der Verschmutzungsgrad der Tiere erfasst. Es besteht zu jedem Beprobungszeitpunkt ein signifikanter Zusammenhang zwischen Kot Score und Verschmutzungsgrad der beprobten Tiere ($p < 0,05$).

3.1. Kotkonsistenz und Verschmutzung in Betrieb A

Mögliche Anzeichen einer Durchfallerkrankung in Form von ungeformtem Kot konnten über den gesamten Versuchszeitraum hinweg in allen beprobten Buchten in Betrieb A beobachtet werden. In insgesamt 83,3% (30/36) der Buchten konnte eine breiige Kotbeschaffenheit (Score 2) festgestellt werden, in 16,7% (6/36) der Buchten war die Kotkonsistenz wässrig (Score 3). Dabei waren in keinem Fall auffällige Schleim- oder Blutbeimengungen zu bemerken. Die erfasste Kotbeschaffenheit der Tiere in Betrieb A ist nach Bucht und Beprobungszeitpunkt in Tabelle 24 schematisch dargestellt.

Tabelle 24: Schematische Darstellung der Kotbeschaffenheit in Betrieb A nach Bucht und Beprobungszeitpunkt.

	Bucht											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
12. LW	2	2	2	2	2	3	3	2	2	2	3	3
16. LW	2	3	2	2	3	2	2	2	2	2	2	2
20. LW	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Score	3	2	1									

Die Tiere in Betrieb A waren zu 58,3% (21/36) stark verschmutzt, zu 33,3% (12/36) mäßig und zu 8,3% (3/36) kaum verschmutzt. Der Grad der Verschmutzung nach Buchten und Alter der Tiere ist in Tabelle 25 schematisch nach Bucht und Beprobungszeitpunkt dargestellt.

Tabelle 25: Schematische Darstellung der Verschmutzung, Betrieb A, dargestellt nach Bucht und Beprobungszeitpunkt.

	Bucht											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
12. LW	leicht	leicht	leicht	mäßig	mäßig	stark	stark	mäßig	stark	stark	stark	stark
16. LW	stark	stark	stark	stark	stark	stark	stark	stark	stark	stark	stark	stark
20. LW	mäßig	mäßig	mäßig	mäßig	stark	stark	stark	mäßig	mäßig	mäßig	mäßig	mäßig
Legende	stark	mäßig	leicht									

3.2. Kotkonsistenz und Verschmutzung in Betrieb B

In Betrieb B war in LW 12 in allen untersuchten Buchten ungeformter Kot zu beobachten, in 8/10 Fällen handelte es sich um Score 2 (breiig), in 2/10 Fällen um Score 3 (wässrig). Bei den weiteren Beprobungen in LW 16 konnte in einer, in LW 20 in zwei Buchten klinische Anzeichen einer Durchfallerkrankung (Score 2) anhand der beurteilten Kotproben festgestellt werden. 9/10 Buchten wiesen in LW 16 und 8/10 Buchten in LW 20 geformten Kot (Score 1) auf. Es waren auch in Bestand B zu keinem Zeitpunkt Blut- oder Schleimbeimengungen zu beobachten. Die Kotbeschaffenheit der Tiere auf Betrieb B nach Bucht und Beprobungszeitpunkt ist schematisch in Tabelle 26 dargestellt.

Tabelle 26: Schematische Darstellung der Kotbeschaffenheit Betrieb in B nach Bucht und Beprobungszeitpunkt.

	Bucht									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
12. LW	mäßig	mäßig	mäßig	mäßig	mäßig	mäßig	stark	mäßig	stark	mäßig
16. LW	leicht	mäßig								
20. LW	leicht	mäßig	leicht	mäßig						
Score	3	2	1							

Der Verschmutzungsgrad der Tiere in Betrieb B ist nach Bucht und Beprobungszeitpunkt (LW 12, LW 16, LW 20) in Tabelle 27 schematisch dargestellt. In LW 12 waren die Tiere in je 5/10 Buchten stark bzw. mäßig

verschmutzt, in LW 16 konnte in 6/10 Buchten eine starke, in 2/10 Buchten eine mäßige und in 2/10 Buchten eine leichte Verschmutzung festgestellt werden. In LW 20 waren lediglich die Tiere in 2/10 Buchten mäßig verschmutzt, die Tiere der übrigen 8/10 Buchten wiesen nur eine leichte Verschmutzung auf.

Tabelle 27: Verschmutzung Betrieb B nach Bucht und Beprobungszeitpunkt.

	Bucht									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
12. LW	stark	stark	mäßig	mäßig	mäßig	mäßig	stark	mäßig	stark	stark
16. LW	stark	leicht	stark	stark	stark	stark	mäßig	leicht	mäßig	stark
20. LW	leicht	leicht	leicht	leicht	mäßig	leicht	leicht	mäßig	leicht	leicht
Legende	stark	mäßig	leicht							

3.3. Zusammenhang zwischen Kotkonsistenz und Erregermenge im Kot

Um einen möglichen Zusammenhang zwischen klinischen Anzeichen einer Durchfallerkrankung und der nachgewiesenen Erregermenge darzustellen wurde ein Kruskal-Wallis-Test zur Rangordnung innerhalb einer beprobten Altersgruppe/innerhalb eines Beprobungszeitpunktes durchgeführt.

Die Verteilung der nachgewiesenen Erregermengen von *L. intracellularis* und *B. hyodysenteriae* ist sowohl in den ausgewerteten Sammelkotproben als auch in den OFS zu allen Beprobungszeitpunkten über die Kategorien des Kot-Scores identisch, somit besteht statistisch kein Zusammenhang zwischen Kotkonsistenz und nachgewiesener Erregermenge. Die für die beiden nachgewiesenen Erreger errechneten Assoziationen zwischen Kot-Score und nachgewiesener Erregermenge sind in Tabelle 28 nach Beprobungszeitpunkt, Erreger und Probenmaterial aufgeführt.

Tabelle 28: Assoziation zwischen Kot-Score (1-3) und nachgewiesener Erregermenge nach Lebenswoche (LW), Erreger und Probenmaterial (pro g Kot bzw. pro ml OFS).

LW	Erreger	Probenmaterial	p
12	<i>L. intracellularis</i>	Sammelkot	0,134
		OFS	0,261
	<i>B. hyodysenteriae</i>	Sammelkot	0,540
		OFS	1,000
16	<i>L. intracellularis</i>	Sammelkot	0,895
		OFS	0,598
	<i>B. hyodysenteriae</i>	Sammelkot	0,093
		OFS	0,093
20	<i>L. intracellularis</i>	Sammelkot	0,450
		OFS	0,450
	<i>B. hyodysenteriae</i>	Sammelkot	1,000
		OFS	0,076

Die Verteilung der nachgewiesenen Erregermengen von *L. intracellularis* und *B. hyodysenteriae* ist außerdem in den ausgewerteten Sammelkotproben und in den OFS zu allen Beprobungszeitpunkten über den Verschmutzungsgrad der Tiere einer Bucht bis auf drei Ausnahmen (OFS *B. hyodysenteriae* LW 16, Sammelkot und OFS *L. intracellularis* LW 20) identisch (siehe Tabellen 25 und 27), somit besteht statistisch mit Ausnahme des Nachweises von *L. intracellularis* in LW 20 kein Zusammenhang zwischen Verschmutzungsgrad und nachgewiesener Erregermenge. Die errechneten Assoziationen sind in Tabelle 29 nach Beprobungszeitpunkt, Erreger und Probenmaterial aufgeführt.

Tabelle 29: Assoziationen zwischen Verschmutzungsgrad (leicht bis stark) und nachgewiesener Erregermenge nach Lebenswoche (LW), Erreger und Probenmaterial.

LW	Erreger	Probenmaterial	p
12	<i>L. intracellularis</i>	Sammelkot	0,277
		OFS	0,264
	<i>B. hyodysenteriae</i>	Sammelkot	0,607
		OFS	1,000
16	<i>L. intracellularis</i>	Sammelkot	0,889
		OFS	0,638
	<i>B. hyodysenteriae</i>	Sammelkot	0,101
		OFS	0,052
20	<i>L. intracellularis</i>	Sammelkot	0,042
		OFS	0,042
	<i>B. hyodysenteriae</i>	Sammelkot	1,000
		OFS	0,196

V. DISKUSSION

1. Interpretation der Ergebnisse der molekularbiologischen Untersuchungen

Das Ziel der vorliegenden Studie war zu ermitteln, ob sich aus Kaustricken gewonnene Oral Fluid Samples für einen quantitativen Nachweis der bakteriellen Durchfallerreger *L. intracellularis*, *B. hyodysenteriae* und *B. pilosicoli* eignen. Hierfür wurden in einer explorativen Verlaufsuntersuchung Sammelkotproben und aus Kaustricken gewonnene OFS von zwei Schweinemastbetrieben mittels Multiplex Realtime-PCR auf das Vorkommen von *L. intracellularis*, *B. hyopneumoniae* und *B. pilosicoli* quantitativ untersucht und bezüglich der nachgewiesenen Erregermengen verglichen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung zeigen, dass sowohl in den 66 untersuchten Sammelkotproben als auch in den 66 untersuchten OFS in insgesamt je 45,5% der untersuchten Proben Genomfragmente von *L. intracellularis* detektiert werden konnten. Der Nachweis von *B. hyodysenteriae* DNA wurde nur bei Proben aus Betrieb B erbracht, hier waren 13,3% der Sammelkotproben und 23,3% der OFS positiv. Genomfragmente von *B. pilosicoli* konnten in keinem der untersuchten Betriebe nachgewiesen werden, was zu dem Schluss führt, dass dieser Erreger entweder unter dem LOD von unter 14 Genomkopien liegt oder nicht in den Betrieben vorkommt. Aus diesem Grund können infolge dieser Arbeit keine Aussagen hinsichtlich der OFS Diagnostik von *B. pilosicoli* getroffen werden.

Der Nachweis von Genomfragmenten von *L. intracellularis* mittels unterschiedlicher PCR Verfahren aus Kotproben wird in zahlreichen Arbeiten dargestellt und gilt mittlerweile in der *ante mortem* Diagnostik als Goldstandard (VANNUCCI et al., 2019). Um eine möglichst repräsentative Übersicht über die Ausscheidungsrate einer Herde zu gewinnen, wird die Untersuchung von gepoolten Einzelkotproben empfohlen (VANNUCCI et al., 2019). Aus diesem Grund wurde diese Methode als Vergleichsmethode gewählt, um den Nutzen von OFS als

Probenmaterial zu evaluieren.

Die in der vorliegenden Studie detektierte Erregerhöchstmenge für *L. intracellularis* war in den untersuchten Sammelkotproben mit $2,04 \times 10^9$ pro g Kot deutlich höher als die detektierte Höchstmenge von *L. intracellularis* in OFS (maximale detektierte Erregermenge $5,57 \times 10^5$ pro ml OFS). Die geringere Erregermenge in den untersuchten OFS im Vergleich zu den Kotproben kann durch die Verdünnung des oral aufgenommenen Kotes mit den restlichen Bestandteilen der OFS, größtenteils Speichel, erklärt werden.

Zu vergleichbaren Resultaten kamen auch LAVIGNE et al. (2013), die in einer explorativen Untersuchung mit ähnlichem Versuchsaufbau Erregerhöchstmengen von *L. intracellularis* in gepoolten Kotproben von $2,8 \times 10^7$ pro g Kot und in OFS von $1,6 \times 10^6$ pro ml OFS nachweisen konnten, wobei hier bei 86% der positiven Kotproben auch die aus den entsprechenden Tiergruppen gewonnenen OFS *L. intracellularis* DNA positiv waren.

Die Menge der detektierten Genomfragmente von *L. intracellularis* in Bestand B war mit einem Maximum im Bereich von $4,30 \times 10^4$ Erregern pro g Kot bzw. $7,98 \times 10^4$ pro ml OFS deutlich geringer als in Bestand A ($2,04 \times 10^9$ Erreger pro g Kot, $5,75 \times 10^5$ pro ml OFS). Während in Betrieb A die größten Erregermengen in LW 12 detektiert wurden und insgesamt aus allen Buchten ein positiver *L. intracellularis* DNA-Nachweis in LW 12 erbracht werden konnte, lag das Maximum der Erregermenge bei Betrieb B in der 16. LW. Außerdem waren Genomfragmente von *L. intracellularis* in Betrieb B über alle Beprobungstermine betrachtet nur in 9/10 Buchten nachweisbar. Es handelte sich bei Betrieb B, im Gegensatz zu Betrieb A, um einen gegen *L. intracellularis* geimpften Tierbestand. Da die Impfung mit einem Lebendimpfstoff bereits in der dritten bis vierten Lebenswoche stattgefunden hat ist davon auszugehen, dass eine vollständige Immunisierung der Herde zum ersten Beprobungstermin in LW 12 bereits abgeschlossen war. Aufgrund fehlender ungeimpfter Kontrollgruppen ist letztlich nur zu vermuten, dass der geringere Gehalt von *L. intracellularis* DNA in Kot und OFS auf die Impfung zurückzuführen ist, es könnten jedoch auch andere Faktoren wie ein

insgesamt geringerer Erregerdruck ursächlich sein. Der Annahme, dass sich eine Impfung negativ auf die ausgeschiedene Erregermenge auswirkt widerspricht eine Studie von NATHUES (2008), in der kein Unterschied in Bezug auf die Detektion von *L. intracellularis* bei geimpften Tieren mittels PCR festgestellt werden konnte, jedoch wurde in dieser Arbeit keine Quantifizierung der nachgewiesenen Erreger vorgenommen. Zudem war die Sensitivität der von NATHUES (2008) verwendeten Multiplex PCR mit einem LOD für *L. intracellularis* von 10^3 Genomkopien geringer als in der für diese Arbeit verwendeten Multiplex realtime-PCR (LOD <10 Genomkopien).

Sowohl die Anzahl der Proben, in denen Genomfragmente von *L. intracellularis* detektiert werden konnten als auch die nachgewiesene Erregermenge pro g Kot bzw. pro ml OFS nahm im Verlauf der Beprobungen ab. In der letzten Beprobung in der 20. Lebenswoche der Tiere war nur noch eine einzige der insgesamt 22 beprobten Buchten *L. intracellularis* DNA positiv. Möglicherweise findet der Erstkontakt, und somit eine Infektion und fortschreitende Immunisierung der beprobten Tiergruppen, schon in der Aufzucht statt. Mit zunehmender Immunisierung der Herde ist davon auszugehen, dass gegen Ende der Mast der Erregerdruck sowie auch die klinischen Erscheinungen deutlich abgenommen haben. Eine ähnliche Ausscheidungsdynamik konnten auch GUEDES und GEBHART (2003) in einer Studie feststellen, bei der naive Tiere vergleichend entweder mit einer infektiösen Dosis von $4,4 \times 10^9$ *L. intracellularis* Erregern infiziert oder mit einer Lebendvakzine geimpft und im Rahmen einer Verlaufsuntersuchung regelmäßig mittels PCR untersucht wurden. Die Ausscheidung von *L. intracellularis* im Kot konnte bei den experimentell infizierten Tieren im Zeitraum von einer bis zur zwölften Woche *post infectionem* intermittierend detektiert werden, bei den geimpften Tieren begann die ebenfalls intermittierende Ausscheidung in der zweiten Woche *post infectionem* und dauerte neun Wochen an (GUEDES und GEBHART, 2003). Folglich ist in Konsequenz dessen und der vorliegenden Arbeit zu empfehlen, eine Probennahme von Kot oder OFS mit dem Zweck der Ermittlung des Infektionsstatus hinsichtlich *L. intracellularis* in Mastbetrieben bevorzugt zu Beginn der

Mast durchzuführen, da hier im Falle einer Infektion sowohl im Kot als auch in OFS eine deutlich höhere Menge an Erregern zu erwarten ist.

Die Ergebnisse der molekularbiologischen Untersuchungen von OFS und Sammelkotproben hinsichtlich DNA von *B. hyodysenteriae* lassen vermuten, dass sich OFS im Rahmen des in der eigenen Studie angewandten Studienaufbaus ebenso für einen Nachweis von *B. hyodysenteriae* eignen wie gepoolte Sammelkotproben. Als Vorteil der Probennahme mittels Kaustrick kann möglicherweise die an der Probe beteiligte Tierzahl gesehen werden. Für eine Sammelkotprobe werden frisch abgesetzter Kot von 3-5 Tieren einer Bucht gepoolt während ein Kaustrick von allen Tieren einer Bucht bekaut werden kann. Diese Überlegungen können in einer der eigenen Arbeit ähnlichen vergleichenden Untersuchung von OFS, Kot- und Umgebungsproben mittels PCR von WEBB et al. (2018) nicht bestätigt werden. Hier konnten die Autoren zeigen, dass die Sensitivität hinsichtlich *Brachyspira ssp.* bei Untersuchungen von OFS deutlich geringer ist als für gepoolte Kotproben. Jedoch wurden in dieser Studie lediglich Kotproben von vorberichtlich *B. hyodysenteriae* positiven, klinisch durchfallkranken Schweinen gewonnen, infolgedessen ist im Kot eine deutlich höhere Erregermenge zu erwarten als in einer Herde ohne akutem Durchfallgeschehen (WEBB et al., 2018).

Für die Diagnostik von Durchfallerkrankungen, deren Ätiologie in einer Infektion mit *Brachyspira ssp.* vermutet wird, sollte nach wie vor die kulturelle Anzucht als Goldstandard bei lebenden Tieren gelten (HAMPSON und BURROUGH, 2019). Allerdings ist diese Methode sehr zeitaufwändig und erfordert trotzdem noch eine genaue Erregerbestimmung mittels PCR, da z.B. Brachyspiren mit starker Betahämolyse nicht durch die alleinige Bakterienkultur differenziert werden können (HAMPSON und BURROUGH, 2019). Zusammenfassend und im Hinblick auf die eigenen Untersuchungen kann der Schluss gezogen werden, dass OFS vermutlich im Falle einer Infektionsstatuserhebung während der Mast hinsichtlich des Vorkommens von *B. hyodysenteriae* gut geeignet sind.

2. Assoziation zwischen den Ergebnissen der Sammelkotproben und Oral Fluid Samples

Hinsichtlich der nachgewiesenen Erregermengen von *L. intracellularis* bzw. *B. hyodysenteriae* der vorliegenden Arbeit konnte über den gesamten Beprobungszeitraum hinweg eine signifikante Korrelation zwischen den beiden Probenmedien Sammelkot und OFS berechnet werden. Dies impliziert, dass sich Kastricke, bzw. die damit gewonnenen OFS gut für eine Untersuchung im Rahmen des in dieser Arbeit verwendeten Studienaufbaus von *L. intracellularis* und *B. hyodysenteriae* mittels Multiplex Realtime PCR eignen. Interessanterweise konnten in einzelnen Fällen *L. intracellularis* und *B. hyodysenteriae* DNA zwar in OFS, jedoch nicht in den zugehörigen Sammelkotproben detektiert werden. Daher lässt sich vermuten, dass OFS möglicherweise besser als gepoolte Kotproben für eine Querschnittsuntersuchung geeignet sind.

Den Untersuchungsergebnissen der eigenen Studie entsprechen auch die Ergebnisse einer ähnlichen Arbeit von LAVIGNE et al. (2013), in der mittels qPCR gepoolte, aus dem Rektum der Tiere entnommene Einzelkotproben von fünf Schweinen einer Bucht mit OFS aus derselben, insgesamt 20 Schweine enthaltenden Bucht, auf Genomfragmente von *L. intracellularis* untersucht und hinsichtlich ihrer Erregermenge verglichen wurden. Auch hier besteht eine signifikante Assoziation zwischen den nachgewiesenen Erregermengen in OFS im Vergleich zu Sammelkotproben bzw. gepoolten Kotproben (LAVIGNE et al., 2013). Die Erklärung für diese Ergebnisse könnte in der größeren Anzahl der Tiere liegen, die an einem OFS im Vergleich zur Sammelkotprobe beteiligt sind (LAVIGNE et al., 2013).

Auch FRANA et al. (2014) untersuchten gepoolte Kotproben von je fünf Tieren einer Bucht und korrespondierende OFS (25-50 Tiere pro Bucht und Kastrick) mittels qPCR auf DNA von *L. intracellularis*, *Brachyspira* ssp. sowie *Salmonella* ssp.. Der Nachweis von Genomfragmenten von *L. intracellularis* gelang hier in 10/20 OFS, während nur 3/20 der gepoolten Kotproben *L. intracellularis* DNA positiv

waren (FRANA et al., 2014). Auch *B. hyodysenteriae* konnte bei dieser Untersuchung mittels qPCR mit 5/5 positiven OFS im Vergleich zu 2/5 positiven Kot-Poolproben häufiger in OFS als in gepoolten Kotproben detektiert werden (FRANA et al., 2014). Als Konsequenz dieser Ergebnisse schlussfolgerten FRANA et al. (2014), dass eine Untersuchung von OFS mittels qPCR mindestens genauso gut wenn nicht besser geeignet ist, um auf Herdenebene das Vorkommen von bakteriellen Durchfallerregern zu untersuchen, als Einzel- oder Sammelkotproben. Allerdings erwähnten die Autoren der genannten Studie, dass man ohne einen validierten Cutoff-Wert keine allgemeingültigen Aussagen über den Zusammenhang zwischen ausgeschiedener Erregermenge und der tatsächlichen klinischen Relevanz dessen treffen kann (FRANA et al., 2014). Diese Vermutung bestätigt sich auch in der eigenen Studie, da die Kotkonsistenz als klinisches Merkmal in keinem signifikanten Zusammenhang zur ausgeschiedenen Erregermenge steht.

Laut einer Studie von WARNEKE (2017) sind OFS im Falle einer klinischen Schweinedysenterie sehr gut geeignet, um *B. hyodysenteriae* und *B. hamptonii* sowohl mittels PCR als auch in Kultur nachzuweisen. Die Autorin wies jedoch darauf hin, dass sich eine Untersuchung von OFS mittels PCR im Falle eines unbekanntem klinischen Status der beprobten Tiere zwar für einen Erregernachweis eignet, jedoch trotzdem für weitere notwendige Untersuchungen, wie z.B. Antibiotikaresistenztests, Kotproben als Untersuchungsmaterial vorzuziehen sind (WARNEKE, 2017). Die Beobachtungen in der vorliegenden Studie zeigen, dass *B. hyodysenteriae* in OFS sogar um 10% häufiger nachgewiesen werden konnte als in den korrespondierenden Sammelkotproben. Dies deutet auf eine höhere Sensitivität dieser Methode für den angewandten Versuchsaufbau im Vergleich zu einer begrenzten Anzahl von Sammelkotuntersuchungen hin und sollte in weiterführenden Arbeiten für eine größere Probenzahl untersucht werden, um mögliche betriebsbezogene Bias ausschließen zu können.

3. Zusammenhang klinischer Durchfallerscheinungen mit den nachgewiesenen Erregermengen im Kot

In der vorliegenden Untersuchung konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Kotkonsistenz und den detektierten Erregermengen von *L. intracellularis* und *B. hyodysenteriae* festgestellt werden.

Der Kot der beprobten Tiere in Betrieb A war zu keinem der drei Beprobungstermine geformt, während die nachgewiesenen Erregermengen von *L. intracellularis* zwischen den einzelnen Beprobungsterminen und Buchten stark variierten und der Erreger in der 20. Lebenswoche nur mehr in einer einzigen Bucht zu detektieren war. Der Kot der beprobten Tiere von Betrieb B war hingegen in den LW 16 und 20 größtenteils geformt, obwohl in einigen Buchten Genomfragmente von *L. intracellularis* und *B. hyodysenteriae* nachgewiesen werden konnten. Auch der Verschmutzungsgrad der Tiere, der in einem signifikanten Zusammenhang zur Kotkonsistenz steht, konnte keinen Aufschluss über die zu erwartende Erregermenge geben, da keine signifikante Korrelation zwischen Verschmutzungsgrad und nachgewiesener Erregermenge berechnet werden konnte.

Da sich aus der eigenen Studie somit keine Hinweise auf eine prognostische Möglichkeit durch alleinige Beurteilung der Kotkonsistenz ergeben haben, kann man davon ausgehen, dass die Beschaffenheit des Kotes sowie der Verschmutzungsgrad einer Tiergruppe möglicherweise auf eine Kombination aus verschiedenen Ursachen zurückzuführen ist und das. neben dem Infektionsstatus z.B. auch die Zusammensetzung der Futtermittel sowie die Qualität der Wasserversorgung eine Rolle spielen könnten. Aus den Beobachtungen der eigenen Studie kann man aufgrund fehlender Kotanalysen lediglich vermuten, dass der Gehalt an Trockensubstanz im Kot bei einer Kotkonsistenz vom Score 3, also wässrig, deutlich unter einem physiologischen Wert von 25% liegt. PEDERSEN et al. (2012a) untersuchten den Effekt der im Kot detektierten Erregermenge von mit *L. intracellularis* infizierten Mastschweinen hinsichtlich des Gehalts der Trockensubstanz im Kot und der täglichen

Zunahmen der Tiere. Sie konnten eine negative Korrelation zwischen der Höhe der nachgewiesenen Erregermenge und den täglichen Zunahmen der Schweine feststellen (PEDERSEN et al., 2012a). Der Gehalt an Trockensubstanz im Kot konnte positiv mit den täglichen Zunahmen assoziiert werden, infolge dessen schlussfolgern die Autoren, dass bei Tieren mit einem physiologischen Trockensubstanzgehalt im Kot von >25% eine Infektion mit *L. intracellularis* keinen negativen Effekt auf die täglichen Zunahmen hat (PEDERSEN et al., 2012a). Schweine mit geringerem Trockensubstanzgehalt im Kot sind demzufolge häufiger von schweren Erkrankungsverläufen betroffen, was sich wiederum auf die Höhe der Tageszunahmen auswirkt (PEDERSEN et al., 2012a). Die Faktoren Trockensubstanzgehalt im Kot, tägliche Zunahmen und Erregermenge im Kot können laut PEDERSEN et al. (2012a) in der Praxis nicht einzeln betrachtet werden, um eine sichere Aussage über den klinischen Zustand und den Infektionsverlauf von mit *L. intracellularis* infizierten Tieren treffen zu können. Diese Hypothese bestätigt sich hinsichtlich der nachgewiesenen Erregermengen und des durch die Kotkonsistenz indirekt beurteilbaren, annähernd gleichen Trockensubstanzgehaltes in der vorliegenden Arbeit.

Auch HERBST et al. (2004) untersuchten Kotproben von 1445 gesunden und 2003 durchfallkranken Schweinen mittels PCR auf DNA von *L. intracellularis* und *B. hyodysenteriae*, um die Frage der klinischen Relevanz eines Erregernachweises zu beantworten. Es konnte eine nahezu dreifach höhere Nachweisrate beider Pathogene bei an Durchfall erkrankten Tieren festgestellt werden als bei klinisch gesunden Tieren (HERBST et al., 2004). Dieses Ergebnis lässt allerdings nicht erkennen, ob sich im Umkehrschluss anhand des Grades der klinischen Anzeichen eine Aussage über die zu erwartende Erregermenge treffen lässt. Infolgedessen ist für eine lückenlose Diagnostik die Untersuchung geeigneter Probenmaterialien als Grundlage einer Behandlung an Durchfall erkrankter Schweine nach wie vor unerlässlich.

4. Möglichkeiten Monitoring – Ausblick

Die vorliegende Arbeit wurde als Verlaufsuntersuchung durchgeführt, um neben dem Vergleich unterschiedlicher Probenmedien auch eine Aussage über die Ausbreitungsdynamik der untersuchten Erreger in den beprobten Buchten treffen zu können. Es zeigte sich, dass *L. intracellularis* DNA hauptsächlich in LW 12 und 16 detektierbar war, *B. hyodysenteriae* dagegen nur in LW 16 und 20. Im Falle einer deutlich ansteigenden Erregermenge von einem zum anderen Beprobungstermin könnten möglicherweise durch ein geeignetes Probennahmeintervall im Rahmen einer regelmäßigen Bestandsuntersuchung schon vor dem Auftreten einer deutlichen klinischen Durchfallssymptomatik entsprechende Behandlungsmaßnahmen ergriffen werden und somit vermutlich einem schlimmeren Verlauf der Erkrankung rechtzeitig Einhalt geboten werden. Neben der Untersuchung und Therapie von akuten klinischen Erkrankungen rückt in der Schweinemedizin vor allem das Monitoring von Infektionskrankheiten in Tierbeständen im Rahmen der tierärztlichen Bestandsbetreuung in den Vordergrund (NATHUES et al., 2011). Bereits 1985 forderten FARVER et al. (1985) regelmäßige Untersuchungen von lebensmittelliefernden Tieren im Rahmen eines Monitoring Programmes mit dem Ziel, Infektionen rechtzeitig zu erkennen, bevor es zu einem bestandsübergreifenden Krankheitsausbruch kommt. In der Schweinehaltungshygieneverordnung wird der tierärztlichen Pflicht unter anderem das Ziel, „den Gesundheitsstatus des Bestandes aufrecht zu erhalten und sofern erforderlich zu verbessern“ auferlegt (BUNDESMINISTERIUM FÜR JUSTIZ UND VERBRAUCHERSCHUTZ, 1999). Nationale und internationale Monitoring Programme existieren bereits für einzelne Erreger, so ist z.B. die Salmonellendiagnostik in Deutschland im nationalen Recht in der Verordnung zur Verminderung der Salmonellenverbreitung durch Schlachtschweine (SchwSalmoV) verankert (BUNDESMINISTERIUM FÜR JUSTIZ UND VERBRAUCHERSCHUTZ, 2017). Des Weiteren können im Rahmen der tierärztlichen Bestandsbetreuung, problemorientiert an den individuellen Schweinebestand angepasst, z.B. Einstellungsuntersuchungen

durchgeführt werden, um unter anderem einen Überblick über die Tiergesundheit einer Tiergruppe von Tag eins im Bestand an zu bekommen oder auch forensische Fragestellungen beantworten zu können (GROSSE BEILAGE, 2013). Die in dieser Studie durchgeführten Untersuchungen sind beispielhaft für eine regelmäßig zu wiederholende Bestandsdiagnostik, die durch die Untersuchung der gewonnenen OFS auf weitere, z.B. atemwegsassoziierte Erreger beliebig an die vorherrschende Problematik des jeweiligen Betriebs angepasst werden könnte. Es ist hinreichend bekannt, dass *L. intracellularis* und *B. hyodysenteriae* bedeutende Pathogene in der intensiven Schweinemast darstellen (HERBST et al., 2004). Aufgrund ihres zum Teil subklinischen Infektionsverlaufs ist das frühzeitige Erkennen unabdingbar, um die Verbreitung der durch diese Erreger verursachten Krankheiten einzuschränken und somit wirtschaftlichen Verlusten vorzubeugen. Ebenfalls ist in der Literatur belegt, dass das Erkrankungsrisiko bei einer Infektion mit beiden Erregern steigt (HERBST et al., 2004), und die Ätiologie von Durchfallerkrankungen noch deutlich an Komplexität zunimmt, je mehr Erreger im Bestand vorhanden sind (JACOBSON et al., 2003).

Die Probennahme der vorliegenden Arbeit wurde aufgrund der zu erstellenden Kotscores von Tierärzten der Klinik für Schweine durchgeführt, jedoch ist eine Gewinnung von OFS ohne weiteres durch die Betriebsleiter selbst durchführbar. Die Probengewinnung einer erforderlichen Anzahl von Stichproben, die eine Aussage über ein Infektionsgeschehen hinsichtlich der jeweiligen Bestandsgröße erlauben würde, ist durch tierärztliches Personal und nötige Manipulation der Tiere zur Probengewinnung bei herkömmlichem Probenmaterial wie Blut, BAL-Flüssigkeit oder Nasentupfern sehr zeit- und kostenintensiv und zudem auch ein Auslöser von Stress für die beprobten Tiere (PRICKETT et al., 2008). Eine Konsequenz dessen ist möglicherweise ein lückenhaftes Monitoring oder der vollständige Verzicht auf regelmäßige Bestandsuntersuchungen (PRICKETT et al., 2008). Die Gewinnung von OFS mittels Kaustrieken und deren Untersuchung im Rahmen eines Monitoring Programmes wurde als erstes in einer Arbeit von (PRICKETT

et al., 2008) beschrieben, in der der Nachweis von PRRSV DNA und Genomfragmenten von PCV2 in drei Schweinebeständen mittels OFS erbracht werden konnte. Seit dieser Veröffentlichung wurde der Nachweis zahlreicher weiterer Infektionserreger mittels OFS erprobt und OFS hinsichtlich ihrer Eignung für Bestandsuntersuchungen, ähnlich wie in der vorliegenden Studie, im Rahmen von Monitoring Programmen evaluiert (KITTAWORNRAT et al., 2010; RAMIREZ et al., 2012; OLSEN et al., 2013).

Davon ausgehend, dass die Sensitivität und Spezifität von diagnostischen Tests bei OFS der Sensitivität und Spezifität anderer Probenmedien wie Serum oder Kot entspricht, bieten Untersuchungen mittels Kaustick eine hervorragende Möglichkeit, Daten über Infektionskrankheiten routinemäßig, kostengünstig und nicht invasiv zu gewinnen und somit proaktiv der Tiergesundheit förderlich zu sein (KITTAWORNRAT et al., 2010).

Wenn eine kostengünstige Methode leicht und auch von Laien, also Landwirten selbst, durchgeführt werden kann, kann man letztendlich auch von einer höheren Bereitschaft ausgehen, regelmäßige Screenings in Mastbeständen durchzuführen. Eine fast ausschließlich mithilfe von Landwirten als probengewinnende Personen erstellte Studie von BEISL (2020) hat gezeigt, dass die Qualität der im Labor eintreffenden OFS nicht beeinträchtigt war. Die einfache Durchführung der regelmäßigen Probengewinnung mittels Kaustick durch betriebseigene Mitarbeiter birgt zudem den Vorteil, dass eine Übertragung von infektiösem Material in andere Bestände ausgeschlossen ist bzw. das Risiko einer Erregerübertragung zwischen einzelnen Betrieben im Gegensatz zu einer Probennahme durch den Tierarzt deutlich herabgesetzt wird (RAMIREZ et al., 2012). Dies soll jedoch nur für Monitoring Maßnahmen gelten, das Hinzuziehen des Tierarztes bei akuten Krankheitsausbrüchen und gesetzlich vorgeschriebenen Betreuungsprogrammen ist nach wie vor unerlässlich (GROSSE BEILAGE, 2013).

Abschließend lässt sich festhalten, dass die Diagnostik mittels OFS eine vielfältig nutzbare Beprobungsmethode darstellt, deren Weiterentwicklung im Sinne der Gesunderhaltung intensiv gehaltener

Mastschweine gefördert werden sollte, um in der Schweinemedizin eine zeitgemäße, günstige und tierschutzgerechte tierärztliche Betreuung praktizieren zu können.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

„Vergleichende Untersuchung zum molekularbiologischen Nachweis von *Lawsonia intracellularis* und *Brachyspira* ssp. aus Sammelkotproben und Oral Fluid Samples bei Mastschweinen.“

Die bakteriellen Durchfallerreger *Lawsonia (L.) intracellularis*, *Brachyspira (B.) hyodysenteriae* und *Brachyspira (B.) pilosicoli* verursachen weltweit hohe wirtschaftliche Schäden in der intensiven Schweinehaltung. Herkömmliche Diagnostikmethoden am lebenden Tier hinsichtlich dieser Erreger sind Serologie, PCR von Kotproben sowie Anzucht auf Selektivnährböden bzw. in Zellkultur. Da die Übertragung dieser Pathogene auf fäkal-oralem Weg erfolgt ist anzunehmen, dass sie in Oral Fluids (=Maulhöhlenflüssigkeit) von Schweinen einer infizierten Tiergruppe nachzuweisen sind. In der vorliegenden explorativen Studie wurde der Nachweis von Genomfragmenten dieser Erreger mittels Multiplex Realtime-PCR in mithilfe von Kaustrieken gewonnenen Oral Fluid Samples (OFS) und den jeweiligen OFS zugeordneten Sammelkotproben untersucht und verglichen. Zusätzlich wurde die Kotkonsistenz und der Verschmutzungsgrad der beprobten Tiere erfasst und auf einen möglichen Einfluss der nachgewiesenen Erregermenge hin überprüft. Es wurden insgesamt 66 OFS und 66 Sammelkotproben im Rahmen einer Verlaufsuntersuchung mit je einem Beprobungstermin in der 12., 16. und 20. Lebenswoche der beprobten Tiere aus zwei niederbayerischen Schweinemastbetrieben auf das Vorhandensein von Genomfragmenten der drei oben genannten Erreger untersucht. DNA von *L. intracellularis* konnte in insgesamt 45,5% (30/66) der untersuchten OFS sowie in 45,5% (30/66) der untersuchten Sammelkotproben nachgewiesen werden, davon waren bei beiden Probenmaterialien je 20 *L. intracellularis* DNA positive Proben von Betrieb A, 10 von Betrieb B. Die höchste nachgewiesene Erregermenge von *L. intracellularis* betrug $2,04 \times 10^9$ pro g Kot bzw. $7,75 \times 10^5$ pro ml OFS. *B. hyodysenteriae* DNA konnte nur auf Betrieb B nachgewiesen werden, insgesamt wiesen 13,3% (4/30) der Sammelkotproben und 23,3% (7/30) der OFS Genomfragmente von *B. hyodysenteriae* auf. Die höchste nachgewiesene Erregermenge von *B. hyodysenteriae* betrug $3,40 \times 10^5$ pro g Kot bzw.

4,17x10⁴ pro ml OFS. DNA von *B. pilosicoli* war in keiner untersuchten Probe nachweisbar. Der Nachweis von *L. intracellularis* in Sammelkot und OFS zeigte eine hohe, signifikante Übereinstimmung von K=0,878 (p<0,001). Hinsichtlich des Nachweises von *B. hyodysenteriae* DNA zeigten die untersuchten Sammelkotproben und OFS eine moderate Übereinstimmung (K=0,453, p=0,009). Insgesamt ist die Übereinstimmung aller untersuchten Sammelkotproben und OFS mit einer Interrater-Reliabilität von K=0,799 (p<0,001) als hoch einzustufen. Die Ergebnisse der klinischen Beobachtungen stehen in keinem statistischen Zusammenhang zu den nachgewiesenen Erregermengen der untersuchten Sammelkotproben und OFS. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen, dass die Untersuchung von OFS im Vergleich zu Sammelkotproben hinsichtlich des Nachweises von *L. intracellularis* und *B. hyodysenteriae* eine sinnvolle Ergänzung bzw. Alternative im Rahmen von Monitoring Programmen oder der Bestandsdiagnostik bei Mastschweinen bieten kann.

VII. SUMMARY

"Comparative study of the molecular biological detection of *Lawsonia intracellularis* and *Brachyspira* ssp. from pooled fecal samples and oral fluid samples in fattening pigs."

Lawsonia (*L.*) *intracellularis*, *Brachyspira* (*B.*) *hyodysenteriae* and *Brachyspira* (*B.*) *pilosicoli* are widely distributed pathogens among intensive domestic pig producing units worldwide. They cause high economic damage by inducing porcine intestinal adenomatosis, swine dysentery, and porcine intestinal spirochetosis, respectively. Conventional *ante mortem* diagnostic methods regarding these pathogens include serology, PCR of fecal samples and selective cultivation or cell culture. The use of oral fluids as a diagnostic specimen has increased, especially in surveillance programs for respiratory pathogens as PRRSV, PCV2, Influenza A Virus, etc. Since *L. intracellularis*, *B. hyodysenteriae* and *B. pilosicoli* are transmitted fecal-orally, it can be assumed that they can be detected in oral fluids of infected pigs. In the present exploratory study, the detection of DNA of these pathogens in pen based oral fluid samples (OFS) and pooled fecal samples was performed using multiplex real-time PCR. Detection levels of the pathogens were compared pen-wise. In addition, the fecal consistency and the degree of fecal staining of the sampled animals were recorded and checked pen-wise for a possible influence by the detected amount of pathogen. A total of 66 OFS and 66 pooled fecal samples were analysed for the presence of genome fragments of the three above-mentioned pathogens as part of a follow-up study with three sampling dates at week 12, 16 and 20 of age of the sampled animals from two fattening units in Lower Bavaria. *L. intracellularis* DNA was detected in a total of 45.5% (30/66) of the OFS and 45.5% (30/66) of the pooled fecal samples, 20 of which were *L. intracellularis* DNA positive samples for both sample materials from farm A, 10 from farm B. The highest detected amount of *L. intracellularis* pathogens was 2.04×10^9 per g feces, 7.75×10^5 per ml OFS. *B. hyodysenteriae* DNA was detected on farm B only, a total of 13.3% (4/30) of the pooled fecal samples and 23.3% (7/30) of the OFS contained genome fragments of *B. hyodysenteriae*. The highest detected

amount of *B. hyodysenteriae* was 3.40×10^5 per g feces and 4.17×10^4 per ml OFS. DNA of *B. pilosicoli* was not detectable in any sample. The detection of *L. intracellularis* in pooled fecal samples and OFS showed a high, significant agreement of $K=0.878$ ($p < 0.001$). Regarding the detection of *B. hyodysenteriae* DNA, the pooled fecal samples and OFS showed moderate agreement ($K=0.453$, $p=0.009$). Overall, the agreement of collected pooled fecal samples and OFS with an interrater reliability of $K=0.799$ ($p < 0.001$) can be rated as high. The results of the clinical observations are not statistically related to the detected amounts of pathogens in both pooled fecal samples and OFS. The results of the present study show that the investigation of OFS compared to pooled fecal samples regarding the detection of *L. intracellularis* and *B. hyodysenteriae* can be a useful addition and a seminal method for surveillance and monitoring programs of diarrheal diseases in fattening pigs.

VIII. TABELLENVERZEICHNIS

<i>Tabelle 1: Darstellung der Sequenzen der in der vorliegenden Studie verwendeten Primer und Sonden (WILLEMS und REINER, 2010).</i>	24
<i>Tabelle 2: Einteilung der Kotkonsistenz</i>	25
<i>Tabelle 3: Darstellung der Multiplex Realtime-PCR Ergebnisse der Sammelkotproben aus Betrieb A – pre-screening (in Erreger pro g Kot).</i>	27
<i>Tabelle 4: Darstellung der Multiplex Realtime-PCR Ergebnisse der Sammelkotproben aus Betrieb B – pre-screening (in Erreger pro g Kot).</i>	28
<i>Tabelle 5: Auswertung aller L. intracellularis DNA positiven Sammelkotproben (LW=Lebenswoche, n=positiv/gesamt, SD= Standardabweichung).</i>	29
<i>Tabelle 6: Auswertung aller L. intracellularis DNA positiven OFS (LW=Lebenswoche, n=positiv/gesamt, SD= Standardabweichung).</i>	29
<i>Tabelle 7: Auswertung der L. intracellularis DNA positiven Sammelkotproben, Betrieb A (LW=Lebenswoche, n=positiv/gesamt, SD= Standardabweichung).</i>	30
<i>Tabelle 8: Auswertung der L. intracellularis positiven OFS Betrieb A (LW=Lebenswoche, n=positiv/gesamt, SD=Standardabweichung).</i>	30
<i>Tabelle 9: Schematische Darstellung der Erregermenge (pro g Kot) von L. intracellularis im Kot nach Bucht und Alter der Tiere, Betrieb A.....</i>	31
<i>Tabelle 10: Schematische Darstellung der Erregermenge (pro ml OFS) von L. intracellularis in OFS nach Bucht und Alter der Tiere, Betrieb A.</i>	31
<i>Tabelle 11: Auswertung der L. intracellularis DNA positiven Sammelkotproben, Betrieb B (LW=Lebenswoche, n=positiv/gesamt, SD=Standardabweichung).</i>	32
<i>Tabelle 12: Auswertung der L. intracellularis DNA positiven OFS, Betrieb B (LW=Lebenswoche, n=positiv/gesamt, SD= Standardabweichung).</i>	32
<i>Tabelle 13: Schematische Darstellung der Erregermenge (pro g Kot) von L. intracellularis im Kot nach Bucht und Alter der Tiere, Betrieb B.....</i>	33
<i>Tabelle 14: Schematische Darstellung der Erregermenge (pro ml OFS) von L. intracellularis in OFS nach Bucht und Alter der Tiere, Betrieb B.</i>	33
<i>Tabelle 15: Auswertung der B. hyodysenteriae DNA positiven</i>	

<i>Sammelkotproben, Betrieb B (LW=Lebenswoche, n=positiv/gesamt, SD=Standardabweichung).....</i>	<i>35</i>
<i>Tabelle 16: Auswertung der B. hyodysenteriae DNA positiven OFS, Betrieb B (LW=Lebenswoche, n=positiv/gesamt, SD=Standardabweichung).</i>	<i>36</i>
<i>Tabelle 17: Schematische Darstellung der Erregermenge (pro g Kot) von B. hyodysenteriae im Kot nach Alter und Bucht, Betrieb B.....</i>	<i>36</i>
<i>Tabelle 18: Schematische Darstellung der Erregermenge (pro ml OFS) von B. hyodysenteriae in OFS nach Alter und Bucht, Betrieb B.....</i>	<i>36</i>
<i>Tabelle 19: Nachweis von L. intracellularis DNA in Sammelkot und OFS, LW 12.....</i>	<i>39</i>
<i>Tabelle 20: Nachweis von L. intracellularis DNA in Sammelkot und OFS, LW 16.....</i>	<i>39</i>
<i>Tabelle 21: : Nachweis von L. intracellularis DNA in Sammelkot und OFS, LW 20.....</i>	<i>40</i>
<i>Tabelle 22: Darstellung der aus den Ergebnissen der quantitativen PCR von beiden Betrieben zusammenfassend errechneten Korrelationskoeffizienten nach Spearman-Rho, Zusammenfassung aller Beprobungstermine (LW 12, LW 16, LW 20).....</i>	<i>41</i>
<i>Tabelle 23: Korrelation der Ergebnisse der quantitativen PCR für L. intracellularis und B. hyodysenteriae aus Sammelkotproben und zugehörigen OFS je Bestand.....</i>	<i>42</i>
<i>Tabelle 24: Schematische Darstellung der Kotbeschaffenheit in Betrieb A nach Bucht und Beprobungszeitpunkt.....</i>	<i>43</i>
<i>Tabelle 25: Schematische Darstellung der Verschmutzung, Betrieb A, dargestellt nach Bucht und Beprobungszeitpunkt.....</i>	<i>44</i>
<i>Tabelle 26: Schematische Darstellung der Kotbeschaffenheit Betrieb in B nach Bucht und Beprobungszeitpunkt.....</i>	<i>44</i>
<i>Tabelle 27: Verschmutzung Betrieb B nach Bucht und Beprobungszeitpunkt.....</i>	<i>45</i>
<i>Tabelle 28: Assoziation zwischen Kot-Score (1-3) und nachgewiesener Erregermenge nach Lebenswoche (LW), Erreger und Probenmaterial (pro g Kot bzw. pro ml OFS).....</i>	<i>47</i>
<i>Tabelle 29: Assoziationen zwischen Verschmutzungsgrad (leicht bis stark) und nachgewiesener Erregermenge nach Lebenswoche (LW),</i>	

<i>Erreger und Probenmaterial</i>	48
<i>Tabelle 30: Schematische Darstellung der Buchtenverteilung, Betrieb A (nicht maßstabsgetreu)</i>	85
<i>Tabelle 31: Schematische Darstellung der Buchtenverteilung, Betrieb B (nicht maßstabsgetreu)</i>	85

IX. LITERATURVERZEICHNIS

Arnold M, Crienen A, Swam H, von Berg S, Jolie R, Nathues H. Prevalence of *Lawsonia intracellularis* in pig herds in different European countries. *Porcine Health Manag* 2019; 5: 1-11.

Atyeo RF, Oxberry SL, Combs BG, Hampson DJ. Development and evaluation of polymerase chain reaction tests as an aid to diagnosis of swine dysentery and intestinal spirochaetosis. *Lett Appl Microbiol* 1998; 26: 126-130.

Beisl M. Randomisierte Querschnittsuntersuchung über die Prävalenz des porzinen Circovirus Typ 2 und zugehöriger Genotypen in deutschen Schweinemastbeständen mittels Oral Fluids. 2020. Diss. med. vet. Ludwig-Maximilians-Universität München.

Biester H, Schwarte L. Intestinal adenoma in swine. *Am J Pathol* 1931; 7: 175-185.

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

Boesen HT, Jensen TK, Jungersen G, Riber U, Boye M, Møller K. Development, characterization and diagnostic application of a monoclonal antibody specific for a proteinase K resistant *Lawsonia intracellularis* antigen. *Vet Microbiol* 2005; 105: 199-206.

Boutrup TS, Boesen H, Boye M, Agerholm JS, Jensen TK. Early pathogenesis in porcine proliferative enteropathy caused by *Lawsonia intracellularis*. *J Comp Pathol* 2010; 143: 101-109.

Brandt D, Kaim U, Baumgärtner W, Wendt M. Evaluation of *Lawsonia intracellularis* infection in a group of pigs in a subclinically affected herd from weaning to slaughter. *Vet Microbiol* 2010; 146: 361-365.

Bundesministerium für Justiz und Verbraucherschutz. Verordnung über hygienische Anforderungen beim Halten von Schweinen. 1999: <https://www.gesetze-im-internet.de/schhalthygv/SchHaltHygV.pdf>. accessed: 02.09.2020.

Bundesministerium für Justiz und Verbraucherschutz. Verordnung zur Verminderung der Salmonellenverbreitung durch Schlachtschweine. 2017: <http://www.gesetze-im-internet.de/schwsalmov/>. accessed: 30.08.2020.

Burrough E. Swine dysentery: etiopathogenesis and diagnosis of a reemerging disease. *Vet Pathol* 2017; 54: 22-31.

Burrough ER, Strait EL, Kinyon JM, Bower LP, Madson DM, Wilberts BL, Schwartz KJ, Frana TS, Songer JG. Comparative virulence of clinical *Brachyspira* spp. isolates in inoculated pigs. *J Vet Diagn Invest* 2012; 24: 1025-1034.

Cadetg RSS, Vidondo B, Nathues H, Schüpbach G, Zeeh F. Retrospektive Studie zur Sanierung von Beständen mit Schweinedysenterie (*Brachyspira hyodysenteriae*) in der Schweiz. 2019. Diss. med. vet. Vetsuisse-Fakultät, Universität Bern.

Chander Y, Primus A, Oliveira S, Gebhart CJ. Phenotypic and molecular characterization of a novel strongly hemolytic *Brachyspira* species, provisionally designated "*Brachyspira hamptonii*". *J Vet Diagn Invest* 2012; 24: 903-910.

Chouet S, Prieto C, Mieli L, Veenhuizen M, McOrist S. Patterns of exposure to *Lawsonia intracellularis* infection on European pig farms. *Vet Rec* 2003; 152: 14-17.

Collins A, Love RJ, Pozo J, Smith SH, McOrist S. Studies on the ex vivo survival of *Lawsonia intracellularis*. *J Swine Health Prod* 2000; 8: 211-215.

Collins A, Love R. Re-challenge of pigs following recovery from proliferative enteropathy. *Vet Microbiol* 2007; 120: 381-386.

Collins AM, Barchia IM. The critical threshold of *Lawsonia intracellularis* in pig faeces that causes reduced average daily weight gains in experimentally challenged pigs. *Vet Microbiol* 2014; 168: 455-458.

Drolet R, Larochelle D, Gebhart CJ. Proliferative enteritis associated with *Lawsonia intracellularis* (ileal symbiont *intracellularis*) in white-tailed deer. *J Vet Diagn Invest* 1996; 8: 250-253.

Dünser M, Untersperger M, Schweighardt H, Schuh M, Awad-Masalmeh M. Diagnostik der porzinen proliferativen Enteropathien: Vergleich unterschiedlicher Nachweismethoden zur Erfassung von *Lawsonia intracellularis*. *Tierärztl Prax Ausg G* 2003; 31: 99-105.

Farver TB, Thomas C, Edson RK. An application of sampling theory in animal disease prevalence survey design. *Prev Vet Med* 1985; 3: 463-473.

Fellström C, Zimmerman U, Aspan A, Gunnarsson A. The use of culture, pooled samples and PCR for identification of herds infected with *Brachyspira hyodysenteriae*. *Anim Health Res Rev* 2001; 2: 37.

Frana T, Warneke H, Stensland W, Kinyon J, Bower L, Borrough E. Comparative detection of *Lawsonia intracellularis*, *Salmonella* and *Brachyspira* from oral fluids and feces. 45th AASV Annual Meeting. 2014. Dallas, USA. 67-69.

Gebhart CJ, Ward G, Chang K, Kurtz H. *Campylobacter hyointestinalis* (new species) isolated from swine with lesions of proliferative ileitis. *Am J Vet Res* 1983; 44: 361-367.

Gebhart CJ, Barns SM, Mcorist S, Lin G-F, Lawson GH. Ileal symbiont *intracellularis*, an obligate intracellular bacterium of porcine intestines showing a relationship to *Desulfovibrio* species. *Int J Syst Evol Microbiol* 1993; 43: 533-538.

Girard C, Lemarchand T, Higgins R. Porcine colonic spirochetosis: a retrospective study of eleven cases. *Can Vet J* 1995; 36: 291.

Glock R, Harris D. Swine dysentery. II. Characterization of lesions in pigs inoculated with *Treponema hyodysenteriae* in pure and mixed culture. *Vet Med* 1972; 67: 65-68.

grosse Beilage E. Klinische Untersuchungen von Schweinebeständen. In: Diagnostik und Gesundheitsmanagement im Schweinebestand: Band 1. grosse Beilage E, Wendt M eds.: Verlag Eugen Ulmer. 2013: 15-52.

Guedes RM, Gebhart CJ, Winkelman NL, Mackie-Nuss RA, Marsteller TA, Deen J. Comparison of different methods for diagnosis of porcine proliferative enteropathy. *Can J Vet Res* 2002; 66: 99-107.

Guedes RM, Gebhart CJ. Onset and duration of fecal shedding, cell-mediated and humoral immune responses in pigs after challenge with a pathogenic isolate or attenuated vaccine strain of *Lawsonia intracellularis*. *Vet Microbiol* 2003; 91: 135-145.

Halter MR, Joens LA. Lipooligosaccharides from *Treponema hyodysenteriae* and *Treponema innocens*. *Infect Immun* 1988; 56: 3152-3156.

Hampson DJ, Oxberry SL, La T. Potential for zoonotic transmission of *Brachyspira pilosicoli*. *Emerg Infect Dis* 2006; 12: 869.

Hampson DJ, Lugsomya K, La T, Phillips ND, Trott DJ, Abraham S. Antimicrobial resistance in *Brachyspira*—an increasing problem for disease control. *Vet Microbiol* 2019; 229: 59-71.

Hampson DJ, Burrough ER. Swine dysentery and *Brachyspiral* colitis. In: *Diseases of swine*, 11th edn. Zimmerman J, Karriker L, Ramirez A, Schwartz K, Stevenson G, Zang J eds.: John Wiley & sons, Inc. 2019: 951-970.

Herbst W, Willems H, Baljer G. Verbreitung von *Brachyspira hyodysenteriae* und *Lawsonia intracellularis* bei gesunden und durchfallkranken Schweinen. *Berl Münch Tierärztl Wochenschr* 2004; 117: 493-498.

Hernandez-Garcia J, Robben N, Magnée 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.

Hidalgo A, Rubio P, Osorio J, Carvajal A. Prevalence of *Brachyspira pilosicoli* and "*Brachyspira canis*" in dogs and their association with diarrhoea. *Vet Microbiol* 2010; 146: 356-360.

Holt SC. Anatomy and chemistry of spirochetes. *Microbiol Rev* 1978; 42: 114-160.

Holyoake P, Emery D, Gonsalves J, Donahoo M, Collins A. Prevalence of antibodies to *Lawsonia intracellularis* in pig herds in Australia. *Aust Vet J* 2010; 88: 186-188.

Huan YW, Bengtsson RJ, MacIntyre N, Guthrie J, Finlayson H, Smith SH, Archibald AL, Ait-Ali T. *Lawsonia intracellularis* exploits β -catenin/Wnt and Notch signalling pathways during infection of intestinal crypt to alter cell homeostasis and promote cell proliferation. *PLoS One* 2017; 12: e0173782.

Huerta B, Arenas A, Carrasco L, Maldonado A, Tarradas C, Carbonero A, Perea A. Comparison of diagnostic techniques for porcine proliferative enteropathy (*Lawsonia intracellularis* infection). *J Comp Pathol* 2003; 129: 179-185.

Jacobs A, Harks F, Hazenberg L, Hoeijmakers M, Nell T, Pel S, Segers R. Efficacy of a novel inactivated *Lawsonia intracellularis* vaccine in pigs against experimental infection and under field conditions. *Vaccine* 2019; 37: 2149-2157.

Jacobson M, af Segerstad CH, Gunnarsson A, Fellström C, de Verdier Klingenberg K, Wallgren P, Jensen-Waern M. Diarrhoea in the growing pig—a comparison of clinical, morphological and microbial findings between animals from good and poor performance herds. *Res Vet Sci* 2003; 74: 163-169.

Jacobson M, Fellström C, Lindberg R, Wallgren P, Jensen-Waern M. Experimental swine dysentery: comparison between infection models. *J Med Microbiol* 2004; 53: 273-280.

Jacobson M, Råsbäck T, Flöistrup H, Benz M, Braun-Fahrländer C, Riedler J, Schram-Bijkerk D, Fellström C. Survey on the occurrence of *Brachyspira* species and *Lawsonia intracellularis* in children living on pig farms. *Epidemiol Infect* 2007a; 135: 1043-1045.

Jacobson M, Lindberg R, Jonasson R, Fellström C, Waern MJ. Consecutive pathological and immunological alterations during experimentally induced swine dysentery—A study performed by repeated endoscopy and biopsy samplings through an intestinal cannula. *Res Vet Sci* 2007b; 82: 287-298.

Jensen T, Jorsal S, Leser T, Carstensen B. Detection of *Lawsonia intracellularis*, *Serpulina hyodysenteriae*, weakly beta-haemolytic intestinal spirochaetes, *Salmonella enterica*, and haemolytic *Escherichia coli* from swine herds with and without diarrhoea among growing pigs. *Vet Microbiol* 1998; 62: 59-72.

Jensen TK, Christensen BB, Boye M. *Lawsonia intracellularis* infection in the large intestines of pigs. *APMIS* 2006; 114: 255-263.

Joens L. Experimental transmission of *Treponema hyodysenteriae* from mice to pigs. *Am J Vet Res* 1980; 41: 1225-1226.

Joens L, Kinyon JM. Isolation of *Treponema hyodysenteriae* from wild rodents. *J Clin Microbiol* 1982; 15: 994-997.

Jones G, Ward G, Murtaugh MP, Lin G, Gebhart CJ. Enhanced detection of intracellular organism of swine proliferative enteritis, ileal symbiont *intracellularis*, in feces by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 2611-2615.

Jordan DM, Knitted JP, Schwartz KJ, Roof MB, Hoffman LJ. A *Lawsonia intracellularis* transmission study using a pure culture inoculated seeder-pig sentinel model. *Vet Microbiol* 2004; 104: 83-90.

Kamp J, Schuttert-Wilps R, Kars-Hendriksen S. Swine dysentery eradication by strategic medication without depopulation. 21st International Pig Veterinary Society Congress, 2010. Vancouver, Kanada. 733-734.

Kaufman E, Lamster IB. The diagnostic applications of saliva—a review. *Crit Rev Oral Biol Med* 2002; 13: 197-212.

Keller C, Ohlinger V, Bulay A, Maala C. A blocking ELISA for the detection of antibodies against *Lawsonia intracellularis*. 2nd Asian Pig Veterinary Society Congress 2004. Pasig City, Philippines. 116-117.

Kennedy MJ, Yancey Jr RJ. Motility and chemotaxis in *Serpulina hyodysenteriae*. *Vet Microbiol* 1996; 49: 21-30.

Kinyon J, Harris D. *Treponema innocens*, a new species of intestinal bacteria, and emended description of the type strain of *Treponema hyodysenteriae* Harris et al. *Int J Syst Evol Microbiol* 1979; 29: 102-109.

Kittawornrat A, Prickett J, Chittick W, Wang C, Engle M, Johnson J, Patnayak D, Schwartz T, Whitney D, Olsen C. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in serum and oral fluid samples from individual boars: will oral fluid replace serum for PRRSV surveillance? *Virus Res* 2010; 154: 170-176.

Kittawornrat A, Zimmerman JJ. Toward a better understanding of pig behavior and pig welfare. *Anim Health Res Rev* 2011; 12: 25.

Knittel J, Jordan D, Schwartz K, Janke B, Roof M, McOrist S, Harris D. Evaluation of antemortem polymerase chain reaction and serologic methods for detection of *Lawsonia intracellularis*-exposed pigs. *Am J Vet Res* 1998; 59: 722-726.

Kroll JJ, Roof MB, McOrist S. Evaluation of protective immunity in pigs following oral administration of an avirulent live vaccine of *Lawsonia intracellularis*. *Am J Vet Res* 2004; 65: 559-565.

Kroll JJ, Roof MB, Hoffman LJ, Dickson JS, Harris DH. Proliferative enteropathy: a global enteric disease of pigs caused by *Lawsonia intracellularis*. *Anim Health Res Rev* 2005; 6: 173-197.

La T, Phillips ND, Hampson DJ. Development of a duplex PCR assay for detection of *Brachyspira hyodysenteriae* and *Brachyspira pilosicoli* in pig feces. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 3372-3375.

La T, Collins A, Phillips N, Oksa A, Hampson D. Development of a multiplex-PCR for rapid detection of the enteric pathogens *Lawsonia intracellularis*, *Brachyspira hyodysenteriae*, and *Brachyspira pilosicoli* in porcine faeces. *Lett Appl Microbiol* 2006; 42: 284-288.

Ladinig A, Sommerfeld-Stur I, Weissenböck H. Comparative evaluation of diagnostic methods for *Lawsonia intracellularis* infection in pigs, with emphasis on cases lacking characteristic lesions. *J Comp Pathol* 2009; 140: 140-148.

Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* 1977: 159-174.

LaVigne KA, Pierdon MK, Armbruster GA, Rincker PJ. Comparison of sampling methods for *Lawsonia intracellularis* testing using qPCR. 44th AASV Annual Meeting 2013. San Diego, USA. 71-74.

Lawson G, Rowland A, MacIntyre N. Demonstration of a new intracellular antigen in porcine intestinal adenomatosis and hamster proliferative ileitis. *Vet Microbiol* 1985; 10: 303-313.

Lawson G, McOrist S, Jasni S, Mackie R. Intracellular bacteria of porcine proliferative enteropathy: cultivation and maintenance in vitro. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 1136-1142.

Lawson G, Gebhart CJ. Proliferative enteropathy. *J Comp Pathol* 2000; 122: 77-100.

Leblanc B, Fox J, Le Net J, Masson M, Picard A. Hyperplastic gastritis with intraepithelial *Campylobacter*-like organisms in a Beagle dog. *Vet Pathol* 1993; 30: 391-394.

Lee J, Hampson D. Genetic characterisation of intestinal spirochaetes and their association with disease. *J Med Microbiol* 1994; 40: 365-371.

Leser TD, Møller K, Jensen TK, Jorsal SE. Specific detection of *Serpulina hyodysenteriae* and potentially pathogenic weakly β -haemolytic porcine intestinal spirochetes by polymerase chain reaction targeting 23S rDNA. *Mol Cell Probes* 1997; 11: 363-372.

Lindecrona R, Jensen TK, Andersen P, Møller K. Application of a 5' nuclease assay for detection of *Lawsonia intracellularis* in fecal samples from pigs. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 984-987.

Lysons R, Kent K, Bland A, Sellwood R, Robinson W, Frost A. A cytotoxic haemolysin from *Treponema hyodysenteriae*—a probable virulence determinant in swine dysentery. *J Med Microbiol* 1991; 34: 97-102.

McOrist S, Lawson G, Rowland A, MacIntyre N. Early lesions of proliferative enteritis in pigs and hamsters. *Vet Pathol* 1989; 26: 260-264.

McOrist S, Jasni S, Mackie R, MacIntyre N, Neef N, Lawson G. Reproduction of porcine proliferative enteropathy with pure cultures of ileal symbiont intracellularis. *Infect Immun* 1993; 61: 4286-4292.

McOrist S, Gebhart CJ, Boid R, Barns SM. Characterization of *Lawsonia intracellularis* gen. nov., sp. nov., the obligately intracellular bacterium of porcine proliferative enteropathy. *Int J Syst Evol Microbiol* 1995; 45: 820-825.

McOrist S, Roberts L, Jasni S, Rowland A, Lawson G, Gebhart C, Bosworth B. Developed and resolving lesions in porcine proliferative enteropathy: possible pathogenetic mechanisms. *J Comp Pathol* 1996; 115: 35-45.

McOrist S, Barcellos D, Wilson R. Global patterns of porcine proliferative enteropathy. *Pig J* 2003; 51: 26-35.

McOrist S. Defining the full costs of endemic porcine proliferative enteropathy. *Vet J* 2005; 1: 8-9.

McOrist S, Gebhart CJ. Proliferative enteropathy. In: *Diseases of Swine*. 10th ed. Hoboken, New Jersey: Wiley-Blackwell Publishing eds.: 2012: 811-819.

Michalski CW, Di Mola FF, Kümmel K, Wendt M, Köninger JS, Giese T, Giese NA, Friess H. Human inflammatory bowel disease does not associate with *Lawsonia intracellularis* infection. *BMC Microbiol* 2006; 6: 1-7.

Nathues H, Oliveira C, Wurm M, Grosse Beilage E, Givisiez P. Simultaneous detection of *Brachyspira hyodysenteriae*, *Brachyspira pilosicoli* and *Lawsonia intracellularis* in porcine faeces and tissue samples by multiplex-PCR. *J Vet Med* 2007; 54: 532-538.

Nathues H. Diagnosis of *Lawsonia intracellularis* infection in pigs after vaccination or antimicrobial treatment. *Dtsch Tierärztl Wochenschr* 2008; 115: 404-409.

Nathues H, Holthaus K, Grosse Beilage E. Quantification of *Lawsonia intracellularis* in porcine faeces by real-time PCR. *J Appl Microbiol* 2009; 107: 2009-2016.

Nathues H, Nienhoff H, grosse Beilage E, Blaha T, Ritzmann M, Reiner G, Lahrman K, Kauffold J, Waberski D, Hennig-Pauka I, Wendt M, Waldmann K. Monitoring-Systeme in Zuchtschweinebeständen aus Sicht der Wissenschaft. *Deutsches Tierärzteblatt* 2011; 10: 1324-1334.

Ochiai S, Adachi Y, Mori K. Unification of the genera *Serpulina* and *Brachyspira*, and proposals of *Brachyspira hyodysenteriae* comb. nov., *Brachyspira innocens* comb. nov. and *Brachyspira pilosicoli* comb. nov. *Microbiol Immunol* 1997; 41: 445-452.

Olsen C, Coetzee J, Karriker L, Kittawornrat A, Lizano S, Main R, Meiszberg A, Panyasing Y, Wang C, Zimmerman J. Effect of sample collection material on detection of PRRSV antibody in oral fluid. 22nd International Pig Veterinary Society Congress, 2012. Jeju, Südkorea. 986-987.

Olsen C, Wang C, Christopher-Hennings J, Doolittle K, Harmon KM, Abate S, Kittawornrat A, Lizano S, Main R, Nelson EA. Probability of detecting Porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection using pen-based swine oral fluid specimens as a function of within-pen prevalence. *J Vet Diagn Invest* 2013; 25: 328-335.

Paradis MA, Gottschalk M, Rajic A, Ravel A, Wilson JB, Aramini J, McClure CA, Dick CP. Seroprevalence of *Lawsonia intracellularis* in different swine populations in 3 provinces in Canada. *Can Vet J* 2007; 48: 57-62.

Paster BJ, Dewhirst FE. Phylogenetic foundation of spirochetes. *J Mol Microbiol Biotechnol* 2000; 2: 341-344.

Pedersen KS, Holyoake P, Stege H, Nielsen JP. Diagnostic performance of different fecal *Lawsonia intracellularis*-specific polymerase chain reaction assays as diagnostic tests for proliferative enteropathy in pigs: a review. *J Vet Diagn Invest* 2010; 22: 487-494.

Pedersen KS, Skrubel R, Stege H, Angen Ø, Ståhl M, Hjulsager C, Larsen LE, Nielsen JP. Association between average daily gain, faecal dry matter content and concentration of *Lawsonia intracellularis* in faeces. *Acta Vet Scand* 2012a; 54: 58.

Pedersen KS, Ståhl M, Guedes RMC, Angen Ø, Nielsen JP, Jensen TK. Association between faecal load of *Lawsonia intracellularis* and pathological findings of proliferative enteropathy in pigs with diarrhoea. *BMC Vet Res* 2012b; 8: 198.

Pohlenz J, Whipp S, Robinson I. Zur Pathogenese der durch *Treponema hyodysenteriae* verursachten Dysenterie des Schweines. *Dtsch Tierärztl Wochenschr* 1983; 90: 363-367.

Pohlenz J. Die Infektion mit *Lawsonia intracellularis* beim Schwein - eine stets neue Herausforderung für Praxis und Forschung *Dtsch Tierärztl Wochenschr* 2005; 112: 163-173.

Prickett JR, Kim W, Simer R. Oral-fluid samples for surveillance of commercial growing pigs for porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus type 2 infections. *J Swine Health Prod* 2008; 16: 86-91.

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

Prim N, Pericas R, Español M, Rivera A, Mirelis B, Coll P. Bloodstream infection due to *Brachyspira pilosicoli* in a patient with multiorgan failure. *J Clin Microbiol* 2011; 49: 3697-3699.

Pusterla N, Gebhart C. Equine proliferative enteropathy caused by *Lawsonia intracellularis*. *Equine Vet Educ* 2009; 21: 415-419.

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

Råsbäck T, Fellström C, Gunnarsson A, Aspán A. Comparison of culture and biochemical tests with PCR for detection of *Brachyspira hyodysenteriae* and *Brachyspira pilosicoli*. *J Microbiol Methods* 2006; 66: 347-353.

Råsbäck T, Jansson DS, Johansson KE, Fellström C. A novel enteropathogenic, strongly haemolytic spirochaete isolated from pig and mallard, provisionally designated '*Brachyspira suanatina*' sp. nov. *Environ Microbiol* 2007; 9: 983-991.

Scholz A, Nuske S, Kremer P, Forster M. Costs of sub-clinical ileitis during finishing: an experimental approach. *Pig J* 2008; 61: 26-35.

Shivaprasad H, Duhamel G. Cecal spirochetosis caused by *Brachyspira pilosicoli* in commercial turkeys. *Avian Dis* 2005; 49: 609-613.

Smith JL. Colonic spirochetosis in animals and humans. *J Food Protect* 2005; 68: 1525-1534.

Song Y, Frey B, Hampson DJ. The use of ELISAs for monitoring exposure of pig herds to *Brachyspira hyodysenteriae*. *BMC Vet Res* 2012; 8: 6.

Stanton TB. Proposal to change the genus designation *Serpula* to *Serpulina* gen. nov. containing the species *Serpulina hyodysenteriae* comb. nov. and *Serpulina innocens* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 1992; 42: 189-190.

Stanton TB, Rosey EL, Kennedy MJ, Jensen NS, Bosworth BT. Isolation, oxygen sensitivity, and virulence of NADH oxidase mutants of the anaerobic spirochete *Brachyspira* (*Serpulina*) *hyodysenteriae*, etiologic agent of swine dysentery. *Appl Environ Microbiol* 1999; 65: 5028-5034.

Steghe H, Jensen TK, Møller K, Baekbo P, Jorsal S. Prevalence of intestinal pathogens in Danish finishing pig herds. *Prev Vet Med* 2000; 46: 279-292.

Takayama Y, Matsumori Y, Ogawa R. Eradication of *Brachyspira* spp. at a swine farm in Nagasaki, Japan with tiamulin and valnemulin in-feed medication. Proceedings, 22nd International Pig Veterinary Society Congress. 2012. Jeju, Südkorea. 628.

Taylor D, Alexander T. The production of dysentery in swine by feeding cultures containing a spirochaete. *Vet J* 1971; 127: 58-61.

Trivett-Moore NL, Gilbert GL, Law CL, Trott DJ, Hampson DJ. Isolation of *Serpulina pilosicoli* from rectal biopsy specimens showing evidence of intestinal spirochetosis. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 261-265.

Trott DJ, Huxtable CR, Hampson DJ. Experimental infection of newly weaned pigs with human and porcine strains of *Serpulina pilosicoli*. *Infect Immun* 1996a; 64: 4648-4654.

Trott DJ, Stanton TB, Jensen NS, Duhamel GE, Johnson JL, Hampson DJ. *Serpulina pilosicoli* sp. nov., the agent of porcine intestinal spirochetosis. *Int J Syst Evol Microbiol* 1996b; 46: 206-215.

Vannucci FA, Gebhart CJ. Recent advances in understanding the pathogenesis of *Lawsonia intracellularis* infections. *Vet Pathol* 2014; 51: 465-477.

Vannucci FA, Gebhart CJ, McOrist S. Proliferative Enteropathy. In: *Diseases of Swine*, 11th edn. Zimmerman J, Karriker L, Ramirez A, Schwartz K, Stevenson G, Zang J eds.: John Wiley & sons, Inc. 2019: 898-911.

Veterinärmedizinischer Informationsdienst für Arzneimittelanwendung, Toxikologie und Arzneimittelrecht. VETIDATA. 2020: <https://www.vetidata.de/>. accessed: 29.07.2020.

Waldmann K. Voraussetzungen und Maßnahmen zur Sanierung von Ferkelerzeugerbetrieben mit latenter Schweinedysenterie. *Tierärztl Prax Ausg G* 1992; 20: 159-163.

Waldmann K, Plonait H. Dysenterie. In: *Lehrbuch der Schweinekrankheiten*. Waldmann K, Wendt M eds.: Parey 2004: 350-355.

Warneke H. Methods for improving diagnostic techniques used for the identification and isolation of *Brachyspira* species from swine. 2017. Diss. med. vet. Iowa State University.

Webb W, Warneke H, Seate J, Jones R, Scheidt A, Gauger P, Harmon K, Burrough E. Comparison of oral fluids, environmental swabs, and pooled feces for detection of dysentery-associated *Brachyspira* spp. in pigs. 49th AASV Annual Meeting. 2018. San Diego, USA. 75-79.

Wendt M, Schulze Johann R, Verspohl J. Epidemiologische Untersuchungen zum Vorkommen von *Lawsonia-intracellularis*-Infektionen in Schweinebeständen. *Tierärztl Prax Ausg G* 2006; 34: 230-239.

Willems H, Reiner G. A multiplex real-time PCR for the simultaneous detection and quantitation of *Brachyspira hyodysenteriae*, *Brachyspira pilosicoli* and *Lawsonia intracellularis* in pig faeces. *Berl Münch Tierärztl Wochenschr* 2010; 123: 205-209.

X. ANHANG

Tabelle 30: Schematische Darstellung der Buchtenverteilung, Betrieb A (nicht maßstabsgetreu).

6	Mittelgang	7
5		8
4		9
3		10
2		11
1		12

Tabelle 31: Schematische Darstellung der Buchtenverteilung, Betrieb B (nicht maßstabsgetreu).

3	Mittelgang	4	9	Mittelgang	X
2		5	8		X
1		6	7		10

XI. DANKSAGUNG

An erster Stelle gilt mein besonderer Dank Professor Dr. Mathias Ritzmann für die Überlassung dieses aktuellen Themas, die tolle Betreuung und die Möglichkeit der Mitarbeit an der Klinik für Schweine.

Ebenfalls bedanke ich mich herzlich bei meinem Betreuer Dr. Matthias Eddicks für die fachliche Unterstützung, die inspirierenden Gespräche sowie Ratschläge für alle Lebenslagen.

Bei allen Mitarbeitern und Doktoranden der Klinik für Schweine, auch den bereits ausgeschiedenen, möchte ich mich ganz herzlich für das tolle Miteinander und die angenehme Arbeitsatmosphäre bedanken. Danke für eure Mithilfe bei der Probennahme, für die gemeinsamen Mittagspausenspaziergänge, die lustigen Ausfahrten und den ein oder anderen Scherz im Vorbeigehen, mit euch wurde es nie langweilig.

Liebe Steffi und Pauline, vielen Dank für das Lösen von diversen Excel-, Word- und Endnote-Mysterien, danke Marina, dass Du auch an Sonn- und Feiertagen jederzeit zu Hilfe geeilt bist.

Danke liebe Sarah, für die unzähligen gemeinsamen Stunden in unserem Büro, für die erheiternden fachlichen und nicht-fachlichen Geschichten und ganz besonders für die tägliche musikalische Aufmunterung, ohne Dich wären die letzten Monate viel langweiliger gewesen.

Beim Team der Schweineklinik der Justus Liebig Universität Gießen möchte ich mich ebenfalls herzlich für die hervorragende Kooperation und die Durchführung der Laboruntersuchungen bedanken. Insbesondere Herr Prof. Dr. Gerald Reiner, Herr Prof. Dr. Hermann Willems und Frau Dr. Sandra Becker standen mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite, vielen Dank!

Ein weiterer Dank gilt den Tierärzten, die mich auf der Suche nach Studienbetrieben unterstützt haben und natürlich den Landwirten, die mir Hoftor und Stalltüre geöffnet und somit diese Arbeit erst ermöglicht haben. Ein herzliches Vergelt's Gott!

Der größte Dank gilt meiner Familie, insbesondere meinen Eltern. Vielen Dank, dass ich immer auf eure bedingungslose Unterstützung zählen kann, danke für euer Vertrauen in mich und danke für den Weg, den ihr mir möglich gemacht habt.