

Christopher Heinrich Wilhelm Wöstmann

Ausscheidung von *Mycoplasma suis*
unter Feldbedingungen

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

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei dem Autoren dieses Werkes.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung der Autoren oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2022

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publisher.

1st Edition 2022

© 2022 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, 35396 GIESSEN, GERMANY
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

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

Ausscheidung von *Mycoplasma suis*
unter Feldbedingungen

von

Christopher Heinrich Wilhelm Wöstmann
aus Münster

München 2022

Aus dem Zentrum für Klinische Tiermedizin
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Krankheiten des Schweines

Arbeit angefertigt unter der Leitung von Univ.-Prof. Dr. Mathias Ritzmann

Mitbetreuung durch Dr. Julia Stadler

Gedruckt mit der 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: PD Dr. Wolfram Petzl

Tag der Promotion: 30. Juli 2022

Für Annabelle

Teile dieser Arbeit wurden bereits in folgender wissenschaftlicher Arbeit veröffentlicht:

Ade, J., Ritzmann, M., Wöstmann, C., Eddicks, M., Reese, S., Hoelzle, K., Hoelzle, L.E., Stadler, J., 2021. Update on shedding and transmission routes of porcine haemotrophic mycoplasmas in naturally and experimentally infected pigs. *Porcine Health Management*; 7, 49.

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung	1
II. Literaturübersicht	3
1. Hämotrophe Mycoplasmen	3
1.1. Taxonomie und Morphologie.....	3
1.2. Vorkommen und Bedeutung.....	4
2. Hämotrophe Mycoplasmen des Schweins.....	5
2.1. Epidemiologie	6
2.1.1. Verbreitung	7
2.1.2. Übertragung.....	8
2.2. Pathogenese und Immunologie	9
2.2.1. Adhäsion und Invasion.....	10
2.2.2. Auswirkung auf den Zellstoffwechsel	12
2.2.3. Eryptose.....	12
2.2.4. Schädigung des Endothels	13
2.2.5. Immunpathologie	14
2.3. Klinisches Bild und Pathologie	15
2.4. Diagnostik	17
2.4.1. Klinisch-pathologische Diagnostik.....	17
2.4.1.1. Hämatologische Veränderungen	17
2.4.1.2. Biologischer Nachweis	18
2.4.2. Bakteriologische Diagnostik.....	18
2.4.2.1. Serologischer Nachweis	19
2.4.2.2. Kultureller Nachweis	20
2.4.2.3. Mikroskopischer Nachweis	21
2.4.2.4. Molekularbiologischer Nachweis.....	21
2.5. Differentialdiagnosen	23

2.5.1. Anämie	23
2.5.2. Ikterus	24
2.5.3. Veränderungen der Haut.....	24
2.6. Therapie und Prophylaxe	25
III. Material und Methoden	27
1. Ziel der Untersuchung	27
2. Probenmaterial	28
3. Probenverarbeitung	30
3.1. Extraktion der <i>M. suis</i> -DNA.....	30
3.2. Quantitative real-time PCR.....	31
4. Statistische Auswertung.....	32
IV. Ergebnisse	33
1. Ergebnisse der Speicheluntersuchung	33
2. Ergebnisse der Urinuntersuchung.....	33
3. Ergebnisse der Plazentauntersuchung	33
4. Blutstatus der Ferkel.....	34
5. Ergebnisse der Zuchteber	35
5.1. Herkunft, Alter und Rasse	35
5.2. Ergebnisse der Blut- und Spermauntersuchung	36
6. Zusammenfassung der Ergebnisse	36
V. Diskussion.....	38
1. Abwesenheit von <i>M. suis</i>-DNA in Speichel und Urin	38
1.1. Erregerstamm KI3806	39
1.2. Splenektomie.....	40
2. <i>M. suis</i>-positive Plazentaprobe.....	41
2.1. Urogenitaltrakt-Spezifität bei anderen <i>Mycoplasma</i> spp. 41	
2.2. Strukturelle Unsicherheiten	43

2.2.1. Bearbeitung der Proben.....	43
2.2.2. Möglichkeit der Blutkontamination	44
3. <i>M. suis</i>-Status der Zuchteber	44
4. Schlussfolgerung.....	47
VI. Zusammenfassung.....	50
VII. Summary	52
Abbildungsverzeichnis.....	54
Tabellenverzeichnis.....	55
Literaturverzeichnis.....	56
Danksagung	77

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
1,3BPG	1,3-Bisphosphoglycerat
2PG	2-Phosphoglycerat
Å	Ångström
ABC	ATP-binding Casette
Aqua bidest.	Aqua bidestillata
ATP	Adenosin-Triphosphat
bp	Basenpaare
dL	Deziliter
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
Ethanol abs.	Ethanol absolut
EZ	Endothelzellen
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer
g	Gramm
GAP	Glycerinaldehyd-3-Phosphat
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GAPN	NADP-abhängige GAPDH
HA	Hämagglutinationshemmungstest
HM	hämotrophe Mycoplasmen
HspA1	heat shock protein A1
IAP	infectious anemia in pigs
IgG	Immunglobulin vom Typ G
IgM	Immunglobulin vom Typ M
IHA	indirekter Hämagglutinationstest
kbp	Kilo-Basenpaare
KBR	Komplementbindungsreaktion
KSP	klassische Schweinepest
L	Liter

LC	Light Cycler
LM	Lebendmasse
LMU	Ludwig-Maximilians-Universität
M	molar
mg	Milligramm
mL	Milliliter
mM/mmol	millimolar
MPS	Mononukleäres Phagozytosesystem
MΦ	Makrophage
μL	Mikroliter
μm	Mikrometer
NADP	Nikotinamidadenindinukleotid-Phosphat
nm	Nanometer
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEP	Phosphoenolpyruvat
PHE	porzine hämorrhagische Enteropathie
p.i.	post infectionem
PS	Phosphatidylserin
qPCR	quantitative Polymerase-Kettenreaktion
rDNA	ribosomale Desoxyribonukleinsäure
rpm	revolutions per minute
ssDNA	einzelsträngige Desoxyribonukleinsäure
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>

I. Einleitung

Bei *Mycoplasma (M.) suis* handelt es sich um ein relevantes Pathogen des Schweins aus der Gruppe der hämotrophen Mycoplasmen (HM). Der Erreger heftet sich im Blut der Tiere an die Oberfläche der roten Blutkörperchen und führt dadurch zu Deformationen und Schädigungen der Zellen (ZACHARY und BASGALL, 1985; MESSICK, 2004; HÖLZLE, 2008).

Eine Infektion mit *M. suis* verläuft in der Regel subklinisch. In Abhängigkeit von der Virulenz des Erregerstammes und der Empfänglichkeit der betroffenen Tiere kann es aber ebenso zur klinischen Manifestation der IAP (infectious anemia in pigs), ehemals bekannt als Eperythrozoonose, kommen. Diese tritt bei Tieren aller Altersstufen auf (HÖLZLE, 2008) und ist gekennzeichnet durch eine potenziell lebensbedrohliche hämolytische Anämie mit Fieber, Ikterus und Hypoglykämie (GWALTNEY, 1995; HÖLZLE, 2008; STADLER et al., 2014).

Zu wirtschaftlichen Einbußen (RITZMANN et al., 2009) kommt es allerdings vorrangig im Zusammenhang mit chronischen Krankheitsverläufen. Diese machen sich durch verringerte Wachstumsraten, allgemeine Krankheitsanfälligkeit für respiratorische und enterische Erkrankungen sowie verringerte Fruchtbarkeit der Zuchtsauen bemerkbar (MESSICK, 2004; STRAIT et al., 2012; HÖLZLE et al., 2014).

Lange Zeit wurde die Übertragung infizierter Erythrozyten im Rahmen von Rankämpfen, iatrogenen und zootecnischen Maßnahmen oder durch blutsaugende Parasiten als erforderlich für die Weitergabe der Infektion angesehen (PRULLAGE et al., 1993; HÖLZLE, 2008; ACOSTA et al., 2019). Allerdings konnte im Jahre 2014 von DIETZ et al. gezeigt werden, dass auch in Urin, Speichel, Nasen- und Vaginalsekret experimentell infizierter Tiere ein Nachweis von *M. suis*-DNA möglich ist.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Übertragbarkeit der experimentell gewonnenen Erkenntnisse von DIETZ et al. (2014) in die Praxis zu überprüfen und auf diese Weise auf ein besseres Verständnis der Epidemiologie der *M. suis*-Infektion – konkret der Übertragung und Übertragungswege des Erregers – hinzuwirken. Dies soll eine zielorientierte Erarbeitung von Hygiene- und Quarantänekonzepten ermöglichen, um die Ausbreitung von *M. suis* in Zukunft besser kontrollieren zu

können. Außerdem würde die routinemäßige Auffindbarkeit des Erregers in Se- und Exkreten der Tiere die Möglichkeit zu einer blutunabhängigen Diagnostik eröffnen. Auf diese Weise sollen wirtschaftliche Verluste reduziert, dem Tierwohl Vorschub geleistet und die Probengewinnung vereinfacht werden.

Darüber hinaus erfolgte eine Untersuchung des Spermas von Zuchtebern einer Besamungsstation in Süddeutschland auf *M. suis*. Diese sollte Aufschluss geben über die Möglichkeit einer venerischen Übertragbarkeit des Erregers und dementsprechend in gleicher Weise zu weiteren Erkenntnissen über die Epidemiologie von *M. suis* verhelfen.

Als Arbeitshypothesen fungierten folgende Annahmen:

1. Da eine Exkretion von *M. suis* im Speichel und im Harn experimentell infizierter Schweine auftreten kann, kann eine gleichartige Exkretion auch in Feldproben nachgewiesen werden.
2. Da eine vertikale Übertragung von *M. suis* auch von negativ getesteten Sauen auf ihre neugeborenen Ferkel wahrscheinlich erscheint und außerdem *M. suis* bereits in Vaginalabstrichen experimentell infizierter Schweine nachgewiesen werden konnte, kann *M. suis* auch in im Feld gewonnenen Nachgeburten nachgewiesen werden.
3. Ausgehend von einer hohen Prävalenz, sind wenigstens einzelne Eber einer Besamungsstation in Süddeutschland mit *M. suis* infiziert.
4. Da die Möglichkeit einer Exkretion von *M. suis* mit verschiedenen Se- und Exkreten bereits nachgewiesen wurde, kann *M. suis* im Sperma infizierter Eber nachgewiesen werden.

II. Literaturübersicht

1. Hämotrophe Mycoplasmen

1.1. Taxonomie und Morphologie

Hämotrophe Mycoplasmen sind kleine, pleomorphe, gramnegative Bakterien. Sie können stäbchen-, ring- oder kugelförmig vorliegen. Ihr Durchmesser beträgt etwa 0,3 bis 3 μm (MESSICK, 2004). Das Genom liegt als zirkuläre, doppelsträngige DNA im Umfang von 745 kbp (*M. suis*) bis 1245 kbp (*M. haemofelis*) vor (MESSICK et al., 2000; BERENT und MESSICK, 2003). Damit gehören sie zu den kleinsten zur Selbstreplikation fähigen Organismen. Sie sind von einer einzelnen Membran umgeben und verfügen weder über eine Zellwand noch über einen Zellkern (MESSICK, 2004; YANG et al., 2007). Allerdings finden sich im Zytoplasma kleine Granula sowie filamentöse Strukturen (MESSICK, 2004). Ein Teil der HM liegt frei im Blutplasma vor, während ein anderer Teil der Bakterien in flachen Mulden oder tiefen Einziehungen der Erythrozytenmembran mittels feiner Fibrillen einzeln oder in Ketten anhaftet (ZACHARY und BASGALL, 1985; MESSICK, 2004; YANG et al., 2007; HÖLZLE, 2008). Ein 15 bis 30 nm breiter Spalt ist dabei im Elektronenmikroskop zwischen Erreger und Erythrozyt erkennbar (ZACHARY und BASGALL, 1985; MESSICK, 2004).

Im Jahre 2001 schlugen NEIMARK et al. vor, die Bakterien *Haemobartonella felis*, *Haemobartonella muris*, *Eperythrozoon suis* und *Eperythrozoon wenyonii* der Gattung *Mycoplasma* in der Klasse der *Mollicutes* hinzuzufügen. Diese waren bis zu diesem Zeitpunkt in die Familie der *Anaplasmataceae* der Ordnung *Rickettsiales* eingeordnet (KREIER und RISTIC, 1984), wobei die Unterscheidung zwischen Haemobartonellen und Eperythrozoen vor allem anhand des bei den Eperythrozoen höheren Anteils frei im Blutplasma vorliegender Erreger getroffen wurde (YANG et al., 2007). Phylogenetische Untersuchungen mittels molekularbiologischer Sequenzierung der 16S rDNA konnten allerdings zeigen, dass *Haemobartonella* spp. und *Eperythrozoon* spp. näher mit *Mycoplasma* spp. als mit *Anaplasma marginale* verwandt sind (NEIMARK und KOCAN, 1997; RIKIHISA et al., 1997).

Diese phylogenetische Analyse konnte darüber hinaus zu einem späteren Zeitpunkt mittels einer Betrachtung der RNase P DNA gestützt werden (PETERS et al., 2008).

Aufgrund dieser Erkenntnisse sowie aufgrund der phänotypischen Eigenschaften hinsichtlich geringer Größe, der Abwesenheit von Zellwand und Flagellen, der Resistenz gegenüber Penicillin nebst Empfindlichkeit gegenüber Tetrazyklinen sowie Parasitismus der Erythrozyten (MESSICK, 2004) wurden die Gattungen *Haemobartonella* und *Eperythrozoon* entsprechend dem Vorschlag von NEIMARK et al. (2001) reklassifiziert. In der Gattung *Mycoplasma* bilden sie innerhalb der „*Mycoplasma pneumoniae* Gruppe“ nun die Gruppe der hämotrophen Mycoplasmen, auch als „Hämoplasmen“ bezeichnet (NEIMARK et al., 2001; MESSICK et al., 2002; NEIMARK et al., 2002; TASKER et al., 2003; MESSICK, 2004).

Dennoch bleibt die taxonomische Position der HM Gegenstand anhaltender Diskussionen (UILENBERG et al., 2004), weshalb beispielsweise die aktuelle Auflage des „Bergey's Manual of Systematic Bacteriology“ sie innerhalb der Familie der Mycoplasmatales als *incertae sedis* einstuft (HÖLZLE et al., 2014).

1.2. Vorkommen und Bedeutung

Hämotrophe Mycoplasmen kommen weltweit bei einer Vielzahl von Wirbeltieren vor. Dazu zählen Katzen, Hunde, Ratten, Schweine, Rinder, Lamas, Opossums und Rentiere sowie nicht zuletzt der Mensch (MESSICK, 2004; STOFFREGEN et al., 2006; STEER et al., 2011).

Mycoplasmen besitzen eine hohe Wirtsspezifität (KREIER und RISTIC, 1984). Ob sie dennoch über ein zoonotisches Potenzial verfügen, ist Gegenstand derzeitiger Forschung: So beschrieben PITCHER und NICHOLAS bereits 2005 verschiedene Formen der speziesüberschreitenden Übertragung von Mycoplasmen.

Es liegen weiterhin Studien chinesischer Autoren vor, die sich mit der Verbreitung von tierspezifischen HM in der chinesischen Bevölkerung beschäftigen (YANG et al., 2000; WU et al., 2006; HU et al., 2009; ZHUANG et al., 2010; HUANG et al., 2012). Da der Nachweis der Mycoplasmen bei diesen allerdings vielfach mittels

mikroskopischer Untersuchung erfolgt, die sich durch mäßige Sensitivität und Spezifität auszeichnet (HEINRITZI, 1990b; HÖLZLE et al., 2007b), hat die Interpretation dieser Ergebnisse mit Vorsicht zu erfolgen.

Aber auch mittels der Sequenzierung von 16S rDNA und außerhalb Chinas konnten bereits bei disponierten (sowie in geringem Umfang auch bei nicht-disponierten) Personengruppen tierspezifische Mycoplasmen nachgewiesen werden (DOS SANTOS et al., 2008; YUAN et al., 2009; MAGGI et al., 2013).

Infektionen mit HM können bei den betroffenen Individuen zu lebensbedrohlicher akuter hämolytischer Anämie oder zu chronischer Anämie und Immunsuppression führen (MESSICK, 2004). Solche anämischen Zustände finden sich vor allem bei Schweinen und Katzen (HÖLZLE, 2007). Dementsprechend gewinnen hämotrophe Mycoplasmen auch in der Kleintierpraxis zunehmend an Bedeutung (MESSICK, 2003; WILLI et al., 2005; HÖLZLE, 2007).

2. Hämotrophe Mycoplasmen des Schweins

Im Jahre 1932 beobachteten KINSLEY und DOYLE erstmals unabhängig voneinander im Blut von an Ikteroanämie erkrankten Schweinen Anaplasmen- bzw. Rickettsien-ähnliche Körperchen, die den Erythrozyten anhafteten.

Erst 1950 gelang es SPLITTER, im Tierversuch mittels Inokulation die Ursächlichkeit dieser Anaplasmen-ähnlichen Erreger für die Erkrankung der Tiere nachzuweisen. Für diese wurde daraufhin aufgrund morphologischer Ähnlichkeit zu den bereits bekannten Blutzellen-parasitierenden Erregern der Rinder und Schafe *Eperythrozoon wenyonii* und *Eperythrozoon ovis* die Bezeichnung „*Eperythrozoon suis*“ gewählt (ADLER und ELLENBOGEN, 1934; NEITZ et al., 1934; SPLITTER, 1950b). Später erfolgte die Umbenennung in *Mycoplasma suis* (siehe II.1.1. Taxonomie und Morphologie).

M. suis erreicht eine Länge von bis zu 600 nm und einen Durchmesser von 375 bis 500 nm (POSPISCHIL und HOFFMANN, 1982). Das Genom umfasst 745 kbp (MESSICK et al., 2000). Elektronenmikroskopisch lassen sich unreife kokkoide Formen von juvenilen diskoiden und reifen ringförmigen Formen unterscheiden. Zum

Zeitpunkt des akuten Krankheitsgeschehens lassen sich auch unterschiedliche Formen nebeneinander im Blut nachweisen (ZACHARY und BASGALL, 1985; LIEBICH und HEINRITZI, 1992).

SPLITTER (1950a) wurde bei seinen ätiologischen Untersuchungen überdies auf einen kleineren, wenig pathogenen, artverwandten Erreger aufmerksam, den er aufgrund der geringeren Größe als „*Eperythrozoon parvum*“, heute *Mycoplasma parvum*, bezeichnete. *M. parvum* ist ein kokkoider bis stäbchenförmiger Organismus mit einer Größe von 200 bis 500 nm. Sein Genom umfasst 564 395 bp. Dieses ist somit das kleinste beschriebene Genom in der Klasse der *Mollicutes* (DO NASCIMENTO et al., 2013; DO NASCIMENTO et al., 2014).

Im Jahre 2017 stieß ein chinesisches Forscherteam bei Untersuchungen der Prävalenz hämotropher Mycoplasmen in Schweinebeständen in der Region Zhejiang auf einen weiteren, bis dato unbekanntem Erreger, den sie bei gut einem Viertel der beprobten Tiere nachweisen konnten und der in der Folge als „*Candidatus Mycoplasma haemosuis*“ bezeichnet wurde. Die phylogenetische Untersuchung der 16S rRNA legte dabei eine enge Verwandtschaft zu dem aus Katzen isolierten Erreger *Candidatus M. turicensis* nahe (WILLI et al., 2005; WILLI et al., 2006; FU et al., 2017).

2.1. Epidemiologie

Ein akuter Anfall der Infektiösen Anämie der Schweine (IAP) tritt vorrangig bei Ferkeln und Mastschweinen sowie bei trächtigen Sauen auf. Ein Großteil der Infektionen verläuft jedoch subklinisch, was möglicherweise mit dem verbreiteten Einsatz unspezifischer Futtermedikation in Zusammenhang steht (HÖLZLE, 2008). Außerdem wird die Bedeutung der individuellen Empfänglichkeit für Mycoplasmen-Infektionen sowie ein entscheidender Beitrag der Immunreaktion zur Ausbildung chronischer Infektionen diskutiert (HÖLZLE, 2008). Solche subklinisch infizierten Tiere bleiben zeitlebens Träger der Infektion und spielen eine bedeutsame Rolle in der Epidemiologie der Erkrankung (HÖLZLE et al., 2011).

Über Morbidität, Mortalität und Letalität ist insgesamt wenig bekannt. Für Ferkel wird für den Fall eines akuten Verlaufs eine Morbidität von 15,0 bis 30,0% angenommen, bei einer Letalität von 5,0 bis 24,0% (HÖLZLE, 2007). SPLITTER beschrieb

im Jahre 1951 eine Morbidität von 1,0 bis 10,0% bei vergleichsweise hoher Mortalität. Dagegen nennt THACKER (2006) Morbiditätsraten im Bereich von 10,0 bis 60,0% und eine Mortalität von bis zu 90,0%.

2.1.1. Verbreitung

SPLITTER vermutete bereits im Jahre 1950, dass eine Infektion mit *M. suis* aufgrund der unterschiedlichen Schweregrade der Erkrankung nicht so oft diagnostiziert würde, wie sie tatsächlich vorkomme.

M. suis-Infektionen treten weltweit in der Schweinepopulation auf. Beschrieben sind sie in Nord- und Südamerika, Afrika, Asien und Europa. Schon 1980 konnten SISK et al. im Rahmen einer Studie an 2417 Sauen aus Schweinebeständen in Georgia, USA mittels indirektem Hämagglutinationstest (IHA) bei 16,0% der Tiere eine Infektion mit *M. suis* nachweisen. Dabei stellte sich bei 88,0% der insgesamt 99 untersuchten Betriebe jeweils mindestens ein Tier seropositiv dar. Im Jahre 2007 führten GUIMARAES et al. in Brasilien erstmals eine Prävalenzerhebung mittels PCR-Untersuchung durch. Dabei wurde in 24 von 186 Tieren (12,9%) *M. suis*-DNA detektiert. Von 121 Sauen erwiesen sich 22 Tiere (18,2%) als seropositiv, während bei einem von vier Ebern (25%) und bei einem von 61 Ferkeln (1,6%) *M. suis*-DNA nachweisbar war. In Asien liegen für China mittels ELISA erhobene Einzeltierprävalenzzahlen von rund 32,0% bis 33,0% vor. Dabei stellen die Zuchtsauen die Tiergruppe mit der höchsten Prävalenz von ca. 80,0% dar (SONG et al., 2014; ZHONGYANG et al., 2017). YUAN et al. ermittelten 2009 in Shanghai mittels konventioneller PCR sogar eine Seroprävalenz über alle Altersgruppen von 86,0%. Für Japan und Südkorea wurden dagegen lediglich Prävalenzen von 5,0% (WATANABE et al., 2012) respektive 0,2% der Tiere (SEO et al., 2019) ermittelt.

In den 1980er Jahren konnte mittels serologischer Untersuchungen für Deutschland eine Prävalenz von 13,4% bei Mastschweinen bzw. eine Betriebsprävalenz von 43,7% ermittelt werden (HÖLZLE et al., 2011). Im Jahre 2008 führte GRIMM erstmals eine PCR-gestützte Statuserhebung für das gesamte Bundesgebiet durch und gelangte dabei zu ähnlichen Ergebnissen. Für diese Studie wurden 1176 Blutproben von Tieren aus 196 Betrieben in 8 Bundesländern u.a. mittels

qPCR untersucht. Dabei wurde in 164 (13,9%) Proben *M. suis*-DNA nachgewiesen, wobei die Spannweite von 10,5% (12/114) in Sachsen-Anhalt bis 20,0% (36/180) in Bayern reichte. Auf 80 von 196 untersuchten Betrieben (40,8%) wurde *M. suis* nachgewiesen. Hierbei reichte die Spannweite von 33,3% (9/27) in Sachsen bis 48,0% (12/25) in Niedersachsen. Die prozentuale Verteilung positiv auf *M. suis* getesteter Tiere innerhalb der betroffenen Betriebe unterschied sich zwischen den Bundesländern ebenfalls deutlich und rangierte zwischen 25,0% in Sachsen-Anhalt und 46,2% in Bayern.

Die derzeit jüngsten Zahlen zur Verbreitung von *M. suis* in Bayern stammen von STADLER et al. aus dem Jahre 2019. Hierbei wurden Blutproben von 474 neonatalen Ferkeln sowie 208 Sauen aus 21 bayerischen Betrieben mittels qPCR auf *M. suis* untersucht. Dabei wurden 68 (14,4%) Ferkel und 65 (31,3%) Sauen positiv getestet. Der prozentuale Anteil betroffener Betriebe lag bei 76,2% (16/21).

Im Jahre 2010 wurde von HÖLZLE et al. erstmals *M. suis* bei Wildschweinen nachgewiesen. Bei 36 von 359 Tieren (10,0%) aus Süddeutschland konnte der Erreger mittels quantitativer real-time PCR identifiziert werden. Später konnten außerdem bei Wildtieren aus Ungarn und Brasilien HM dargestellt werden. Dabei zeigten sich Prävalenzzahlen von 50,0% (7/14) für die brasilianischen bzw. 47,1% (8/17) für die ungarischen Tiere (HORNOK et al., 2018; DIAS et al., 2019).

2.1.2. Übertragung

Experimentell ist eine Übertragung von HM über subkutane, intravenöse, intra-peritoneale und orale Inokulation von infiziertem Blut möglich (HÖLZLE, 2008). Dies legt nahe, dass es im Zusammenhang mit iatrogenen und zotechnischen Maßnahmen sowie im Rahmen von Rankämpfen zu einer Übertragung mittels Bluttransfer kommen kann (HÖLZLE, 2008; DIETZ et al., 2014).

Darüber hinaus konnte im Tierversuch eine Übertragbarkeit durch die gemeine Stechfliege *Stomoxys calcitrans* und die ägyptische Tigermücke *Aedes aegypti* nachgewiesen werden (PRULLAGE et al., 1993). 2019 wurde zudem erstmals der Nachweis von *M. suis* in der Schweinelaus *Haematopinus suis*, einem der verbreitetsten Ektoparasiten des Schweins, beschrieben (ACOSTA et al., 2019).

Weiterhin konnte infolge experimenteller Infektion beim Schwein innerhalb von sechs Tagen p.i. eine Ausscheidung von *M. suis* mit dem Speichel, dem Nasen- und Vaginalsekret sowie im Harn nachgewiesen werden. Dementsprechend kann die Möglichkeit einer blutunabhängigen Erregerübertragung als gegeben angesehen werden (DIETZ et al., 2014). Ob eine solche in gleicher Weise unter Feldbedingungen auftritt, ist Gegenstand der vorliegenden Untersuchung.

Persistent subklinisch infizierte Tiere stellen ein Erregerreservoir dar und verkörpern somit ein Vehikel sowohl zur inner- als auch zur zwischenbetrieblichen Übertragung (HÖLZLE, 2008).

Die Möglichkeit der intrauterinen Übertragung wurde erstmals 1954 von BERRIER und GOUGE angeführt. 1975 beschrieben CLAXTON und KUNESH, dass im Blut von allen 13 Ferkeln, die von einer *M. suis*-positiven Sau stammten und per Kaiserschnitt entwickelt worden waren, HM nachweisbar waren. 1977 wurde das Auftreten anämischer und lebensschwacher Ferkel unter Praxisbedingungen beschrieben und die intrauterine Übertragung als wahrscheinliche Ursache diskutiert (HENDERSON et al., 1997).

Vor Kurzem untersuchten STADLER et al. (2019) 474 neonatale Ferkel von 208 Sauen noch vor der Kolostrumaufnahme mittels qPCR auf das Vorkommen von *M. suis*. Dabei konnte bei 68 Ferkeln (14,4%) *M. suis*-DNA mit einer Erregerlast in einer Größenordnung von 1,02 *M. suis*/mL Blut bis $3,46 \times 10^9$ *M. suis*/mL Blut (im Mittel $5,09 \times 10^7$ *M. suis*/mL Blut) nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse deuten ebenfalls auf eine vertikale Transmission hin.

2.2. Pathogenese und Immunologie

Das Kardinalsymptom der IAP ist die Anämie. Dass diese gleichermaßen bei immenser wie auch bei minimaler Erregerlast auftritt (ZACHARY und BASGALL, 1985), lässt ahnen, dass es unterschiedliche Mechanismen geben muss, die eine Zerstörung der Erythrozyten verursachen.

Grundsätzlich kann dabei eine direkte Schädigung der Blutzellen durch den Erreger selbst (infolge von Adhäsion und Invasion) von einer indirekten, immunmedierten Schädigung unterschieden werden, bei der die Zerstörung der Erythrozyten auf Autoantikörper zurückzuführen ist (HÖLZLE et al., 2014).

2.2.1. Adhäsion und Invasion

Die Adhäsion an die Wirtszelle stellt ein wesentliches Charakteristikum der HM dar. Die elektronenmikroskopische Betrachtung lässt dabei erkennen, dass die Erreger einen ca. 30 nm breiten Spalt zu den Blutzellen mittels feiner, fibrillärer Strukturen überbrücken (ZACHARY und BASGALL, 1985). Durch diese Interaktion kommt es an der Zellmembran der Wirtszellen zu Deformationen und daraus resultierend zur Zellschädigung u.a. aufgrund veränderter osmotischer Verhältnisse (HEINRITZI und PLANK, 1992; GUIMARAES et al., 2011a; HÖLZLE et al., 2014). Dass avirulente Mutanten zur Adhäsion nicht fähig sind, zeigt auch, dass es sich bei der Adhäsion um ein wichtiges Pathogenitätsmerkmal handelt (ROTTEM, 2003).

Die molekularen Mechanismen der Erreger-Erythrozyt-Interaktion sind bislang nicht vollständig geklärt. Allerdings ist für die beiden Proteine MSG1 und α -Enolase bekannt, dass sie als sog. „Moonlighting“-Proteine neben ihrer Funktion als enzymatische Katalysatoren im Kohlenhydratstoffwechsel außerdem am Adhäsionsprozess beteiligt sind (HÖLZLE et al., 2014).

Als erstes Adhäsins für *M. suis* konnte im Jahre 2007 MSG1 identifiziert werden. Bei diesem handelt es sich ursprünglich um eine Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH), welche im Rahmen der Glykolyse die Umwandlung von Glycerinaldehyd-3-Phosphat (GAP) zu 1,3-Bisphosphoglycerat (1,3BPG) katalysiert (HÖLZLE et al., 2007d). Dagegen katalysiert α -Enolase zunächst die Umbildung von 2-Phosphoglycerat (2PG) zu Phosphoenolpyruvat (PEP) (SCHREINER et al., 2012b). Aufgrund der Einbindung beider Enzyme in den Kohlenhydratstoffwechsel ist ein Zusammenhang mit der Ausbildung hochgradiger Hypoglykämie während eines akuten Anfalls der IAP denkbar (HÖLZLE et al., 2007d).

Zahlreiche Vertreter der Gattung *Mycoplasma* sind mit Adhäsionskomplexen und apikalen Organellen ausgestattet (MESSICK, 2004; BURGOS et al., 2006; CHAUDHRY et al., 2007). Solche konnten bei *M. suis* bislang allerdings nicht beobachtet werden (ZACHARY und BASGALL, 1985; HÖLZLE et al., 2014).

Untersuchungen des Genoms von *M. suis* haben weitere potenziell an der Zell-Adhäsion beteiligte Proteine identifizieren können: Dabei handelt es sich um das „Heat-shock“-Protein HspA1 (HÖLZLE et al., 2007c), zwei MgpA-orthologe Proteine, eine NADP-abhängige GAPDH (GAPN) und ein P97-ähnliches Protein (GUIMARAES et al., 2011a; OEHLERKING et al., 2011; FELDER et al., 2012; GUIMARAES

et al., 2014). Für eine Beteiligung von HspA1 an der Zelladhäsion spricht, dass es stark immunogen und oberflächenständig ist und während eines akuten Anfalls exprimiert wird. Außerdem hat das ähnliche Protein DnaK bei *M. pneumoniae* die Funktion eines Adhäsionsfaktors (LAYH-SCHMITT et al., 2000; HÖLZLE et al., 2007c; FELDER et al., 2012). Bei den MgpA-orthologen Proteinen ist eine solche Beteiligung hingegen unsicherer. MgpA ist eine Phosphoesterase, die in *M. genitalium* zusammen mit MgpB und MgpC an der Bildung der apikalen Organelle und somit an der Anheftung an die Wirtszelle beteiligt ist (HU et al., 1987; BURGOS et al., 2006; MA et al., 2010; HÖLZLE et al., 2014). Zwar verfügt *M. suis* nicht über apikale Organellen, dennoch wird eines der MgpA-orthologen Proteine während der akuten Phase der Infektion exprimiert (FELDER et al., 2012). GAPN hat eine ähnliche Funktion wie MSG1 und ist im Zellstoffwechsel für die Bildung von NADPH verantwortlich. Es wirkt stark immunogen und wird während der akuten Phase der Infektion exprimiert. Seine Bedeutung für die Zell-Adhäsion ist jedoch nicht geklärt (FELDER et al., 2012; GUIMARAES et al., 2014; HÖLZLE et al., 2014). Bei P97 handelt es sich um ein Protein, das die Anheftung von *M. hyopneumoniae* an das respiratorische Epithel ermöglicht. Allerdings kommt es bei *M. suis* während eines akuten Anfalls nicht zu einer Expression von P97-ähnlichem Protein (HSU und MINION, 1998; OEHLERKING et al., 2011; FELDER et al., 2012; HÖLZLE et al., 2014).

Im Jahre 2009 konnten GROEBEL et al. am Beispiel des *M. suis*-Stamms KI3806 zeigen, dass es mitunter auch zum Eindringen von HM in die Wirtszelle kommen kann. Dies wird mit dem Vorgang der Beschädigung und Zerstörung der Zellen in Verbindung gebracht (HÖLZLE et al., 2014). Hierbei werden die Erreger ausgehend von tiefen Invaginationen der Erythrozytenmembran (ZACHARY und BASGALL, 1985) über Endozytose-ähnliche Vorgänge in die Blutzelle aufgenommen (GROEBEL et al., 2009). Die Lokalisation im Zellinneren geht für den Erreger mit einem verbesserten Schutz vor dem Immunsystem des Wirts sowie vor antibiotischer Behandlung einher (ROTTEM, 2003).

2.2.2. Auswirkung auf den Zellstoffwechsel

Die Sequenzierung des Genoms von *M. suis* hat gezeigt, dass dem bakteriellen Metabolismus verschiedene Stoffwechselwege fehlen bzw. diese nur unvollständig ausgebildet sind. Dies lässt darauf schließen, dass Biomoleküle wie zum Beispiel Glukose, Inosin, Hypoxanthin, Aminosäuren, Ribose und NADH/NADPH nicht eigenständig gebildet, sondern vom Wirt bezogen werden (GUIMARAES et al., 2011a; OEHLERKING et al., 2011).

M. suis generiert ATP im Wege der Glykolyse (OEHLERKING et al., 2011). Durch den Entzug von Glukose mittels des Phosphotransferase-Systems (DIETZ et al., 2016) kommt es somit im Verlauf der Infektion teilweise zu einer erheblichen Hypoglykämie (PETERANDERL, 1988; HEINRITZI et al., 1990; SMITH et al., 1990; STADLER et al., 2014). Die resultierende reduzierte Nährstoffversorgung der Erythrozyten könnte eine Ursache für verringerte Energieproduktion, oxidativen Stress und eine verkürzte Lebensspanne der Zellen sein (FELDER et al., 2011; HÖLZLE et al., 2014). Weiterhin konnten bei Genom- und Proteomanalysen ABC-Transporter (ATP-Binding Casette Transporter) für verschiedene Biomoleküle nachgewiesen werden (GUIMARAES et al., 2011a; OEHLERKING et al., 2011; FELDER et al., 2012; DIETZ et al., 2016).

Auch das Eindringen in die Wirtszelle könnte für den Nährstoffentzug von Bedeutung sein (GROEBEL et al., 2009; HÖLZLE et al., 2014).

2.2.3. Eryptose

Die Eryptose gleicht als programmierter Zelltod der Erythrozyten der Apoptose in kernhaltigen Zellen. Sie ist gekennzeichnet durch Zellschrumpfung, *Blebbing*, die Aktivierung von Proteasen, *Scrambling* der Zellmembranphospholipide und die Exposition von Phosphatidylserin (PS) auf der Zelloberfläche der Erythrozyten, die letztlich zur Erkennung, zur Aufnahme und zum Abbau durch Makrophagen (MΦ) führt (LANG et al., 2005; LANG et al., 2006; LANG et al., 2012).

FELDER et al. beschrieben im Jahre 2011 die Induktion der Eryptose durch *M. suis* im splenektomierten Schweinemodell als weiteren Pathogenitätsmechanismus hämotropher Mycoplasmen.

Man geht davon aus, dass Konformationsänderungen in der Membran und im Zytoskelett der Erythrozyten infolge von Adhäsion bzw. Invasion der HM (ZACHARY und BASGALL, 1985; GROEBEL et al., 2009) die Eryptose auslösen (FELDER et al., 2011; HÖLZLE et al., 2014). Gleichermaßen verursacht die Anheftung von *M. suis* an die Erythrozyten oxidativen Stress (HÖLZLE et al., 2014). Dieser ist neben u.a. einem hyperosmotischen Schock, erhöhter zytosolischer Kalziumaktivität, Hyperthermie, Energiemangel und diversen Xenobiotika ein Auslöser der Eryptose (LANG et al., 2012; LANG et al., 2014).

Welche Mechanismen genau die Eryptose auslösen, ist bislang nicht bekannt. Allerdings konnten FELDER et al. (2011) eine negative Korrelation von Eryptose und dem Schweregrad der Anämie nachweisen. Es ist also vorstellbar, dass eine vermehrte Eryptose einer ausufernden Proliferation der HM in Verbindung mit einer resultierenden Verschärfung der Bakteriämie entgegenwirkt (HÖLZLE et al., 2014).

2.2.4. Schädigung des Endothels

Im Jahre 2013 beschrieben SOKOLI et al. die Interaktion von *M. suis* mit Zellen der Gefäßendothelien (EZ) als weiteren Pathogenitätsmechanismus von *M. suis*. Derartige Interaktion scheint ein Auslöser zu sein für die teils hochgradigen Veränderungen sowie die flächenhafte Ablösung der Endothelien während einer *M. suis*-Infektion (SOKOLI et al., 2013). Dabei binden die Erreger an das zytoskelettale Protein Aktin. Auf diese Weise wird eine Kondensation des Aktins ausgelöst, wodurch es zu einer Umlagerung innerhalb des Zytoskeletts kommt. Eine vermehrte Ausbildung von Mikrovilli sowie eine Aktivierung der EZ sind die Folge. Die Erreger lagern sich dem Endothel einzeln oder biofilmartig als Kolonie an (SOKOLI et al., 2013). Weiterhin konnte eine vermehrte Adhäsion von Erythrozyten an die Gefäßwände festgestellt werden (SOKOLI et al., 2013). Dabei mag auch die Induktion der Eryptose eine Rolle spielen, da die Expression von membranständigem PS eine Anheftung an das Gefäßendothel fördert (LANG und QADRI, 2012; SOKOLI et al., 2013).

Gleichzeitig kommt es zu der für die IAP typischen disseminierten intravasalen Gerinnung. In unmittelbarer Nähe der veränderten EZ findet man dem Endothel

anhaftende Mikrothromben, bestehend aus Leukozyten, Erythrozyten, Thrombozyten und Fibrinfasern, die Zirkulationsstörungen mit lokaler Hypoxie sowie daraus folgende Zyanosen und Funktionsstörungen an verschiedenen Organen verursachen können (PLANK und HEINRITZI, 1990; SOKOLI et al., 2013).

Durch die Adhäsion an das Endothel entgeht *M. suis* einer Filtration in der Milz. Auch ein besserer Schutz vor antimikrobieller Therapie könnte gegeben sein (SOKOLI et al., 2013; HÖLZLE et al., 2014).

2.2.5. Immunpathologie

Einen bedeutenden Pathogenitätsmechanismus von *M. suis* stellt die indirekte Zellschädigung im Wege der Induktion autoimmun wirksamer Antikörper dar. Gegen Zellstrukturen der Erythrozyten gerichtete IgG und IgM führen zu intra- und extravasaler Hämolyse (HÖLZLE et al., 2014).

Es konnte gezeigt werden, dass in der akuten Phase der Infektion, im Stadium der maximalen Bakteriämie, bis zu 95,0% Immunglobuline vom Typ G vorliegen (HÖLZLE et al., 2006). Da diese vor allem bei Temperaturen um die 37°C an die Blutzellen binden, werden sie auch als Wärmeagglutinine bezeichnet (PACKMAN, 2008). FELDER et al. (2010) wiesen nach, dass die Wärmeagglutinine zum großen Teil an zytoskelettales α - und β -Aktin der Erythrozyten binden. Auf diese Weise opsonierte Zellen werden anschließend (hauptsächlich in der Milz) vom mononukleären Phagozytosesystem (MPS) erkannt und aus dem Blut entfernt. Dadurch kommt es zu Anämie und Bilirubinämie (HÖLZLE et al., 2006; FELDER et al., 2010; HÖLZLE et al., 2014).

Immunglobuline vom Typ M liegen dagegen vorrangig während der chronischen Phase der Infektion vor (JÜNGLING et al., 1994; HÖLZLE et al., 2014). Anders als IgG agglutinieren sie vor allem bei Temperaturen unter 25°C (ZACHARY und BASGALL, 1985), weshalb sie im Bereich der kühleren Akren die Bildung von Zellaggregaten auslösen. Sie verursachen in der Folge Durchblutungsstörungen mit daraus resultierenden Zyanosen und Nekrosen (SCHMIDT et al., 1992; JÜNGLING et al., 1994; HÖLZLE et al., 2006; HÖLZLE et al., 2014). Der IgM-Spiegel beginnt 5 bis 7 Tage nach einem akuten Anfall anzusteigen (HÖLZLE, 2008). Die Antikörper sind in diesem Fall gegen Kohlenwasserstoff-Antigene auf der Oberfläche der Erythrozyten

gerichtet (HÖLZLE et al., 2006). Darüber hinaus wird vermutet, dass Kälteagglutinine eine supprimierende Wirkung auf die Proliferation von T-Lymphozyten ausüben, die mit einer erhöhten Infektanfälligkeit erkrankter Tiere einhergeht (ZACHARY und SMITH, 1985; HÖLZLE, 2008). Des Weiteren kommt es durch die Aktivität von IgM wahrscheinlich zu einer Aktivierung des Komplementsystems, wodurch in der Spätphase der Erkrankung eine Hämolyse ausgelöst wird (FELDER et al., 2010; HÖLZLE et al., 2014).

Mehrere Gründe für die Entwicklung der Autoaggression des Immunsystems werden gegenwärtig diskutiert (FELDER et al., 2010): Möglicherweise könnte die Infektion mit *M. suis* zu einer Anregung der klonalen Proliferation von B-Lymphozyten führen (ZACHARY und SMITH, 1985; FELDER et al., 2010). Weiterhin könnte es durch die Interaktion der Erythrozyten mit den HM zu einer Freilegung des normalerweise verborgenen α - und β -Aktins respektive zu einer Modifikation membranständiger Kohlenwasserstoff-Strukturen kommen (HÖLZLE et al., 2006; FELDER et al., 2010). Letztlich wäre auch denkbar, dass die HM sich zum Zweck der Immun-evasion einer molekularen Mimikry (ALBERT und INMAN, 1999) bedienen. Unabhängig davon scheint eine Kreuzreaktivität von porzinem Aktin und dem mycoplasmaalen Adhäsionsprotein MSG1 zu bestehen (FELDER et al., 2010).

2.3. Klinisches Bild und Pathologie

Bei der infektiösen Anämie der Schweine handelt es sich um eine häufig subklinisch verlaufende Erkrankung. Ein akuter Verlauf tritt vorrangig bei Ferkeln und Mastschweinen sowie bei trächtigen Sauen auf (HÖLZLE, 2008). Er geht mit hochgradiger Bakteriämie und daraus resultierender schwerer, teilweise tödlich verlaufender hämolytischer Anämie einher (THACKER, 2006; HÖLZLE, 2008). Ein akuter Anfall tritt meistens infolge besonderer Belastung wie zootechnischer Maßnahmen, Absetzen, Umstallung oder auftretenden Koinfektionen auf (HEINRITZI, 1989).

Krankheitsverlauf und Inkubationszeit variieren stark in Abhängigkeit von der Virulenz des jeweiligen Erregers, der Empfänglichkeit des Einzeltiers und der Infektionsdosis (HÖLZLE, 2008; STADLER et al., 2014). Im Feld infizierte Tiere können mitunter erst nach mehreren Monaten Symptome zeigen (HÖLZLE, 2008).

Infizierte Saugferkel entwickeln Blässe sowie teilweise Ikterus (PRESTON und GREVE, 1965; HENDERSON et al., 1997). Sie zeichnen sich durch schlechte Gewichtszunahme und eine generelle Krankheitsanfälligkeit aus (HEINRITZI, 1989; PEREYRA et al., 2006; HÖLZLE, 2008). Weiterhin zeigen die Tiere eine allgemeine Lebensschwäche, bedingt durch schwere Azidose und Hypoglykämie (HEINRITZI et al., 1990; HENDERSON et al., 1997). Bei einzelnen Ferkeln können darüber hinaus Tachypnoe und Tachykardie auftreten (HENDERSON et al., 1997).

Absetzferkel und Mastschweine zeigen Ikterooanämie mit Blässe, Inappetenz und Fieber bis 42°C (SPLITTER, 1951). Auch diese Altersgruppe ist von Azidose und Hypoglykämie mit Werten unter 10 mg/dL (PETERANDERL, 1988) betroffen, die unbehandelt innerhalb von ein bis fünf Tagen (GWALTNEY, 1995) auf einen komatösen Status mit Todesfolge hinauslaufen können (HÖLZLE, 2008). Außerdem können sich subkutane Ödeme, Nekrosen der Extremitäten (vor allem der Ohren) oder eine hämorrhagische Diathese entwickeln (GWALTNEY, 1995). Dyspnoe, Enteritis, Zyanosen, sowie gallig verfärbte Fäzes sind weitere mögliche Begleiterscheinungen (HÖLZLE, 2008). Außerdem sind schlechte Wachstumsraten zu verzeichnen (MESSICK, 2004).

Zuchtsauen erkranken für gewöhnlich kurz vor der Geburt infolge der Umstaltung in den Abferkelstall, unmittelbar nach der Geburt oder nach dem Absetzen. Die Tiere sind anorektisch, entwickeln Fieber bis 41,7°C sowie gelegentlich Ödeme der Vulva oder des Gesäuges, die sich über einen reduzierten Milchfluss und reduziertes mütterliches Verhalten bemerkbar machen können (HÖLZLE, 2008). Infolge der Dysgalaktie kann es zu vermehrten Saugferkelverlusten kommen. Auch eine verringerte Fruchtbarkeit mit erhöhten Umrauschquoten, vermehrter embryonaler Sterblichkeit und der Geburt lebensschwacher Ferkel wird von einigen Autoren als Folge der Infektion mit *M. suis* angeführt (THACKER, 2006; HÖLZLE, 2008; STRAIT et al., 2012).

Die chronische Erkrankung ist neben Blässe und Kümern gekennzeichnet durch allergische Hautreaktionen wie Urtikaria oder Morbus maculosus (STADLER et al., 2014). Die von *M. suis* verursachte Immunsuppression führt zu einer vermehrten Anfälligkeit infizierter Tiere für Sekundärerkrankungen (ZACHARY und SMITH, 1985; GWALTNEY und OBERST, 1994). Diese sind häufig für eine Verschleierung der Grunderkrankung verantwortlich (HEINRITZI, 2006; HÖLZLE, 2008).

In der Sektion fallen vordergründig Blässe und regelmäßig hochgradiger Ikterus auf (GWALTNEY, 1995). Das Blut ist dünnflüssig, lackfarben, neigt zu spontaner Agglutination und haftet nicht an der Wand des Reagenzglases (HEINRITZI, 2006). Einige Tiere weisen Aszites, einen Hydrothorax oder ein Hydroperikard auf (GWALTNEY, 1995). Die Leber ist gelblich-braun verfärbt und die Galle dickflüssig und gelatinös (SPLITTER, 1950b). Herz und Nieren sind blass und von schlaffer Konsistenz (SPLITTER, 1950b).

2.4. Diagnostik

Für die Diagnosestellung können das klinisch-pathologische Bild, die hämatologischen Veränderungen, der mikroskopische und der serologische Erregernachweis herangezogen werden. Der Nachweis bakterieller DNA mittels Polymerase-Kettenreaktion hat das biologische Nachweisverfahren, bei dem die Erkrankung im Tierversuch am splenektomierten Schwein nachgewiesen wird, als diagnostischen Goldstandard abgelöst.

2.4.1. Klinisch-pathologische Diagnostik

Eine verlässliche klinische oder hämatologische Diagnose der IAP kann ausschließlich während einer akuten Phase der Infektion erfolgen (HEINRITZI, 1990b). Charakteristische Symptome sind dabei Fieber bis 42°C, Anämie, Apathie, Ikterus und Zyanosen der Ohrränder (HÖLZLE, 2007).

2.4.1.1. Hämatologische Veränderungen

Mit Gerinnungshemmern (EDTA) versetztes Blut zeigt eine charakteristische Mikroagglutination bei Temperaturen unter 25°C (ZACHARY und BASGALL, 1985). Hämatokrit und Hämoglobinwert sind aufgrund der geringen Menge roter Blutkörperchen stark verringert. Hierbei handelt es sich um eine normochrome und normozytäre Anämie (HEINRITZI, 2006). STADLER et al. ermittelten im Jahre 2014

für 7 experimentell infizierte, nicht-splenektomierte Tiere im Durchschnitt eine Erythrozytenzahl von $5,00 \times 10^6 \mu\text{L}^{-1}$, ein PCV von 27,0% und einen Hämoglobinwert von 5,26 mmol/L. Weiterhin sind eine Leukozytose und eine Bilirubinämie feststellbar. Der Blutglukosegehalt ist deutlich reduziert ($<20 \text{ mg/dL}$) (ZACHARY und SMITH, 1985; SMITH et al., 1990; HEINRITZI, 2006).

2.4.1.2. Biologischer Nachweis

Vor der Etablierung molekularbiologischer Nachweismethoden mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) für *M. suis* stellte der Nachweis im splenektomierten Tiermodell den Goldstandard der *M. suis*-Diagnostik dar. Dabei wird entweder einem *M. suis*-verdächtigen Tier die Milz entnommen oder das Blut eines verdächtigen Tieres einem zuvor splenektomierten Versuchstier injiziert. Stellt sich innerhalb von 6 bis 14 Tagen im Anschluss an dieses Verfahren ein eperythrozoonotischer Anfall ein, gilt die Diagnose als positiv (HEINRITZI, 1984, 1990b).

Die Ursache hierfür ist darin zu sehen, dass es aufgrund des Ausfalls der Filterfunktion der Milz zu einer hochgradigen Vermehrung von *M. suis* kommt. Daraus resultiert in der Folge die klinische Manifestation einer zuvor latenten Erkrankung (MARMORSTON, 1935; HEINRITZI, 1984).

2.4.2. Bakteriologische Diagnostik

Im Rahmen der bakteriologischen Diagnostik kann der direkte vom indirekten Erregernachweis unterschieden werden. Während der direkte Erregernachweis auf die Darstellung des Erregers selbst abzielt, ist der indirekte Erregernachweis hingegen darauf gerichtet, die gegen den Erreger gebildeten Antikörper zu detektieren.

Indirekter Erregernachweis

2.4.2.1. Serologischer Nachweis

In der serologischen Diagnostik der HM des Schweins spielen drei relevante Testsysteme eine Rolle:

Den ältesten unter diesen stellt die Komplementbindungsreaktion (KBR) nach SPLITTER (1958) dar. Bei diesem Verfahren wird der Verbrauch von Komplement infolge der Bildung von Immunkomplexen aus definiertem Antigen sowie nachzuweisenden Antikörpern überprüft. Das zu prüfende Serum wird hierfür mit definiertem Antigen und Komplement versetzt. Im zweiten Schritt wird ein Indikatorsystem aus Schaferythrozyten und einem gegen diese gerichteten Immuns Serum hinzugegeben. Im Falle einer positiven Serumprobe wurde aufgrund der Immunkomplexbildung das zugesetzte Komplement bereits verbraucht und im zweiten Schritt geschieht nichts weiter. Andernfalls kommt es für den Fall einer negativen Serumprobe zu einer komplement-vermittelten Hämolyse der Schaferythrozyten (HAAS und BEER, 2015b).

Ein weiteres Verfahren der serologischen Diagnostik ist der indirekte Hämagglutinationstest (IHA). Dabei werden die Immunglobuline vom M-Typ (Kälteagglutinine) nachgewiesen (SMITH und RAHN, 1975; BALJER et al., 1989). Dafür werden die Blutseren zu untersuchender Schweine mit *M. suis*-sensibilisierten Schaferythrozyten (zusammen mit *M. suis*-Antigen inkubierten und dadurch zellwandgeschädigten Erythrozyten) versetzt. Kommt es daraufhin zur Ausbildung eines netzartigen Granulates, zeigt dies die Anwesenheit von IgM im untersuchten Blutserum an. Andernfalls kommt es der Schwerkraft folgend zur Akkumulation der Erythrozyten im tiefsten Punkt des Testgefäßes (BALJER et al., 1989; HAAS und BEER, 2015a). Das Auftreten von IgM-Antikörpern steht in enger Beziehung zum akuten Anfall. Zwischen den Anfällen sinkt der Antikörpertiter innerhalb kurzer Zeit unter die Nachweisgrenze, weshalb der IHA ein hohes Risiko falsch-negativer Ergebnisse birgt (BALJER et al., 1989).

Die dritte serologische Nachweismethode stellt der *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) dar (SCHULLER et al., 1990; HSU et al., 1992). Bei dieser Methode wird das Serum der zu untersuchenden Tiere zusammen mit Enzym-markierten Ziege-anti-Schwein-Antikörpern in einem zuvor mit *M. suis*-Antigen beschichteten

Probengefäß inkubiert. Im positiven Fall binden Antikörper aus dem Serum an das *M. suis*-Antigen und werden ihrerseits von den Enzym-markierten anti-Schwein-Antikörpern gebunden, wodurch ein Enzym-vermittelter optischer Nachweis möglich wird (HÖLZLE et al., 2006).

Der Nachteil dieser serologischen Testsysteme besteht darin, dass sie allesamt auf *M. suis*-Antigen angewiesen sind, das zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht anders als durch Aufreinigung aus dem Blut erkrankter, in der Regel experimentell infizierter Schweine zu beziehen ist (HÖLZLE, 2008).

Im Jahre 2007 konnten HÖLZLE et al. (2007a) den serologischen Nachweis von *M. suis* im ELISA mittels zweier *M. suis*-spezifischer Proteine etablieren. Bei diesen handelt es sich zum einen um das membranständige, an der Zelladhäsion sowie der Glykolyse beteiligte MSG1 und zum anderen um das ebenfalls membranständige und mutmaßlich an der Zelladhäsion beteiligte „Heat-shock“-Protein HspA1 (HÖLZLE et al., 2007c; HÖLZLE et al., 2007d). Der serologische Nachweis mittels dieser *M. suis*-spezifischen Antigene zeichnet sich nicht nur im Vergleich zum Voll-Antigen ELISA durch gleich hohe und teils höhere Sensitivität und Spezifität aus. Er stellt überdies auch die erste serologische Nachweismethode für *M. suis* dar, für die das erforderliche Antigen rekombinant in der *E. coli*-Kultur *in vitro* im Labor erzeugt werden kann (HÖLZLE et al., 2007a; HÖLZLE, 2008).

Direkter Erregernachweis

2.4.2.2. Kultureller Nachweis

Bisher ist es nicht gelungen, *M. suis* kulturell anzuzüchten. Im Jahre 1996 gelang NONAKA et al. lediglich eine kurzzeitige Aufrechterhaltung von *M. suis* in der Zellkultur. Im Jahre 2012 erreichten auch SCHREINER et al. (2012a) eine 12-wöchige Persistenz von *M. suis* in einem modifizierten SP-4 Mycoplasmen Medium. Eine Vermehrung der Erreger erzielten sie jedoch ebenso wenig.

2.4.2.3. Mikroskopischer Nachweis

Der lichtmikroskopische Nachweis der HM kann an einem nach Giemsa oder mittels Acridinorange gefärbten Blutaussstrich erfolgen. Darin können die HM einzeln, paarweise oder in Ketten angeordnet auf der Oberfläche der Erythrozyten detektiert werden (HÖLZLE et al., 2011).

Mit Acridinorange eingefärbte HM erscheinen unter ultraviolettem Licht als leuchtend orange Punkte und Kreise (KREIER und GOTHE, 1976; LIEBICH und HEINRITZI, 1992). In der Färbung nach Giemsa hingegen erscheinen die HM purpurn oder purpurrot (KREIER und GOTHE, 1976). Im Elektronenmikroskop können kleine kokkoide unreife von juvenilen diskoiden und reifen ringförmigen Formen unterschieden werden (LIEBICH und HEINRITZI, 1992; HÖLZLE, 2007). In der akuten Phase sind alle diese drei Erregerformen auf denselben Erythrozyten auffindbar (LIEBICH und HEINRITZI, 1992). In der chronischen Phase können hingegen kugelige, 1 µm durchmessende Ruhephase-Formen beobachtet werden (LIEBICH und HEINRITZI, 1992).

Allerdings zeichnet sich der Erregernachweis mittels Mikroskopie durch eine relativ niedrige Sensitivität und Spezifität aus. Eine gesicherte Detektion von *M. suis* ist erst ab einer Keimzahl von 10^5 Bakterien mL⁻¹ Blut möglich. Diese liegt außerhalb eines akuten Anfalls in der Regel nicht vor. Ebenso kommt es aufgrund der Fehlinterpretation von beispielsweise Howell-Jolly-Körperchen oder Färbartefakten regelmäßig zu falsch-positiven Befunden (HÖLZLE et al., 2011).

2.4.2.4. Molekularbiologischer Nachweis

Der molekularbiologische Erregernachweis mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) hat in den letzten Jahren den biologischen Nachweis als Goldstandard zur Diagnostik einer *M. suis*-Infektion abgelöst. Er kann an Blut- und Gewebeproben durchgeführt werden (HÖLZLE, 2008)

Bei der PCR handelt es sich um ein Verfahren zur gezielten Vervielfältigung ausgewählter DNA-Sequenzen, die anschließend mittels Agarosegelelektrophorese dargestellt werden können (HAAS und BEER, 2015a). Die PCR läuft in verschiedenen Phasen ab, die sich im Verlauf des Verfahrens 25- bis 45-mal zyklisch

wiederholen. Im ersten Schritt erfolgt bei ca. 95°C für 30 bis 60 Sekunden die *Denaturierung* der Ziel-DNA (HAAS und BEER, 2015a). Während des zweiten Schritts, des *Annealings*, der bei 50 bis 55°C ebenfalls 30 bis 60 Sekunden andauert, lagern sich kurze, zielspezifische DNA-Sonden, die als Primer fungieren, der denaturierten Nukleinsäuresequenz an (HAAS und BEER, 2015a). Schließlich erfolgt mit der *Elongation* die Replikation der Ziel-DNA ausgehend von den Primer-Oligonukleotiden mittels einer hitzestabilen DNA-Polymerase, meistens die Polymerase des thermophilen Bakteriums *Thermus aquaticus*, Taq. Dieser dritte Schritt dauert, abhängig von der Länge der Zielsequenz, 30 bis 120 Sekunden an (HAAS und BEER, 2015a).

Neben dieser konventionellen PCR existiert außerdem die sogenannte „real-time quantitative“ PCR. Im Unterschied zur Erstgenannten erfolgt bei dieser der Sequenznachweis über die Bestimmung der Fluoreszenzintensität mittels interskalierender Farbstoffe (z.B. Ethidiumbromid, SYBR® Green I) – diese binden unspezifisch an doppelsträngige DNA, weshalb die Fluoreszenzintensität mit steigender Anzahl der Amplifikationsprodukte zunimmt – oder fluoreszenzmarkierter Sonden. Diesen liegt dabei das Prinzip des Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfers (FRET) zugrunde (HAAS und BEER, 2015a). Das bedeutet, dass es zum Energietransfer mit resultierender Fluoreszenz kommt, wenn zwei Fluorochrome, deren Anregungs- und Emissionsspektren sich überlappen, in eine räumliche Nähe zueinander gebracht werden (HAAS und BEER, 2015a). Zu diesem Zweck werden etwa die entsprechenden Fluorochrome an Oligonukleotidsequenzen gekoppelt, die unmittelbar nebeneinander an die denaturierte ssDNA der Zielsequenz binden (HAAS und BEER, 2015a). Als Alternative zu diesen „FRET-Sonden“ existieren außerdem sogenannte „TaqMan®-Sonden“. Diese Oligonukleotide binden ebenfalls an die Ziel-DNA, beginnen aber erst dann zu fluoreszieren, wenn sie im Rahmen der Exonuklease-Aktivität der Taq-Polymerase abgebaut werden (HAAS und BEER, 2015a). Dies führt dazu, dass es bei einer steigenden Zahl von Amplifikationsprodukten auch zu einer gesteigerten Fluoreszenz-Emission kommt (HAAS und BEER, 2015a).

Es stehen mehrere Protokolle zur Untersuchung auf *M. suis* mittels PCR zur Verfügung, die auf der Amplifikation verschiedener Gensequenzen beruhen: Das älteste dieser Verfahren verwendet Sequenzen des KSU-2-Klons (GWALTNEY et al., 1993; GWALTNEY und OBERST, 1994), während jüngere Methoden auf solche

der 16S-rDNA (RIKIHISA et al., 1997; MESSICK et al., 1999; MESSICK et al., 2000) oder eines *M. suis*-spezifischen 1,8 kb *EcoRI* DNA-Fragments (HÖLZLE et al., 2003) zurückgreifen.

Im Jahre 2007 etablierten HÖLZLE et al. (2007b) darüber hinaus ein Protokoll für eine quantitative LightCycler® PCR, die auf der Amplifikation der codierenden Sequenzen des im selben Jahr von HÖLZLE et al. (2007d) beschriebenen Proteins MSG1 basiert. Diese weist mit 100% Sensitivität und 96,7% Spezifität eine hohe statistische Güte auf. Zudem zeichnet sie sich durch gute Reproduzierbarkeit und Zuverlässigkeit für verschiedene Untersuchungsmaterialien wie Blut oder Organewebe aus (HÖLZLE et al., 2011).

Weitere Protokolle zur Durchführung einer quantitativen PCR mittels der Amplifikation der 16S-rDNA wurden von den Arbeitsgruppen GUIMARAES et al. (2011b) und WATANABE et al. (2012) erarbeitet.

2.5. Differentialdiagnosen

Leitsymptome der IAP sind Blässe, Ikterus und Veränderungen der Haut (SPLITTER, 1951; STADLER et al., 2014). Entsprechend sind verschiedene Erkrankungen differentialdiagnostisch in Betracht zu ziehen. Die Wichtigsten sind im Folgenden gruppiert anhand der Leitsymptome aufgeführt:

2.5.1. Anämie

Neben der durch *M. suis* ausgelösten hämolytischen Anämie sind bei Schweinen die Eisenmangelanämie sowie verschiedene Formen hämorrhagischer Anämien vertreten (REINER, 2015a).

Die Eisenmangelanämie ist auf den zu niedrigen Eisengehalt der Sauenmilch bei gleichzeitiger Abwesenheit von Erde als natürlichem Eisensubstrat zurückzuführen. Die Ferkel weisen einen Hämatokrit von unter 33 L/L und eine MCHC von unter 300 g Hämoglobin/L Erythrozyten auf. Es entwickelt sich eine mikrozytäre hypochrome Anämie (REINER, 2015a). Auch Eisen-, Kupfer- oder Kobaltmangel können Auslöser einer hypoplastischen Anämie sein (HEINRITZI, 2006).

Hämorrhagische Anämien sind beim Schwein selten traumatisch bedingt. Mögliche Ursachen können dagegen ein akutes Magengeschwür oder auch ein akuter Verlauf der Porzinen Hämorrhagischen Enteropathie (PHE) sein (REINER, 2015a). Die Hauptgefährdung ist allerdings in der Akkumulation von Sickerblutungen zu sehen. Diese können beispielsweise im Zusammenhang mit gestörter Blutgerinnung auftreten, etwa in Folge der Antagonisierung von Vitamin K durch Dicumarol (Rattengift) oder Sulfonamid-Präparate (REINER, 2015a). Ebenfalls bedeutsam für das Zustandekommen von Hämorrhagien sind Störungen der Thrombozyten, etwa durch die thrombozytopenische Purpura. Bei dieser immunvermittelten Erkrankung nehmen die Ferkel über das Kolostrum gegen ihre paternal vererbten Thrombozyten-Antigene gerichtete Antikörper auf. Kurze Zeit nach der Geburt zeigen die Ferkel Blässe, Mattigkeit sowie Einblutungen in Haut, Schleimhaut und verschiedene Organgewebe (hämorrhagische Diathese) (SCHMIDT et al., 1977; REINER, 2015a). Auch Mykotoxine, Schweinepest (KSP) oder sonstige Septikämien können für eine Beeinträchtigung der Thrombozyten mit resultierender Blutungsneigung verantwortlich sein (REINER, 2015a).

2.5.2. Ikterus

Durch toxische Schädigung der Erythrozyten kann es bei mit Leptospiren infizierten Sauen und deren Ferkeln zu ikterisch-anämischen Veränderungen sowie zu Hämoglobinurie kommen. Wesentliches Charakteristikum ist hierbei aber das Abortgeschehen mit protrahiertem Verlauf (REINER, 2015b). Auch Intoxikationen, etwa mit Cyanamid, Kupfer oder toxischen Unkrautsamen können ikterische Veränderungen zur Folge haben (HEINRITZI, 1986).

2.5.3. Veränderungen der Haut

Die Veränderungen der Haut, die durch IAP hervorgerufen werden, manifestieren sich zum einen über die gesamte Körperoberfläche verteilt als Petechien bzw. Ekchymosen, zum anderen lokal als zyanotische bzw. nekrotische Veränderungen der Ohrränder.

Für erstere ist neben der bereits zuvor beschriebenen thrombozytopenischen Purpura die KSP eine wichtige Differentialdiagnose (KORN und MUSSGAY, 1968). Anders als bei der IAP, die sich durch einen Anstieg der Leukozyten im Blut äußert, geht die KSP mit einer Leukopenie bei relativer Lymphozytose einher (HEINRITZI, 1990a). Flächige Hauteinblutungen treten überdies im Zusammenhang mit Dicumarol-Vergiftungen in Erscheinung (HEINRITZI, 1990a).

Zyanotische Veränderungen der Ohrränder treten unter anderem bei Rechts-Herzschwäche, Thrombendokarditis oder Septikämien zu Tage. Nekrotische Veränderungen der Ohrränder können etwa auf Vergiftungen durch Mutterkornalkaloide oder Erfrierungen zurückzuführen sein (HEINRITZI, 1990a).

2.6. Therapie und Prophylaxe

Eine Therapie mit HM infizierter Schweine erfolgt vorzugsweise mit Tetrazyklin oder Oxytetrazyklin (SPLITTER und CASTRO, 1957; HÖLZLE et al., 2011) in einer Dosierung von 20-30 mg/kg LM parenteral appliziert, um die reduzierte Futteraufnahme zu umgehen (DENT et al., 2013). Eine entsprechende Maßnahme kann auch prophylaktisch vor Stresssituationen erfolgen (DENT et al., 2013). Eine Elimination der Erreger aus dem Körper ist nicht möglich. Die Therapie bewirkt lediglich bei nicht-invasiven Isolaten eine Herabsetzung klinischer Symptome. Die Tiere bleiben lebenslang infizierte Träger und nehmen somit eine herausragende Position im epidemiologischen Geschehen ein (HÖLZLE et al., 2011). Bei invasiven Isolaten ist eine Besserung der Symptome infolge antibiotischer Therapie nicht zu erzielen (GROEBEL et al., 2009).

Zur Prävention der Erkrankung sind alle Maßnahmen geeignet, die eine Verbesserung der Betriebshygiene mit sich bringen, wie z.B. häufiges Wechseln bzw. Desinfizieren von zootecnischem Instrumentarium oder konsequente Parasitenbekämpfung (HEINRITZI, 2006). In Beständen mit niedriger Prävalenz sollten die Trägertiere identifiziert und aus dem Bestand entfernt werden (HÖLZLE et al., 2011).

Eine Impfung gegen *M. suis* steht bisher nicht zur Verfügung. Dies hängt damit zusammen, dass eine *in vitro* Kultivierung des Erregers noch nicht möglich ist (siehe II.2.4.2.2. Kultureller Nachweis), woraus sich ergibt, dass Impfantigen notwendigerweise aus dem Blut infizierter Tiere isoliert werden muss. Inhaltsstoffe des Schweineblutes, die in diesen Impfstoffen vorhanden sein können, haben das Potenzial, autoimmune Vorgänge hervorzurufen (HÖLZLE, 2007). Außerdem sind die isolierten Erregerzellen voll virulent und können derzeit noch nicht attenuiert werden (HÖLZLE, 2007). Letztlich ist über die Antigenstruktur von *M. suis* und die Immunreaktion im infizierten Schwein insgesamt zu wenig bekannt (HÖLZLE, 2007). Ein auf dem Adhäsions-Protein MSG1 basierender, rekombinant in *E. coli* hergestellter Impfstoff löste im splenektomierten Tier zwar eine deutliche Immunreaktion aus, konnte aber dennoch keine protektive Wirkung erzielen (HÖLZLE et al., 2009).

Der Einsatz von Tetracyklinen als unspezifische Futtermedikation hat in der Vergangenheit zu einem verringerten Auftreten des klinischen Krankheitsbildes geführt (MESSICK, 2004).

III. Material und Methoden

1. Ziel der Untersuchung

Mittels der vorliegenden Arbeit sollte ein tiefergehendes Verständnis der Ausbreitungswege von *M. suis* innerhalb infizierter Bestände sowie der Eintragswege in naive Tierbestände erlangt werden. Dies sollte die Implementierung zielgerichteter Hygienekonzepte begünstigen und somit dazu beitragen, gesunde Tiere und Tierbestände gesund zu erhalten, dem Tierwohl Vorschub zu leisten sowie wirtschaftliche Verluste zu reduzieren. Als Nebeneffekt sollten die gewonnenen Erkenntnisse herangezogen werden, um gegebenenfalls neue diagnostische Methoden bereitzustellen. So wäre etwa eine Speichelgewinnung mittels Kaustrick zum Zweck des Nachweises von *M. suis* deutlich einfacher und tierschonender umzusetzen als die derzeit erforderliche Gewinnung von Blutproben.

Aus diesen Gründen sollte die von DIETZ et al. (2014) im Tierversuch festgestellte Ausscheidung von *M. suis* innerhalb unterschiedlicher Körperflüssigkeiten nachvollzogen und evaluiert werden, ob eine entsprechende Exkretion gleichermaßen bei im Feld infizierten Tieren nachweisbar ist. Um dies zu ermöglichen, wurden Speichel-, Urin- und Plazentaprobe aus Asservaten der Klinik für Schweine der Ludwig-Maximilians-Universität München (LMU) analysiert und auf ihren *M. suis*-Gehalt hin getestet. Die Proben stammten aus bekannt *M. suis*-positiven Beständen in Süddeutschland.

Zusätzlich wurden Sperma und Blut von 183 Zuchtebern einer Besamungsstation in Süddeutschland untersucht. Dies sollte eine Beurteilung der Fragestellung erlauben, ob es zu einer Ausscheidung von *M. suis* mit dem Sperma kommt. Gegebenenfalls wäre in der Verwendung erregerehaltigen Spermas ein erhebliches Infektionsrisiko für bis dato unbelastete Tierhaltungen zu sehen.

2. Probenmaterial

Für die Nachvollziehung der Ergebnisse von DIETZ et al. (2014) wurden Speichel- (n = 148), Urin- (n = 47) und Plazentaprobe(n) (n = 143) aus Asservaten der Klinik für Schweine der LMU herangezogen. Diese entstammten zwei vorangegangenen Studien an der Klinik für Schweine (KÖPPEN, 2015; WILLI, 2017). Die Proben waren von Sauen auf bis zu 15 bekannt *M. suis*-positiven Betrieben in Süddeutschland gewonnen und das Blut der Tiere bereits mittels PCR auf *M. suis* untersucht worden.

Tabelle 1: Umfang aller zur Verfügung stehenden Speichel-, Urin- und Plazentaprobe(n) nach Betrieb inklusive *M. suis*-positiver Anteil der Blutproben

Betrieb	Speichel- proben	Urin- proben	Plazenta- proben	<i>M. suis</i> -positive Blutproben (n / %)	
1	10	8	10	1/10	10,0%
2	10	6	10	7/10	70,0%
3	10	1	10	4/10	40,0%
4	10	3	10	9/10	90,0%
5	10	3	10	3/10	30,0%
6	10	-	7	2/10	20,0%
7	10	5	10	2/10	20,0%
8	10	7	10	3/10	30,0%
9	10	2	9	2/10	20,0%
10	10	5	10	4/10	40,0%
11	10	5	10	2/10	20,0%
12	10	-	10	10/10	100%
13	9	-	10	3/10	30,0%
14	9	2	8	7/9	77,8%
15	10	-	9	2/10	20,0%
gesamt	148	47	143	61/149	40,9%

Von den 148 Tieren, die im Rahmen der Speicheluntersuchung beprobt wurden, stellten sich 61 (41,2%) in der Blutuntersuchung *M. suis*-positiv dar. Die Erregerlast reichte dabei von $1,75 \times 10^0$ bis $1,94 \times 10^9$ *M. suis*/mL Blut.

Von den 47 Tieren, die im Rahmen der Urinuntersuchung beprobt wurden, stellten sich 14 (29,8%) in der Blutuntersuchung *M. suis*-positiv dar. Die Erregerlast reichte dabei von $1,22 \times 10^3$ bis $1,94 \times 10^9$ *M. suis*/mL Blut.

Von den 143 Tieren, die im Rahmen der Plazentauntersuchung beprobt wurden, stellten sich 60 (42,0%) in der Blutuntersuchung *M. suis*-positiv dar. Die Erregerlast reichte dabei von $1,75 \times 10^0$ bis $1,94 \times 10^9$ *M. suis*/mL Blut.

Den Proben wurden vierstellige versuchsinterne Identifikationsnummern zugeordnet, wobei die vorderen beiden Ziffern den Betrieb und die hinteren beiden Ziffern das Tier kennzeichneten; jeweils in aufsteigender Reihenfolge entsprechend dem Zeitpunkt der Probengewinnung.

Für die Speichelgewinnung, wurde den Tieren mittels einer sterilen Klemme eine Watterolle (Salivette®, Firma Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland) solange ins Maul gehalten, bis diese gut durchsaftet war. Die Urinproben waren als Spontanharn gesammelt worden (KÖPPEN, 2015). Zur Gewinnung des Plazentamaterials wurden die selbstständig abgegangenen Nachgeburten der Tiere eingesammelt (KÖPPEN, 2015). Weiterhin waren unmittelbar nach der Abferkelung drei Ferkel je Sau auf *M. suis* getestet worden (WILLI, 2017). Die Asservate waren bis zur Untersuchung in den Lagerräumen der Klinik für Schweine bei -20°C tiefgekühlt.

Zusätzlich wurden im Rahmen des Routine-Monitorings auf einer Besamungsstation in Süddeutschland Blut- und Spermaproben von 183 Zuchtebern gewonnen. Diese wurden ebenfalls bis zur Untersuchung bei -20°C gelagert. Die Beprobung der Eber erfolgte unter Zustimmung der Ethikkommission der Tierärztlichen Fakultät der LMU München (Referenznummer: 245-17-12-2020).

3. Probenverarbeitung

Die Verarbeitung der Proben gliederte sich in die beiden Phasen

1. Extraktion der bakteriellen DNA
2. Nachweis bakterieller DNA mittels quantitativer real-time PCR

Die erste Phase fand dabei in den Laborräumen der Klinik für Schweine und des Lehrstuhls für Virologie des Instituts für Infektionskrankheiten und Zoonosen der Tierärztlichen Fakultät der LMU München statt, während die zweite Phase am Institut für Nutztierwissenschaften der Universität Hohenheim erfolgte.

3.1. Extraktion der *M. suis*-DNA

Das asservierte Plazentamaterial musste vor Beginn der eigentlichen DNA-Extraktion zunächst mittels Homogenisation in eine flüssige Form überführt werden. Hierzu wurden je 200 mg jeder Probe mit 800 µL PBS (phosphat-gepufferte Salzlösung) versetzt und die Mischung anschließend in den FastPrep® FP 120 Cell Disruptor (Thermo Savant, Qbiogene Inc, Illkirch, Frankreich) gegeben und darin homogenisiert.

Die Probenaufbereitung zum Zwecke der DNA-Extraktion von Speichel-, Urin- und Plazentaprobe wurde mit dem kommerziell erhältlichen GenElute™ Bacterial Genomic DNA Kit (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) durchgeführt.

Für die Präparation der Spermaprobe wurde das QIAamp® DNA Mini Kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland) verwendet. Die Untersuchung der Spermaprobe erfolgte an Pools zu je 5 Proben.

Zur Vorbereitung des Blutes auf die DNA-Extraktion mittels GenElute™ Bacterial Genomic DNA Kit wurden zunächst die Erythrozyten lysiert. Hierfür wurden 200 µL EDTA-behandelten Blutes in ein Eppendorf Röhrchen pipettiert, mit ebenfalls 200 µL Lysis-Puffer (10 mM Tris-HCl, 5 mM MgCl₂, 0,32 M Saccharose, 1,0% Triton X-

100) versetzt und anschließend kurz im Reagensglas-Schüttler Reamix 2789 (Assistent®, Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & CO KG, Sondheim vor der Rhön, Deutschland) „gevortext“. Darauf folgte eine einminütige Zentrifugation bei 8.000 rpm. Als nächstes wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 400 µL Lysis-Puffer gewaschen. Nach kurzem „Vortexen“ erfolgte eine weitere Zentrifugation für eine Minute bei 8.000 rpm. Nach erneutem Verwerfen des Überstandes wurde der Prozess der Waschung des Pellets ein weiteres Mal wiederholt. Im Anschluss an eine dritte Verwerfung des Überstandes erfolgte eine Resuspension des Pellets in 180 µL Lysis Solution T.

Das zuvor beschriebene Verfahren wurde im Falle der sonstigen Probenmaterialien (Speichel, Urin und Plazenta-Homogenisat) etwas vereinfacht. Für diese Materialien wurden direkt 90 µL des unbearbeiteten Probenmaterials mit 90 µL Lysis Solution T versetzt. Im weiteren Verlauf wurden sämtliche Materialien exakt gleich und in Übereinstimmung mit den Arbeitsanweisungen des Benutzerhandbuchs bearbeitet.

Die Aufbereitung des Spermas zur DNA-Extraktion erfolgte in Pools zu je 5 Proben entsprechend den Angaben des Herstellers mit dem QIAamp® DNA Mini Kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland) am Lehrstuhl für Virologie des Instituts für Infektionskrankheiten und Zoonosen, Tierärztliche Fakultät der LMU (MÜLLER, 2021).

3.2. Quantitative real-time PCR

Die Untersuchung des Proben-Eluats wurde am Institut für Nutztierwissenschaften der Universität Hohenheim mittels LightCycler® (LC) 2.0 System (Roche-Diagnostics, Mannheim, Deutschland) durchgeführt. Das Verfahren zur Detektion von *M. suis*-DNA wurde im Jahre 2007 von HÖLZLE et al. (2007b) entwickelt.

4. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte unter Verwendung des Programms Excel® 2016 (Microsoft Office, Fa. Microsoft, Redmond, USA) und der Statistiksoftware IBM SPSS® Statistics Version 26.0 (Fa. IBM Corp., Armonk, USA). Die Graphiken wurden ebenfalls mit Excel® 2016 erstellt.

Die Ergebnisse der Probenuntersuchung wurden unter Verwendung des Shapiro-Wilk Tests auf Normalverteilung geprüft. Da eine Normalverteilung nicht bestätigt werden konnte, wurde eine mögliche Korrelation der Ergebnisse der Probenuntersuchung mit dem *M. suis*-Blutstatus der betreffenden Tiere mittels Spearman-Korrelationstest durchgeführt.

IV. Ergebnisse

1. Ergebnisse der Speicheluntersuchung

In keiner der 148 untersuchten Speichelproben war *M. suis*-DNA nachweisbar.

2. Ergebnisse der Urinuntersuchung

In keiner der 47 untersuchten Urinproben war *M. suis*-DNA nachweisbar.

3. Ergebnisse der Plazentauntersuchung

In sechs der 143 untersuchten Plazentaprobe (4,2%) bei Tieren von fünf Betrieben konnte mittels PCR *M. suis*-DNA detektiert werden. Dabei reichte die Erregerlast von $1,77 \times 10^3$ bis $2,36 \times 10^5$ *M. suis*/mL Probenlösung. Vier von den sechs Sauen, von denen die *M. suis*-positiven Plazentaprobe stammten, waren auch in der Blutuntersuchung positiv auf *M. suis* getestet worden (Erregerlast von $4,98 \times 10^0$ bis $1,69 \times 10^5$ *M. suis*/mL Blut).

Tabelle 2: Erregerlast (*M. suis*/mL) der positiv auf *M. suis* getesteten Plazentaprobe im Vergleich zu den Ergebnissen der Blutuntersuchung

Sau (versuchsinterne Nummer)	Blut (<i>M. suis</i> /mL)	Plazenta (<i>M. suis</i> /mL)
06.04	4.98×10^0	1.77×10^3
06.05	7.23×10^0	2.36×10^5
10.03	negativ	5.01×10^3
17.10	4.69×10^3	9.50×10^3
21.02	negativ	4.66×10^3
35.03	1.69×10^5	2.64×10^3

Fünf von sechs Tieren wiesen im Plazentamaterial eine höhere Erregerlast auf als im Blut, während bei einer Sau die nachgewiesene Menge *M. suis*-DNA pro mL Probenmaterial im Blut höher war als in der Plazenta-Probe (siehe Tabelle 2). Dabei war keine Korrelation zwischen dem Schweregrad der Erregerlast im Blut und in den Plazentaprobe feststellbar.

4. Blutstatus der Ferkel

Aus dem aktuellen Wurf jeder beprobten Sau war außerdem das Blut von je drei neonatalen Ferkeln mittels PCR auf *M. suis* untersucht worden. Von den 18 beprobten Ferkeln der sechs Sauen mit *M. suis*-positivem Ergebnis der Plazentauntersuchung war bei insgesamt acht Tieren (44,4%) aus fünf Würfen (83,3%) ebenfalls *M. suis*-DNA nachweisbar.

Tabelle 3: Nachweisbarkeit von *M. suis*-DNA im Blut der Sauen mit *M. suis*-positivem Plazentamaterial und im Blut ihrer Ferkel

Sau (versuchsinterne Nummer)	06.04	06.05	10.03	17.10	21.02	35.03
Blutstatus	+	+	-	+	-	+
Positive Ferkel	2	2	0	2	1	1

+ *M. suis*-DNA mittels PCR nachweisbar

- *M. suis*-DNA mittels PCR nicht nachweisbar

Insgesamt wurden 444 Ferkel aus 148 Würfen mittels PCR auf das Vorkommen von *M. suis*-DNA im Blut getestet. Dabei konnte bei 63 Tieren (14,2%) *M. suis*-DNA identifiziert werden. Diese stammten aus 44 Würfen (29,7%), wobei bei 30 Muttertieren (20,3%) *M. suis*-DNA im Blut nachgewiesen werden konnte.

5. Ergebnisse der Zuchteber

5.1. Herkunft, Alter und Rasse

Die evaluierten Spermaproben stammten von 183 Zuchtebern aus einer Besamungsstation in Süddeutschland. Die Tiere stammten von ursprünglich mindestens 26 verschiedenen Eberzuchtbetrieben (von 20 Tieren war der Herkunftsbetrieb unbekannt), die ebenfalls in Süddeutschland lokalisiert sind. Dabei lag die Anzahl Tiere pro Herkunftsbetrieb zwischen 1 und 42.

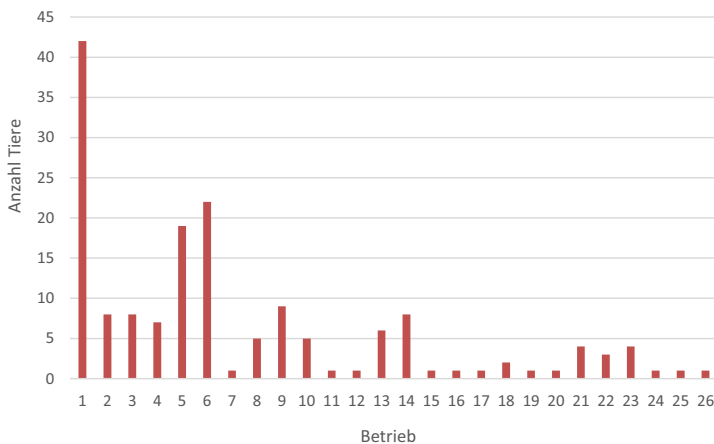


Abbildung 1: Anzahl Eber nach Herkunftsbetrieb

Die Tiere gehörten den Rassen Deutsches Edelschwein ($n = 8$), Deutsche Landrasse ($n = 16$), Iberisches Schwein ($n = 1$), Duroc ($n = 6$) und Piétrain ($n = 150$), sowie einer Duroc-Piétrain-Kreuzung ($n = 2$) an. Ihr Alter lag zwischen 9 und 77 Monaten.

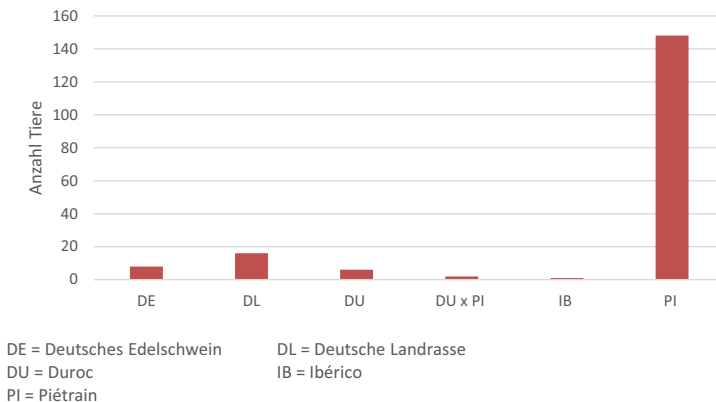


Abbildung 2: Anzahl Eber nach Rasse

5.2. Ergebnisse der Blut- und Spermauntersuchung

Bei der Untersuchung der Spermaproben der 183 Zuchteber mittels qPCR war in keiner der Proben *M. suis*-DNA nachweisbar.

Die ergänzende Untersuchung des Blutes der 183 Zuchteber mittels qPCR auf *M. suis*-DNA ergab ebenfalls keinen Erregernachweis.

6. Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Beprobung der Speichel- und Urin-Asservate ergab keinen Hinweis auf *M. suis*. Bei der Untersuchung der Plazentaprobe mittels PCR erwiesen sich sechs Proben (4,2%) als *M. suis*-DNA positiv. Bei vier von diesen Tieren wurde außerdem *M. suis*-DNA im Blut nachgewiesen. Die Untersuchung von je drei Ferkeln aus den Würfen der Sauen zeigte, dass fünf der Tiere mindestens ein *M. suis*-positives Ferkel geboren hatten. Die Beprobung der Zuchteber erbrachte für keines der Tiere den Nachweis von *M. suis*-DNA im Blut oder im Sperma.

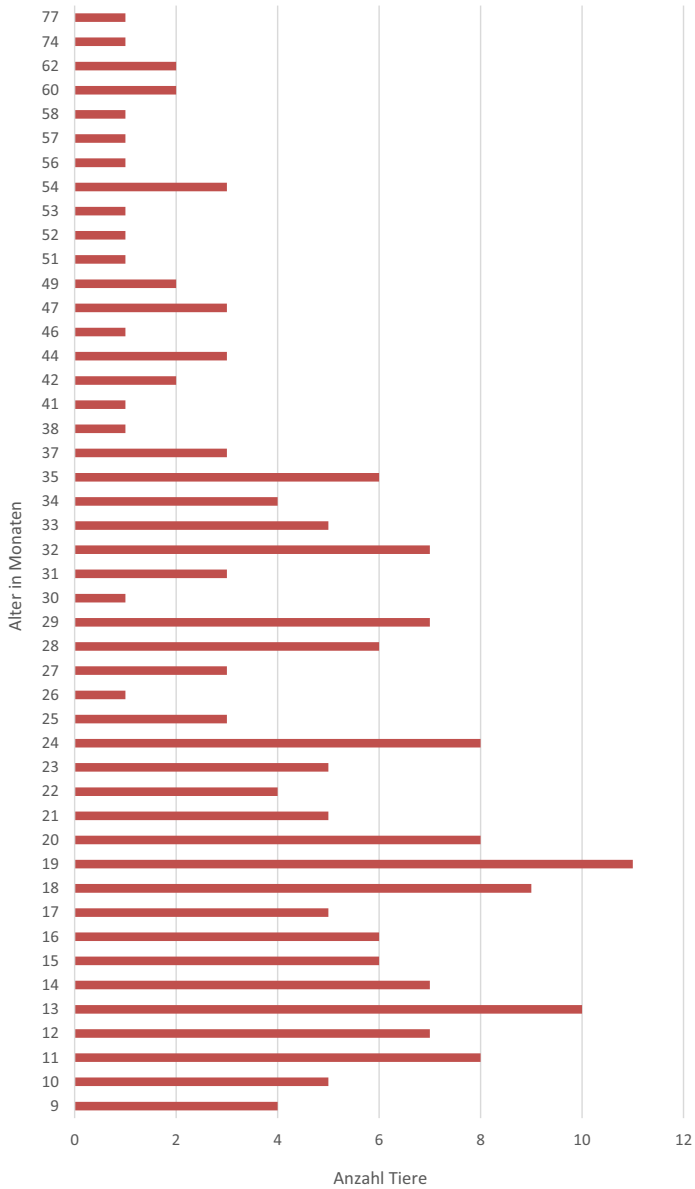


Abbildung 3: Anzahl Eber nach Lebensmonaten

V. Diskussion

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Untersuchung verschiedener möglicher Exkretionsmechanismen von *M. suis*. Dazu wurden zum einen an der Klinik für Schweine der LMU asservierte Speichel-, Urin- und Plazentaprobe von Sauen aus süddeutschen Ferkelerzeugerbetrieben auf das Vorkommen von *M. suis*-DNA beprobt. Zum anderen wurden im Rahmen eines Routine-Monitorings gewonnene Blut- und Spermaproben von Zuchtebern einer Besamungsstation in Süddeutschland gleichfalls auf *M. suis*-DNA hin untersucht.

1. Abwesenheit von *M. suis*-DNA in Speichel und Urin

In der Vergangenheit konnte bereits wiederholt gezeigt werden, dass es zu einer Exkretion von *M. suis* mit dem Harn infizierter Tiere kommen kann, sofern dieser Residuen roter Blutkörperchen enthält (HEINRITZI, 1992; GLONEGGER-REICHERT, 2015; ADE et al., 2021). Weiterhin haben die Ergebnisse von DIETZ et al. (2014) gezeigt, dass grundsätzlich auch eine blutunabhängige Ausscheidung von *M. suis* mit dem Urin ebenso wie mit dem Speichel vorkommen kann. In dieser Untersuchung konnte gezeigt werden, dass von sieben experimentell infizierten Schweinen 100% im Laufe des Versuchs *M. suis* mit dem Urin ausschieden, wobei bei vieren der Tiere keine Residuen roter Blutkörperchen im Harn nachweisbar waren. Die mediane Erregerlast lag dabei zwischen $4,9 \times 10^3$ und $3,6 \times 10^4$ *M. suis*/mL.

Im Gegensatz dazu war es im Rahmen der vorliegenden Untersuchung nicht möglich, auch nur bei einzelnen der 47 beprobten Sauen *M. suis*-DNA im Urin nachzuweisen. Auch in den 148 untersuchten Speichelproben war keine *M. suis*-DNA darstellbar. Dies galt gleichermaßen für Tiere, in deren Blut *M. suis*-DNA in Mengen bis zu $1,94 \times 10^9$ *M. suis*/mL nachweisbar war, wie auch für die Tiere, in deren Blut der Erreger nicht nachgewiesen werden konnte. Mögliche Ursachen dafür sollen im Folgenden Erläuterung finden:

1.1. Erregerstamm KI3806

Eine mögliche Ursache für die andersartigen Ergebnisse ist in dem Erregerstamm KI3806 zu sehen, der von DIETZ et al. (2014) verwendet wurde und der sich von den im Feld vorherrschenden Wildtypen erheblich unterscheidet. Bei KI3806 handelt es sich um einen Stamm, der im infizierten Tier einen drastischen Krankheitsverlauf induziert und für den etwa auch eine Invasion der Erythrozyten beschrieben wurde (GROEBEL et al., 2009; OEHLERKING et al., 2011; STADLER et al., 2014). Während die deutlich ausgeprägte Klinik bei der Beurteilung potenzieller Infektionsfolgen sehr von Vorteil ist, ergibt sich für die Praxis das Problem, dass es sich bei den im Feld anzutreffenden Erregerstämmen größtenteils um weniger aggressive Varianten handelt.

Beispielsweise führte GLONEGGER-REICHERT im Jahre 2015 im Rahmen ihrer Doktorarbeit einen ähnlichen Versuch unter Verwendung des Feldstammes K323/13 durch, der ebenfalls weniger deutliche Ergebnisse erkennen ließ als die Erhebung von DIETZ et al. aus dem Vorjahr. So beschreibt GLONEGGER-REICHERT (2015) eine um vier Tage spätere *M. suis*-Positivität der infizierten Tiere (Tag 6 p.i. anstatt Tag 2 p.i.). Außerdem gelang es ihr, unter den untersuchten Nasen-, Speichel- und Vaginalsekret-Tupfern nur in einem Nasensekret-Tupfer *M. suis*-DNA zu detektieren. Dieses vergleichsweise wenig drastische Ergebnis erzielte sie, obwohl, ebenso wie im Versuch von DIETZ et al. (2014), splenektomierte Tiere verwendet wurden (siehe V.1.2. Splenektomie), was einen nicht unbeträchtlichen Einfluss des verwendeten Erregerstammes auf den Versuchsausgang nahelegt. Auch in älteren Infektionsversuchen mit weniger aggressiven Erregerstämmen konnten moderatere Verläufe beobachtet werden (ZACHARY und SMITH, 1985; HEINRITZI et al., 1990).

Denkbare Ursachen für die Diskrepanz der Untersuchungsergebnisse der vorliegenden Arbeit zu den Ergebnissen von DIETZ et al. (2014) wären im Zusammenhang mit der höheren Virulenz von KI3806 etwa eine insgesamt größere Erregerlast, die zu einer „Überschwemmung“ des Körpers mit infektiösem Agens führen würde, oder auch analog zur Fähigkeit der Zellinvasion ein möglicher Übertritt von KI3806 über Gewebescheiden.

1.2. Splenektomie

Eine weitere mögliche Ursache für die Diskrepanz der Ergebnisse der vorliegenden Studie zu jenen von DIETZ et al. (2014) stellt die Verwendung splenektomierter Versuchstiere bei DIETZ et al. dar. Im Tierversuch wird meist auf splenektomierte Modelltiere zurückgegriffen, da diese aufgrund des Ausfalls der blutreinigenden Aktivität der Milz gegenüber *M. suis* eine deutlich gesteigerte Suszeptibilität aufweisen, sodass die unter Feldbedingungen häufig subklinisch verlaufende Infektion mit *M. suis* (SPLITTER, 1951; HÖLZLE, 2008) deutlich erkennbar zur Ausprägung kommt. Wie auch die Verwendung hoch aggressiver Erregerstämme, ist die Verwendung splenektomierter Tiere zwar qualifiziert, mögliche Infektionsfolgen in aller Deutlichkeit darzustellen, nicht aber dazu, den Infektionsverlauf unter Feldbedingungen zu simulieren.

Um bewerten zu können, in welchem Ausmaß die Verwendung splenektomierter bzw. nicht splenektomierter Tiere die Versuchsergebnisse beeinflusst, führten STADLER et al. (2014) eine Untersuchung durch, bei der der klinische Verlauf der IAP bei splenektomierten und nicht splenektomierten Schweinen verglichen wurde, denen *M. suis* KI3806 injiziert worden war. Aus dieser Untersuchung ging deutlich hervor, dass *M. suis* KI3806 in den splenektomierten Tieren zwar einen fulminanten Erkrankungsverlauf induzierte, es in den nicht-splenektomierten Tieren aber trotz der Verwendung des hoch virulenten Stammes KI3806 nur zu milden Verläufen kam. Dies geht einher mit einer höheren Erregerlast im Blut splenektomierter Tiere, welche auf die Reduktion der Immunkompetenz dieser Tiere zurückzuführen ist (HÖLZLE, 2008; STADLER et al., 2014).

Dementsprechend kann auch für den Fall einer Feldinfektion davon ausgegangen werden, dass es in den üblicherweise nicht-splenektomierten Tieren zu deutlich mildereren Verläufen einschließlich eines deutlich geringeren Angriffs auf Gewebeschränken kommen dürfte.

2. *M. suis*-positive Plazentaprobe

Markantestes Ergebnis der vorliegenden Studie sind sicher die sechs *M. suis*-positiven Plazentaprobe. Ein entsprechendes Ergebnis konnte nach Kenntnis des Autors bisher noch in keiner wissenschaftlichen Erhebung dargestellt werden. Von DIETZ et al. (2014) wurde bisher lediglich der Nachweis von *M. suis*-DNA in Vaginaltupfern erbracht. Dort konnten in sechs von 11 Vaginaltupfern mediane Erregermengen zwischen $4,7 \times 10^3$ und $5,75 \times 10^4$ *M. suis*/Tupfer gemessen werden.

Außerdem ergab eine Untersuchung von STADLER et al. aus dem Jahre 2019 den starken Hinweis auf eine mögliche vertikale Übertragung des Erregers. Die Evaluation von 474 Blutproben neonataler Ferkel ergab, dass bei 14,4% der Tiere bereits vor der ersten Kolostrumaufnahme *M. suis*-DNA im Blut nachweisbar war. Diese bewegte sich mit durchschnittlich $5,09 \times 10^7$ *M. suis*/mL Blut mit Extremwerten von bis zu $3,46 \times 10^9$ *M. suis*/mL Blut in Bereichen, in denen von einer Infektion der Ferkel unter der Geburt nicht mehr auszugehen ist (STADLER et al., 2019). Wenn es *M. suis* also möglich ist, die Plazentaschranke zu überwinden und die ungeborenen Feten zu infizieren, erscheint es schlüssig, dass ebenfalls ein Übertritt aus dem Blut in sonstige Gewebe erfolgen könnte.

Auch konnte im Rahmen einer Untersuchung von TASKER et al. aus dem Jahre 2009 zum Zeitpunkt maximaler Bakteriämie in sämtlichen Geweben experimentell mit *M. haemofelis* infizierter Katzen *M. haemofelis*-DNA nachgewiesen werden. Zwar reduzierte sich die Nachweisbarkeit des Erregers im Gewebe in den Phasen geringerer Erregerlast im Blut, was eine Kopplung der Erregermengen im Blut und im Gewebe nahelegt, allerdings stützt der Befund unabhängig davon die Annahme, dass grundsätzlich ein Übertritt hämotropher Mycoplasmen über Gewebeschränken möglich ist.

2.1. Urogenitaltrakt-Spezifität bei anderen Mycoplasmen spp.

Es ist hinlänglich bekannt, dass einige relativ eng mit *M. suis* verwandte Mycoplasmen-Spezies den Urogenitaltrakt ihrer Wirte besiedeln. Dies ist beispielsweise für die an den Menschen angepassten Bakterien *Ureaplasma parvum*, *Ureaplasma*

urealyticum und *M. hominis* beschrieben (WAITES, 2006; KOKKAYIL und DHAWAN, 2015). Die Besiedlung von Zervix und Vagina von bis zu 80,0% der asymptomatischen, geschlechtsreifen Frauen ist etwa für *U. urealyticum* beschrieben, sowie in selteneren Fällen auch die des Endometriums (CASSELL et al., 1993). Ebenfalls kann es zu einer Infektion des Chorioamnions kommen, bei der die Erreger in der Amnion-Flüssigkeit nachweisbar sind (CASSELL et al., 1993; CHU et al., 2020). Eine solche Infektion soll mit Chorioamnionitis, Frühgeburten und der Geburt lebensschwacher Neugeborener einhergehen (CASSELL et al., 1993; CHU et al., 2020). Auch eine vertikale Übertragung auf den Nachwuchs ist in diesem Falle möglich (CASSELL et al., 1993; CHU et al., 2020). Hier führen die Erreger zu Erkrankungen des Respirationstraktes sowie des zentralen Nervensystems (CASSELL et al., 1993; CHU et al., 2020).

Eine brasilianische Untersuchung zum Einfluss des noch enger mit *M. suis* verwandten Erregers *Candidatus Mycoplasma haemobos* auf das Abortgeschehen bei Milchkühen konnte in den Organen abortierter Feten *C. M. haemobos*-DNA nachweisen (GIROTTO-SOARES et al., 2016). Eine transplazentare Übertragung scheint mithin auch für diesen Fall gesichert. Die Untersuchung des Blutes der Muttertiere auf *C. M. haemobos* zeigte, dass in zwei Fällen ein Muttertier mit negativem Blutstatus einen Mycoplasmen-positiven Fetus abortiert hatte (GIROTTO-SOARES et al., 2016). Leider erfolgte in diesen Fällen keine weitere Untersuchung der Plazenten der Muttertiere, sodass deren Mycoplasmen-Status unbekannt ist. Die äußeren Umstände legen hier allerdings nahe, dass eine lokal abgegrenzte Infektion des Geschlechtstraktes auf dem Wege der transplazentaren Übertragung auf den Fetus übertragen wurde.

Eine vergleichbare Situation findet sich auch bei den im Rahmen der vorliegenden Arbeit evaluierten Sauen. So hatten bereits die Ergebnisse einer vorangegangenen Untersuchung gezeigt, dass von den Sauen mit *M. suis*-negativem Blutstatus 14 Tiere *M. suis*-positive Ferkel zur Welt gebracht hatten (WILLI, 2017). Für eine dieser Sauen konnte in der vorliegenden Arbeit nun *M. suis*-DNA in der Plazenta nachgewiesen werden. Vier weitere Tiere mit *M. suis*-positivem Plazenta-Ergebnis, die gleichzeitig *M. suis*-DNA im Blut aufwiesen, hatten ebenfalls *M. suis*-positive Ferkel zur Welt gebracht.

Werden die zuvor aufgeführten Erkenntnisse ins Verhältnis zueinander gesetzt, mag dies einen Hinweis darauf darstellen, dass der an das Schwein adaptierte

Erreger *M. suis* zusätzlich zu seiner Lokalisierung im Blut der Tiere - ähnlich wie verwandte Erreger aus der Gruppe der Mycoplasmen – eine Affinität zu den Harn- und Geschlechtsorganen der infizierten Tiere aufweisen könnte, von wo aus er auf dem Wege der vertikalen Übertragung auf die Feten übertragen wird.

2.2. Strukturelle Unsicherheiten

Abschließend soll diskutiert werden, ob bzw. wo in der durchgeführten Untersuchung strukturelle Unsicherheiten liegen könnten, um deren Störpotenzial soweit möglich auszuschließen.

2.2.1. Bearbeitung der Proben

Grundsätzlich besteht im Verlauf der Probenbearbeitung immer ein gewisses Kontaminationsrisiko. Insbesondere wenn – wie in diesem Fall geschehen – die Probenbearbeitung überwiegend bzw. ausschließlich händisch und nicht automatisiert erfolgt. Eine Kontamination des Probenmaterials im Rahmen der Bearbeitung ist im Falle der vorliegenden Arbeit aus den folgenden Gründen allerdings unwahrscheinlich:

Damit es zu einer Verschleppung von Erreger-DNA kommen kann, muss die entsprechende DNA grundsätzlich präsent sein. In dem Labor, in dem die Aufarbeitung der Proben erfolgte, fanden im selben Zeitraum jedoch keine sonstigen Untersuchungen statt, bei denen *M. suis*-DNA beteiligt gewesen wäre. Eine Verschleppung von Erreger-DNA innerhalb der untersuchten Proben würde die Implikationen der Ergebnisse nicht wesentlich ändern, ist ansonsten aber ebenfalls unwahrscheinlich:

Erstens wurde insgesamt nur ein kleiner Anteil der Proben positiv getestet, zweitens wurden nur zwei dieser Proben (06.04 und 06.05) am selben Tag bearbeitet. Bei den vier übrigen Proben war nie mehr als eine positive Probe an einem Tag bearbeitet worden. Zweitens waren während des gesamten Bearbeitungsvorgangs Sicherheitsmaßnahmen in Kraft, die eine Verschleppung der DNA verhindern sollten. So wurden Pipetten mit Filterspitzen verwendet, um eine Verschleppung von

DNA zu vermeiden. Es wurden nie mehr als 10 Proben pro Durchgang bearbeitet und nie mehr als zwei Durchgänge am Tag, um die Aerosolbildung möglichst gering zu halten. Zwischen den beiden Durchgängen lagen jeweils mindestens zwei Stunden Zeit und alle Arbeitsflächen wurden in der Zwischenzeit desinfiziert. Selbstverständlich wurden außerdem die Grundsätze der guten Laborpraxis berücksichtigt.

2.2.2. Möglichkeit der Blutkontamination

Erwogen werden sollte ferner die Möglichkeit einer Kontamination der positiv getesteten Plazentaprobe mit dem Blut der Tiere.

So wie es auch bei Urinproben durch eine Verunreinigung mit Residuen roter Blutkörperchen zu einer Positivtestung des Exkrets kommen kann (HEINRITZI, 1992; GLONEGGER-REICHERT, 2015; ADE et al., 2021), ist ein entsprechender Effekt natürlich grundsätzlich auch für die Untersuchung sonstiger Probenmaterialien denkbar. Insbesondere im Falle des Plazentagewebes erscheint die Annahme berechtigt, dass es auch im vorliegenden Fall zu einer Kontamination des Gewebes mit Blut gekommen sein könnte, da es sich bei der Plazenta um stark durchblutetes Gewebe handelt.

Gegen die Annahme, die Ergebnisse könnten durch eine Blutkontamination verfälscht worden sein, spricht allerdings, dass zum einen im Blut von zwei betroffenen Tieren überhaupt keine *M. suis*-DNA nachweisbar war und dass zum anderen bei den übrigen Tieren keinerlei Korrelation zwischen dem DNA-Gehalt im Blut und dem im Plazentamaterial ersichtlich war (siehe Tabelle 2).

3. *M. suis*-Status der Zuchteber

Da nach wie vor nicht abschließend geklärt ist, wie es zum Eintrag von *M. suis* in naive Tierbestände kommt, ist eine Berücksichtigung von Ebersperma als möglichem Vehikel besondere Aufmerksamkeit zu zollen. Für virale Erkrankungen

wurde 2005 von GUÉRIN und POZZI auf die herausragende epidemiologische Bedeutung von Ebersperma hingewiesen. Bei mit *M. suis* verwandten Mycoplasmen ist die Möglichkeit einer venerischen Übertragung durchaus bekannt (THACKER et al., 1984; HAAPALA et al., 2018; VÉGI et al., 2021). Somit kommt angesichts der üblichen Praxis in der Ferkelproduktion, die Sauen mittels künstlicher Besamung zu befruchten, Besamungsstationen und ihren Zuchtebern eine zentrale Position bei einer potenziellen Verbreitung des Erregers zu (MAES et al., 2008).

Die vorliegende Untersuchung der Blut- und Spermaproben von 183 Zuchtebern hat unabhängig davon keinen Hinweis auf das Vorhandensein von *M. suis* erbracht. Angesichts der üblicherweise hohen Prävalenzen bei adulten Tieren (SONG et al., 2014; ZHONGYANG et al., 2017; GATTO et al., 2019; STADLER et al., 2019) war dies ein unerwartetes Ergebnis. Im Folgenden sollen mögliche Erklärungsansätze kurz erläutert werden.

Im Rahmen der verschiedenen Prävalenzstudien, die es zur Verbreitung von *M. suis* in der Schweinepopulation gibt und die üblicherweise mittels serologischer oder PCR-Untersuchung des Blutes erhoben werden, entfällt regelmäßig nur ein untergeordneter Teil der Aufmerksamkeit auf die Prävalenz in der Teilpopulation der Zuchteber. Dies ist sicher vor allem damit zu erklären, dass es sich angesichts geringer Gesamttierzahlen schwierig gestaltet, die für eine belastbare Prävalenzbestimmung erforderlichen Probenzahlen zusammenzutragen.

Allerdings lassen Erhebungen, die wenigstens in geringem Umfang die Beprobung adulter Eber einschließen, regelmäßig vermuten, dass die Infektionsrate mit *M. suis* für die Teilpopulation adulter Eber über jener der Gesamtpopulation zu liegen scheint. So erhoben zwei chinesische Studien über die serologische Untersuchung des Blutes etwa Prävalenzen bei Ebern von 44,4% (44/99) bzw. 47,1% (114/242), während die Prävalenzen für die gesamte Tierpopulation bei 31,9% (1277/4004) bzw. 33,3% (1150/3458) lagen (SONG et al., 2014; ZHONGYANG et al., 2017).

Eine groß angelegte Prävalenzerhebung von *M. suis*, die allerdings an Spanferkeln beider Geschlechter durchgeführt wurde, ist in Deutschland zuletzt im Jahre 2009 von RITZMANN et al. publiziert worden. Dabei wurde mittels PCR-Untersuchung des Blutes eine durchschnittliche Prävalenzrate von 13,9% der beprobten

Tiere (164/1176) bzw. 40,3% der beprobten Betriebe (79/196) ermittelt. Allerdings ist zu berücksichtigen, dass für die Altersgruppe der Spanferkel andere Prävalenzen anzunehmen sind als bei adulten Ebern und so etwa auch die zuvor genannten chinesischen Studien für jene Altersgruppe Prävalenzwerte in einer vergleichbaren Größenordnung von 12,5% (66/528) bzw. 10,8% (100/923) der Tiere anführen (SONG et al., 2014; ZHONGYANG et al., 2017).

In einer jüngeren Studie aus dem Jahre 2019 ermittelten STADLER et al. in Deutschland auch für die Altersgruppe adulter Sauen mittels PCR-Untersuchung des Blutes auf *M. suis*-DNA eine Infektionsrate von 31,3% (65/208). Es kann also vermutet werden, dass Zahlen in der Größenordnung von 13,9% der Tiere bzw. 40,3% der Betriebe, wie sie von RITZMANN et al. (2009) in Deutschland für die Altersgruppe der Spanferkel ermittelt wurden, für die Teilpopulation adulter Tiere in Deutschland eher zu niedrige Werte sein dürften, da sowohl chinesische Erhebungen zur *M. suis*-Prävalenz bei Ebern (44,4% bzw. 47,1%) und Sauen (47,0% bzw. 45,0%) als auch deutsche Erhebungen zur *M. suis*-Prävalenz bei adulten Sauen (31,3%) deutlich höher liegen (SONG et al., 2014; ZHONGYANG et al., 2017; STADLER et al., 2019).

Werden zur Interpretation der vorliegenden Studie dennoch die Zahlen von RITZMANN et al. (2009) zugrunde gelegt, so kann eine Infektion wenigstens einzelner Tiere – angesichts deren Herkunft von mindestens 26 verschiedenen Eberzuchtbetrieben – immer noch als wahrscheinlich eingestuft werden. Nichtsdestoweniger hat die Untersuchung von Blut und Sperma der Tiere mittels PCR keinen Nachweis von *M. suis*-DNA erbracht.

In diesem Zusammenhang sollte auch Beachtung finden, dass in einer aktuellen Studie von BRISSONNIER et al. (2020) festgestellt wurde, dass für den Fall adulter, tragender Sauen die Rate der *M. suis*-positiven Tiere unter den Jungsauen deutlich höher war als unter den multiparen Tieren (61,0% bzw. 37,0%). Daraus schließen die Autoren, dass es zu einer altersabhängigen Immunitätsentwicklung gegen *M. suis* zu kommen scheint. Eine solche wäre entsprechend auch für den Fall männlicher Tiere zu erwarten, sodass es im Rahmen des Möglichen liegt, dass wenigstens einzelne der beprobten Zuchteber zu einem Zeitpunkt in der Vergangenheit zwar mit *M. suis* infiziert gewesen sein könnten, sich aber auch bei

ihnen eine altersabhängige Immunität entwickelt hat. Diese Hypothese wird durch die vorliegenden Ergebnisse allerdings nicht gestützt und müsste in einer breiter aufgestellten Folgestudie validiert werden. Außerdem konnte an anderer Stelle kein Einfluss der Parität auf die Infektionsrate festgestellt werden (WILLI, 2017).

Anders herum betrachtet, geben die zuvor diskutierten Prävalenzzahlen aber auch keine Gewissheit, dass die in dieser Studie beprobten Tiere notwendigerweise mit *M. suis* infiziert sein müssten. In Abwesenheit eines Nachweises von *M. suis*-DNA im Blut der Tiere kann also auch nicht garantiert werden, dass die Eber überhaupt jemals mit *M. suis* in Berührung gekommen sind.

Eine mögliche Ursache für den *M. suis*-negativen Status der Zuchteber liegt in der separierten Haltung der Einzeltiere auf der Besamungsstation bzw. in den dort allgemein hohen hygienischen Standards sowie sehr begrenzten Zukäufen begründet. Insbesondere ein reduzierter Tierverkehr kann dabei als protektiv angesehen werden (BÜTTNER et al., 2015).

4. Schlussfolgerung

Eine Ausscheidung von *M. suis* unter Feldbedingungen in Speichel und Urin konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden. Ein Nachvollziehen der experimentell erzielten Ergebnisse von DIETZ et al. (2014) war somit nicht möglich. Mögliche Ursachen können in der im Vergleich zum Tierversuch geringeren Virulenz der *M. suis*-Wildtypstämme (GROEBEL et al., 2009; GLONEGGER-REICHERT, 2015) sowie der unbeeinträchtigten Immunität nicht-splenektomierter Tiere (STADLER et al., 2014) gesehen werden. Die Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass in der Praxis eine Exkretion mittels Speichel oder Urin in der Übertragung von *M. suis* eher keine Rolle zu spielen scheint, mithin eine Weiterentwicklung von Hygienemaßnahmen in diese Richtung nicht zielführend erscheint. Gleichzeitig zeigt sich, dass eine diagnostische Verwertung von Speichel, die sich zum Erregernachweis im Schwein zunehmend etabliert (BJUSTROM-KRAFT et al., 2016; SENTHILKUMARAN et al., 2017; PANYASING et al., 2018) zum Nachweis von *M. suis* wohl nicht in Frage kommt. Auf die Verwendung von Blutproben zur Diagnostik von *M. suis* wird also vorerst nicht verzichtet werden können.

Ein Nachweis von *M. suis* in porzinem Plazentagewebe scheint grundsätzlich möglich zu sein. Die dortige Erregerlast stellte sich im Rahmen der vorliegenden Arbeit überdies als unabhängig von einer möglichen Bakteriämie dar. Unter Berücksichtigung der bekannten Affinität mit *M. suis* verwandter Mycoplasmen-Spezies zu den Harn- und Geschlechtsorganen ihrer Wirte (WAITES, 2006; GIROTTO-SOARES et al., 2016) erscheint ein vergleichbares Verhalten von *M. suis* denkbar. Ebenfalls scheint die Tatsache, dass die betreffenden Tiere zum großen Teil Ferkel geboren hatten, für die eine *M. suis*-Infektion nachgewiesen werden konnte, die Annahme einer vertikalen Übertragbarkeit (STADLER et al., 2019) zu bestätigen. Wie regelmäßig und unter welchen Bedingungen eine Infektion des Plazentagewebes nachgewiesen werden kann und inwiefern diese tatsächlich unabhängig von einer Manifestation des Erregers im Blut ist, muss in folgenden Untersuchungen eruiert werden.

Eine Untersuchung des Blutes der Zuchteber konnte trotz üblicherweise hoher Prävalenzzahlen bei adulten Tieren (SONG et al., 2014; ZHONGYANG et al., 2017; GATTO et al., 2019) keinen Hinweis auf eine Infektion mit *M. suis* geben. Mögliche Ursachen hierfür könnten in einer altersabhängigen Genesung (BRISSENIER et al., 2020) oder in hohen hygienischen Standards mit geringem Tierverkehr im Sinne von BÜTTNER et al. (2015) zu sehen sein. Letztlich könnte auch die Herkunft der Proben von nur einer Besamungsstation eine Ursache sein, sofern die beprobte Besamungsstation trotz insgesamt hoher zu erwartender Prävalenz einfach zufällig negativ gewesen ist. Auch eine Untersuchung des Spermas der Tiere mittels PCR lieferte keine positiven Befunde.

Unter Berücksichtigung der fehlenden Nachweisbarkeit von *M. suis*-DNA im Blut der Tiere wäre ein positiver Befund des Spermas zwar ein Indiz für eine blutunabhängige Infektion des Urogenitaltraktes gewesen, umgekehrt bleibt die Möglichkeit der Existenz einer solchen Lokalinfection aber grundsätzlich bestehen, da eine Nativität der Tiere letztlich nicht ausgeschlossen werden kann. Zur weiteren Beurteilung einer möglichen Affinität von *M. suis* zu den männlichen Geschlechtsorganen wären dementsprechend Folgeuntersuchungen, vorzugsweise mit größeren Tierzahlen bzw. unter Einbeziehung eines experimentellen Tiermodells, erforderlich. Ebenfalls wäre eine Berücksichtigung von Ebern aus anderen Haltungssystemen

ein möglicher Ansatz, bei dem die hohen hygienischen Standards, wie sie auf einer Besamungsstation gelten, außer Acht gelassen werden könnten.

VI. Zusammenfassung

Das Ziel dieser Studie war es, eine Vorstellung von der Relevanz möglicher blut-unabhängiger Übertragungswege von *Mycoplasma suis* im Rahmen einer Feldinfektion zu gewinnen. Hierfür wurden zum einen Urin-, Speichel- und Nachgeburtspalten von Sauen und zum anderen Blut- und Spermaproben von 183 Ebern einer Besamungsstation in Süddeutschland mittels qPCR auf *M. suis* untersucht. Die 148 Speichel-, 47 Urin- und 143 Plazentapalten stammten aus Asservaten der Klinik für Schweine der LMU und waren im Rahmen vorangegangener Studien auf 15 bekannt *M. suis*-positiven Betrieben in Süddeutschland gewonnen worden. Die Blut- und Spermapalten der 183 Eber waren auf der Besamungsstation im Rahmen des Routine-Monitorings gewonnen und freundlicherweise von deren Betreiber zur wissenschaftlichen Untersuchung zur Verfügung gestellt worden.

Die DNA-Extraktion der Speichel-, Urin- und Plazentapalten sowie der Eber-Blutpalten erfolgte unter Verwendung des GenElute™ Bacterial Genomic DNA Kits (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland). Die Plazentapalten waren hierfür zunächst homogenisiert worden. Die DNA-Extraktion der Spermapalten erfolgte unter Verwendung des QIAamp® DNA Mini Kits (QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland) in Pools zu je 5 Proben am Lehrstuhl für Virologie des Instituts für Infektionskrankheiten und Zoonosen, Tierärztliche Fakultät der LMU. Die anschließende PCR-Untersuchung wurde am Institut für Nutztierwissenschaften der Universität Hohenheim mittels LightCycler® (LC) 2.0 System (Roche-Diagnostics, Mannheim, Deutschland) durchgeführt.

Die Untersuchung der Speichel- und Urinproben ergab keinen Nachweis von *M. suis*-DNA. Währenddessen zeigte die Beprobung der Nachgeburtspalten bei sechs Tieren ein positives Ergebnis. Aufgrund der Ergebnisse einer früheren Untersuchung war ersichtlich, dass bei zweien dieser Tiere die Blutuntersuchung mittels PCR auf *M. suis*-DNA ein negatives Ergebnis gezeigt hatte, sowie dass außer einem dieser beiden Tiere alle Sauen *M. suis*-positive Ferkel geboren hatten. Allerdings war keinerlei Korrelation der Bakterienzahlen im Blut und im Plazentagewebe ersichtlich.

Die 183 Eber der Besamungsstation entstammten mindestens 26 Eberzuchtbetrieben. Ihr Alter lag zwischen 9 und 77 Monaten und sie verteilten sich auf die Rassen Deutsches Edelschwein (n = 8), Deutsche Landrasse (n = 16), Iberisches Schwein (n = 1), Duroc (n = 6) und Piétrain (n = 150), sowie eine Duroc-Piétrain-Kreuzung (n = 2). Die analysierten Blut- und Spermaproben der Tiere waren zu 100% *M. suis*-negativ. Dies überraschte insofern, als dass für adulte Schweine eine hohe Prävalenz von *M. suis* erwartet wurde.

Die Ergebnisse dieser Untersuchung legen nahe, dass Urin und Speichel in der Übertragung von *M. suis* keine größere Rolle spielen. Hygienekonzepte zum Schutz vor *M. suis* sind entsprechend auf eine Berücksichtigung dieser Körperflüssigkeiten wohl nicht angewiesen. Weiterhin zeigen die Ergebnisse, dass eine Diagnostik mittels Kaustick für *M. suis* eher keine Option darstellt.

Der Nachweis von *M. suis*-DNA im Plazentagewebe stützt die Annahme der vertikalen Übertragbarkeit dieses Erregers. Wie häufig eine solche Organmanifestation auftritt und ob sie tatsächlich von der Präsenz von *M. suis* im Blut des Wirtes unabhängig ist, müssen zukünftige Untersuchungen zeigen.

Ob die Tatsache, dass im Rahmen der vorliegenden Studie kein Nachweis von *M. suis*-DNA im Sperma der Zuchteber möglich war, bedeutet, dass es tatsächlich nicht zu einer Ausscheidung des Erregers mit dem Samen kommt, oder ob dies schlicht auf eine Naivität der Tiere – ggf. im Zusammenhang mit einer altersabhängigen Rekonvaleszenz – zurückzuführen ist, muss im Rahmen künftiger Forschung ermittelt werden.

VII. Summary

The aim of this study was to get an idea of the relevance of potential blood independent transmission routes of *M. suis* in the context of a field infection. For this purpose, saliva, urine and afterbirth specimens of sows on one hand and blood and semen specimens of 183 boars from a boar stud in Southern Germany on the other hand were tested for *Mycoplasma suis* by qPCR. The 148 saliva, 47 urine and 143 placenta specimens originated from retained samples from the Clinic for Swine of the LMU and had been obtained in previous studies on 15 known *M. suis* positive farms in Southern Germany. The blood and semen specimens of the 183 boars had been obtained at the boar stud as part of routine monitoring and kindly provided by the stud operator for scientific investigation.

The DNA extraction of the saliva, urine and placenta specimens as well as the boar blood specimens was conducted using the GenElute™ Bacterial Genomic DNA kit (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany). Therefore, the placental specimens had been preliminarily homogenized. The DNA extraction of the semen specimens was conducted using the QIAamp® DNA Mini kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany) in pools of 5 specimens each at the Department of Virology of the Institute of Infectious Diseases and Zoonoses, Faculty of Veterinary Medicine, LMU Munich. The subsequent PCR examination was performed at the Institute of Animal Science, University of Hohenheim, using the LightCycler® (LC) 2.0 System (Roche-Diagnostics, Mannheim, Germany).

The examination of the saliva and urine specimens did not reveal any evidence of *M. suis* DNA. Meanwhile, sampling of the afterbirth specimens showed a positive result for six animals. Based on the results of an earlier examination, it was apparent that the blood assay by PCR for *M. suis* DNA had shown a negative result in two of these animals, as well as that all but one of these two sows had given birth to *M. suis* positive offspring. However, no correlation of bacterial counts in the blood and in the placental tissue was evident.

The 183 boars on the boar stud originated from at least 26 boar breeding farms. Their age was in between 9 and 77 months and they were allocated to the breeds large white (n = 8), german landrace (n = 16), iberic pig (n = 1), duroc (n = 6), piétrain (n = 150) and a duroc-piétrain-crossover (n = 2). The analyzed blood and semen specimens of the animals were 100% *M. suis* negative. This was quite surprising in that adult pigs had been expected to have a high prevalence of *M. suis*.

The results of this study suggest that urine and saliva have no major impact in the transmission of *M. suis*. Accordingly, hygiene concepts for protection from *M. suis* presumably do not depend on regard of these body fluids. Furthermore, the results show that diagnostics using oral fluids is rather not an option for *M. suis*.

The detection of *M. suis* DNA in the placental tissue corroborates the assumption of vertical transmissibility of this agent. The frequency of such an organ manifestation and whether it is actually independent of the presence of *M. suis* in the host's blood, must be shown by future examination.

Whether the fact that no detection of *M. suis* DNA was possible in the semen of the breeding boars in the present study implies that excretion of the agent within the sperm does indeed not occur, or whether this is simply due to naivety of the animals – possibly in the context of an age-dependent reconvalescence – has to be evaluated in further research.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Anzahl Eber nach Herkunftsbetrieb	35
Abbildung 2: Anzahl Eber nach Rasse	36
Abbildung 3: Anzahl Eber nach Lebensmonaten	37

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Umfang aller zur Verfügung stehenden Speichel-, Urin- und Plazenta-
proben nach Betrieb inklusive *M. suis*-positiver Anteil der Blutproben..... 28

Tabelle 2: Erregerlast (*M. suis*/mL) der positiv auf *M. suis* getesteten Plazenta-
proben im Vergleich zu den Ergebnissen der Blutuntersuchung 33

Tabelle 3: Nachweisbarkeit von *M. suis*-DNA im Blut der Sauen mit *M. suis*-posi-
tivem Plazentamaterial und im Blut ihrer Ferkel..... 34

Literaturverzeichnis

- Acosta, D.B., Ruiz, M., Sanchez, J.P., 2019. First Molecular Detection of *Mycoplasma suis* in the Pig Louse *Haematopinus suis* (Phthiraptera: Anoplura) from Argentina. *Acta tropica* 194, 165-168.
- Ade, J., Ritzmann, M., Wöstmann, C., Eddicks, M., Reese, S., Hoelzle, K., Hoelzle, L.E., Stadler, J., 2021. Update on Shedding and Transmission Routes of Porcine Haemotrophic Mycoplasmas in Naturally and Experimentally Infected Pigs. *Porcine Health Management* 7, 49.
- Adler, S., Ellenbogen, V., 1934. A Note on Two New Blood Parasites of Cattle, *Eperythrozoon* and *Bartonella*. *Journal of Comparative Pathology and Therapeutics* 47, 219-221.
- Albert, L.J., Inman, R.D., 1999. Molecular Mimicry and Autoimmunity. *New England Journal of Medicine* 341, 2068-2074.
- Baljer, G., Heinritzi, K., Wieler, L., 1989. Untersuchungen mit der indirekten Hämagglutination zum *Eperythrozoon suis*-Nachweis in experimentell und spontan infizierten Schweinen. *Journal of Veterinary Medicine, Series B* 36, 417-423.
- Berent, L.M., Messick, J.B., 2003. Physical Map and Genome Sequencing Survey of *Mycoplasma haemofelis* (*Haemobartonella felis*). *Infection and Immunity* 71, 3657-3662.
- Berrier, H.H., Gouge, R.E., 1954. Eperythrozoonosis Transmitted in Utero from Carrier Sows to Their Pigs. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 124, 98-100.

- Bjuström-Kraft, J., Woodard, K., Giménez-Lirola, L., Rotolo, M., Wang, C., Sun, Y., Lasley, P., Zhang, J., Baum, D., Gauger, P., Main, R., Zimmerman, J., 2016. Porcine Epidemic Diarrhea Virus (PEDV) Detection and Antibody Response in Commercial Growing Pigs. *BMC Veterinary Research* 12, 99.
- Brissonnier, M., Normand, V., Leuret, A., Moalic, P.-Y., Guyomard, A.-S., Bachy, V., Berton, P., Auvigne, V., Bouchet, F., Boulbria, G., 2020. Frequency of Infection with *Mycoplasma suis* in Gestating Sows Using qPCR on Ten Commercial French Herds, and Impact of the Infection on Clinical, Haematological and Biochemical Parameters. *Porcine Health Management* 6, 1-6.
- Burgos, R., Pich, O.Q., Ferrer-Navarro, M., Baseman, J.B., Querol, E., Piñol, J., 2006. *Mycoplasma genitalium* P140 and P110 Cytadhesins Are Reciprocally Stabilized and Required for Cell Adhesion and Terminal-Organelle Development. *Journal of Bacteriology* 188, 8627-8637.
- Büttner, K., Krieter, J., Traulsen, I., 2015. Characterization of Contact Structures for the Spread of Infectious Diseases in a Pork Supply Chain in Northern Germany by Dynamic Network Analysis of Yearly and Monthly Networks. *Transboundary and Emerging Diseases* 62, 188-199.
- Cassell, G., Waites, K., Watson, H., Crouse, D., Harasawa, R., 1993. *Ureaplasma urealyticum* Intrauterine Infection: Role in Prematurity and Disease in Newborns. *Clinical Microbiology Reviews* 6, 69-87.
- Chaudhry, R., Varshney, A.K., Malhotra, P., 2007. Adhesion Proteins of *Mycoplasma pneumoniae*. *Frontiers in Bioscience* 12, 690-699.
- Chu, A., de St Maurice, A., Sim, M.S., Kallapur, S.G., 2020. Neonatal *Mycoplasma* and *Ureaplasma* Infections. *Pediatric Annals* 49, e305-e312.
- Claxton, M., Kunesh, J.P., 1975. Eperythrozoonosis in Swine. *Iowa State University Veterinarian* 37, 4.

- Dent, B.T., Stevens, K.A., Korvick, D.L., Clymer, J.W., 2013. *Mycoplasma suis* Infection in Pigs after Splenectomy. *Lab Animal* 42, 125-128.
- Dias, G.B., do Amaral, R.B., Gatto, I.R.H., Lapera, I.M., de Oliveira, L.G., Hoppe, E.G.L., Machado, R.Z., André, M.R., 2019. Molecular Detection of *Mycoplasma suis* in Captive White-Lipped Peccaries (*Tayassu pecari*) and Wild Boars (*Sus scrofa*) in Brazil. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 63, 94-96.
- Dietz, S., Lassek, C., Mack, S.L., Ritzmann, M., Stadler, J., Becher, D., Hoelzle, K., Riedel, K., Hoelzle, L.E., 2016. Updating the Proteome of the Uncultivable Hemotrophic *Mycoplasma suis* in Experimentally Infected Pigs. *Proteomics* 16, 609-613.
- Dietz, S., Mack, S.L., Hoelzle, K., Becker, K., Jannasch, C., Stadler, J., Ritzmann, M., Hoelzle, L.E., 2014. Quantitative PCR Analysis of *Mycoplasma suis* Shedding Patterns During Experimental Infection. *Veterinary Microbiology* 172, 581-585.
- do Nascimento, N.C., dos Santos, A.P., Chu, Y., Guimaraes, A.M., Baird, A.N., Weil, A.B., Messick, J.B., 2014. Microscopy and Genomic Analysis of *Mycoplasma parvum* Strain Indiana. *Veterinary Research* 45, 86.
- do Nascimento, N.C., Dos Santos, A.P., Chu, Y., Guimaraes, A.M., Pagliaro, A., Messick, J.B., 2013. Genome Sequence of *Mycoplasma parvum* (Formerly *Eperythrozoon parvum*), a Diminutive Hemoplasma of the Pig. *Genome Announcements* 1.
- dos Santos, A.P., dos Santos, R.P., Biondo, A.W., Dora, J.M., Goldani, L.Z., De Oliveira, S.T., de Sá Guimarães, A.M., Timenetsky, J., De Moraes, H.A., González, F.H., 2008. Hemoplasma Infection in HIV-Positive Patient, Brazil. *Emerging Infectious Diseases* 14, 1922.

- Doyle, L., 1932. A Rickettsia-Like or Anaplasmosis-Like Disease in Swine. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 81, 668-671.
- Felder, K.M., Carranza, P.M., Gehrig, P.M., Roschitzki, B., Barkow-Oesterreicher, S., Hoelzle, K., Riedel, K., Kube, M., Hoelzle, L.E., 2012. Insights into the Gene Expression Profile of Uncultivable Hemotrophic *Mycoplasma suis* During Acute Infection, Obtained Using Proteome Analysis. *Journal of Bacteriology* 194, 1505-1514.
- Felder, K.M., Hoelzle, K., Heinritzi, K., Ritzmann, M., Hoelzle, L.E., 2010. Antibodies to Actin in Autoimmune Haemolytic Anaemia. *BMC Veterinary Research* 6, 18.
- Felder, K.M., Hoelzle, K., Ritzmann, M., Kilchling, T., Schiele, D., Heinritzi, K., Groebel, K., Hoelzle, L.E., 2011. Hemotrophic Mycoplasmas Induce Programmed Cell Death in Red Blood Cells. *Cellular Physiology and Biochemistry* 27, 557-564.
- Fu, Y., Shi, T., Xu, L., Wei, W., Lu, F., Zhang, X., Yuan, X., Li, J., Lv, J., Fang, W., 2017. Identification of a Novel Hemoplasma Species from Pigs in Zhejiang Province, China. *The Journal of Veterinary Medical Science* 79, 864-870.
- Gatto, I.R.H., Sonalio, K., Amaral, R.B.D., Mores, N., Dalla Costa, O.A., Andre, M.R., de Oliveira, L.G., 2019. High Frequency and Molecular Characterization of Porcine Hemotrophic Mycoplasmas in Brazil. *Veterinary Microbiology* 231, 33-39.
- Giroto-Soares, A., Soares, J.F., Bogado, A.L.G., de Macedo, C.A.B., Sandeski, L.M., Garcia, J.L., Vidotto, O., 2016. 'Candidatus Mycoplasma haemobos': Transplacental Transmission in Dairy Cows (*Bos taurus*). *Veterinary Microbiology* 195, 22-24.

- Glonegger-Reichert, J., 2015. Klinischer Krankheitsverlauf der Infektösen Anämie der Schweine und Ausscheidungswege von *Mycoplasma suis* nach experimenteller Infektion splenektomierter Schweine mit dem Feldstamm K323/13. Diss. med. vet. Ludwig-Maximilians-Universität, München.
- Grimm, J., 2008. Untersuchungen zur Prävalenz von *Mycoplasma suis* in Deutschland sowie vergleichende Untersuchungen zwischen real-time Polymerasekettenreaktion und Akridin-Ausstrich bezüglich ihrer Sensitivität und Spezifität. Diss. med. vet. Ludwig-Maximilians-Universität, München.
- Groebel, K., Hoelzle, K., Wittenbrink, M.M., Ziegler, U., Hoelzle, L.E., 2009. *Mycoplasma suis* Invades Porcine Erythrocytes. *Infection and Immunity* 77, 576-584.
- Guérin, B., Pozzi, N., 2005. Viruses in Boar Semen: Detection and Clinical as Well as Epidemiological Consequences Regarding Disease Transmission by Artificial Insemination. *Theriogenology* 63, 556-572.
- Guimaraes, A.M., Biondo, A.W., Lara, A.C., Messick, J.B., 2007. Exploratory Study of *Mycoplasma suis* (*Eperythrozoon suis*) on Four Commercial Pig Farms in Southern Brazil. *The Veterinary Record* 160, 50-53.
- Guimaraes, A.M., Santos, A.P., do Nascimento, N.C., Timenetsky, J., Messick, J.B., 2014. Comparative Genomics and Phylogenomics of Hemotrophic *Mycoplasmas*. *PLoS One* 9, e91445.
- Guimaraes, A.M., Santos, A.P., SanMiguel, P., Walter, T., Timenetsky, J., Messick, J.B., 2011a. Complete Genome Sequence of *Mycoplasma suis* and Insights into Its Biology and Adaption to an Erythrocyte Niche. *PLoS One* 6, e19574.

- Guimaraes, A.M., Vieira, R.F., Poletto, R., Vemulapalli, R., Santos, A.P., de Moraes, W., Cubas, Z.S., Santos, L.C., Marchant-Forde, J.N., Timenetsky, J., Biondo, A.W., Messick, J.B., 2011b. A Quantitative TaqMan PCR Assay for the Detection of *Mycoplasma suis*. *Journal of Applied Microbiology* 111, 417-425.
- Gwaltney, S.M., 1995. *Eperythrozoon suis* Infections in Pigs: Clinical Syndromes and Diagnosis. *Swine Health and Production: The Official Journal of the American Association of Swine Practitioners (USA)*.
- Gwaltney, S.M., Hays, M.P., Oberst, R.D., 1993. Detection of *Eperythrozoon suis* Using the Polymerase Chain Reaction. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 5, 40-46.
- Gwaltney, S.M., Oberst, R.D., 1994. Comparison of an Improved Polymerase Chain Reaction Protocol and the Indirect Hemagglutination Assay in the Detection of *Eperythrozoon suis* Infection. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 6, 321-325.
- Haapala, V., Pohjanvirta, T., Vähänikkilä, N., Halkilahti, J., Simonen, H., Pelkonen, S., Soveri, T., Simojoki, H., Autio, T., 2018. Semen as a Source of *Mycoplasma bovis* Mastitis in Dairy Herds. *Veterinary Microbiology* 216, 60-66.
- Haas, L., Beer, M. 2015a. Direkter Erregernachweis bei Virusinfektion. In *Tiermedizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre*, Selbitz, H.-J., Truyen, U., Valentin-Weigand, P., eds. (Enke Verlag), S. 75 - 90.
- Haas, L., Beer, M. 2015b. Indirekter Erregernachweis. In *Tiermedizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre*, Selbitz, H.-J., Truyen, U., Valentin-Weigand, P., eds. (Enke Verlag), S. 90 - 94.
- Heinritzi, K., 1984. Ein Beitrag zur Splenektomie beim Schwein. *Tierärztliche Praxis* 12, 451-454.

- Heinritzi, K., 1986. Vergiftungen beim Schwein. Tierärztliche Praxis 14, 219-230.
- Heinritzi, K., 1989. Eperythrozoon-Infektion beim Schwein als Faktorenkrankheit. Berliner und Münchener tierärztliche Wochenschrift 102, 337-342.
- Heinritzi, K., 1990a. Untersuchung zur Pathogenese und Diagnostik der Infektion mit *Eperythrozoon suis*. Habilitationsschrift. München.
- Heinritzi, K., 1990b. Zur Diagnostik der *Eperythrozoon-suis*-Infektion. Tierärztliche Praxis 18, 477-481.
- Heinritzi, K., 1992. Untersuchungen zur Übertragbarkeit von *Eperythrozoon suis*. Tierärztliche Umschau 47, 588-599.
- Heinritzi, K. 2006. Blutkrankheiten. In Schweinekrankheiten, Heinritzi, K., Gindel, H.R., Reiner, G., Schnurrbusch, U., eds. (UTB), 51 - 61.
- Heinritzi, K., Plank, G., 1992. Einfluss der *Eperythrozoon-suis*-Infektion auf die osmotische Resistenz der Erythrozyten. Berliner und Münchener tierärztliche Wochenschrift 105, 380-383.
- Heinritzi, K., Plank, G., Peteranderl, W., Sandner, N., 1990. Untersuchungen zum Säure-Basen-Haushalt und Kohlenhydratstoffwechsel bei der Infektion mit *Eperythrozoon suis*. Journal of Veterinary Medicine, Series B 37, 412-417.
- Henderson, J.P., O'Hagan, J., Hawe, S.M., Pratt, M.C., 1997. Anaemia and Low Viability in Piglets Infected with *Eperythrozoon suis*. The Veterinary Record 140, 144-146.
- Hölzle, K., Doser, S., Ritzmann, M., Heinritzi, K., Palzer, A., Elicker, S., Kramer, M., Felder, K.M., Hölzle, L.E., 2009. Vaccination with the *Mycoplasma suis* Recombinant Adhesion Protein MSG1 Elicits a Strong Immune Response but Fails to Induce Protection in Pigs. Vaccine 27, 5376-5382.

- Hölzle, K., Engels, M., Kramer, M.M., Wittenbrink, M.M., Dieckmann, S.M., Hölzle, L.E., 2010. Occurrence of *Mycoplasma suis* in Wild Boars (*Sus scrofa* L.). *Veterinary Microbiology* 143, 405-409.
- Hölzle, K., Grimm, J., Ritzmann, M., Heinritzi, K., Torgerson, P., Hamburger, A., Wittenbrink, M.M., Hölzle, L.E., 2007a. Use of Recombinant Antigens to Detect Antibodies against *Mycoplasma suis*, with Correlation of Serological Results to Hematological Findings. *Clinical and Vaccine Immunology* 14, 1616-1622.
- Hölzle, L.E., 2007. Zur Bedeutung der haemotrophen Mycoplasmen in der Veterinärmedizin unter besonderer Berücksichtigung der *Mycoplasma suis*-Infektion beim Schwein. *Berliner und Münchener tierärztliche Wochenschrift* 120, 34-41.
- Hölzle, L.E., 2008. Haemotrophic Mycoplasmas: Recent Advances in *Mycoplasma suis*. *Veterinary Microbiology* 130, 215-226.
- Hölzle, L.E., Adelt, D., Hölzle, K., Heinritzi, K., Wittenbrink, M.M., 2003. Development of a Diagnostic PCR Assay Based on Novel DNA Sequences for the Detection of *Mycoplasma suis* (*Eperythrozoon suis*) in Porcine Blood. *Veterinary Microbiology* 93, 185-196.
- Hölzle, L.E., Felder, K.M., Hölzle, K., 2011. Porzine Eperythrozoonose: Von *Eperythrozoon suis* zu *Mycoplasma suis*. *Tierärztliche Praxis. Ausgabe G, Großtiere/Nutztiere* 39, 215-220.
- Hölzle, L.E., Helbling, M., Hölzle, K., Ritzmann, M., Heinritzi, K., Wittenbrink, M.M., 2007b. First LightCycler Real-Time PCR Assay for the Quantitative Detection of *Mycoplasma suis* in Clinical Samples. *Journal of Microbiological Methods* 70, 346-354.

- Hölzle, L.E., Hölzle, K., Harder, A., Ritzmann, M., Aupperle, H., Schoon, H.A., Heinritzi, K., Wittenbrink, M.M., 2007c. First Identification and Functional Characterization of an Immunogenic Protein in Unculturable Haemotrophic *Mycoplasmas* (*Mycoplasma suis* HspA1). *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 49, 215-223.
- Hölzle, L.E., Hölzle, K., Helbling, M., Aupperle, H., Schoon, H.A., Ritzmann, M., Heinritzi, K., Felder, K.M., Wittenbrink, M.M., 2007d. MSG1, a Surface-Localized Protein of *Mycoplasma suis* Is Involved in the Adhesion to Erythrocytes. *Microbes and Infection* 9, 466-474.
- Hölzle, L.E., Hölzle, K., Ritzmann, M., Heinritzi, K., Wittenbrink, M.M., 2006. *Mycoplasma suis* Antigens Recognized During Humoral Immune Response in Experimentally Infected Pigs. *Clinical and Vaccine Immunology* 13, 116-122.
- Hölzle, L.E., Zeder, M., Felder, K.M., Hölzle, K., 2014. Pathobiology of *Mycoplasma suis*. *The Veterinary Journal* 202, 20-25.
- Hornok, S., Sugár, L., de Mera, I.G.F., de la Fuente, J., Horváth, G., Kovács, T., Micsutka, A., Gönczi, E., Flaisz, B., Takács, N., 2018. Tick- and Fly-Borne Bacteria in Ungulates: The Prevalence of *Anaplasma phagocytophilum*, Haemoplasmas and Rickettsiae in Water Buffalo and Deer Species in Central Europe, Hungary. *BMC Veterinary Research* 14, 98.
- Hsu, F.S., Liu, M., Chou, S., Zachary, J., Smith, A., 1992. Evaluation of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Detection of *Eperythrozoon suis* Antibodies in Swine. *American Journal of Veterinary Research* 53, 352-354.
- Hsu, T., Minion, F.C., 1998. Molecular Analysis of the P97 Cilium Adhesin Operon of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Gene* 214, 13-23.

- Hu, P., Schaper, U., Collier, A., Clyde, W., Horikawa, M., Huang, Y., Barile, M., 1987. A *Mycoplasma genitalium* Protein Resembling the *Mycoplasma pneumoniae* Attachment Protein. *Infection and Immunity* 55, 1126-1131.
- Hu, Z., Yin, J., Shen, K., Kang, W., Chen, Q., 2009. Outbreaks of Hemotrophic *Mycoplasma* Infections in China. *Emerging Infectious Diseases* 15.
- Huang, D.-S., Guan, P., Wu, W., Shen, T.-F., Liu, H.-L., Cao, S., Zhou, H., 2012. Infection Rate of *Eperythrozoon* spp. In Chinese Population: A Systematic Review and Meta-Analysis since the First Chinese Case Reported in 1991. *BMC Infectious Diseases* 12, 171.
- Jüngling, A., Erhard, M.H., Heinritzi, K., Losch, U., 1994. Significance and Course of a Cold Agglutinin in *Eperythrozoon suis* Infection of Swine. *Berliner und Münchener tierärztliche Wochenschrift* 107, 271-275.
- Kinsley, A., 1932. Protozoan-Like Body in the Blood of Swine. *Veterinary Medicine* 27, 196.
- Kokkayil, P., Dhawan, B., 2015. *Ureaplasma*: Current Perspectives. *Indian Journal of Medical Microbiology* 33, 205-214.
- Köppen, M., 2015. Untersuchung über intrauterine Infektionen von Ferkeln mit dem Porzinen Circovirus Typ 2 (PCV2) sowie der Ausscheidung von PCV2 bei Muttersauen in Bayern. Diss. med. vet. Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Korn, G., Mussgay, M., 1968. Ein Fall von *Eperythrozoon suis* mit differentialdiagnostischer Bedeutung bei einem Schweinepestverdacht. *Zentralblatt für Veterinärmedizin. Reihe B.* 15, 617-630.
- Kreier, J., Gothe, R., 1976. Aegyptianellosis, Eperythrozoonosis, Grahamellosis and Haemobartonellosis. *Veterinary Parasitology* 2, 83-95.

- Kreier, J.P., Ristic, M., 1984. Genus III *Haemobartonella*; Genus IV *Eperythrozoon*. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 1, 724-729.
- Lang, F., Abed, M., Lang, E., Foeller, M., 2014. Oxidative Stress and Suicidal Erythrocyte Death. *Antioxidants & Redox Signaling* 21, 138-153.
- Lang, F., Lang, E., Föller, M., 2012. Physiology and Pathophysiology of Eryptosis. *Transfusion Medicine and Hemotherapy* 39, 308-314.
- Lang, F., Lang, K.S., Lang, P.A., Huber, S.M., Wieder, T., 2006. Mechanisms and Significance of Eryptosis. *Antioxidants & Redox Signaling* 8, 1183-1192.
- Lang, F., Qadri, S.M., 2012. Mechanisms and Significance of Eryptosis, the Suicidal Death of Erythrocytes. *Blood Purification* 33, 125-130.
- Lang, K., Lang, P., Bauer, C., Duranton, C., Wieder, T., Huber, S., Lang, F., 2005. Mechanisms of Suicidal Erythrocyte Death. *Cellular Physiology and Biochemistry* 15, 195-202.
- Layh-Schmitt, G., Podtelejnikov, A., Mann, M., 2000. Proteins Complexed to the P1 Adhesin of *Mycoplasma pneumoniae*. *Microbiology* 146, 741-747.
- Liebich, H.G., Heinritzi, K., 1992. Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen an *Eperythrozoon suis*. *Tierärztliche Praxis* 20, 270-274.
- Ma, L., Jensen, J.S., Mancuso, M., Hamasuna, R., Jia, Q., McGowin, C.L., Martin, D.H., 2010. Genetic Variation in the Complete MgPa Operon and Its Repetitive Chromosomal Elements in Clinical Strains of *Mycoplasma genitalium*. *PLoS One* 5, e15660.
- Maes, D., Nauwynck, H., Rijsselaere, T., Mateusen, B., Vyt, P., de Kruif, A., Van Soom, A., 2008. Diseases in Swine Transmitted by Artificial Insemination: An Overview. *Theriogenology* 70, 1337-1345.

- Maggi, R.G., Compton, S.M., Trull, C.L., Mascarelli, P.E., Mozayeni, B.R., Breitschwerdt, E.B., 2013. Infection with Hemotropic Mycoplasma Species in Patients with or without Extensive Arthropod or Animal Contact. *Journal of Clinical Microbiology* 51, 3237-3241.
- Marmorston, J., 1935. Effect of Splenectomy on a Latent Infection, *Eperythrozoon coccoides*, in White Mice. *The Journal of Infectious Diseases*, 142-152.
- Messick, J.B., 2003. New Perspectives About Hemotropic Mycoplasma (Formerly, *Haemobartonella* and *Eperythrozoon* Species) Infections in Dogs and Cats. *Veterinary Clinics: Small Animal Practice* 33, 1453-1465.
- Messick, J.B., 2004. Hemotropic Mycoplasmas (Hemoplasmas): A Review and New Insights into Pathogenic Potential. *Veterinary Clinical Pathology* 33, 2-13.
- Messick, J.B., Cooper, S.K., Huntley, M., 1999. Development and Evaluation of a Polymerase Chain Reaction Assay Using the 16s rRNA Gene for Detection of *Eperythrozoon suis* Infection. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 11, 229-236.
- Messick, J.B., Smith, G., Berent, L., Cooper, S., 2000. Genome Size of *Eperythrozoon suis* and Hybridization with 16s rRNA Gene. *Canadian Journal of Microbiology* 46, 1082-1086.
- Messick, J.B., Walker, P.G., Raphael, W., Berent, L., Shi, X., 2002. '*Candidatus* Mycoplasma haemodidelphidis' sp. nov., '*Candidatus* Mycoplasma haemolamae' sp. nov. and *Mycoplasma haemocanis* comb. nov., Hemotropic Parasites from a Naturally Infected Opossum (*Didelphis virginiana*), Alpaca (*Lama pacos*) and Dog (*Canis familiaris*): Phylogenetic and Secondary Structural Relatedness of Their 16s rRNA Genes to Other Mycoplasmas. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52, 693-698.

- Müller, M., 2021. Porzines Circovirus Typ 3 in Serum- und Spermaproben von Zuchtebern einer süddeutschen Besamungsstation. Diss. med. vet. Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Neimark, H., Johansson, K.-E., Rikihisa, Y., Tully, J.G., 2002. Revision of Haemotrophic Mycoplasma Species Names. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52, 683-683.
- Neimark, H., Johansson, K.E., Rikihisa, Y., Tully, J.G., 2001. Proposal to Transfer Some Members of the Genera *Haemobartonella* and *Eperythrozoon* to the Genus *Mycoplasma* with Descriptions of '*Candidatus Mycoplasma haemofelis*', '*Candidatus Mycoplasma haemomuris*', '*Candidatus Mycoplasma haemosuis*' and '*Candidatus Mycoplasma wenyonii*'. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51, 891-899.
- Neimark, H., Kocan, K.M., 1997. The Cell Wall-Less Rickettsia *Eperythrozoon wenyonii* Is a *Mycoplasma*. *FEMS Microbiology Letters* 156, 287-291.
- Neitz, W., Alexander, R., Du Toit, P., 1934. *Eperythrozoon ovis* (sp. nov.) Infection in Sheep. *Onderstepoort Journal of Veterinary Science and Animal Industry* 3.
- Nonaka, N., Thacker, B., van Veen, T.S., Bull, R., 1996. *In Vitro* Maintenance of *Eperythrozoon suis*. *Veterinary Parasitology* 61, 181-199.
- Oehlerking, J., Kube, M., Felder, K.M., Matter, D., Wittenbrink, M.M., Schwarzenbach, S., Kramer, M.M., Hoelzle, K., Hoelzle, L.E., 2011. Complete Genome Sequence of the Hemotrophic *Mycoplasma suis* Strain KI3806. *Journal of Bacteriology* 193, 2369-2370.
- Packman, C.H., 2008. Hemolytic Anemia Due to Warm Autoantibodies. *Blood Reviews* 22, 17-31.

- Panyasing, Y., Kedkovid, R., Kittawornrat, A., Ji, J., Zimmerman, J., Thanawongnuwech, R., 2018. Detection of Aujeszky's Disease Virus DNA and Antibody in Swine Oral Fluid Specimens. *Transboundary and Emerging Diseases* 65, 1828-1835.
- Pereyra, N.B., Sarradell, J.E., Cane, F.D., Francois, S.E., Pidone, C.L., Comba, E.R., Rodriguez, F., Guglielmone, A.A., 2006. [Detection of *Mycoplasma suis* in Clinical Cases with Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome in Swine]. *Revista Argentina de Microbiologia* 38, 130-133.
- Peteranderl, W., 1988. Untersuchungen über den Glucose-, Lactat- und Pyruvatgehalt sowie den Säure-Basenhaushalt im venösen Blut bei der Eperythrozoonose des Schweines. Diss. med. vet. Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Peters, I.R., Helps, C.R., McAuliffe, L., Neimark, H., Lappin, M.R., Gruffydd-Jones, T.J., Day, M.J., Hoelzle, L.E., Willi, B., Meli, M., 2008. RNase P RNA Gene (*mpB*) Phylogeny of Hemoplasmas and Other *Mycoplasma* Species. *Journal of Clinical Microbiology* 46, 1873-1877.
- Pitcher, D., Nicholas, R., 2005. *Mycoplasma* Host Specificity: Fact or Fiction? *The Veterinary Journal* 170, 300-306.
- Plank, G., Heinritzi, K., 1990. Disseminierte intravasale Gerinnung bei der Eperythrozoonose des Schweines. *Berliner und Münchener tierärztliche Wochenschrift* 103, 13-18.
- Pospischil, A., Hoffmann, R., 1982. *Eperythrozoon suis* in Naturally Infected Pigs: A Light and Electron Microscopic Study. *Veterinary Pathology* 19, 651-657.
- Preston, K., Greve, J., 1965. Eperythrozoonosis in 4-Week-Old Pigs. *Iowa State University Veterinarian* 27, 6.

- Prullage, J.B., Williams, R.E., Gaafar, S.M., 1993. On the Transmissibility of *Eperythrozoon suis* by *Stomoxys calcitrans* and *Aedes aegypti*. *Veterinary Parasitology* 50, 125-135.
- Reiner, G. 2015a. Erkrankungen des Blutes. Krankes Schwein - Kranker Bestand. Verlag Eugen Ulmer Stuttgart, 105 - 110.
- Reiner, G. 2015b. Infektionskrankheiten. Krankes Schwein - Kranker Bestand. Verlag Eugen Ulmer Stuttgart, 204 - 208.
- Rikihisa, Y., Kawahara, M., Wen, B., Kociba, G., Fuerst, P., Kawamori, F., Suto, C., Shibata, S., Futohashi, M., 1997. Western Immunoblot Analysis of *Haemobartonella muris* and Comparison of 16s rRNA Gene Sequences of *H. muris*, *H. felis*, and *Eperythrozoon suis*. *Journal of Clinical Microbiology* 35, 823-829.
- Ritzmann, M., Grimm, J., Heinritzi, K., Hoelzle, K., Hoelzle, L.E., 2009. Prevalence of *Mycoplasma suis* in Slaughter Pigs, with Correlation of PCR Results to Hematological Findings. *Veterinary Microbiology* 133, 84-91.
- Rottem, S., 2003. Interaction of Mycoplasmas with Host Cells. *Physiological Reviews* 83, 417-432.
- Schmidt, P., Kaspers, B., Jungling, A., Heinritzi, K., Losch, U., 1992. Isolation of Cold Agglutinins in *Eperythrozoon suis*-Infected Pigs. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 31, 195-201.
- Schmidt, U., Trautwein, G., Hertrampf, B., Ehard, H., Fiedler, H., 1977. Thrombozytopenische Purpura beim Saugferkel Morphologische, hämatologische und serologische Untersuchungen. *Zentralblatt für Veterinärmedizin Reihe B* 24, 386-397.

- Schreiner, S.A., Hoelzle, K., Hofmann-Lehmann, R., Hamburger, A., Wittenbrink, M.M., Kramer, M.M., Sokoli, A., Felder, K.M., Groebel, K., Hoelzle, L.E., 2012a. Nanotransformation of the Haemotrophic *Mycoplasma suis* During *In Vitro* Cultivation Attempts Using Modified Cell Free *Mycoplasma Media*. *Veterinary Microbiology* 160, 227-232.
- Schreiner, S.A., Sokoli, A., Felder, K.M., Wittenbrink, M.M., Schwarzenbach, S., Guhl, B., Hoelzle, K., Hoelzle, L.E., 2012b. The Surface-Localised α -Enolase of *Mycoplasma suis* Is an Adhesion Protein. *Veterinary Microbiology* 156, 88-95.
- Schuller, W., Heinritzi, K., al-Nuktha, S., Kolbl, S., Schuh, M., 1990. Serologische Verlaufsuntersuchungen mittels KBR und ELISA zum Nachweis von Antikörpern gegen die *Eperythrozoon*-Infektion des Schweines. *Berliner und Münchener tierärztliche Wochenschrift* 103, 9-12.
- Senthilkumar, C., Yang, M., Bittner, H., Ambagala, A., Lung, O., Zimmerman, J., Giménez-Lirola, L.G., Nfon, C., 2017. Detection of Genome, Antigen, and Antibodies in Oral Fluids from Pigs Infected with Foot-and-Mouth Disease Virus. *Canadian Journal of Veterinary Research* 81, 82-90.
- Seo, M.G., Kwon, O.D., Kwak, D., 2019. Prevalence and Phylogenetic Analysis of Hemoplasma Species in Domestic Pigs in Korea. *Parasites & Vectors* 12, 378.
- Sisk, D.B., Cole Jr, J.R., Pursell, A.R. 1980. Serologic Incidence of Eperythrozoonosis in Georgia Swine. In: *Proceedings of the Annual Meeting of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians*, 91-99.
- Smith, A., Rahn, T., 1975. An Indirect Hemagglutination Test for the Diagnosis of *Eperythrozoon suis* Infection in Swine. *American Journal of Veterinary Research* 36, 1319-1321.

- Smith, J.E., Cipriano, J.E., Hall, S.M., 1990. *In Vitro* and *In Vivo* Glucose Consumption in Swine Eperythrozoonosis. *Journal of Veterinary Medicine, Series B* 37, 587-592.
- Sokoli, A., Groebel, K., Hoelzle, K., Amselgruber, W.M., Mateos, J.M., Schneider, M.K., Ziegler, U., Felder, K.M., Hoelzle, L.E., 2013. *Mycoplasma suis* Infection Results Endothelial Cell Damage and Activation: New Insight into the Cell Tropism and Pathogenicity of Hemotrophic Mycoplasma. *Veterinary Research* 44, 6.
- Song, Q., Zhang, W., Song, W., Liu, Z., Khan, M.K., He, L., Fang, R., Li, P., Zhou, Y., Hu, M., Zhao, J., 2014. Seroprevalence and Risk Factors of *Mycoplasma suis* Infection in Pig Farms in Central China. *Preventive Veterinary Medicine* 117, 215-221.
- Splitter, E., Castro, E., 1957. Antibiotic Therapy in Acute Eperythrozoonosis of Swine. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 131, 293-294.
- Splitter, E.J., 1950a. *Eperythrozoon suis* n. sp. and *Eperythrozoon parvum* n. sp., 2 New Blood Parasites of Swine. *Science* 111, 513-514.
- Splitter, E.J., 1950b. *Eperythrozoon suis*, the Etiologic Agent of Ictero-Anemia or an Anaplasmosis-Like Disease in Swine. *American Journal of Veterinary Research* 11, 324-330.
- Splitter, E.J., 1951. Eperythrozoonosis in Swine. *Iowa State University Veterinarian* 13, 3.
- Splitter, E.J., 1958. The Complement-Fixation Test in Diagnosis of Eperythrozoonosis in Swine. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 132, 47-49.

- Stadler, J., Jannasch, C., Mack, S., Dietz, S., Zöls, S., Ritzmann, M., Hoelzle, K., Hoelzle, L., 2014. Clinical and Haematological Characterisation of *Mycoplasma suis* Infections in Splenectomised and Non-Splenectomised Pigs. *Veterinary Microbiology* 172, 294-300.
- Stadler, J., Willi, S., Ritzmann, M., Eddicks, M., Ade, J., Hoelzle, K., Hoelzle, L.E., 2019. Detection of *Mycoplasma suis* in Pre-Suckling Piglets Indicates a Vertical Transmission. *BMC Veterinary Research* 15, 252.
- Steer, J.A., Tasker, S., Barker, E.N., Jensen, J., Mitchell, J., Stocki, T., Chalker, V.J., Hamon, M., 2011. A Novel Hemotropic Mycoplasma (Hemoplasma) in a Patient with Hemolytic Anemia and Pyrexia. *Clinical Infectious Diseases* 53, e147-e151.
- Stoffregen, W., Alt, D., Palmer, M., Olsen, S., Waters, W., Stasko, J., 2006. Identification of a Haemomycoplasma Species in Anemic Reindeer (*Rangifer tarandus*). *Journal of Wildlife Diseases* 42, 249-258.
- Strait, E.L., Hawkins, P.A., Wilson, W.D., 2012. Dysgalactia Associated with *Mycoplasma suis* Infection in a Sow Herd. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 241, 1666-1667.
- Tasker, S., Helps, C.R., Day, M.J., Harbour, D.A., Shaw, S.E., Harrus, S., Baneth, G., Lobetti, R.G., Malik, R., Beaufils, J.P., Belford, C.R., Gruffydd-Jones, T.J., 2003. Phylogenetic Analysis of Hemoplasma Species: An International Study. *Journal of Clinical Microbiology* 41, 3877-3880.
- Tasker, S., Peters, I.R., Day, M.J., Willi, B., Hofmann-Lehmann, R., Gruffydd-Jones, T.J., Helps, C.R., 2009. Distribution of *Mycoplasma haemofelis* in Blood and Tissues Following Experimental Infection. *Microbial Pathogenesis* 47, 334-340.

- Thacker, B.J., Larsen, R.E., Joo, H.S., Leman, A.D., 1984. Swine Diseases Transmissible with Artificial Insemination. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 185, 511-516.
- Thacker, E.L. 2006. Mycoplasmal Diseases. In *Diseases of Swine*, Straw, B.E., Zimmerman, J.J., D'Allaire, S., Taylor, D.J., eds. (Blackwell Publishing), 701-717.
- Uilenberg, G., Thiaucourt, F., Jongejan, F., 2004. On Molecular Taxonomy: What Is in a Name? *Experimental & Applied Acarology* 32, 301-312.
- Végi, B., Bíró, E., Grózner, D., Drobnyák, Á., Kreizinger, Z., Gyuranecz, M., Barna, J., 2021. *Mycoplasma* Species in the Male Reproductive Organs and the Fresh and Frozen Semen of the Hungarian Native Goose. *Avian Pathology* 50, 458-464.
- Waites, K.B. 2006. *Mycoplasma* and *Ureaplasma* Congenital and Perinatal Infections. Springer, 271-288.
- Watanabe, Y., Fujihara, M., Suzuki, J., Sasaoka, F., Nagai, K., Harasawa, R., 2012. Prevalence of Swine Hemoplasmas Revealed by Real-Time PCR Using 16s rRNA Gene Primers. *The Journal of Veterinary Medical Science* 74, 1315-1318.
- Willi, B., Boretti, F.S., Cattori, V., Tasker, S., Meli, M.L., Reusch, C., Lutz, H., Hofmann-Lehmann, R., 2005. Identification, Molecular Characterization, and Experimental Transmission of a New Hemoplasma Isolate from a Cat with Hemolytic Anemia in Switzerland. *Journal of Clinical Microbiology* 43, 2581-2585.

- Willi, B., Tasker, S., Boretti, F.S., Doherr, M.G., Cattori, V., Meli, M.L., Lobetti, R.G., Malik, R., Reusch, C.E., Lutz, H., Hofmann-Lehmann, R., 2006. Phylogenetic Analysis of "*Candidatus Mycoplasma turicensis*" Isolates from Pet Cats in the United Kingdom, Australia, and South Africa, with Analysis of Risk Factors for Infection. *Journal of Clinical Microbiology* 44, 4430-4435.
- Willi, S., 2017. Untersuchung zur intrauterinen Übertragung von *Mycoplasma suis* sowie dem Vorkommen von *Mycoplasma suis* bei Zuchtsauen in Bayern. Diss. med. vet. Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Wu, J., Yu, J., Song, C., Sun, S., Wang, Z., 2006. Porcine Eperythrozoonosis in China. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1081, 280-285.
- Yang, D., Tai, X., Qiu, Y., Yun, S., 2000. Prevalence of *Eperythrozoon* spp. Infection and Congenital Eperythrozoonosis in Humans in Inner Mongolia, China. *Epidemiology & Infection* 125, 421-426.
- Yang, Z., Yuan, C., Yu, F., Hua, X., 2007. Haemotrophic Mycoplasma: Review of Aetiology and Prevalence. *Reviews in Medical Microbiology* 18, 1-3.
- Yuan, C.L., Liang, A.B., Yao, C.B., Yang, Z.B., Zhu, J.G., Cui, L., Yu, F., Zhu, N.Y., Yang, X.W., Hua, X.G., 2009. Prevalence of *Mycoplasma suis* (*Eperythrozoon suis*) Infection in Swine and Swine-Farm Workers in Shanghai, China. *American Journal of Veterinary Research* 70, 890-894.
- Zachary, J., Smith, A., 1985. Experimental Porcine Eperythrozoonosis: T-Lymphocyte Suppression and Misdirected Immune Responses. *American Journal of Veterinary Research* 46, 821-830.
- Zachary, J.F., Basgall, E.J., 1985. Erythrocyte Membrane Alterations Associated with the Attachment and Replication of *Eperythrozoon suis*: A Light and Electron Microscopic Study. *Veterinary Pathology* 22, 164-170.

Zhongyang, L., Jiansong, Z., Yijuan, S., Yuting, X., Yufeng, L., Jiarong, X., 2017. Seroprevalence of *Mycoplasma suis* Infection in Pigs in Eastern China as Estimated by a Blocking Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. Canadian Journal of Veterinary Research 81, 313-317.

Zhuang, Q., Song, H., Zhu, X., Fu, B., 2010. Human Infection with Hemoplasma in Mainland China. Journal of Animal and Veterinary Advances 9, 1905-1908.

Danksagung

Zu allererst möchte ich Herrn Prof. Dr. Mathias Ritzmann dafür danken, dass er mir dieses interessante Thema überlassen und mir damit die Möglichkeit gegeben hat, an der Klinik für Schweine zu promovieren. Ich danke ihm besonders für seine Geduld und die stets angenehme und produktive Zusammenarbeit, nicht zuletzt auch in Pandemiezeiten.

Weiterhin danke ich meiner Betreuerin Frau Dr. Julia Stadler für ihre Unterstützung, ihre Geduld und ihre hilfreichen Ratschläge. Ohne sie wäre diese Arbeit wohl kaum zu einem erfolgreichen Abschluss gekommen.

Ich danke meinem Kollegen Herrn Dr. Michael Müller für die Unterstützung bei der Probenbearbeitung sowie für regelmäßigen fachlichen und zwischenmenschlichen Austausch. Meiner Kollegin Frau Dr. Pauline Deffner danke ich herzlich für ihre Mithilfe bei der Korrektur dieser Arbeit. Ferner danke ich dem gesamten Team der Klinik für Schweine, stellvertretend besonders Frau Anja Wernecke und Herrn Dr. Niklas Peters, für die gute Zusammenarbeit und den Zusammenhalt nicht zuletzt auch in den ungewissen und belastenden Zeiten der Pandemie.

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. Ludwig E. Hölzle und bei Frau Dr. Katharina Hölzle dafür, dass sie dieses Projekt erst möglich gemacht haben und danke ihnen ferner sehr für ihre Kooperation und Unterstützung. Daneben danke ich den Mitarbeitern am Institut für Nutztierwissenschaften der Universität Hohenheim, allen voran Frau Julia Ade und Frau Patricia Kasper für die stets freundliche und kompetente Hilfestellung bei der Probenbearbeitung sowie für die Durchführung der PCR.

Ganz besonders danke ich meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, die mich immer mit Rat und Tat unterstützt und mir mein Studium überhaupt ermöglicht haben. Und meiner wundervollen Frau Annabelle, die immer an mich geglaubt hat, mich immer motiviert und nach Kräften unterstützt hat und ohne die ich auf keinen Fall so weit gekommen wäre.

Zuletzt danke ich allen, die bis hierhin nicht explizit erwähnt sind und die mich doch auf meinem Weg und bei der Anfertigung dieser Arbeit begleitet haben. Allen Freunden, Kollegen, Weggefährten, die auf die eine oder andere Weise zum Gelingen dieses Projektes beigetragen haben.

Meinen herzlichsten Dank Ihnen und Euch allen!



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-7070-0



9 783835 197070 0