

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

Molekulare Untersuchungen zum Vorkommen von
Mycoplasma parvum in Schweinen in Deutschland

von Julia Ade
aus Tübingen

München, 2023

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

Angefertigt am Fachgebiet für Infektions- und Umwelthygiene
der Universität Hohenheim

Mentor: Prof. Dr. Ludwig E. Hoelzle

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.
Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Mathias Ritzmann
Korreferent/en: Univ.-Prof. Dr. Claudia Guldemann, Ph.D.

Tag der Promotion: 22.07.2023

Die vorliegende Arbeit wurde gemäß §6 Abs. 2 der Promotionsordnung für die Tierärztliche Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München in kumulativer Form verfasst.

Folgende wissenschaftliche Arbeit ist in dieser Dissertation enthalten:

Julia Ade, Katharina Hölzle, Julia Stadler, Mathias Ritzmann,
Ludwig E. Hölzle

Occurrence of *Mycoplasma parvum* in German Pigs of Different Age Groups Using a Novel Quantitative Real-Time PCR Assay

Pathogens. 2022 Nov 18; 11 (11): 1374.
doi: 10.3390/pathogens11111374.

Meinen Eltern gewidmet

INHALTSVERZEICHNIS

| | |
|---|----|
| ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS | 1 |
| ABBILDUNGSVERZEICHNIS | 2 |
| 1. EINLEITUNG UND ZIELSTELLUNG | 3 |
| 2. LITERATUR | 5 |
| 2.1 Hämotrophe Mykoplasmen | 5 |
| 2.1.1 Taxonomie | 5 |
| 2.1.2 Mikrobiologie | 6 |
| 2.1.3 Medizinische und pathobiologische Eigenschaften | 6 |
| 2.1.4 Hämotrophe Mykoplasmen bei Schweinen | 8 |
| 2.2 <i>Mycoplasma parvum</i> | 12 |
| 2.2.1 Historie und Taxonomie | 12 |
| 2.2.2 Spezielle Mikrobiologie und Genomik | 12 |
| 2.2.3 Klinik und Infektionsverlauf / Infektiologie | 14 |
| 2.2.4 Diagnostik | 15 |
| 2.2.5 Epidemiologie | 16 |
| 3. PUBLIKATION | 18 |
| 4. ERWEITERTE DISKUSSION | 30 |
| 5. SCHLUSSFOLGERUNG UND AUSBLICK | 37 |
| 6. ZUSAMMENFASSUNG | 38 |
| 7. SUMMARY | 40 |
| LITERATURVERZEICHNIS | 42 |
| DANKSAGUNG | 50 |

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

| | |
|-------------|--|
| °C | Grad Celsius |
| bp | Basenpaar |
| Ca. | <i>Candidatus</i> |
| DNS / DNA | Desoxyribonukleinsäure / deoxyribonucleic acid |
| <i>E.</i> | <i>Eperythrozoon</i> |
| ELISA | Enzyme-linked immunosorbent Assay |
| GAPDH | Glyceraldehyde 3- Phosphate Dehydrogenase |
| GE | Genomäquivalente |
| <i>H.</i> | <i>Haemobartonella</i> |
| HM | Hämotrophe Mykoplasmen |
| IAP | Infektiöse Anämie des Schweines |
| IgG | Immunglobulin G |
| IgM | Immunglobulin M |
| LOD | lower limit of detection |
| <i>M.</i> | <i>Mycoplasma</i> |
| mL | Milliliter |
| PCR | Polymerase Chain Reaction (Polymerase Kettenreaktion) |
| spp. | species pluralis |
| µm | Mikrometer |
| rDNS / rDNA | ribosomale Deoxyribonukleinsäure / ribosomal deoxyribonucleic acid |
| RNS / RNA | Ribonukleinsäure / ribonucleic acid |

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

| | |
|---|----|
| Abbildung 1: Veränderungen an den Ohren bei von infektiöser Anämie betroffener Schweinen. A: Nekrose an der Ohrspitze eines <i>M. suis</i> infizierten Schweines (HEINRITZI 1990); B: subkutane Hämorrhagien eines mit `Ca. M. haemosuis` infizierten Schweines (STADLER et al. 2020)..... | 9 |
| Abbildung 2: Ikterische Veränderungen der Skleren (A) und der Aorta (B) bei einem mit `Ca. M. haemosuis` infizierten Tier (STADLER et al. 2020) (Bilder nicht in der Publikation veröffentlicht)..... | 10 |
| Abbildung 3: Drei aneinander liegende <i>M. parvum</i> Zellen (durch Pfeil markiert) zwischen zwei Erythrozyten in einem <i>M. parvum</i> infizierten Schwein (DO NASCIMENTO et al. 2014). | 13 |

1. EINLEITUNG UND ZIELSTELLUNG

1. EINLEITUNG UND ZIELSTELLUNG

Infektionen mit hämotrophen Mykoplasmen sind bereits seit über 90 Jahren bekannt (DOYLE 1932). Aktuell werden drei porcine Spezies dieser nicht kultivierbaren Bakterien unterschieden, *Mycoplasma (M.) suis*, *M. parvum* (SPLITTER 1950a) sowie `Candidatus (Ca.) Mycoplasma haemosuis` (FU et al. 2017).

Mycoplasma suis ist in der Lage, sowohl akut verlaufende, schwerwiegende klinische Erkrankungen als auch subklinische Infektionen auszulösen, wobei insbesondere die subklinischen Verläufe zu wirtschaftlichen Verlusten in der Schweinehaltung führen können (SPLITTER 1950b; HEINRITZI 1989; HOELZLE et al. 2014; STADLER et al. 2014; PETRI et al. 2020). Für die neu beschriebene Spezies `Ca. M. haemosuis` wurden in ersten Untersuchungen ähnliche Eigenschaften beschrieben (FU et al. 2017; SEO et al. 2019; STADLER et al. 2020; ADE et al. 2022b). Beide Spezies sind außerdem epidemiologisch untersucht, weshalb von einer weltweiten Verbreitung ausgegangen werden kann (GUIMARAES et al. 2007; RITZMANN et al. 2009; FU et al. 2017; GATTO et al. 2019; MARTINS et al. 2019; SEO et al. 2019; STADLER et al. 2019; BRISSONNIER et al. 2020; ADE et al. 2022b; THONGMEESEE et al. 2022).

Im Gegensatz zu *M. suis* und `Ca. M. haemosuis` ist die Bedeutung von *M. parvum* für die Tiergesundheit sowie für die Ökonomie der Schweineproduktion weitgehend ungeklärt. Jahrelang wurde angenommen, dass es sich bei *M. parvum* um ein für Schweine apathogenes Agens handelt (SPLITTER 1950a; DO NASCIMENTO et al. 2014). Jedoch gab es in jüngster Zeit Berichte über mögliche Zusammenhänge zu klinischen Symptomen (mündliche Mitteilung Dr. Lukas Schwarz, Universitätsklinik für Schweine, Veterinärmedizinische Universität Wien (SCHWARZ 2023)) sowie über negative Auswirkungen von subklinischen *M. parvum* Infektionen auf Leistungsparameter in Schweinebeständen (PETRI et al. 2020; SONALIO et al. 2021). Seit der ersten Beschreibung von *M. parvum* gibt es nur wenige Studien, die sich mit diesem Bakterium befassen. Dies betrifft sowohl Untersuchungen zur Pathogenität als auch zu epidemiologischen Grundkenntnissen (SEAMER 1960; WATANABE et al. 2012; DO NASCIMENTO et al. 2013; DO NASCIMENTO et al. 2014; FU et al. 2017; GATTO et al. 2019; SEO et al. 2019; SONALIO et al. 2021). Somit ist das Vorkommen von *M. parvum* in Deutschland unbekannt.

1. EINLEITUNG UND ZIELSTELLUNG

Eine weitere Problematik stellt die bislang fehlende verlässliche Diagnostik von *M. parvum* dar. Die als aktueller Standard geltenden, auf dem 16S rRNA Gen basierenden PCR Tests, können nicht ausreichend zwischen *M. suis* und *M. parvum* differenzieren (RAZIN et al. 1998; SONALIO et al. 2021).

Das erste Ziel der vorliegenden Arbeit war es, eine *M. parvum*-spezifische quantitative real-time PCR (qPCR) zu etablieren. Diese diente als Grundlage für den zweiten Teil der Arbeit, der Untersuchung des Vorkommens von *M. parvum* in Schweinen in Deutschland. Dabei wurden Blutproben von insgesamt 200 Mastschweinen, 60 Sauen und 183 Ebern aus Süddeutschland mittels der neuen qPCR quantitativ nachgewiesen. Außerdem wurde untersucht, inwieweit neben *M. parvum* Infektionen auch Ko-Infektionen mit den anderen porzinen hämotrophen Mykoplasmen, nämlich *M. suis* und `Ca. *M. haemosuis*` auftreten. Des Weiteren wurde das 16S rRNA Genfragment von insgesamt sieben der aus dieser Studie stammenden *M. parvum* Isolate sequenziert. Diese Sequenzen wurden anschließend untereinander und mit weiteren, in der NCBI GeneBank deponierten Sequenzen von *M. parvum* und anderen hämotrophen Mykoplasmen spezie phylogenetisch eingruppiert und verglichen.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in der Publikation, welche in der vorliegenden Arbeit eingebunden ist, verfasst (ADE et al. 2022a).

2. LITERATUR

2. LITERATUR

2.1 Hämotrophe Mykoplasmen

2.1.1 Taxonomie

Hämotrophe Mykoplasmen (HM), oftmals auch als Hämoplasmen bezeichnet, sind eine Gruppe nicht-kultivierbarer Bakterien, die ehemals zwei verschiedenen Gattungen zugeordnet wurden, nämlich *Eperythrozoon* und *Haemobartonella* (NEIMARK et al. 2001, 2002). Diese Genera wurden der Familie *Anaplasmataceae*, Ordnung *Rickettsiales* zugeordnet. Ab Beginn der 2000-er Jahre erfolgte aufgrund phylogenetischer Untersuchungen die Reklassifizierung der Bakterien zur Gruppe der Mykoplasmen (Ordnung *Mycoplasmatales*, Familie *Mycoplasmataceae*, Genus *Mycoplasma*) (RIKIHISA et al. 1997; NEIMARK et al. 2001, 2002; TASKER et al. 2003; MESSICK 2004; HOELZLE et al. 2011). Im phylogenetischen Stammbaum innerhalb der Gattung *Mycoplasma* lassen sich die hämotrophen Mykoplasmen phylogenetisch und taxonomisch in ein eigenes Cluster einordnen und sich somit von den anderen Spezies dieser Gattung, beispielsweise den Vertretern *Mycoplasma (M.) hyopneumoniae*, *M. bovis* oder *M. pneumoniae*, differenzieren (RIKIHISA et al. 1997; NEIMARK et al. 2001; MESSICK et al. 2002; NEIMARK et al. 2002; TASKER et al. 2003; HICKS et al. 2014). Auch innerhalb des Clusters der hämotrophen Mykoplasmen lässt sich die ehemalige Unterscheidung der Genera *Eperythrozoon* und *Haemobartonella* durch Abgrenzung zweier Cluster noch erkennen (TASKER et al. 2003; PETERS et al. 2008). Insgesamt ist die Klassifizierung der hämotrophen Mykoplasmen jedoch nicht abgeschlossen und die Abgrenzung als eigene Gattung wird diskutiert (HICKS et al. 2014). GUPTA et al. haben in ihrer Publikation 2018 die Mykoplasmen-Taxonomie grundlegend überarbeitet und die Gruppe der hämotrophen Mykoplasmen als eigene Gattung definiert, die wieder *Eperythrozoon* heißen soll. Diese soll dann sowohl einer neuen Familie (*Mycoplasmoidaceae*) als auch einer neuen Ordnung (*Mycoplasmoidales*) zugeordnet werden (GUPTA et al. 2018). Diese Umbenennung und Reklassifizierung hat allerdings bislang keine praktische Berücksichtigung gefunden.

2. LITERATUR

2.1.2 Mikrobiologie

Hämotrophe Mykoplasmen sind, wie andere Mykoplasmenarten, zellwandlose und außergewöhnlich kleine (i. d. R. $> 1 \mu\text{m}$), pleomorphe Bakterien (MESSICK 2004). Das Genom dieser Bakterien besteht aus doppelsträngiger, zirkulär aufgebauter DNA und einer hohen Anzahl an hypothetischen Genen (OEHLERKING et al. 2011; DO NASCIMENTO et al. 2013; DO NASCIMENTO et al. 2014). Die Größe der Genome befinden sich im Bereich zwischen 564.395 Basenpaaren (bp) (*M. parvum*; DO NASCIMENTO et al. 2013) und 1.152.484 bp (*M. haemofelis*; BARKER et al. 2011;).

Die Bezeichnung der Bakteriengruppe erlaubt Rückschlüsse auf ihre Lebensweise, nämlich dem Vorkommen im Blut verschiedener Säugetiere inklusive des Menschen (MESSICK 2004). Erstmals wurde ein Vertreter dieser Bakteriengruppe vor fast 100 Jahren in Mäusen beschrieben (SCHILLING 1928). Die einzelnen HM Spezies gelten dabei als wirtsspezifisch, wobei bei vielen der zugehörige Wirt am Speziesnamen abgeleitet werden kann. So findet sich beispielsweise *M. suis* bei Schweinen (SPLITTER 1950a), *M. ovis* und `Ca. *M. haemovis*` bei Schafen (NEITZ 1934; HORNOK et al. 2009), *M. haemofelis* bei Katzen (CLARK 1942; FLINT und MOSS 1953; FLINT et al. 1959; NEIMARK et al. 2001), sowie *M. haemocanis* bei Hunden (KIKUTH 1928; NEIMARK et al. 2001, 2002). Der humane Vertreter dieser Bakteriengruppe wird als `Ca. *M. haemohominis*` bezeichnet (STEER et al. 2011).

Aufgrund der fehlenden Möglichkeit, hämotrophe Mykoplasmen im Labor zu kultivieren, erfolgt der Nachweis der Bakterien in aller Regel molekularbiologisch mittels PCR, wobei verschiedenste Spezies-spezifische und Spezies-übergreifende Protokolle veröffentlicht sind. Des Weiteren gibt es einige Publikationen zu serologischen Nachweisverfahren (HOELZLE et al. 2007b; WOLF-JÄCKEL et al. 2010; LIU et al. 2012; ZHAO et al. 2017; ZHONGYANG et al. 2017).

2.1.3 Medizinische und pathobiologische Eigenschaften

Hämotrophe Mykoplasmen werden bei vielen Tieren mit dem Auftreten von fieberhaften Allgemeinerkrankungen sowie einer hämolytischen Anämie in Verbindung gebracht (MESSICK 2004). Aus diesen Gründen wird diese Erkrankung in den meisten

2. LITERATUR

Fällen als „infektiöse Anämie“ bezeichnet. Am häufigsten und besten beschrieben ist hierbei die infektiöse Anämie bei Katzen und Schweinen (MESSICK 2004). Auf letztere wird in Kapitel 2.1.4 näher eingegangen.

Trotz der in Kapitel 2.1.2 bereits angesprochenen Wirtsspezifität der hämotrophen Mykoplasmen ist ein Zoonosepotenzial immer wieder in Diskussion. Dies beruht auf einzelnen Nachweisen von verschiedenen hämotrophen Mykoplasmenpezies, inklusive der porzinen Spezies *M. suis* bei Menschen (PUNTARIC et al. 1986; DUARTE et al. 1992; DOS SANTOS et al. 2008; YUAN et al. 2009; BOSNIC et al. 2010; SYKES et al. 2010; HUANG et al. 2012; MAGGI et al. 2013a; MAGGI et al. 2013b). Des Weiteren wurde erst kürzlich die humane Spezies `Ca. M. haemohominis` in Fledermäusen nachgewiesen, weshalb die Autoren dieser Publikation eine Übertragung dieser humanen Spezies zwischen Tier und Mensch diskutieren (DESCLOUX et al. 2020).

Die genaue Pathogenese hämotropher Mykoplasmen ist nach wie vor weitgehend unbekannt, was auch den Ort der Erregervermehrung im Wirtstier betrifft. Studien zur Wirt-Erreger Interaktion beschränken sich auf die felinen und caninen HM Spezies sowie die porzine Spezies *M. suis*. Im Mittelpunkt bisheriger Erkenntnisse stehen die Adhäsion, teilweise auch die Invasion von Erythrozyten und deren Zerstörung. Diese äußert sich entsprechend als Anämie (GROEBEL et al. 2009; HOELZLE et al. 2014). Für die Adhäsion an Erythrozyten konnten für *M. suis* verschiedene putative Adhäsionsfaktoren identifiziert werden, wie z.B. das MSG1 oder die α -Enolase (HOELZLE et al. 2007b; SCHREINER et al. 2012; HOELZLE et al. 2014). Des Weiteren sind autoimmune Mechanismen in Form von IgM-Kälteagglutininen und autoreaktiver Antikörper vom IgG-Typ genauso bekannt wie eine Immunmodulation und Suppression. Allerdings müssen auch hier Interaktionsmechanismen noch weiter untersucht werden (BELLAMY et al. 1978; HENRY 1979; ZACHARY und SMITH 1985; ZULTY und KOCIBA 1990; SCHMIDT et al. 1992; JÜNGLING und ERHARD 1994; TASKER et al. 2009; FELDER et al. 2010; DO NASCIMENTO et al. 2018; MACK 2019).

Im Allgemeinen werden hämotrophe Mykoplasmen hämatogen übertragen. Nicht-hämatogene Übertragungswege werden außerdem in einigen Publikationen diskutiert (WILLI et al. 2007; DEAN et al. 2008; DIETZ et al. 2014; ADE et al. 2021).

2. LITERATUR

2.1.4 Hämotrophe Mykoplasmen bei Schweinen

Mindestens drei verschiedene Spezies von hämotrophen Mykoplasmen kommen bei Schweinen vor: *Mycoplasma suis* (SPLITTER 1950a), *Mycoplasma parvum* (SPLITTER 1950a) und `Candidatus Mycoplasma haemosuis` (FU et al. 2017). Das Vorkommen einer vierten, noch unbenannten Spezies, wird in einer aktuellen Publikation diskutiert (THONGMEESEE et al. 2022).

Mycoplasma suis ist als Verursacher der infektiösen Anämie der Schweine (IAP) schon sehr lange bekannt (SPLITTER 1950a, b; SPLITTER und WILLIAMSON 1950; HOELZLE et al. 2011; HOELZLE et al. 2014). Auch die 2017 erstmals beschriebene Spezies `Ca. M. haemosuis` scheint in der Lage zu sein, IAP bzw. IAP-ähnliche Erkrankungen auszulösen, wobei der Nachweis in Form einer experimentellen Infektion noch ausstehend ist (FU et al. 2017; STADLER et al. 2020). *M. parvum* gilt bislang nicht als Auslöser einer klinisch apparenten Erkrankung, worauf in Kapitel 2.2.3 genauer eingegangen wird.

Die infektiöse Anämie der Schweine kann akut oder chronisch verlaufen und prinzipiell alle Altersklassen betreffen (HENRY 1979; MESSICK 2004; HOELZLE et al. 2011). Das hauptsächliche Merkmal der akuten Form ist eine hämolytische Anämie, die sich klinisch durch Fieber und Ikterus äußert (PRESTON und GREVE 1965; STADLER et al. 2014; STADLER et al. 2021). Weitere klinische Zeichen können Zyanosen und Nekrosen an den Ohren und Akren sein (PRESTON und GREVE 1965; HENRY 1979; HEINRITZI 1990). Außerdem tritt oftmals eine Hypoglykämie auf (ZACHARY und SMITH 1985; STADLER et al. 2014).

Makroskopisch und mikroskopisch können Anzeichen einer gestörten Blutgerinnung und disseminierten intravasalen Koagulopathie sowie Endothelzellschäden beobachtet werden (PLANK und HEINRITZI 1990; SOKOLI et al. 2013; STADLER et al. 2021). Diese klinischen Anzeichen sind jener der Schweinepest sehr ähnlich (KORN und MUSSGAY 1968).

Abbildung 1 zeigt typisch zu beobachtende Veränderungen an den Ohren bei von der akuten Form der infektiösen Anämie betroffener Tiere, wobei im linken Bild (A) eine Nekrose an der Ohrspitze eines mit *M. suis* infizierten Schweines zu sehen ist

2. LITERATUR

(HEINRITZI 1990), im rechten Bild subkutane Hämorrhagien von einem mit `Ca. M. haemosuis` infiziertem Tieres (STADLER et al. 2020).



Abbildung 1: Veränderungen an den Ohren bei von infektiöser Anämie betroffener Schweine. A: Nekrose an der Ohrspitze eines *M. suis* infizierten Schweines (HEINRITZI 1990); B: subkutane Hämorrhagien eines mit `Ca. M. haemosuis` infizierten Schweines (STADLER et al. 2020).

Gut erkennbare ikterische Veränderungen im Zusammenhang mit der akuten Form der infektiösen Anämie sind in Abbildung 2 dargestellt. Dabei ist auf dem linken Bild (A) die gelblich gefärbte Sklera eines mit `Ca. M. haemosuis` infizierten Tieres, auf dem rechten Bild (B) die Innenwand einer gelblich verfärbten Aorta eines ebenfalls mit `Ca. M. haemosuis` infizierten Tieres zu sehen (STADLER et al. 2020, die Bilder sind nicht in der Publikation veröffentlicht).

2. LITERATUR

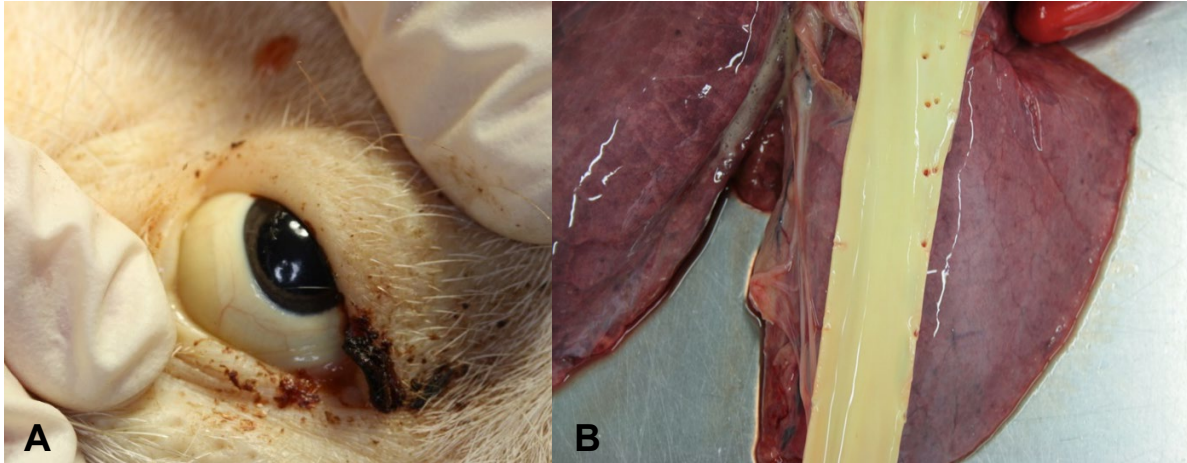


Abbildung 2: Ikerische Veränderungen der Skleren (A) und der Aorta (B) bei einem mit 'Ca. M. haemosuis' infizierten Tier (STADLER et al. 2020) (Bilder nicht in der Publikation veröffentlicht).

Die akute IAP kann tödlich verlaufen und tritt überwiegend als individuelles Ereignis nach Stresssituationen oder im Zuge von experimentellen Infektionen in splenektomierten Schweinen auf (SPLITTER 1950a; HENRY 1979; HENDERSON et al. 1997; STADLER et al. 2014; STADLER et al. 2021). Durch das Fehlen der Milz kommt es zu einer schnelleren Progression, da befallene Erythrozyten weniger effektiv aus dem Blutkreislauf entfernt werden können (SCHILLING 1928; HEINRITZI 1984; STADLER et al. 2014). Die chronische Form hingegen kommt häufiger als die akute Form der IAP vor und hat einen hohen ökonomischen Stellenwert (HEINRITZI 1989; HOELZLE et al. 2011). Sichtbare Zeichen hierbei sind mildere Formen des Krankheitsverlaufs wie eine geringgradige Anämie, leichte Zyanosen und Nekrosen sowie subkutane petechiale Blutungen. Außerdem kann es zu reduzierten Wachstums- und Reproduktionsleistungen sowie zur Modulation und Suppression des Immunsystems der Tiere kommen (HENRY 1979; ZACHARY und SMITH 1985; DO NASCIMENTO et al. 2018; MACK 2019; BRISSONNIER et al. 2020; PETRI et al. 2020).

Während das Vorkommen von *M. suis* umfangreich und weltweit beschrieben wurde, gibt es für die erst kürzlich beschriebene Spezies 'Ca. M. haemosuis' bisher nur Nachweise in Asien und Deutschland (FU et al. 2017; SEO et al. 2019; ADE et al. 2022b; THONGMEESEE et al. 2022). Auf die Verbreitung von *M. parvum* wird in Kapitel 2.2.5 gesondert und detailliert eingegangen.

2. LITERATUR

Wie bei anderen hämotrophen Mykoplasmen erfolgt auch die Übertragung der porzinen Spezies blutgebunden, wobei sich die meisten der zugrunde legenden Studien mit der Übertragung von *M. suis* befassen. Für die hämatogene Übertragung kommen verschiedenste Wege, wie eine iatrogene Übertragung bei Impfungen und zootecnischen Maßnahmen, im Zuge von Rangkämpfen, sowie durch blutsaugende Arthropoden in Frage (JANSEN 1952; SEAMER 1960). Des Weiteren kommen vertikale Übertragungen vor (STADLER et al. 2019; ADE et al. 2022b). Blut-unabhängige Übertragungswege, zum Beispiel über Speichel, Urin und Sperma wurden für die porzinen Spezies einige Male diskutiert, scheinen aber unter Feldbedingungen vernachlässigbar zu sein (DIETZ et al. 2014; ADE et al. 2021).

Im Erkrankungsfall besteht die Therapie aus einer Antibiose, wobei hier in der Regel auf Tetrazykline zurückgeriffen wird (SEAMER 1960; STRAIT et al. 2012; STADLER et al. 2020). Unterstützend kann auch die Gabe von Analgetika und Glukose, um einer Hypoglylämie entgegenzuwirken, erfolgen (GROEBEL et al. 2009; STADLER et al. 2014; STADLER et al. 2020).

2. LITERATUR

2.2 *Mycoplasma parvum*

2.2.1 Historie und Taxonomie

Mycoplasma parvum wurde als *Eperythrozoon parvum* erstmals 1950, zeitgleich mit der ersten Publikation über *Mycoplasma suis*, von SPLITTER erwähnt. Bereits in dieser Publikation erfolgte eine mikroskopische und pathologische Differenzierung der beiden Spezies (SPLITTER 1950a). SPLITTER gibt jedoch an, die beiden Eperythrozoen bereits zuvor gemeinsam mit WILLIAMSON gesehen und beschrieben zu haben. Die Publikation von SPLITTER und WILLIAMSON wurde allerdings erst kurz nach jener von SPLITTER fertiggestellt und veröffentlicht (SPLITTER 1950a; SPLITTER und WILLIAMSON 1950). Auch *Eperythrozoon parvum* wurde letztendlich als *Mycoplasma parvum* reklassifiziert (WATANABE et al. 2011; DO NASCIMENTO et al. 2013; DO NASCIMENTO et al. 2014). Wie in Kapitel 2.1.1. beschrieben hat das Bestreben, die hämotrophen Mykoplasmen wieder als eigene Spezies abzugrenzen und als *Eperythrozoon* zu benennen (GUPTA et al. 2018), auch bei *M. parvum* noch keine praktische Umsetzung erfahren.

Die nächste verwandte Spezies zu *M. parvum* ist *M. suis*. Beide sind sehr nah miteinander verwandt, sodass die 16S rDNA Sequenzen nahezu identisch sind (Identitäten >96%, ersichtlich durch den Vergleich publizierter Sequenzen mittels des NCBI Blast Tools). Somit ist eine Differenzierung der beiden Spezies mittels 16S rDNA PCR sehr schwierig (Vgl. Kapitel 2.2.4) (SONALIO et al. 2021).

2.2.2 Spezielle Mikrobiologie und Genomik

Mycoplasma parvum ist mit einem Durchmesser zwischen 0,2 – 0,8 µm auch für hämotrophe Mykoplasmen sehr klein (SPLITTER 1953; DO NASCIMENTO et al. 2014). *M. suis* misst im Vergleich dazu durchschnittlich 0,8 – 1,0 µm, kann aber nach Angaben einiger Autoren auch bis zu 2,5 µm groß sein (SPLITTER 1953; POSPISCHIL und HOFFMANN 1982; LIEBICH und HEINRITZI 1992; DO NASCIMENTO et al. 2014). Typischerweise zeigen sich auch Zellen von *M. parvum* als pleomorph (kokkoid – stäbchenförmig) und sind in längeren oder kürzeren Ketten auf Erythrozyten zu finden (SPLITTER 1950a, 1953). Abbildung 3 zeigt eine aus drei

2. LITERATUR

Zellen bestehende Kette von *M. parvum* an Erythrozyten in einem infizierten Schwein (DO NASCIMENTO et al. 2014).

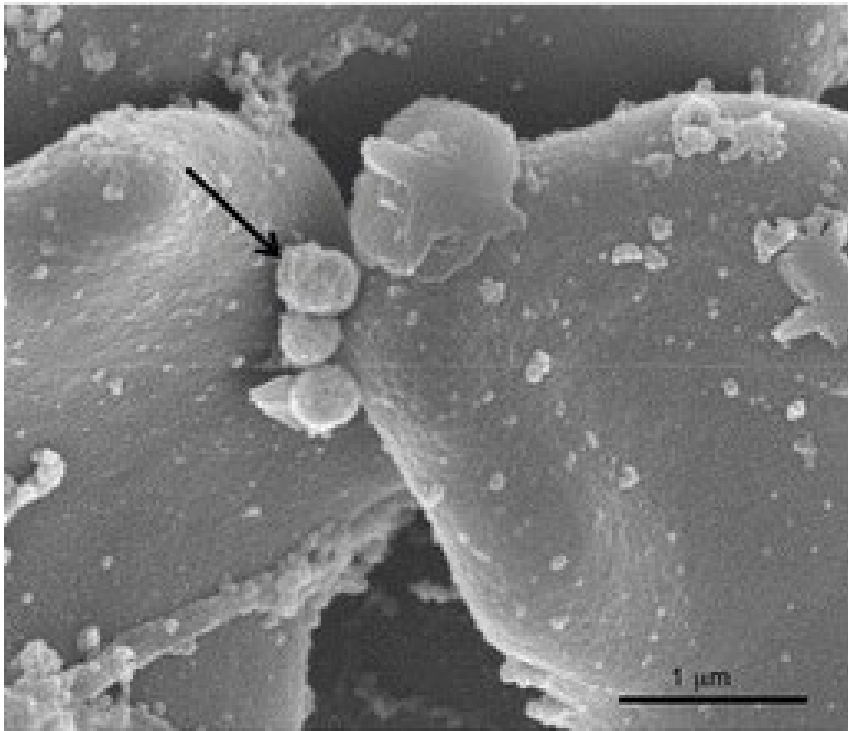


Abbildung 3: Drei aneinander liegende *M. parvum* Zellen (durch Pfeil markiert) zwischen zwei Erythrozyten in einem *M. parvum* infizierten Schwein (DO NASCIMENTO et al. 2014).

Das Genom von *M. parvum* ist typischerweise zirkulär und besteht aus nur 564.395 bp, womit es sogar kleiner als das der humanen, nicht-hämotropen Spezies *M. genitalium* ist. Vor der Sequenzierung von *M. parvum* war man immer davon ausgegangen, *M. genitalium* besitze das kleinste Genom innerhalb der *Mollicutes* (DO NASCIMENTO et al. 2013; DO NASCIMENTO et al. 2014). Nach aktueller Taxonomie sind *M. parvum* und *M. suis* nächste Verwandte zueinander (WATANABE et al. 2011; DO NASCIMENTO et al. 2013). Insgesamt 77% der proteinkodierenden Sequenzen von *M. parvum* repräsentieren hypothetische Proteine, also solche mit noch unbekannter Funktion (DO NASCIMENTO et al. 2013). Interessanterweise zeigte der detaillierte Genomvergleich zwischen *M. suis* und *M. parvum*, dass beide Spezies alle Protein-kodierenden Sequenzen mit bekannter Funktion gemeinsam haben. Unterschiede bestehen demnach in den hypothetischen, unbekannt Proteinen, die somit auch für die unterschiedliche Pathogenität verantwortlich sein müssten (DO NASCIMENTO et al. 2013).

2. LITERATUR

2.2.3 Klinik und Infektionsverlauf / Infektiologie

Nach derzeitigem Wissensstand gilt *M. parvum* als nicht primär pathogen (SPLITTER 1950a, 1953; DO NASCIMENTO et al. 2014). Schon SPLITTER erklärte in der erstmaligen Beschreibung von *M. parvum*, dass der Erreger im Gegensatz zu *M. suis* nur unter experimentellen Bedingungen nachweisbar sei (SPLITTER 1950a). Dieses Kapitel soll eine Übersicht über die wenigen verfügbaren Studien zur Beschreibung der Infektion sowie der klinischen Beschreibung von *M. parvum* in Schweinen geben.

Viele Beobachtungen und Untersuchungen erfolgten dabei nach Splenektomie an bereits natürlich infizierten Schweinen, die daraufhin eine Bakteriämie entwickelten (SPLITTER 1950a; JANSEN 1952; JENNINGS und SEAMER 1956; DO NASCIMENTO et al. 2014). Während SPLITTER sowie auch JANSEN bei keinem der verwendeten Tiere klinische Anzeichen feststellen konnten, entwickelte in der Studie von JENNINGS eines von sieben infizierten Tieren eine geringgradige Anämie und Fieber. Das einzige in der Studie von DO NASCIMENTO verwendete Tier zeigte am Höhepunkt der Bakteriämie (10^{10} *M. parvum* Zellen pro mL Blut) eine leichte Erhöhung der Körpertemperatur. Auch der Hämatokrit dieses Tieres variierte, fiel aber nur einmalig leicht unter das untere Referenzniveau (DO NASCIMENTO et al. 2014).

SEAMER untersuchte die Auswirkungen einer experimentellen Infektion von Absetzferkeln. Während bei den splenektomierten Tieren klinisch apparente Erkrankungen mit schwerer Anämie auftraten, waren die nicht-splenektomierten Tiere klinisch unauffällig geblieben. Die Erkrankung sprach auf eine Behandlung mit Oxytetracyclin und Neoarsphenamin an (SEAMER 1960).

Ein weiterer Hinweis auf klinische Erkrankungen durch *M. parvum* stammt von Dr. Lukas Schwarz (Universitätsklinik für Schweine, Veterinärmedizinische Universität Wien), der in Verbindung mit einer *M. parvum* Infektion Blässe bei einigen Tieren festgestellt hat (persönliche Mitteilung (SCHWARZ 2023)).

PETRI und Mitarbeiter untersuchten 2020 den Zusammenhang zwischen dem Vorkommen hämotropher Mykoplasmen und den Tageszunahmen bei Mastschweinen, wobei beide Parameter negativ korreliert waren. In dieser Studie war *M. parvum* die dominierende Spezies (PETRI et al. 2020). Ähnlich hierzu konnten SONALIO und Mitarbeiter in ihrer Studie beobachten, dass die Anzahl der abgesetzten

2. LITERATUR

Ferkel sowie das Schlachtgewicht beim Vorkommen von hämotrophen Mykoplasmen geringer waren. Auch in dieser Studie war *M. parvum* die dominierende Spezies vor *M. suis* (SONALIO et al. 2021).

Ebenso wie die Klinik sind immunologische Grundlagen von *M. parvum* Infektionen kaum beschrieben. JANSEN führt die rasche Eliminierung einer natürlichen *M. parvum* Infektion, welche durch Splenektomie künstlich exazerbiert wurde, auf eine bereits vorhandene Immunität zurück (JANSEN 1952). SPLITTER beschreibt, dass Tiere mit einer vorhandenen Immunität gegen *M. parvum* sehr leicht empfänglich für *M. suis* sind, was auch auf den umgekehrten Fall zutrifft (SPLITTER 1953). Ob *M. parvum* in der Lage ist, das Immunsystem zu supprimieren und zu modulieren, wie es für *M. suis* beschrieben ist (ZACHARY und SMITH 1985; DO NASCIMENTO et al. 2018; MACK 2019), wurde bislang nicht untersucht.

In der Literatur sind Ko-Infektionen von *M. parvum* mit *M. suis* beschrieben (SPLITTER 1950a, 1953; DIPEOLU et al. 1982; WATANABE et al. 2012). SPLITTER gibt an, dass bei Ko-Infektionen *M. parvum* durch *M. suis* verdrängt wird (SPLITTER 1950a, 1953).

Für die Dynamik von *M. parvum* im Verlauf der Infektion gibt es einige Beschreibungen. SPLITTER gibt an, dass *M. parvum* Zellen in großer Anzahl auf einzelnen Erythrozyten akkumulieren, wobei die gesamte Anzahl betroffener Erythrozyten insgesamt gering ausfällt (SPLITTER 1950a). JANSEN beschreibt die Lokalisation von *M. parvum* auf und zwischen einzelnen Erythrozyten (JANSEN 1952). Ein intrazelluläres Vorkommen, wie es für *M. suis* beschrieben ist (GROEBEL et al. 2009), ist bei *M. parvum* bislang nicht bekannt.

2.2.4 Diagnostik

Wie alle hämotrophen Mykoplasmen gilt auch *M. parvum* als nicht kultivierbar. Im letzten Jahrhundert wurde die Infektion daher ausschließlich mikroskopisch diagnostiziert. SPLITTER gibt dabei an, *M. parvum* und *M. suis* aufgrund der unterschiedlichen Größe und Morphologie voneinander differenzieren zu können. *M. parvum* ist, wie in Kapitel 2.2.2 beschrieben, kleiner als *M. suis* und erscheint

2. LITERATUR

kokkoid, während *M. suis* laut Angaben des Autors eher ein diskusförmiges Aussehen aufweist (SPLITTER 1953).

Neben der Mikroskopie konnte *M. parvum* im prä-PCR Zeitalter auch über dessen kaum vorhandene Pathogenität, der relativ längeren Inkubationszeit bei experimentellen Infektionen, sowie dessen Filtrierbarkeit von *M. suis* unterschieden werden (SPLITTER 1953).

Die Etablierung der Polymerase-Kettenreaktionen hat den Nachweis von hämotrophen Mykoplasmen stark vereinfacht und ermöglicht eine schnelle und sensitive Diagnostik. Dabei werden in aller Regel Primer verwendet, welche das 16S rRNA Gen der hämotrophen Mykoplasmen nachweisen (FU et al. 2017; SEO et al. 2019; PETRI et al. 2020; SONALIO et al. 2021; SANTANA et al. 2022; THONGMEESEE et al. 2022).

Bisher wurden zwei PCRs publiziert, die *M. parvum* nachweisen und entweder auf Basis des 16S rRNA Gens oder auf Basis des 23S rRNA *M. suis* und *M. parvum* differenzieren sollen (WATANABE et al. 2011; WATANABE et al. 2012; SONALIO et al. 2021). Jedoch ist es durch die enge Verwandtschaft von *M. parvum* und *M. suis* schwer bis nicht möglich, die beiden Spezies mittels dieser PCRs voneinander zu differenzieren. Hierfür sind zumindest für die 16S rDNA Amplifikate Sequenzierungen notwendig (SONALIO et al. 2021).

2.2.5 Epidemiologie

Für *Mycoplasma parvum* sind bislang nur sehr wenige epidemiologische Daten verfügbar. Die meisten Publikationen zum Vorkommen des Bakteriums in Hausschweinen sind auf Einzelfallberichte zurückzuführen. Solche sind aus Europa (Niederlande (UILENBERG et al. 1981); Großbritannien (JENNINGS und SEAMER 1956)), aus Amerika (USA (SPLITTER 1950a; DO NASCIMENTO et al. 2013; DO NASCIMENTO et al. 2014); Brasilien (GATTO et al. 2019; PETRI et al. 2020)), sowie aus Asien (China (FU et al. 2017); Japan (WATANABE et al. 2012); Südkorea (SEO et al. 2019); Thailand (THONGMEESEE et al. 2022)), und Afrika (Nigeria (DIPEOLU et al. 1982); Kenia (BARNETT 1963); Südafrika (JANSEN 1952)) bekannt.

2. LITERATUR

Neben Einzelfallberichten gibt es HM Prävalenzstudien beim Schwein mit höheren Probenanzahlen, die auch *M. parvum* umfassen. Jedoch erfolgte in den Untersuchungen entweder keine Differenzierung zwischen den Spezies, oder die vorgenommene Differenzierung mittels Sequenzierung beinhaltete nur wenige der HM positiven Proben (FU et al. 2017; SEO et al. 2019; SONALIO et al. 2021; SANTANA et al. 2022; THONGMEESEE et al. 2022).

Studien, die einen gewissen Umfang beprobter Tiere sowie eine eindeutige Diagnostik von *M. parvum* bieten sind sehr rar, und wurden bisher nur in Ländern außerhalb Europas durchgeführt (WATANABE et al. 2012; SEO et al. 2019). Die beiden hier bekannten Studien zeigten ein Vorkommen von *M. parvum* in beprobten Tieren zwischen 2,7% in Südkorea mit insgesamt 1867 beprobten Tieren (SEO et al. 2019) und 15,0% in Japan mit insgesamt 120 beprobten Tieren (WATANABE et al. 2012). Während in der Studie von SEO et al. alle Altersgruppen untersucht wurden, beschränkt sich die Studie von WATANABE et al. auf Mastschweine und Sauen.

Eine kürzlich erschienene Studie aus Brasilien beschreibt außerdem das Auftreten von *M. parvum* in Wildschweinen (SANTANA et al. 2022).


3. PUBLIKATION

3. PUBLIKATION

Die Ergebnisse der vorliegenden Dissertation wurden in der folgenden Publikation veröffentlicht.

Article

Occurrence of *Mycoplasma parvum* in German Pigs of Different Age Groups Using a Novel Quantitative Real-Time PCR Assay

Julia Ade ¹, Katharina Hoelzle ¹, Julia Stadler ², Mathias Ritzmann ² and Ludwig E. Hoelzle ^{1,*} 

¹ Institute of Animal Science, Institute of Animal Science, Department of Livestock Infectiology and Environmental Hygiene, University Hohenheim, 70599 Stuttgart, Germany

² Clinic for Swine, Centre for Clinical Veterinary Medicine, LMU Munich, 85764 Oberschleissheim, Germany

* Correspondence: ludwig.hoelzle@uni-hohenheim.de; Tel.: +49-711-459-22427

Abstract: *Mycoplasma (M.) parvum* is a hemotrophic bacterium circulating in the blood of pigs but is not considered a primary pathogen. Only a handful of studies dealing with this agent have been published since its first description in 1951, and many issues, including epidemiology and the impact of subclinical infections, are yet to be elucidated. This study aimed to establish a *M. parvum* specific real-time PCR for its detection and quantification in porcine blood and the application of this assay to obtain insights into the occurrence of *M. parvum* in German pigs. Furthermore, 16S rDNA amplicons of *M. parvum* positive blood samples were phylogenetically analyzed using MEGA 11 software. The established qPCR targeting the *M. parvum* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase encoding gene (*gap*) showed a lower detection limit of 10 gene copies per reaction and no cross-reactivity within the specificity test. A total of 36.0% ($n = 72$) of the sampled fattening pigs, 25.0% ($n = 15$) of the sows, and 4.37% ($n = 8$) of the boars tested *M. parvum* positive. The dendrogram showed the typical allocation of the *M. parvum* isolates into the “haemominutum group” subgroup within the hemotrophic *Mycoplasma* species. Both the novel established qPCR and the obtained epidemiological data can serve as an important basis for future studies dealing with *M. parvum*.

Keywords: hemotrophic mycoplasmas; *Mycoplasma parvum*; quantitative PCR; phylogenetics



Citation: Ade, J.; Hoelzle, K.; Stadler, J.; Ritzmann, M.; Hoelzle, L.E.

Occurrence of *Mycoplasma parvum* in German Pigs of Different Age Groups Using a Novel Quantitative Real-Time PCR Assay. *Pathogens* **2022**, *11*, 1374. <https://doi.org/10.3390/pathogens11111374>

Academic Editor: David Rodríguez-Lázaro

Received: 24 October 2022

Accepted: 14 November 2022

Published: 18 November 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Hemotrophic mycoplasmas (HMs), small cell-wall-less pathogens, are found on and in erythrocytes in the blood of a wide range of mammalian hosts, including human beings [1–3]. Three porcine HM species are known so far: the two long-known species *Mycoplasma suis* and *Mycoplasma parvum* [4] and the recently described species *Candidatus (Ca.) Mycoplasma haemosuis* [5]. In addition, further porcine HM species or subspecies are suspected but not yet confirmed [6]. In pigs, HM-induced diseases are complex and comprise a variety of clinical signs. *Mycoplasma suis* and *Ca. M. haemosuis* can cause acute diseases that are characterized by anemia, icterus, and high fever. All three HM species are known to induce chronic and persistent infections with low-grade anemia or subclinical courses, effects on growth rates as well as on fattening and reproduction performance [5,7–13]. Of all three porcine HM species, *M. parvum* is considered the least pathogenic species. Only a few studies concerning *M. parvum* have been published so far [14,15], including the experimental infection of one pig to provide bacteria for sequencing purposes [16]. However, the long-term effects of chronic and subclinical infections with *M. parvum* have not been studied so far. It therefore remains undetermined whether immune-mediating effects are induced in the host during *M. parvum* infection, as is known for *M. suis* [17]. Very little is also known about the prevalence of *M. parvum*. The reason for this is that there are no *M. parvum* specific PCR assays available so far. Evidence about the occurrence of *M. parvum* is obtained from studies investigating all porcine HM species using cross-species PCR assays [5,6,18]. As HMs cannot yet be cultivated in vitro, in the last two decades, specific molecular detection methods for HMs have proven

to be the basic prerequisite to obtain insights into the epidemiology, species, and strain differentiation, as well as into the clinical impact of HM infections [9,19–23]. The present study first aimed to develop a specific real-time PCR assay for the quantitative diagnostic of *M. parvum* in pigs. In a second step, this novel qPCR assay was applied to blood samples of domestic pigs from different herds and age groups, i.e., fattening pigs, sows, and boars, to investigate the circulation of *M. parvum* in Germany for the first time ever since the first description of *M. parvum* in 1950 [4]. Furthermore, the genetic diversity of *M. parvum* was compared among seven appropriate isolates by 16S rDNA phylogeny.

2. Materials and Methods

2.1. Blood Samples and DNA Preparation

EDTA-anticoagulated blood samples were collected from fattening pigs, sows, and boars from southern Germany (federal states of Baden-Wuerttemberg and Bavaria). Figure 1 illustrates the sampled area of Germany shaded in grey.



Figure 1. Sampling areas: the grey-shaded areas show the federal states of Baden-Wuerttemberg and Bavaria (Germany), from which the sampled animals originated.

Blood samples of the sows ($n = 60$) were collected by the punctation of the jugular vein. Sows (gilts as well as different parity) originated from a total of three piglet-producing farms with 20 sows per farm sampled. For the group of fattening pigs and boars, DNA extracts from EDTA-anticoagulated blood were available from previous studies [9,24]. Briefly, a total of 200 fattening pigs from 20 farms (10 animals per farm) were sampled at the time of slaughter [9], and 183 boars, housed for artificial insemination in a boar stud and originating from a total of 26 multiplier farms [24], were sampled by punctation of the jugular vein. The boars were aged between 9 and 77 months. The number of sampled boars per multiplier farm ranged from 1 to 42. None of the animals showed any clinical signs. The fattening and multiplier farms had an unknown HM history and were chosen randomly. As sows were sampled during regular on-farm health monitoring, no ethical approval was needed according to the German Animal Welfare Law. Similarly, sampling of the fattening pigs did not require ethical approval according to the German Animal Welfare Law and the Directive 2010/63/EU, as blood collection was performed after slaughtering [9]. The sampling of the boars was approved by the ethical commission of the veterinary faculty of the Ludwig-Maximilians-Universität, Munich (authorization reference number: 245-17-12-2020) [24]. Bacterial DNA was extracted from the EDTA-anticoagulated blood, as described elsewhere [9,25]. Blood as well as DNA samples were stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ prior to use. DNA extracts available from previous studies were submitted for a quality analysis using a NanoDropTM 2000 (Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Germany) before use.

2.2. 16S rDNA and Amplicon Sequencing

In order to obtain *M. parvum* positive DNA for the establishment of the *M. parvum* specific quantitative real-time PCR as well as for phylogenetical analysis, a total of 100 of the DNA samples were randomly chosen for conventional, HM-specific 16S rDNA using the primers described by Volokhov and coworkers [26]. The 25 µL PCR reaction mixture contained 12.5 µL of Maxima Hot Start Taq DNA-Polymerase (Thermo Fisher Scientific™), 10.5 µL of primer–water mixture (containing 0.5 µmol of the primer UNI_16S_mycF and 0.5 µmol of the primer UNI_16S_mycR [26]), and 2.0 µL of template DNA. Cycling conditions consisted of 95 °C for 3 min and 30 cycles at 95 °C for 15 s and 57 °C for 1 min. The PCR was directly analyzed after the run by means of agarose gel electrophoresis. *Mycoplasma parvum* positive DNA samples were then analyzed with *M. suis* and *Ca. M. haemosuis* specific real-time PCR (see Section 2.4) to exclude *M. suis* and sequences within the 16S rDNA amplicons. Afterward, seven 16S rDNA PCR amplicons from *M. suis* and *Ca. M. haemosuis* negative animals were selected for Sanger sequencing (Seqlab Sequence Laboratories, Göttingen, Germany). Obtained sequences were compared to GenBank entries using the NCBI BLAST tool [27].

2.3. Phylogenetic Analysis

The 16S rDNA amplicons of *M. parvum* ($n = 7$) as well as 16S rDNA amplicons (*M. parvum* and other HM species) were used for a phylogenetic analysis. Table 1 gives an overview of all sequences included in the study.

Table 1. Sequences of the different HM species included in the phylogenetic analysis.

| HM Species and Name in the Phylogenetic Tree | Acc. Number (Version) | Host Species | Country of Origin |
|--|-----------------------|--------------|-------------------|
| <i>Mycoplasma parvum</i> | | | |
| <i>M. parvum</i> ON703815 * | ON703815.1 | pig | Germany |
| <i>M. parvum</i> ON703816 * | ON703816.1 | pig | Germany |
| <i>M. parvum</i> ON703817 * | ON703817.1 | pig | Germany |
| <i>M. parvum</i> ON703818 * | ON703818.1 | pig | Germany |
| <i>M. parvum</i> ON703819 * | ON703819.1 | pig | Germany |
| <i>M. parvum</i> ON703820 * | ON703820.1 | pig | Germany |
| <i>M. parvum</i> ON703821 * | ON703821.1 | pig | Germany |
| <i>M. parvum</i> MK287838 | MK287838.1 | pig | Brazil |
| <i>M. suis</i> FN391022 | FN391022.1 | pig | Germany |
| <i>Ca. M. haemosuis</i> JX489601 | JX489601.1 | pig | China |
| <i>M. wenyonii</i> FN392885 | FN392885.1 | cattle | Germany |
| <i>M. ovis</i> MH379798 | MH379798.1 | sheep | Brazil |
| <i>M. coccoides</i> AY171918.1 | AY171918.1 | mouse | USA |
| <i>M. haemofelis</i> U88563 | U88563.2 | cat | USA |
| <i>Ca. M. haemominutum</i> AY150979 | AY150979.1 | cat | South Africa |

* Sequences acquired in this study (highlighted in grey).

The 16S rDNA sequences were aligned with the multiple sequence alignment tool of ClustalW in MEGA X [28], and phylogenetic analysis was performed using the neighbor-joining method with a 1000 bootstrap value in MEGA 11 Software [28,29].

2.4. *M. suis* and *Ca. M. haemosuis* qPCR

The *M. suis* status was defined by a specific qPCR targeting the MSG1 gene of *M. suis*, as described elsewhere [25,30]. Likewise, the recently described *Ca. M. haemosuis* qPCR targeting the *Ca. M. haemosuis* gap gene was used for the determination of the *Ca. M. haemosuis* status. While both the *M. suis* and *Ca. M. haemosuis* status of the fattening pigs and boars was ascertained in previous studies [9,24], qPCR of the sows was performed in the present study.

2.5. Primer Design

The following primers targeting the *gap* gene of *M. parvum* were designed with Primer 3 software [31,32]. *MPaF'*- 5'-ATGCTGGCGCTCCTAAAGTT-3' and *MPaR'*- 5'-CTGCTGCAGCTCTAGCTCTT-3'. *gap* encodes the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) of *M. parvum* (accession no. NC_022575.1). Test specificity was analyzed in silico by using an NCBI-provided BLAST algorithm as well as by sequencing (SeqLab Sequence Laboratories, Göttingen, Germany) of the resulting 276 bp *gap* PCR fragment of *M. parvum*. Sequences were compared to GenBank entries using the BLAST tool provided by NCBI.

2.6. Cloning of the qPCR Fragment (qPCR-Positive Control)

Escherichia coli transformants (pC_Parvum) containing the 276 bp qPCR *gap* fragment of *M. parvum* were produced by cloning the amplicon into the plasmid vector pCR2.1 (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. Plasmid DNA was extracted and purified from the *E. coli* transformants (pC_Parvum) with the GenElute™ Plasmid Miniprep Kit (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany) and obtained plasmid DNA was quantified afterward by means of spectrophotometry (NanoDrop™ 2000, Thermo Fisher Scientific). With a plasmid size of 4.106 kb concentrations, genome equivalents (GE) of *M. parvum* were calculated, and DNA concentrations were adjusted to 45 pg/2 µL representing 1×10^7 GE (<http://cels.uri.edu/gsc/cndna.html> accessed on 13 November 2022).

2.7. Quantitative Real-Time PCR

The 20 µL reaction mixture containing 10 µL of the 2x SYBR® Green PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific), 8 µL of primer mixture (containing 0.5 µM primer each), and 2 µL of template DNA was applied to the StepOne™ System (Applied Biosystems) for the detection of *M. parvum* DNA. Cycling conditions consisted of 95 °C for 5 min, 40 cycles at 95 °C for 15 s, and 60 °C for 1 min, followed by a melting curve analysis. Quantification was performed by the inclusion of plasmid pC_Parvum DNA standard dilutions (450 fg/2 µL, 45 fg/2 µL, and 4.5 fg/2 µL) representing 10^5 , 10^4 , and 10^3 GE per reaction run, respectively. PCR results were analyzed using StepOne™ Software Version 2.2 (Applied Biosystems, Dreieich, Germany) and Microsoft® Excel, 2016.

For the determination of the analytical specificity of the novel qPCR assay, DNA from the porcine HM species *M. suis*, *Ca. M. haemosuis*, other hemotrophic and nonhemotrophic *Mycoplasma* spp. (i.e., *M. wenyonii*, *Ca. M. haemobos*, *M. haemofelis*, *M. bovis*, and *M. bovoculi*), and the following panel of other porcine pathogens was used as template DNA: *Escherichia coli* ($n = 2$), *Salmonella* Typhimurium ($n = 2$), *Staphylococcus aureus*, *Pasteurella multocida*, and *Streptococcus suis*. DNA isolation and/or cultivation of the bacteria was performed as previously described [9,25,30,33]. DNA was adjusted to 10^5 bacteria/ reaction.

Ten-fold dilutions from 10^7 to 1 GE/reaction out of the pC_Parvum plasmid DNA were analyzed by qPCR to determine the lower limit of detection (LOD).

2.8. Intra- and Interassay Repeatability

The intra-assay repeatability was determined by analyzing four replicates of the plasmid dilutions (10^7 to 1 GE/reaction) in the same run. The interassay variability was determined by running quadruples of the same plasmid dilution in five different runs on four consecutive days.

3. Results

3.1. Identification of *Mycoplasma parvum* Positive Samples

Porcine blood samples ($n = 100$) were analyzed by an HM-specific conventional 16S rDNA PCR, and *M. suis* and *Ca. M. haemosuis* specific real-time PCR. Seven randomly chosen HM-specific 16S rDNA amplicons derived from *M. suis* and *Ca. M. haemosuis* negative pigs were analyzed after Sanger sequencing with the BLAST algorithm. All amplicons showed 99.8–100.0% identity to other GenBank entries for *M. parvum* 16S rDNA genes and

could therefore be used as positive controls for the novel *M. parvum* specific real-time PCR. Sequences were uploaded to the GenBank (accession numbers ON703815–ON703821).

3.2. Development of a *M. parvum*-Specific Quantitative Real-Time PCR

We developed a quantitative SYBR[®] green real-time PCR as a diagnostic tool for the detection of *Mycoplasma parvum* in the blood of infected pigs. For this purpose, primers targeting the GAPDH of *M. parvum* were chosen. The novel real-time qPCR assay successfully amplified each of the seven *M. parvum* DNA samples. The specificity of the qPCR was proven because no cross-reactivity was observed with DNA samples from other HM species and nonhemotrophic mycoplasma species or from other porcine bacterial pathogens.

Melting curve analyses revealed a *M. parvum* specific melting temperature of 74.177 °C (± 0.135 °C). Ten-fold serial dilutions of the plasmid pC_Mparvum from 45 pg to 45 ag (corresponding to 10^7 to 10^1 genome equivalents) per reaction were used to determine the analytical sensitivity of the qPCR assay. All different concentrations in the standard dilutions from 10^7 to 10^1 GE were consistently detected by the qPCR assay. The highest dilution yielding consistently positive qPCR results contained 0.45 fg pC_Mparvum DNA per reaction corresponding to 10 GE per reaction. The lower limit of detection of the qPCR was thus 10 *gap* copies per reaction and 2.5×10^3 GE per mL blood.

The intra- and interassay repeatability is shown in Table 2.

Table 2. Intra- and interassay repeatability values of the novel established qPCR.

| Plasmid Copy Number | Intra-Assay Repeatability Mean CT (\pm SD) * | Interassay Repeatability Mean CT (\pm SD) |
|---------------------|--|---|
| 10^7 | 15.23 (± 0.44) | 15.02 (± 0.92) |
| 10^6 | 19.01 (± 0.27) | 18.94 (± 0.92) |
| 10^5 | 22.78 (± 0.11) | 21.92 (± 0.94) |
| 10^4 | 26.20 (± 0.15) | 25.25 (± 0.96) |
| 10^3 | 29.93 (± 0.07) | 29.28 (± 0.75) |
| 10^2 | 32.81 (± 0.73) | 31.89 (± 0.99) |
| 10^1 | 35.92 (± 0.81) | 35.51 (± 0.54) |

* Mean threshold cycle values and standard deviations.

3.3. Hemotrophic mycoplasma Infection in Fattening Pigs, Sows, and Boars

Using the herein established, novel established, *M. parvum*-specific qPCR assay, *M. parvum* could be detected in the blood of each sampled age group of fattening pigs, sows, and boars. Regarding the fattening pigs, 72 out of 200 pigs were positive for *M. parvum*, whereas 38 and 35 out of the 200 were positive for *M. suis* and *Ca. M. haemosuis*, respectively. *M. parvum* was present in the blood of 15 out of the 60 sampled sows. *M. suis* and *Ca. M. haemosuis* were detected in 4 and 13 sows, respectively. A total of 8 out of the 183 boars were positive for *M. parvum* in qPCR, whereas the other two HM species could not be detected in any blood sample of this age group. Co-infections with three HM species were detected in fattening pigs, co-infections with two HM species were detected in fattening pigs as well as in sows.

Average bacterial blood-loads equaled 9.34×10^6 *M. parvum*/mL blood, 7.62×10^7 *M. suis*/mL blood and 1.61×10^5 *Ca. M. haemosuis*/mL blood in fattening pigs; 1.18×10^6 *M. parvum*/mL blood, 3.58×10^4 *M. suis*/mL blood and 4.83×10^5 *Ca. M. haemosuis*/mL blood in sows; and 1.12×10^5 *M. parvum*/mL blood in boars.

Table 3 gives a detailed overview of the HM status of all investigated samples.

Table 3. An overview of the quantitative detection of HMs in sampled fattening pigs, sows, and boars.

| | | Fattening Pigs | | |
|--------------------------------------|---|---|---|---|
| qPCR positive pigs (total) | | <i>M. parvum</i> ¹ | <i>M. suis</i> ² | <i>Ca. M. haemosuis</i> ² |
| bacterial blood-loads (per mL blood) | | 72/200 (36.00%) | 38/200 (19.00%) | 35/200 (17.50%) |
| Average: | | 9.34×10^6 | 7.62×10^7 | 1.61×10^5 |
| Range: | | 3.41×10^3 – 4.82×10^8 | 9.58×10^2 – 1.14×10^9 | 5.52×10^3 – 1.55×10^6 |
| Co-infections | | | | |
| <i>M. parvum</i> | + | <i>M. suis</i> | 17/200 (8.50%) | |
| <i>M. parvum</i> | + | <i>Ca. M. haemosuis</i> | 19/200 (9.50%) | |
| <i>M. suis</i> | + | <i>Ca. M. haemosuis</i> | 12/200 (6.00%) | |
| all species (triple infection) | | 5/200 (2.50%) | | |
| | | Sows | | |
| qPCR positive pigs (total) | | <i>M. parvum</i> ¹ | <i>M. suis</i> ¹ | <i>Ca. M. haemosuis</i> ¹ |
| bacterial blood-loads (per mL blood) | | 15/60 (25.00%) | 4/60 (6.67%) | 13/60 (21.67%) |
| Average: | | 1.18×10^6 | 3.58×10^4 | 4.83×10^5 |
| Range: | | 5.48×10^3 – 1.53×10^7 | 5.66×10^3 – 5.49×10^4 | 2.39×10^3 – 3.56×10^6 |
| Co-infections | | | | |
| <i>M. parvum</i> | + | <i>M. suis</i> | 0/60 (0.00%) | |
| <i>M. parvum</i> | + | <i>Ca. M. haemosuis</i> | 3/60 (5.00%) | |
| <i>M. suis</i> | + | <i>Ca. M. haemosuis</i> | 1/60 (1.66%) | |
| all species (triple infection) | | 0/60 (0.00%) | | |
| | | Boars | | |
| qPCR positive pigs (total) | | <i>M. parvum</i> ¹ | <i>M. suis</i> ³ | <i>Ca. M. haemosuis</i> ³ |
| bacterial blood-loads (per mL blood) | | 8/183 (4.37%) | 0/183 (0.00%) | 0/183 (0.00%) |
| Average: | | 1.12×10^5 | / | / |
| Range: | | 6.23×10^3 – 6.26×10^6 | / | / |
| Co-infections | | | | |
| <i>M. parvum</i> | + | <i>M. suis</i> | 0/183 (0.00%) | |
| <i>M. parvum</i> | + | <i>Ca. M. haemosuis</i> | 0/183 (0.00%) | |
| <i>M. suis</i> | + | <i>Ca. M. haemosuis</i> | 0/183 (0.00%) | |
| all species (triple infection) | | 0/183 (0.00%) | | |

¹ determined in the present study; ² determined in the study of Ade and co-workers (2022) [9]; ³ determined in the study of Ade and co-workers (2021) [24].

3.4. *Mycoplasma parvum* Phylogeny

Seven 16S rDNA *M. parvum* amplicons derived from samples in the present study were used for phylogenetic analyses. Those seven amplicons were randomly chosen from seven different herds without any known contact with each other. Furthermore, the 16S rDNA sequences of *M. parvum*, *M. suis*, *Ca. M. haemosuis*, *M. wenyonii*, *M. ovis*, *M. coccoides*, *M. haemofelis*, and *Ca. M. haemominutum* were obtained from GenBank and are included in the dendrogram. The neighbor-joining method with a 1000 bootstrap value was chosen. The dendrogram is shown in Figure 2.

The obtained *M. parvum* isolates clustered within the “hemominutum” group of the HM species in close relation to *M. suis*. Among the novel German *M. parvum* isolates (accession numbers ON703815–ON703821), two subclusters (orange and yellow highlighted clades) could be distinguished. The *M. parvum* isolate obtained in Brazil (accession number MK287838.1) could be assigned to a further cluster (blue highlighted clade) within all the *M. parvum* isolates.

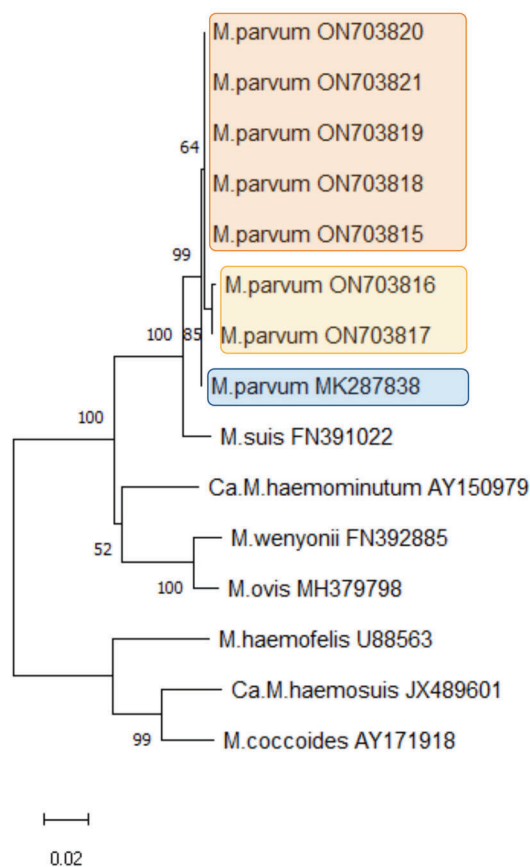


Figure 2. The 16S rDNA phylogenetic analysis of *M. parvum* isolates obtained in the present study (created with MEGA 11 software).

4. Discussion

The study herein described the occurrence of *Mycoplasma parvum* in fattening pigs, sows, and boars in Germany, for which a novel quantitative real-time PCR was successfully established.

Mycoplasma parvum is a long-known but rarely described and investigated porcine HM species. To the best of our knowledge, the novel qPCR assay is the first quantitative and specific assay detecting *M. parvum* in pigs. We used this specific qPCR assay to quantitatively detect *M. parvum* in the blood samples of fattening pigs, sows, and boars from southern Germany. So far, the few descriptions of *M. parvum* reported were based on 16S rDNA PCR or microscopy [5,14–16]. Our established qPCR assay specifically targets the *gap* gene of *M. parvum*, which encodes the GAPDH of *M. parvum*. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase encoding genes have successfully been used as target genes in diagnostics of HMs before, such as for the identification of *M. suis*, *Ca. M. haemosuis*, *M. wenyonii*, and *Ca. M. haemobos* [9,30,33]. Often, the 16S rDNA gene is chosen as the PCR target gene because it is considered highly conserved within bacterial species. However, in the case of the porcine HM species, the 16S rRNA gene is not well suited due to the low differentiation potential, as the 16S rDNA genes of *M. suis* and *M. parvum* show nearly 96% identity among each other [16]. In contrast, the GAPDH-encoding genes of *M. suis* and *M. parvum* have only 76% identity. Therefore, we decided to use the *gap* gene as a PCR target, which is also a housekeeping gene and known to be highly conserved within bacterial species but significantly different between *M. parvum* and *M. suis*. The successful target selection was also reflected in the determination of the analytical specificity. Analytical specificity was first predicted through in silico analysis and verified afterward by negative qPCR results with DNA of other *Mycoplasma species* and further porcine bacterial pathogens.

In the few previous studies dealing with *M. parvum*, a quantification of bacterial blood loads was not performed. Within the herein described novel *M. parvum* qPCR

assay, quantification with a sensitivity of 10 genome equivalents per PCR, corresponding to 2.5×10^3 bacteria per mL blood, is possible. This is in line with similar qPCR assays of other HM species such as *M. suis*, *Ca. M. haemosuis*, *M. wenyonii*, *Ca. M. haemobos*, *M. haemocanis*, and *Ca. M. haematoparvum* [9,30,33,34], and displays a high analytical sensitivity. Therefore, we assume that our novel qPCR assay allows the identification of asymptomatic infected carrier animals. This was evidenced by the application of the qPCR for the successful detection of *M. parvum* in fattening pigs, sows, and boars. To the best of our knowledge, this was the first survey for a European sample panel within different age groups and 443 tested pigs in total. *M. parvum* was present in each of the sampled age groups, i.e., in fattening pigs, sows, and boars. Interestingly, the *M. parvum* infection rate was significantly higher in fattening pigs and sows with 36.0% and 25.0% of *M. parvum* positive animals, respectively, compared with boars, with a total of 4.37% *M. parvum* positive animals.

There could have been many reasons for the variation in the infection rates among the different age groups and could especially include potentially higher biosecurity levels in boar studs, as well as individually housed animals and the absence of group vaccinations in boar studs compared with fattening and piglet-producing farms. Furthermore, the higher HM rates in sows compared with boars could be owing to the known general changes and depression of the immune system during pregnancy [35–37]. The occurrence of *M. parvum* in German fattening pigs and sows in the present study was lower compared with that in Brazil, with 79.7% positive sows [38], and lower than in China, with 50.0% *M. parvum* positive pigs (feeder pigs and sows) [5]. On the contrary, studies in Japan and South Korea revealed lower *M. parvum* prevalence, with 15.0% (feeder pigs and sows) and 2.7% positive pigs (various age groups), respectively [7,39]. For boars, however, there are no comparable studies dealing with the prevalence of *M. parvum* in this age group. Comparing the detection rates of the different HM species within the sampled animals, *M. parvum* was more frequent in each of the age groups than *M. suis* and *Ca. M. haemosuis*. A higher prevalence of *M. parvum* compared with *M. suis* in the same animals was also reported by Seo and coworkers in South Korea [7] and by Gatto and coworkers in Brazil [38].

Coinfections with two or three HM species are a commonly observed issue and have been previously described in pigs, for example, in China, with coinfections of *M. suis*/*M. parvum* and the novel *Ca. M. haemosuis* [5], as well as in Germany with *M. suis* and *Ca. M. haemosuis* [9]. This phenomenon has further been described in other species such as sheep [40], goats [41], cattle [22,33], dogs [42], and cats [43,44].

Despite the long history of *M. parvum*, knowledge of its pathogenicity, and especially its impact on the immune system, is rather limited. So far, two studies conducted 60–70 years ago reported clinical signs similar to *M. suis* induced IAP within experimental *M. parvum* infection [14,15]. From today's point of view, *M. parvum* seems primarily apathogenic to pigs due to the lack of major clinical field cases and the lack of clinical signs in a current experimental infection study conducted in one splenectomized pig [16]. On the contrary, *M. parvum* was related to the loss of performance in subclinical infected pigs in Brazil [10]. In the present study, *M. parvum* was also frequently detected in clinically healthy animals in various age groups in Germany. Chronical and subclinical infections have extensively been described in pigs with *M. suis* [25,45,46] and *Ca. M. haemosuis* [5,7,9,24]. For *M. suis*, it is known that such infections are related to various silent influences, especially those related to dysregulation of the immune system, a higher susceptibility to other infections, and impacts on reproductive performance (e.g., increased stillbirth rates) [17,25,45–47]. Thus, such subclinical *M. suis* infections are of major economic importance to the porcine industry. Whether *M. parvum* is also capable of causing such effects in the course of subclinical infections has not yet been investigated. In the context of the widely observed subclinical infections of *M. parvum* found in the present study, this should be a research topic to be investigated in the future. Our herein developed novel *M. parvum* specific qPCR assay was proven to be a suitable and reliable diagnostic tool to implement in future studies.

5. Conclusions

In this study, a quantitative real-time PCR assay was established for the diagnosis of *M. parvum* in blood samples of pigs. Applying this PCR assay to blood samples of different-aged German pigs, *M. parvum* could successfully be detected in 36.0% ($n = 72$) of fattening pigs, in 25.0% ($n = 15$) of sows, and in 4.27% ($n = 8$) of boars. Both data on the occurrence of *M. parvum* in Germany as well as the novel qPCR are a profound basis for the further studies required to evaluate the medical and economic significance of *M. parvum* in pigs.

Author Contributions: Conceptualization and validation: J.A., K.H. and L.E.H., methodology and software: J.A. and K.H., resources (samples) and data curation: J.S. and M.R., writing: J.A., K.H. and J.S.; review and editing: L.E.H. and M.R. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: The animal study protocol (sampling of the boars) was approved by the ethical commission of the veterinary faculty of the Ludwig-Maximilians-Universität, Munich (authorization reference number: 245-17-12-2020). Ethical review and approval were waived for the sampling of the sows and for the fattening pigs. As sows were sampled during regular on-farm health monitoring, no ethical approval was needed according to the German Animal Welfare Law. Similarly, sampling of the fattening pigs did not require ethical approval according to the German Animal Welfare Law and the Directive 2010/63/EU, as blood collection was performed after slaughtering.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Acknowledgments: The authors wish to thank the colleagues from the Clinic for Swine who assisted at sample collection. The authors are grateful to the farmers who contributed to this study. The authors want to thank Anna-Caroline Wöhr, Animal Welfare Officer of the Faculty of Veterinary Medicine, for professional support concerning ethical issues.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Messick, J.B. Hemotropic mycoplasmas (hemoplasmas): A review and new insights into pathogenic potential. *Vet. Clin. Pathol.* **2004**, *33*, 2–13. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Hattori, N.; Kuroda, M.; Katano, H.; Takuma, T.; Ito, T.; Arai, N.; Yanai, R.; Sekizuka, T.; Ishii, S.; Miura, Y.; et al. Candidatus *Mycoplasma haemohominis* in Human, Japan. *Emerg. Infect. Dis.* **2020**, *26*, 11–19. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Hoelzle, L.E. Haemotropic mycoplasmas: Recent advances in *Mycoplasma suis*. *Vet. Microbiol.* **2008**, *130*, 215–226. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Splitter, E.J. *Eperythrozoon suis* n. sp. and *Eperythrozoon parvum* n. sp., 2 new blood parasites of swine. *Science* **1950**, *111*, 513–514. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Fu, Y.; Shi, T.; Xu, L.; Wei, W.; Lu, F.; Zhang, X.; Yuan, X.; Li, J.; Lv, J.; Fang, W. Identification of a novel Hemoplasma species from pigs in Zhejiang province, China. *J. Vet. Med. Sci.* **2017**, *79*, 864–870. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Thongmeesee, K.; Kamkong, P.; Thanee, S.; Wattanapansak, S.; Kaewthamasorn, M.; Tiawsirisup, S. Molecular detection and genetic analysis of porcine haemoplasmas in commercial pig farms from Thailand reveal a putative novel species. *Transbound. Emerg. Dis.* **2022**, *69*, e2028–e2040. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Seo, M.G.; Kwon, O.D.; Kwak, D. Prevalence and phylogenetic analysis of hemoplasma species in domestic pigs in Korea. *Parasites Vectors* **2019**, *12*, 378. [[CrossRef](#)]
8. Stadler, J.; Ade, J.; Ritzmann, M.; Hoelzle, K.; Hoelzle, L.E. Detection of a novel haemoplasma species in fattening pigs with skin alterations, fever and anaemia. *Vet. Rec.* **2020**, *187*, 66. [[CrossRef](#)]
9. Ade, J.; Stadler, J.; Ritzmann, M.; Zübert, C.; Hoelzle, K.; Hoelzle, L.E. Occurrence of ‘*Candidatus Mycoplasma haemosuis*’ in fattening pigs, sows and piglets in Germany using a novel gap-based quantitative real-time PCR assay. *BMC Vet. Res.* **2022**, *18*, 40. [[CrossRef](#)]
10. Petri, F.A.M.; Sonalio, K.; de Souza Almeida, H.M.; Ferraz, M.E.S.; Storino, G.Y.; de Souza, M.R.; André, M.R.; de Oliveira, L.G. Porcine hemotropic mycoplasmas infection associated with productive impact in intensive pig production. *Porcine Health Manag.* **2020**, *6*, 33. [[CrossRef](#)]

11. Stadler, J.; Jannasch, C.; Mack, S.L.; Dietz, S.; Zöls, S.; Ritzmann, M.; Hoelzle, K.; Hoelzle, L.E. Clinical and haematological characterisation of *Mycoplasma suis* infections in splenectomised and non-splenectomised pigs. *Vet. Microbiol.* **2014**, *172*, 294–300. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Stadler, J.; Ade, J.; Hermanns, W.; Ritzmann, M.; Wentzel, S.; Hoelzle, K.; Hoelzle, L.E. Clinical, haematological and pathomorphological findings in *Mycoplasma suis* infected pigs. *BMC Vet. Res.* **2021**, *17*, 214. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Henry, S.C. Clinical observations on eperythrozoonosis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **1979**, *174*, 601–603.
14. Seamer, J. Studies with *Eperythrozoon parvum* Splitter, 1950. *Parasitology* **1960**, *50*, 67–80. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Barnett, S.F. *Eperythrozoon parvum* in pigs in Kenya. *Bull. Epizoot. Dis. Afr.* **1963**, *11*, 185–195. [[PubMed](#)]
16. Do Nascimento, N.C.; dos Santos, A.P.; Chu, Y.; Guimaraes, A.M.; Baird, A.N.; Weil, A.B.; Messick, J.B. Microscopy and genomic analysis of *Mycoplasma parvum* strain Indiana. *Vet. Res.* **2014**, *45*, 86. [[CrossRef](#)]
17. Do Nascimento, N.C.; Guimaraes, A.M.S.; Dos Santos, A.P.; Chu, Y.; Marques, L.M.; Messick, J.B. RNA-Seq based transcriptome of whole blood from immunocompetent pigs (*Sus scrofa*) experimentally infected with *Mycoplasma suis* strain Illinois. *Vet. Res.* **2018**, *49*, 49. [[CrossRef](#)]
18. Sonalio, K.; Perles, L.; Gatto, I.R.H.; do Amaral, R.B.; Almeida, H.M.S.; Galdeano, J.V.B.; Vieira, R.F.C.; André, M.R.; de Oliveira, L.G. Genetic diversity of emerging hemotropic mycoplasmas in domestic pigs from Brazil. *Transbound. Emerg. Dis.* **2021**, *68*, 1162–1174. [[CrossRef](#)]
19. Tasker, S.; Helps, C.R.; Day, M.J.; Gruffydd-Jones, T.J.; Harbour, D.A. Use of real-time PCR to detect and quantify *Mycoplasma haemofelis* and “*Candidatus Mycoplasma haemominutum*” DNA. *J. Clin. Microbiol.* **2003**, *41*, 439–441. [[CrossRef](#)]
20. Willi, B.; Boretti, F.S.; Cattori, V.; Tasker, S.; Meli, M.L.; Reusch, C.; Lutz, H.; Hofmann-Lehmann, R. Identification, molecular characterization, and experimental transmission of a new hemoplasma isolate from a cat with hemolytic anemia in Switzerland. *J. Clin. Microbiol.* **2005**, *43*, 2581–2585. [[CrossRef](#)]
21. Meli, M.L.; Kaufmann, C.; Zanolari, P.; Robert, N.; Willi, B.; Lutz, H.; Hofmann-Lehmann, R. Development and application of a real-time TaqMan® qPCR assay for detection and quantification of ‘*Candidatus Mycoplasma haemolamae*’ in South American camelids. *Vet. Microbiol.* **2010**, *146*, 290–294. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Meli, M.L.; Willi, B.; Dreher, U.M.; Cattori, V.; Knubben-Schweizer, G.; Nuss, K.; Braun, U.; Lutz, H.; Hofmann-Lehmann, R. Identification, molecular characterization, and occurrence of two bovine hemoplasma species in Swiss cattle and development of real-time TaqMan quantitative PCR assays for diagnosis of bovine hemoplasma infections. *J. Clin. Microbiol.* **2010**, *48*, 3563–3568. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. 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.; et al. A quantitative TaqMan PCR assay for the detection of *Mycoplasma suis*. *J. Appl. Microbiol.* **2011**, *111*, 417–425. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Ade, J.; Ritzmann, M.; Wöstmann, C.; Eddicks, M.; Reese, S.; Hoelzle, K.; Hoelzle, L.E.; Stadler, J. Update on shedding and transmission routes of porcine haemotropic mycoplasmas in naturally and experimentally infected pigs. *Porcine Health Manag.* **2021**, *7*, 49. [[CrossRef](#)]
25. Stadler, J.; Willi, S.; Ritzmann, M.; Eddicks, M.; Ade, J.; Hoelzle, K.; Hoelzle, L.E. Detection of *Mycoplasma suis* in pre-suckling piglets indicates a vertical transmission. *BMC Vet. Res.* **2019**, *15*, 252. [[CrossRef](#)]
26. Volokhov, D.V.; Norris, T.; Rios, C.; Davidson, M.K.; Messick, J.B.; Gulland, F.M.; Chizhikov, V.E. Novel hemotropic mycoplasma identified in naturally infected California sea lions (*Zalophus californianus*). *Vet. Microbiol.* **2011**, *149*, 262–268. [[CrossRef](#)]
27. Altschul, S.F.; Gish, W.; Miller, W.; Myers, E.W.; Lipman, D.J. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **1990**, *215*, 403–410. [[CrossRef](#)]
28. Thompson, J.D.; Higgins, D.G.; Gibson, T.J. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **1994**, *22*, 4673–4680. [[CrossRef](#)]
29. Tamura, K.; Stecher, G.; Kumar, S. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Mol. Biol. Evol.* **2021**, *38*, 3022–3027. [[CrossRef](#)]
30. Hoelzle, L.E.; Helbling, M.; Hoelzle, K.; Ritzmann, M.; Heinritzi, K.; Wittenbrink, M.M. First LightCycler real-time PCR assay for the quantitative detection of *Mycoplasma suis* in clinical samples. *J. Microbiol. Methods* **2007**, *70*, 346–354. [[CrossRef](#)]
31. Koressaar, T.; Remm, M. Enhancements and modifications of primer design program Primer3. *Bioinformatics* **2007**, *23*, 1289–1291. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Untergasser, A.; Cutcutache, I.; Koressaar, T.; Ye, J.; Faircloth, B.C.; Remm, M.; Rozen, S.G. Primer3—New capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res.* **2012**, *40*, e115. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Ade, J.; Niethammer, F.; Schade, B.; Schilling, T.; Hoelzle, K.; Hoelzle, L.E. Quantitative analysis of *Mycoplasma wenyonii* and ‘*Candidatus Mycoplasma haemobos*’ infections in cattle using novel gapN-based realtime PCR assays. *Vet. Microbiol.* **2018**, *220*, 1–6. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Barker, E.N.; Tasker, S.; Day, M.J.; Warman, S.M.; Woolley, K.; Birtles, R.; Georges, K.C.; Ezeokoli, C.D.; Newaj-Fyzul, A.; Campbell, M.D.; et al. Development and use of real-time PCR to detect and quantify *Mycoplasma haemocanis* and “*Candidatus Mycoplasma haematoparvum*” in dogs. *Vet. Microbiol.* **2010**, *140*, 167–170. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Elbers, A.R.; Geudeke, M.J.; van Rossem, H.; Kroon, M.C.; Counotte, G.H. Haematology and biochemistry reference values for sows kept under modern management conditions. *Vet. Q.* **1994**, *16*, 127–130. [[CrossRef](#)]

36. Schollenberger, A.; Degórski, A.; Bielecki, W.; Stempniak, M. Lymphocyte subpopulations in peripheral blood of pregnant sows. *Arch. Vet. Pol.* **1992**, *32*, 35–46.
37. Luppi, P. How immune mechanisms are affected by pregnancy. *Vaccine* **2003**, *21*, 3352–3357. [[CrossRef](#)]
38. Gatto, I.R.H.; Sonálio, K.; Amaral, R.B.D.; Morés, N.; Dalla Costa, O.A.; André, M.R.; de Oliveira, L.G. High frequency and molecular characterization of porcine hemotrophic mycoplasmas in Brazil. *Vet. Microbiol.* **2019**, *231*, 33–39. [[CrossRef](#)]
39. Watanabe, Y.; Fujihara, M.; Suzuki, J.; Sasaoka, F.; Nagai, K.; Harasawa, R. Prevalence of swine hemoplasmas revealed by real-time PCR using 16S rRNA gene primers. *J. Vet. Med. Sci.* **2012**, *74*, 1315–1318. [[CrossRef](#)]
40. Tagawa, M.; Takeuchi, T.; Fujisawa, T.; Konno, Y.; Yamamoto, S.; Matsumoto, K.; Yokoyama, N.; Inokuma, H. A clinical case of severe anemia in a sheep coinfecting with *Mycoplasma ovis* and ‘*Candidatus Mycoplasma haemovis*’ in Hokkaido, Japan. *J. Vet. Med. Sci.* **2012**, *74*, 99–102. [[CrossRef](#)]
41. Hornok, S.; Hajtós, I.; Meli, M.L.; Farkas, I.; Gönczi, E.; Meili, T.; Hofmann-Lehmann, R. First molecular identification of *Mycoplasma ovis* and ‘*Candidatus M. haemoovis*’ from goat, with lack of haemoplasma PCR-positivity in lice. *Acta Vet. Hung.* **2012**, *60*, 355–360. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Roblejo-Arias, L.; Díaz-Sánchez, A.A.; Corona-González, B.; Meli, M.L.; Fonseca-Rodríguez, O.; Rodríguez-Mirabal, E.; Marrero-Perera, R.; Vega-Cañizares, E.; Lobo-Rivero, E.; Hofmann-Lehmann, R. First molecular evidence of *Mycoplasma haemocanis* and ‘*Candidatus Mycoplasma haematoparvum*’ infections and its association with epidemiological factors in dogs from Cuba. *Acta Trop.* **2022**, *228*, 106320. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Martínez-Díaz, V.L.; Silvestre-Ferreira, A.C.; Vilhena, H.; Pastor, J.; Francino, O.; Altet, L. Prevalence and co-infection of haemotropic mycoplasmas in Portuguese cats by real-time polymerase chain reaction. *J. Feline Med. Surg.* **2013**, *15*, 879–885. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Duarte, A.; Marques, V.; Correia, J.H.; Neto, I.; Bráz, B.S.; Rodrigues, C.; Martins, T.; Rosado, R.; Ferreira, J.P.; Santos-Reis, M.; et al. Molecular detection of haemotropic *Mycoplasma* species in urban and rural cats from Portugal. *J. Feline Med. Surg.* **2015**, *17*, 516–522. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Ritzmann, M.; Grimm, J.; Heinritzi, K.; Hoelzle, K.; Hoelzle, L.E. Prevalence of *Mycoplasma suis* in slaughter pigs, with correlation of PCR results to hematological findings. *Vet. Microbiol.* **2009**, *133*, 84–91. [[CrossRef](#)]
46. Brissonnier, M.; Normand, V.; Lebret, A.; Moalic, P.Y.; Guyomard, A.S.; Bachy, V.; Berton, P.; Auvigne, V.; Bouchet, F.; Boulbria, G. 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 Manag.* **2020**, *6*, 13. [[CrossRef](#)]
47. Hoelzle, L.E.; Zeder, M.; Felder, K.M.; Hoelzle, K. Pathobiology of *Mycoplasma suis*. *Vet. J.* **2014**, *202*, 20–25. [[CrossRef](#)]

4. ERWEITERTE DISKUSSION

4. ERWEITERTE DISKUSSION

Mycoplasma parvum ist eine bereits seit langem bekannte, aber selten und unzureichend beschriebene hämotrophe Mykoplasmen-Spezies bei Schweinen (SPLITTER 1950a). Bislang wird *M. parvum* als primär apathogen betrachtet (SPLITTER 1950a, 1953; DO NASCIMENTO et al. 2014). Dennoch sind Art und Umfang des Einflusses subklinischer *M. parvum* Infektionen auf Gesundheit, Wohlbefinden und Produktivität betroffener Tiere weitestgehend unbekannt und ein wichtiges Thema zukünftiger Forschungen. Auf Basis dieser Forschungen sollten Maßnahmen wie Eradikation und Therapiekonzepte für die Praxis abgeleitet werden können. Für derartige künftige Untersuchungen sind mehrere Voraussetzungen zu erfüllen. Eine Voraussetzung sind geeignete diagnostische Instrumente, die *M. parvum* spezifisch im Blut infizierter Tiere nachweisen und eine Abgrenzung von den anderen porzinen HM Spezies *M. suis* und `Ca. *M. haemosuis*` ermöglichen. Aufgrund der Nicht-Kultivierbarkeit hämotropher Mykoplasmen wird auch *M. parvum* gewöhnlich molekularbiologisch mittels PCR nachgewiesen, wobei bei den bisher publizierten Protokollen eine Speziesdifferenzierung zwischen *M. suis* und *M. parvum* nicht immer eindeutig möglich war und nur durch eine sich anschließende Sequenzierung der PCR-Amplifikate sicher erfolgte (PETRI et al. 2020; SONALIO et al. 2021).

Aufgrund dieser Ausgangslage wurde in der vorliegenden Arbeit zunächst eine *M. parvum* spezifische real-time PCR für den quantitativen Nachweis des Erregers im Blut von Schweinen etabliert. Dafür wurde anstelle des in der Diagnostik gewöhnlich verwendeten 16S rRNA Gens das *gap* Gen, welches für die Glyceraldehyd-3-Phosphate Dehydrogenase (GAPDH) von *M. parvum* kodiert, als Zielgen verwendet. Zwar ist das 16S rRNA Gen auch bei *M. parvum* hoch konserviert, allerdings ist aufgrund der großen Übereinstimmung zum analogen Gen von *M. suis* mit 96% eine Differenzierung hierüber nicht möglich. Dies ist durch Vergleiche von publizierten Sequenzen mittels des NCBI Blast Tools ersichtlich. Im *gap* Gen hingegen findet sich lediglich eine 76%-ige Übereinstimmung mit *M. suis*. GAPDH-kodierende Gene wurden aus diesem Grund auch schon für die PCR-Diagnostik anderer hämotropher Mykoplasmen, wie beispielsweise für *M. suis*, `Ca. *M. haemosuis*` und für die bovinen

4. ERWEITERTE DISKUSSION

Spezies *M. wenyonii* und `Ca. *M. haemobos*` verwendet (HOELZLE et al. 2007a; ADE et al. 2018; ADE et al. 2022b). Die ausgewählten Primer, die ein 276 bp großes Fragment des *gap* Gens von *M. parvum* amplifizieren, wurden verschiedenen Spezifitätstests unterzogen. Dabei erfolgten eine *in-silico* Analyse über das NCBI Blast Tool, Sequenzierungen von PCR-positiven Amplifikaten sowie die Verwendung der DNA anderer Bakterien (*M. suis*, `Ca. *M. haemosuis*, *M. wenyonii*, `Ca. *M. haemobos*`, *M. haemofelis*, *M. bovis*, *M. bovocoli*, *Escherichia coli*, *Salmonella* Typhimurium, *Pasteurella multocida*, *Staphylococcus aureus*) als Template DNA in einem PCR Lauf. Bei all diesen Tests erwiesen sich die ausgewählten Primer als hoch spezifisch, da einerseits der *in-silico* Test keine Übereinstimmung mit anderen Gensequenzen und andererseits die Sequenzanalyse PCR-positiver Isolate eine 99%-ige Übereinstimmung mit den in der Genbank eingetragenen *M. parvum* Sequenzen ergab. Die DNA der anderen bakteriellen Erreger wurde außerdem nicht in der PCR amplifiziert. Diese hohe Spezifität von Primern für das *gap* Gen wurde auch für andere hämotrophe Mykoplasmen beschrieben (HOELZLE et al. 2007a; ADE et al. 2018; ADE et al. 2022b). Nach der Herstellung von *Escherichia coli* Transformanten, die das 276 bp große Fragment des *gap* Gens von *M. parvum* beinhalten, konnten über die Größe des verwendeten Plasmids Genomäquivalenten (GE) von *M. parvum* bestimmt werden. Standard-Verdünnungsreihen dieses Plasmids wurden dann für die Bestimmung der Sensitivität der PCR sowie deren unterer Nachweisgrenze erstellt. Damit wurde eine untere Nachweisgrenze von 10 GE pro PCR Ansatz ermittelt. Rückgerechnet auf die Erregermenge pro mL Schweineblut entspricht dies $2,5 \times 10^3$ *M. parvum*. Diese beobachtete untere Nachweisgrenze entspricht denen von anderen Mykoplasmen-spezifischen quantitativen real-time PCRs (ADE et al. 2018; ADE et al. 2022b). Außerdem wurden die Plasmidverdünnungen (10^5 , 10^4 und 10^3 GE je Reaktionsansatz) als Standards für die Quantifizierung untersuchter Proben verwendet.

Durch Etablierung dieser PCR als diagnostisches Instrument konnte die Grundlage für künftige Bearbeitungen von Fragestellungen zu *M. parvum* und für die Routinediagnostik dieses Erreges geschaffen werden.

4. ERWEITERTE DISKUSSION

Eine weitere wichtige und grundlegende Thematik ist die Verbreitung von *M. parvum* in Schweinen. Dazu gibt es wenig verlässliche Daten, da einerseits Einzelfallberichte vorliegen, die häufig aus prä-PCR Zeiten stammen und somit auf mikroskopischer Diagnostik beruhen, welche keine sichere Speziesdifferenzierung ermöglicht (SPLITTER 1950a; JENNINGS und SEAMER 1956; UILENBERG et al. 1981; DO NASCIMENTO et al. 2013; GATTO et al. 2019; PETRI et al. 2020). Andererseits wurden in PCR-basierten Studien HMs beim Schwein nachgewiesen, aber ohne dass eine umfassende Speziesdifferenzierung vorgenommen wurde.

In der vorliegenden Arbeit wurden unter Verwendung der neu etablierten quantitativen real-time PCR insgesamt 443 Schweine verschiedener Altersklassen aus Süddeutschland (Baden-Württemberg und Bayern) untersucht, was nach Sichtung sämtlicher verfügbarer Literatur die erste derartige Studie in Europa ist. Die Ergebnisse werden im Folgenden in verschiedenen Szenarien analysiert.

i. Allgemeiner Vergleich des Vorkommens von *M. parvum* mit anderen publizierten Daten:

Die qualitative Auswertung der PCR ergab bei insgesamt 21,4% (n=95) der 443 untersuchten Tiere ein *M. parvum*-positives Ergebnis. Im Vergleich zu den wenigen verfügbaren *M. parvum* Studien ist dies ein höheres prozentuales Vorkommen als in Japan und Korea (WATANABE et al. 2012; SEO et al. 2019) jedoch ein geringeres Vorkommen als in China und Brasilien (FU et al. 2017; PETRI et al. 2020; SONALIO et al. 2021). Allerdings muss bei den Studien aus China und Brasilien beachtet werden, dass keine eindeutige Unterscheidung zwischen *M. parvum* und *M. suis* erfolgte, sondern allenfalls *M. parvum* als vorherrschende Spezies unter den positiven Ergebnissen genannt wurde. Dies wurde jeweils über Sequenzierung einer Auswahl von positiven Isolaten bestätigt.

ii. Vergleich des Vorkommens von *M. parvum* mit dem Auftreten von *M. suis* und `Ca. *M. haemosuis*` in denselben Tieren:

Weiterhin wurden in der vorliegenden Arbeit neben dem Vorkommen von *M. parvum* die beprobten Tiere auch auf die anderen beiden porcinen Hämoplasmenspezies *M. suis* und `Ca. *M. haemosuis*`, entweder im Rahmen dieser Arbeit (Sauen) oder im Rahmen vorhergegangener Studien (Eber und

4. ERWEITERTE DISKUSSION

Mastschweine) (ADE et al. 2021; ADE et al. 2022b), untersucht. Für *M. suis* kann eine Anzahl von 42 PCR positiven Tieren (4,5%) angegeben werden, für `Ca. *M. haemosuis*` eine Anzahl von 48 (10,9%) PCR positiven Tieren. Somit ist das Vorkommen von *M. parvum* in den untersuchten Proben doppelt so hoch wie das Vorkommen der beiden anderen porzinen Hämoplasmen-Spezies. Ein höheres Vorkommen von *M. parvum* im Vergleich zu *M. suis* wurde auch von anderen Autoren aus Japan, Korea und Brasilien berichtet (WATANABE et al. 2012; SEO et al. 2019; PETRI et al. 2020; SONALIO et al. 2021), Ko-Infektionen von *M. parvum* und `Ca. *M. haemosuis*` wurden in bisherigen Studien noch nicht untersucht. Eine mögliche Erklärung für die höhere Nachweisrate von *M. parvum* im Vergleich zu den anderen beiden porzinen HM Spezies könnte die höhere Pathogenität von *M. suis* und `Ca. *M. haemosuis*` im Vergleich zu *M. parvum* sein. Aufgrund dessen würden Infektionen mit *M. suis* und `Ca. *M. haemosuis*` offensichtlicher zum Vorschein treten. Klinisch inapparente *M. parvum* Infektionen könnten im Gegensatz dazu lange unerkant bleiben und in Beständen fortbestehen. Weitere Erklärungen für die möglicherweise länger unerkante Existenz von *M. parvum* in Tieren und Betrieben könnten Unterschiede in der Immunologie mit einer schlechteren Eliminierung von *M. parvum* durch das Immunsystem, sowie eine geringere Empfindlichkeit von *M. parvum* auf antibiotische Behandlungen sein. Diese Theorien können aber bislang nicht anhand von Literatur oder vergleichbaren Beobachtungen belegt werden.

iii. Vergleich der *M. parvum*-Nachweisraten in den untersuchten Altersgruppen und das Auftreten von Ko-Infektionen mit anderen porzinen hämotrophen Mykoplasmen:

Vergleicht man die untersuchten Altersgruppen untereinander, so traten *M. parvum*-Infektionen bei Ebern mit 4,4% (n=8/183) PCR positiver Tiere weniger häufig auf als bei Sauen und Mastschweinen, mit 25,0% (n=15/60) bzw. 36,0% (n=72/200) PCR positiven Tieren. Auch für *M. suis* und `Ca. *M. haemosuis*` waren die Nachweisraten in den Mastschweinen höher im Vergleich zu den Sauen und Ebern (ADE et al. 2021; ADE et al. 2022b). Eine mögliche Erklärung hierfür könnte eine abnehmenden Anfälligkeit für Infektionen im Laufe des Alters sein. Weiterhin könnten möglicherweise

4. ERWEITERTE DISKUSSION

strengere Biosicherheitsmaßnahmen in Sauenbetrieben und Eberstationen, verglichen mit Mastbetrieben, einen Grund hierfür darstellen.

Unterschiede in den Nachweisraten zwischen Sauen und Ebern könnten auf abweichende Haltungs- und Managementbedingungen zurückzuführen sein. Dabei sind Eber in der Regel individuell aufgestellt, weshalb Rangordnungskämpfe ausbleiben. Außerdem werden Impfmaßnahmen weniger häufig durchgeführt, womit das Risiko einer Übertragung hämotropher Mykoplasmen, die vorwiegend blutgebunden erfolgt (JANSEN 1952; SEAMER 1960; STADLER et al. 2019; ADE et al. 2021), deutlich reduzierter sein dürfte als bei in Gruppen gehaltenen Sauen.

Aufgrund der in der Studie verwendeten Einzeltierproben konnten Ko-Infektionen mit anderen porzinen hämotrophen Mykoplasmen in mehreren Tieren festgestellt werden. So lag die Gesamtzahl an Ko-Infektionen von *M. parvum* und `Ca. *M. haemosuis*` in der Gruppe der Mastschweine bei 9,5% (n=19/200) und in der Gruppe der Sauen bei 5,0% (n=3/60), die Rate von Ko-Infektionen mit *M. suis* und `Ca. *M. haemosuis*` bei 6,0% (n=12/200) bzw. 1,7% (n=1/60). Ko-Infektionen von *M. suis* und *M. parvum* kamen ausschließlich bei den Mastschweinen, und zwar bei 8,5% der untersuchten Tiere (n=17/200) vor. In dieser Gruppe gab es auch Ko-Infektionen mit allen drei untersuchten Spezies. Ko-Infektionen mit mehr als einer HM Spezies wurden weltweit in verschiedenen Tierarten beschrieben, zum Beispiel bei Schafen, Katzen und Rindern (MELI et al. 2010; HORNOK et al. 2012; TAGAWA et al. 2012; MARTÍNEZ-DÍAZ et al. 2013; DUARTE et al. 2015; ADE et al. 2018; ROBLEJO-ARIAS et al. 2022). Auch bei Schweinen gibt es Berichte über das simultane Auftreten von *M. parvum* und *M. suis* sowie von *M. suis* / *M. parvum* mit `Ca. *M. haemosuis*` in einem betroffenen Tier (SPLITTER 1950a, 1953; DIPEOLU et al. 1982; WATANABE et al. 2012; ADE et al. 2022b).

- iv. Vergleiche in Bezug auf die Quantifizierungsergebnisse von *M. parvum* im Blut:
Die durchschnittlichen Erregermengen von $9,34 \times 10^6$ *M. parvum* je mL Blut (Mastschweine), $1,18 \times 10^5$ *M. parvum* je mL Blut (Sauen) und $1,12 \times 10^5$ *M. parvum* je mL Blut (Eber) sind ähnlich zu den durchschnittlichen Erregermengen von *M. suis* und `Ca. *M. haemosuis*` aus Feldproben (RITZMANN et al. 2009; STADLER et al. 2019; ADE et al. 2022b).

4. ERWEITERTE DISKUSSION

Vergleichbare Daten zur Erregermenge von *M. parvum* bei natürlich infizierten Tieren existieren nicht. Die in der vorliegenden Studie erhobenen *M. parvum* Blut-Quantitäten können einzig mit jenen verglichen werden, die im Rahmen der experimentellen Infektion eines splenektomierten Einzeltieres von DO NASCIMENTO und Mitarbeitern festgestellt wurden. Interessanterweise stiegen die Erregermengen je mL Blut bei diesem Tier, welches keine klinischen Anzeichen zeigte, auf bis zu 10^{10} *M. parvum* je mL Blut an (DO NASCIMENTO et al. 2014). Im Vergleich zu den im Rahmen dieser Dissertation erhobenen Felddaten war die Quantität von *M. parvum* circa doppelt so hoch. Diese hohe Erregermenge im Rahmen einer experimentellen Infektion im Vergleich zu einer Feldinfektion ist ein typisches Phänomen, welches auch bei experimentellen Infektionen mit *M. suis* beobachtet wurde (DIETZ et al. 2014; STADLER et al. 2014).

Zusammenfassend gesagt zeigt sich durch die Beprobung von insgesamt 443 Schweinen aus Süddeutschland eine weite Verbreitung von *M. parvum* in verschiedenen Altersklassen sowie ein häufigeres Vorkommen dieser Spezies im Vergleich zu *M. suis* und `Ca. M. haemosuis`. Phänomene, die bislang bei den anderen beiden porzinen Hämoplasmenspezies beobachtet wurden, wie höhere Infektionsraten bei Mastschweinen im Vergleich zu Sauen und Ebern, Ko-Infektionen mit mehreren Hämoplasmenspezies, höhere durchschnittliche Erregermengen im Blut bei Mastschweinen im Vergleich zu älteren Tieren, sowie deutlich niedrigere Erregermengen in natürlich infizierten Tieren als bei einer experimentellen Infektion, treffen hier auch auf *M. parvum* zu.

Neben der qualitativen und quantitativen Analyse zum *M. parvum* Vorkommen in Deutschland war eine phylogenetische Analyse von *M. parvum* Isolaten ein weiteres Ziel dieser Arbeit. Dazu wurden von sieben zufällig ausgewählten *M. parvum* Isolaten 16S rDNA Amplifikate sequenziert, und aus den erhaltenen Sequenzen zusammen mit anderen Sequenzen von *M. parvum* und weiterer hämotropher Mykoplasmen (*M. suis*, `Ca. M. haemosuis`, *M. wenyonii*, *M. ovis*, *M. coccoides*, *M. haemofelis*, `Ca. M. haemominutum`) ein phylogenetischer Stammbaum mittels der „neighbour-joining“ Methode (MEGA 11 Programm) erstellt. In diesem Stammbaum lassen sich zwei größere Cluster abgrenzen, wobei in eines der Cluster *M. parvum*, *M. suis*,

4. ERWEITERTE DISKUSSION

‘*Ca. M. haemominutum*’, *M. wenyonii* und *M. ovis*, in das andere Cluster *M. haemofelis*, ‘*Ca. M. haemosuis*’ und *M. coccoides* eingeordnet werden konnten. Diese Beobachtung stimmt mit bisherigen Angaben überein, in denen diese beiden beobachteten Cluster als „Haemominutum“ und „Haemofelis“ Cluster bezeichnet werden (PETERS et al. 2008). Interessanterweise umfasst das „Haemominutum“ Cluster jene Spezies, die ehemals der Gattung *Eperythrozoon* zugeordnet wurden, das „Haemofelis“ Cluster die Spezies, die ehemals zur Gattung *Haemobartonella* gehörten. Unsere sieben neuen *M. parvum* Isolate konnten in zwei Subgruppen aufgeteilt werden, wobei sich diese beiden Subgruppen vom brasilianischen *M. parvum* Isolat abgrenzen. Der nächste Verwandte aller analysierten *M. parvum* Isolate ist hier *M. suis*, was ebenfalls der aktuellen Taxonomie entspricht (DO NASCIMENTO et al. 2014). Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten phylogenetischen Analysen ergaben eine eindeutige genetische Zuordnung der neuen HM Isolate zu *M. parvum*, aber auch gleichzeitig eine phylogenetische Abgrenzung zu *M. parvum* Isolaten aus Brasilien. Neben der Bestätigung der aktuellen Taxonomie kann somit auch nochmals die Spezifität der neu etablierten *M. parvum*-spezifischen real-time PCR bestätigt werden.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zum Vorkommen von *M. parvum* sowie die phylogenetischen Analysen von sieben erhobenen *M. parvum* Isolaten ermöglichen eine erste Einschätzung des Infektionsgeschehens mit *M. parvum*, wobei der Erreger offensichtlich in Süddeutschland weit verbreitet ist. Weitere Forschungen zu *M. parvum*, die insbesondere die Frage nach der Pathogenität, der Beteiligung an Krankheitskomplexen sowie Fähigkeit einer Immunmodulation klären, werden in Zukunft benötigt, um die Bedeutung des Bakteriums für die Tiergesundheit und die Schweineproduktion zu beleuchten.

5. SCHLUSSFOLGERUNG UND AUSBLICK

5. SCHLUSSFOLGERUNG UND AUSBLICK

Die im ersten Schritt der Arbeit etablierte qPCR, die sich durch Testung der Spezifität und Sensitivität als geeigneten Nachweis von *M. parvum* in Schweineblut erwiesen hat, bietet fortan eine wichtige Grundlage für die Diagnostik und Grundlagenforschung dieser hämotrophe Mykoplasmenspezies. Die mittels dieser etablierten PCR im zweiten Schritt der Arbeit durchgeführten Studien zum Vorkommen von *M. parvum* in Schweinen zeigen eine weite Verbreitung des Bakteriums in Süddeutschland. Diese Erkenntnis unterstützt die Intention und Notwendigkeit weiterer Forschungsaktivitäten. Hier sollte im nächsten Schritt in einem Tierversuch die sekundäre Pathogenität von *M. parvum* geklärt werden, wobei ganz besonders der Frage nachgegangen werden sollte, ob *M. parvum* auch in der Lage ist, das Immunsystem des Wirtes zu regulieren und supprimieren. Im positiven Falle würde *M. parvum* einen wichtigeren Stellenwert in der Beteiligung von Krankheitskomplexen einnehmen. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit etablierte PCR und die epidemiologischen Daten dienen dann nicht nur als Grundlage für eine solche weiterführende Arbeit, sondern können auch im Anschluss für gegebenenfalls einzuleitende Überwachungs- und Eradikationsmaßnahmen eine wichtige Rolle spielen.

6. ZUSAMMENFASSUNG

6. ZUSAMMENFASSUNG

Mycoplasma parvum ist ein porciner Vertreter der Gruppe der nicht-kultivierbaren hämotrophen Mykoplasmen, welcher bislang als primär apathogen definiert wird. Die tatsächliche Bedeutung dieses Bakteriums für die Tiergesundheit, das Tierwohl sowie für die Ökonomie der Schweineproduktion sind weitgehend ungeklärt, da die Thematik bisher kaum Gegenstand wissenschaftlicher Untersuchungen war. Daher sollte in der vorliegenden Dissertation erstmals das Vorkommen von *M. parvum* in Deutschland untersucht werden und neue *M. parvum* Isolate weiterhin phylogenetisch analysiert werden. Um dies zu ermöglichen war es zunächst notwendig, ein *M. parvum* spezifisches Diagnostikinstrument zu etablieren. Aufgrund der fehlenden Kultivierbarkeit wird *M. parvum*, wie auch andere hämotrophe Mykoplasmen, mittels PCR nachgewiesen. Allerdings können bislang veröffentlichte PCR-Protokolle, die auf Amplifikation des 16S rRNA Gens beruhen, nicht ausreichend zwischen *M. suis* und *M. parvum* differenzieren, was eine anschließende Sequenzierung positiver PCR Amplifikate notwendig macht (PETRI et al. 2020; SONALIO et al. 2021). Dahingegen zeigte sich die im Rahmen dieser Dissertation etablierte PCR, die das *gap* Gen von *M. parvum* nachweist, als sehr spezifisch und effektiv für den Nachweis von *M. parvum* aus Blutproben von Schweinen und wird für zukünftige wissenschaftliche Fragestellungen sowie für die Diagnostik ein essentielles Instrument darstellen.

Erste epidemiologischen Erkenntnisse konnten durch Untersuchung von Schweinen sowie durch phylogenetische Analyse von *M. parvum* Isolaten gewonnen werden. Durch die insgesamt 443 untersuchten Schweine verschiedener Altersgruppen wurde *M. parvum* erstmals in Deutschland mit einer Gesamtprävalenz von 21,4% nachgewiesen. Somit ist das Vorkommen von *M. parvum* höher als jenes von *M. suis* und `Ca. *M. haemosuis*` in denselben Tieren. Die Gründe hierfür sind nicht bekannt, lassen aber Unterschiede in der Pathophysiologie der drei Spezies vermuten. Beim Vergleich der verschiedenen Gruppen waren Mast Schweine häufiger mit *M. parvum* infiziert (36,0%) als Sauen (25,0%) und Eber (4,4%), was den Beobachtungen mit den anderen beiden porcinen Hämoplasmenspezies entspricht. Mögliche Erklärungen für dieses Phänomen könnten unterschiedliche Biosicherheitsmaßnahmen der Betriebe oder Unterschiede in der Immunantwort der Tiere sein. Die Erregermengen aller drei porcinen Hämoplasmenspezies im Blut der untersuchten Tiere waren quantitativ auf

6. ZUSAMMENFASSUNG

vergleichbarem Niveau. Die phylogenetische Analyse von insgesamt sieben neuen *M. parvum* Isolaten bestätigte die Speziesdiagnose sowie die Einordnung in die aktuell gültige Taxonomie.

Die Erkenntnisse aus der Untersuchung von Schweinen verschiedener Altersklassen zeigen eine weite Verbreitung von *M. parvum* in Deutschland und dienen somit als erste Grundlage für weiterführende Arbeit, indem sie deren Notwendigkeit bestärken. In jedem Fall muss im nächsten Schritt der Frage nach dem Einfluss des Erregernachweises und der Auswirkungen auf die Tiergesundheit und Produktivität nachgegangen werden. Ganz zentral wird dabei die Thematik der sekundären Pathogenität und Fähigkeit zur Immunmodulation sein.

7. SUMMARY

7. SUMMARY

Mycoplasma parvum, a porcine representative of the group of hemotropic mycoplasmas, has so far been defined as primarily apathogenic. To date, the actual significance of this bacterium for animal health, animal welfare and the economy of pig production is mainly unclear, and the subject has hardly been studied scientifically to date.

In order to gain first insights into fundamental topics of *M. parvum*, this thesis aimed to investigate the occurrence of *M. parvum* in Germany. Further, obtained isolates of *M. parvum* should be analyzed from a phylogenetic point of view.

To enable this, it was primary necessary to establish a *M. parvum*-specific diagnostic tool. Due to its uncultivability, *M. parvum* is usually detected by PCR. However, published PCR protocols target the 16S rRNA gene of *M. parvum* and due to the close genetic relationship to *M. suis*, those primers cannot differ sufficiently between *M. suis* and *M. parvum*. Thus, sequencing of positive PCR amplicons would be necessary (PETRI et al. 2020; SONALIO et al. 2021). In contrast, the quantitative real-time PCR assay established in this thesis is targeting the *gap* Gene of *M. parvum* proved to be highly specific and effective for the detection of this bacterium in porcine blood. Thus, it represents an essential tool for future scientific questions as well as for routine diagnostics.

First findings on the frequency of *M. parvum* in the field were obtained by PCR-examination of different-aged pigs as well as via phylogenetic analysis of *M. parvum* isolates. Within those examinations, *M. parvum* was detected for the first time ever in Germany with an overall prevalence of 21.4% *M. parvum* infected pigs (95/443), which is higher than the occurrence of *M. suis* and `Ca. *M. haemosuis*` in the same animals. Reasons therefore are not yet known but suggest differences in the pathophysiology of the three HM species. Comparing the different groups with each other, fattening pigs were more frequently infected with *M. parvum* (36.0%) than sows (25.0%) and boars (4.4%). Those observations are in line with the two other porcine HM species. Possible explanations are discrepancies concerning the biosecurity of the farms or variations in the immune response of the animals. Bacterial blood loads of all three porcine hemoplasma species were at approximately the same level. Phylogenetic analysis of

7. SUMMARY

a total out of seven collected *M. parvum* isolates confirmed the species diagnosis as well as the classification into the currently valid taxonomy.

Those findings show a wide distribution of *M. parvum* in Germany and thus confirm the necessity of further work on this topic. In any case, the next step must be to raise the question about the impact of *M. parvum* on animal health and pig production. A central issue here will be the question on the secondary pathogenicity and immunomodulatory capacity of *M. parvum*.

LITERATURVERZEICHNIS

LITERATURVERZEICHNIS

Ade, J., Hoelzle, K., Stadler, J., Ritzmann, M., and Hoelzle, L. E. 2022a. 'Occurrence of *Mycoplasma parvum* in German Pigs of Different Age Groups Using a Novel Quantitative Real-Time PCR Assay', *Pathogens*, 11.

Ade, J., Niethammer, F., Schade, B., Schilling, T., Hoelzle, K., and Hoelzle, L. E. 2018. 'Quantitative analysis of *Mycoplasma wenyonii* and 'Candidatus *Mycoplasma haemobos*' infections in cattle using novel gapN-based realtime PCR assays', *Vet Microbiol*, 220: 1-6.

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

Ade, J., Stadler, J., Ritzmann, M., Zübert, C., Hoelzle, K., and Hoelzle, L. E. 2022b. 'Occurrence of 'Candidatus *Mycoplasma haemosuis*' in fattening pigs, sows and piglets in Germany using a novel gap-based quantitative real-time PCR assay', *BMC Vet Res*, 18: 40.

Barker, E. N., Helps, C. R., Peters, I. R., Darby, A. C., Radford, A. D., and Tasker, S. 2011. 'Complete genome sequence of *Mycoplasma haemofelis*, a hemotropic mycoplasma', *J Bacteriol*, 193: 2060-1.

Barnett, S. F. 1963. 'Eperythrozoon parvum in pigs in Kenya', *Bull Epizoot Dis Afr*, 11: 185-95.

Bellamy, J. E., MacWilliams, P. S., and Searcy, G. P. 1978. 'Cold-agglutinin hemolytic anemia and *Haemobartonella canis* infection in a dog', *J Am Vet Med Assoc*, 173: 397-401.

Bosnic, D., Baresic, M., Anic, B., Sentic, M., Cerovec, M., Mayer, M., and Cikes, N. 2010. 'Rare zoonosis (hemotropic mycoplasma infection) in a newly diagnosed systemic lupus erythematosus patient followed by a *Nocardia asteroides pneumonia*', *Braz J Infect Dis*, 14: 92-5.

Brissonnier, M., Normand, V., Lebret, A., Moalic, P. Y., Guyomard, A. S., Bachy, V., Berton, P., Auvigne, V., Bouchet, F., and 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 Manag*, 6: 13.

Clark, B. 1942. 'Eperythrozoon felis (sp. nov.) in a cat', *J S Afr Vet Med Assoc*, 13 (1): 15-16.

Dean, R. S., Helps, C. R., Gruffydd Jones, T. J., and Tasker, S. 2008. 'Use of real-time PCR to detect *Mycoplasma haemofelis* and 'Candidatus *Mycoplasma haemominutum*' in the saliva and salivary glands of haemoplasma-infected cats', *J Feline Med Surg*, 10: 413-7.

Descloux, E., Mediannikov, O., Gourinat, A. C., Colot, J., Chauvet, M., Mermoud, I., Desoutter, D., Cazorla, C., Klement-Frutos, E., Antonini, L., Levasseur, A., Bossi, V., Davoust, B., Merlet, A., Goujart, M. A., Oedin, M., Brescia, F., Laumond, S., Fournier, P. E., and Raoult, D. 2020. 'Flying fox haemolytic fever, description of a new zoonosis caused by "Candidatus *Mycoplasma haemohominis*"', *Clin Infect Dis*. 73(7):e1445-e1453.

Dietz, S., Mack, S. L., Hoelzle, K., Becker, K., Jannasch, C., Stadler, J., Ritzmann, M., and Hoelzle, L. E. 2014. 'Quantitative PCR analysis of *Mycoplasma suis* shedding patterns during experimental infection', *Vet Microbiol*, 172: 581-5.

LITERATURVERZEICHNIS

Dipeolu, O. O., Majaro, O. M., Akinboade, O. A., and Nwufor, K. J. 1982. 'Studies on the blood parasites of pigs in Ibadan, Nigeria', *Vet Parasitol*, 10: 87-90.

do Nascimento, N. C., dos Santos, A. P., Chu, Y., Guimaraes, A. M., Baird, A. N., Weil, A. B., and Messick, J. B. 2014. 'Microscopy and genomic analysis of *Mycoplasma parvum* strain Indiana', *Vet Res*, 45: 86.

do Nascimento, N. C., Dos Santos, A. P., Chu, Y., Guimaraes, A. M., Pagliaro, A., and Messick, J. B. 2013. 'Genome Sequence of *Mycoplasma parvum* (Formerly *Eperythrozoon parvum*), a Diminutive Hemoplasma of the Pig', *Genome Announc*, 1.

do Nascimento, N. C., Guimaraes, A. M. S., Dos Santos, A. P., Chu, Y., Marques, L. M., and Messick, J. B. 2018. 'RNA-Seq based transcriptome of whole blood from immunocompetent pigs (*Sus scrofa*) experimentally infected with *Mycoplasma suis* strain Illinois', *Vet Res*, 49: 49.

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., and Messick, J. B. 2008. 'Hemoplasma infection in HIV-positive patient, Brazil', *Emerg Infect Dis*, 14: 1922-4.

Doyle, L.P. 1932. 'A Rickettsia-Like or Anaplasmosis-Like Disease in Swine.', *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 81: 668-71.

Duarte, A., Marques, V., Correia, J. H., Neto, I., Bráz, B. S., Rodrigues, C., Martins, T., Rosado, R., Ferreira, J. P., Santos-Reis, M., and Tavares, L. 2015. 'Molecular detection of haemotropic *Mycoplasma* species in urban and rural cats from Portugal', *J Feline Med Surg*, 17: 516-22.

Duarte, M. I., Oliveira, M. S., Shikanai-Yasuda, M. A., Mariano, O. N., Takakura, C. F., Pagliari, C., and Corbett, C. E. 1992. 'Haemobartonella-like microorganism infection in AIDS patients: ultrastructural pathology', *J Infect Dis*, 165: 976-7.

Felder, K. M., Hoelzle, K., Heinritz, K., Ritzmann, M., and Hoelzle, L. E. 2010. 'Antibodies to actin in autoimmune haemolytic anaemia', *BMC Vet Res*, 6: 18.

Flint, J. C., and Moss, L. C. 1953. 'Infectious anemia in cats', *J Am Vet Med Assoc*, 122: 45-8.

Flint, J. C., Roepke, M. H., and Jensen, R. 1959. 'Feline infections anemia. II. Experimental cases', *Am J Vet Res*, 20: 33-40.

Fu, Y., Shi, T., Xu, L., Wei, W., Lu, F., Zhang, X., Yuan, X., Li, J., Lv, J., and Fang, W. 2017. 'Identification of a novel *Hemoplasma* species from pigs in Zhejiang province, China', *J Vet Med Sci*, 79: 864-70.

Gatto, I. R. H., Sonálio, K., Amaral, R. B. D., Morés, N., Dalla Costa, O. A., André, M. R., and de Oliveira, L. G. 2019. 'High frequency and molecular characterization of porcine hemotropic mycoplasmas in Brazil', *Vet Microbiol*, 231: 33-39.

Groebel, K., Hoelzle, K., Wittenbrink, M. M., Ziegler, U., and Hoelzle, L. E. 2009. '*Mycoplasma suis* invades porcine erythrocytes', *Infect Immun*, 77: 576-84.

Guimaraes, A. M., Biondo, A. W., Lara, A. C., and Messick, J. B. 2007. 'Exploratory study of *Mycoplasma suis* (*Eperythrozoon suis*) on four commercial pig farms in southern Brazil', *Vet Rec*, 160: 50-3.

LITERATURVERZEICHNIS

- Gupta, R. S., Sawnani, S., Adeolu, M., Alnajar, S., and Oren, A. 2018. 'Phylogenetic framework for the phylum Tenericutes based on genome sequence data: proposal for the creation of a new order Mycoplasmoidales ord. nov., containing two new families Mycoplasmoidaceae fam. nov. and Metamycoplasmataceae fam. nov. harbouring Eperythrozoon, Ureaplasma and five novel genera', *Antonie Van Leeuwenhoek*, 111: 1583-630.
- Heinritzi, K. 1984. Ein Beitrag zur Splenektomie beim Schwein, *Tierärztl Prax*, 12: 451-4.
- Heinritzi, K. 1989. 'Eperythrozoon-Infektion beim Schwein als Faktorenkrankheit.', *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr*, 102: 337-42.
- Heinritzi, K. 1990. 'Untersuchungen zur Pathogenese und Diagnostik der Infektion mit Eperythrozoon suis', Habilitationsschrift. Ludwig-Maximilians-Universität München, München
- Henderson, J. P., O'Hagan, J., Hawe, S. M., and Pratt, M. C. 1997. 'Anaemia and low viability in piglets infected with Eperythrozoon suis', *Vet Rec*, 140: 144-6.
- Henry, S. C. 1979. 'Clinical observations on eperythrozoonosis', *J Am Vet Med Assoc*, 174: 601-3.
- Hicks, C. A., Barker, E. N., Brady, C., Stokes, C. R., Helps, C. R., and Tasker, S. 2014. 'Non-ribosomal phylogenetic exploration of Mollicute species: new insights into haemoplasma taxonomy', *Infect Genet Evol*, 23: 99-105.
- Hoelzle, L. E., Felder, K. M., and Hoelzle, K. 2011. 'Porzine Eperythrozoonose: von Eperythrozoon suis zu Mycoplasma suis', *Tierärztl Prax Ausg G Grosstiere Nutztiere*, 39: 215-20.
- Hoelzle, L. E., Helbling, M., Hoelzle, K., Ritzmann, M., Heinritzi, K., and Wittenbrink, M. M. 2007a. 'First LightCycler real-time PCR assay for the quantitative detection of Mycoplasma suis in clinical samples', *J Microbiol Methods*, 70: 346-54.
- Hoelzle, L. E., Hoelzle, K., Helbling, M., Aupperle, H., Schoon, H. A., Ritzmann, M., Heinritzi, K., Felder, K. M., and Wittenbrink, M. M. 2007b. 'MSG1, a surface-localised protein of Mycoplasma suis is involved in the adhesion to erythrocytes', *Microbes Infect*, 9: 466-74.
- Hoelzle, L. E., Zeder, M., Felder, K. M., and Hoelzle, K. 2014. 'Pathobiology of Mycoplasma suis', *Vet J*, 202: 20-5.
- Hornok, S., Hajtós, I., Meli, M. L., Farkas, I., Gönczi, E., Meili, T., and Hofmann-Lehmann, R. 2012. 'First molecular identification of Mycoplasma ovis and 'Candidatus M. haemoovis' from goat, with lack of haemoplasma PCR-positivity in lice', *Acta Vet Hung*, 60: 355-60.
- Hornok, S., Meli, M. L., Erdos, A., Hajtós, I., Lutz, H., and Hofmann-Lehmann, R. 2009. 'Molecular characterization of two different strains of haemotropic mycoplasmas from a sheep flock with fatal haemolytic anaemia and concomitant Anaplasma ovis infection', *Vet Microbiol*, 136: 372-7.
- Huang, D. S., Guan, P., Wu, W., Shen, T. F., Liu, H. L., Cao, S., and 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 Infect Dis*, 12: 171.
- Jansen, B.C. . 1952. 'The Occurrence of Eperythrozoon Parvum Splitter, 1950 in South African Swine ', *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 25: 5-6.

LITERATURVERZEICHNIS

- Jennings, A. R., Seamer, John. 1956. 'A New Blood Parasite in British Pigs', *Nature*, 178: 153-54.
- Jüngling, A., and Erhard, M.H. Heinritzi, K. Lösch, U. 1994. 'Bedeutung und Verlauf eines Kälteagglutinins bei der Eperythrozoon suis-Infektion des Schweines', *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr*, 107: 271-75.
- Kikuth, W. 1928. 'Über einen neuen Anämieerreger, Bartonella canis nov. spec.', *Klinische Wochenschrift*, 7.37: 1729-30.
- Korn, G., Mussgay, M. 1968. Ein Fall von Eperythrozoon suis mit differentialdiagnostischer Bedeutung bei einem Schweinepestverdacht, *Zentralbl Veterinärmed B*, 15: 617-30.
- Liebich, H. G., and Heinritzi, K. 1992. Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen an Eperythrozoon suis, *Tierärztl Prax*, 20: 270-4.
- Liu, J., Zhou, D., Cheng, Z., Wang, Z., Wang, L., Wang, S., Yang, D., and Chai, T. 2012. 'Development and evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay based on recombinant inorganic pyrophosphatase gene antigen for the detection of Mycoplasma suis antibodies', *Res Vet Sci*, 93: 48-50.
- Mack, S.L. 2019. 'Transcriptomic analyses during infectious anemia in pigs'. Dissertation Universität Hohenheim, Stuttgart. <http://opus.uni-hohenheim.de/volltexte/2019/1666/>.
- Maggi, R. G., Compton, S. M., Trull, C. L., Mascarelli, P. E., Mozayeni, B. R., and Breitschwerdt, E. B. 2013a. 'Infection with hemotropic Mycoplasma species in patients with or without extensive arthropod or animal contact', *J Clin Microbiol*, 51: 3237-41.
- Maggi, R. G., Mascarelli, P. E., Havenga, L. N., Naidoo, V., and Breitschwerdt, E. B. 2013b. 'Co-infection with Anaplasma platys, Bartonella henselae and Candidatus Mycoplasma haematoparvum in a veterinarian', *Parasit Vectors*, 6: 103.
- Martínez-Díaz, V. L., Silvestre-Ferreira, A. C., Vilhena, H., Pastor, J., Francino, O., and Altet, L. 2013. 'Prevalence and co-infection of haemotropic mycoplasmas in Portuguese cats by real-time polymerase chain reaction', *J Feline Med Surg*, 15: 879-85.
- Martins, Msds, Silva, L. D., Miranda, L. M., Lima, C. A. A., Amaral, R. B. D., Machado, R. Z., André, M. R., Braga, Mdsco, Rosário, Cjrmd, Melo, F. A., and Pereira, J. G. 2019. 'Molecular detection of Mycoplasma suis in extensive pig production systems in the State of Maranhão, northeast Brazil', *Rev Bras Parasitol Vet*, 28: 306-09.
- Meli, M. L., Willi, B., Dreher, U. M., Cattori, V., Knubben-Schweizer, G., Nuss, K., Braun, U., Lutz, H., and Hofmann-Lehmann, R. 2010. 'Identification, molecular characterization, and occurrence of two bovine hemoplasma species in Swiss cattle and development of real-time TaqMan quantitative PCR assays for diagnosis of bovine hemoplasma infections', *J Clin Microbiol*, 48: 3563-8.
- Messick, J. B. 2004. 'Hemotropic mycoplasmas (hemoplasmas): a review and new insights into pathogenic potential', *Vet Clin Pathol*, 33: 2-13.
- Messick, J. B., Walker, P. G., Raphael, W., Berent, L., and Shi, X. 2002. 'Candidatus mycoplasma haemodidelphidis' sp. nov., 'Candidatus mycoplasma haemolamae' sp. nov. and Mycoplasma haemocanis comb. nov., haemotropic 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', *Int J Syst Evol Microbiol*, 52: 693-98.

LITERATURVERZEICHNIS

- Neimark, H., Johansson, K. E., Rikihisa, Y., and 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'', *Int J Syst Evol Microbiol*, 51: 891-99.
- Neimark, H., Johansson, K. E., Rikihisa, Y., and Tully, J. G. 2002. 'Revision of haemotrophic Mycoplasma species names', *Int J Syst Evol Microbiol*, 52: 683.
- Neitz, W.O. 1934. 'Eperythrozoon Ovis (sp. nov.) Infection in Sheep', *Onderstepoort Journal of Veterinary Science and Animal Industry*, 3: 203-71.
- Oehlerking, J., Kube, M., Felder, K. M., Matter, D., Wittenbrink, M. M., Schwarzenbach, S., Kramer, M. M., Hoelzle, K., and Hoelzle, L. E. 2011. 'Complete genome sequence of the hemotrophic Mycoplasma suis strain KI3806', *J Bacteriol*, 193: 2369-70.
- Peters, I. R., Helps, C. R., Willi, B., Hofmann-Lehmann, R., and Tasker, S. 2008. 'The prevalence of three species of feline haemoplasmas in samples submitted to a diagnostics service as determined by three novel real-time duplex PCR assays', *Vet Microbiol*, 126: 142-50.
- Petri, F. A. M., Sonalio, K., de Souza Almeida, H. M., Ferraz, M. E. S., Storino, G. Y., de Souza, M. R., André, M. R., and de Oliveira, L. G. 2020. 'Porcine hemotrophic mycoplasmas infection associated with productive impact in intensive pig production', *Porcine Health Manag*, 6: 33.
- Plank, G., Heinritzi K. 1990. 'Disseminierte intravasale Gerinnung bei der Eperythrozoonose des Schweines'. *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr*, 103: 13-18.
- Pospischil, A., and Hoffmann, R. 1982. 'Eperythrozoon suis in naturally infected pigs: a light and electron microscopic study', *Vet Pathol*, 19: 651-7.
- Preston, K. S., and Greve, J. H. 1965. 'Eperythrozoonosis in 4-week-old pigs', *Iowa State Univ Vet*, 27: 119.
- Puntaric, V., Borčić, D., Vukelić, D., Jeren, T., Burek, V., Wikerhauser, T., and Richter, B. 1986. 'Eperythrozoonosis in man', *Lancet*, 2: 868-9.
- Razin, S., Yogev, D., and Naot, Y. 1998. 'Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas', *Microbiol Mol Biol Rev*, 62: 1094-156.
- Rikihisa, Y., Kawahara, M., Wen, B., Kociba, G., Fuerst, P., Kawamori, F., Suto, C., Shibata, S., and Futohashi, M. 1997. 'Western immunoblot analysis of Haemobartonella muris and comparison of 16S rRNA gene sequences of H. muris, H. felis, and Eperythrozoon suis', *J Clin Microbiol*, 35: 823-9.
- Ritzmann, M., Grimm, J., Heinritzi, K., Hoelzle, K., and Hoelzle, L. E. 2009. 'Prevalence of Mycoplasma suis in slaughter pigs, with correlation of PCR results to hematological findings', *Vet Microbiol*, 133: 84-91.
- Roblejo-Arias, L., Díaz-Sánchez, A. A., Corona-González, B., Meli, M. L., Fonseca-Rodríguez, O., Rodríguez-Mirabal, E., Marrero-Perera, R., Vega-Cañizares, E., Lobo-Rivero, E., and Hofmann-Lehmann, R. 2022. 'First molecular evidence of Mycoplasma haemocanis and 'Candidatus Mycoplasma haematoparvum' infections and its association with epidemiological factors in dogs from Cuba', *Acta Trop*, 228: 106320.

LITERATURVERZEICHNIS

- Santana, M. S., Hoppe, E. G. L., Carraro, P. E., Calchi, A. C., de Oliveira, L. B., do Amaral, R. B., Mongruel, A. C. B., Machado, D. M. R., Burger, K. P., Barros-Batestti, D. M., Machado, R. Z., and André, M. R. 2022. 'Molecular detection of vector-borne agents in wild boars (*Sus scrofa*) and associated ticks from Brazil, with evidence of putative new genotypes of Ehrlichia, Anaplasma, and haemoplasmas', *Transbound Emerg Dis*, 69: e2808-e31.
- Schilling, V. 1928. 'Eperythrozoon Coccoides, eine neue durch Splenektomie Aktivierbare Dauerinfektion der Weissen Maus', *Klinische Wochenschrift*, 7: 1853–55.
- Schmidt, P., Kaspers, B., Jüngling, A., Heinritzi, K., and Lösch, U. 1992. 'Isolation of cold agglutinins in Eperythrozoon suis-infected pigs', *Vet Immunol Immunopathol*, 31: 195-201.
- Schreiner, S. A., Sokoli, A., Felder, K. M., Wittenbrink, M. M., Schwarzenbach, S., Guhl, B., Hoelzle, K., and Hoelzle, L. E. 2012. 'The surface-localised α -enolase of Mycoplasma suis is an adhesion protein', *Vet Microbiol*, 156: 88-95.
- Schwarz, L. 2023. 'Universitätsklinik für Schweine, Veterinärmedizinische Universität Wien, mündliche Mitteilung über eine Mycoplasma parvum Infektion in Verbindung mit klinischer Symptomatik'.
- Seamer, J. 1960. 'Studies with Eperythrozoon parvum Splitter, 1950', *Parasitology*, 50: 67-80.
- Seo, M. G., Kwon, O. D., and Kwak, D. 2019. 'Prevalence and phylogenetic analysis of hemoplasma species in domestic pigs in Korea', *Parasit Vectors*, 12: 378.
- Sokoli, A., Groebel, K., Hoelzle, K., Amselgruber, W. M., Mateos, J. M., Schneider, M. K., Ziegler, U., Felder, K. M., and Hoelzle, L. E. 2013. 'Mycoplasma suis infection results endothelial cell damage and activation: new insight into the cell tropism and pathogenicity of hemotropic mycoplasma', *Vet Res*, 44: 6.
- Sonalio, K., Perles, L., Gatto, I. R. H., do Amaral, R. B., Almeida, H. M. S., Galdeano, J. V. B., Vieira, R. F. C., André, M. R., and de Oliveira, L. G. 2021. 'Genetic diversity of emerging hemotropic mycoplasmas in domestic pigs from Brazil', *Transbound Emerg Dis*, 68: 1162-74.
- Splitter, E. J. 1950a. 'Eperythrozoon suis n. sp. and Eperythrozoon parvum n. sp., 2 new blood parasites of swine', *Science*, 111: 513-4.
- Splitter, E. J. 1950b. 'Eperythrozoon suis, the etiologic agent of ictero-anemia or an anaplasmosis-like disease in swine', *Am J Vet Res*, 11: 324-30.
- Splitter, E. J. 1953. 'Eperythrozoon parvum, a filterable blood parasite of swine', *Nature*, 172: 40.
- Splitter, E. J., and Williamson, R. L. 1950. 'Eperythrozoonosis in swine; a preliminary report', *J Am Vet Med Assoc*, 116: 360-4.
- Stadler, J., Ade, J., Hermanns, W., Ritzmann, M., Wentzel, S., Hoelzle, K., and Hoelzle, L. E. 2021. 'Clinical, haematological and pathomorphological findings in Mycoplasma suis infected pigs', *BMC Vet Res*, 17: 214.
- Stadler, J., Ade, J., Ritzmann, M., Hoelzle, K., and Hoelzle, L. E. 2020. 'Detection of a novel haemoplasma species in fattening pigs with skin alterations, fever and anaemia', *Vet Rec*, 187: 66.

LITERATURVERZEICHNIS

Stadler, J., Jannasch, C., Mack, S. L., Dietz, S., Zöls, S., Ritzmann, M., Hoelzle, K., and Hoelzle, L. E. 2014. 'Clinical and haematological characterisation of *Mycoplasma suis* infections in splenectomised and non-splenectomised pigs', *Vet Microbiol*, 172: 294-300.

Stadler, J., Willi, S., Ritzmann, M., Eddicks, M., Ade, J., Hoelzle, K., and Hoelzle, L. E. 2019. 'Detection of *Mycoplasma suis* in pre-suckling piglets indicates a vertical transmission', *BMC Vet Res*, 15: 252.

Steer, J. A., Tasker, S., Barker, E. N., Jensen, J., Mitchell, J., Stocki, T., Chalker, V. J., and Hamon, M. 2011. 'A novel hemotropic *Mycoplasma* (hemoplasma) in a patient with hemolytic anemia and pyrexia', *Clin Infect Dis*, 53: e147-51.

Strait, E. L., Hawkins, P. A., and Wilson, W. D. 2012. 'Dysgalactia associated with *Mycoplasma suis* infection in a sow herd', *J Am Vet Med Assoc*, 241: 1666-7.

Sykes, J. E., Lindsay, L. L., Maggi, R. G., and Breitschwerdt, E. B. 2010. 'Human coinfection with *Bartonella henselae* and two hemotropic mycoplasma variants resembling *Mycoplasma ovis*', *J Clin Microbiol*, 48: 3782-5.

Tagawa, M., Takeuchi, T., Fujisawa, T., Konno, Y., Yamamoto, S., Matsumoto, K., Yokoyama, N., and Inokuma, H. 2012. 'A clinical case of severe anemia in a sheep coinfecting with *Mycoplasma ovis* and 'Candidatus *Mycoplasma haemovis*' in Hokkaido, Japan', *J Vet Med Sci*, 74: 99-102.

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., and Gruffydd-Jones, T. J. 2003. 'Phylogenetic analysis of hemoplasma species: an international study', *J Clin Microbiol*, 41: 3877-80.

Tasker, S., Peters, I. R., Papasouliotis, K., Cue, S. M., Willi, B., Hofmann-Lehmann, R., Gruffydd-Jones, T. J., Knowles, T. G., Day, M. J., and Helps, C. R. 2009. 'Description of outcomes of experimental infection with feline haemoplasmas: copy numbers, haematology, Coombs' testing and blood glucose concentrations', *Vet Microbiol*, 139: 323-32.

Thongmeesee, K., Kamkong, P., Thanee, S., Wattanapansak, S., Kaewthamasorn, M., and Tiawsirisup, S. 2022. 'Molecular detection and genetic analysis of porcine haemoplasmas in commercial pig farms from Thailand reveal a putative novel species', *Transbound Emerg Dis.*, 69(5):e2028-e2040.

Uilenberg, G., Zeeuwen, A. A., and de Ruijter, T. 1981. '[Eperythrozoon parvum (Rickettsiales) in swine in the Netherland]', *Tijdschr Diergeneeskd*, 106: 456.

Watanabe, Y., Fujihara, M., Obara, H., Nagai, K., and Harasawa, R. 2011. 'Two genetic clusters in swine hemoplasmas revealed by analyses of the 16S rRNA and RNase P RNA genes', *J Vet Med Sci*, 73: 1657-61.

Watanabe, Y., Fujihara, M., Suzuki, J., Sasaoka, F., Nagai, K., and Harasawa, R. 2012. 'Prevalence of swine hemoplasmas revealed by real-time PCR using 16S rRNA gene primers', *J Vet Med Sci*, 74: 1315-8.

Willi, B., Boretti, F. S., Meli, M. L., Bernasconi, M. V., Casati, S., Hegglin, D., Puorger, M., Neimark, H., Cattori, V., Wengi, N., Reusch, C. E., Lutz, H., and Hofmann-Lehmann, R. 2007. 'Real-time PCR investigation of potential vectors, reservoirs, and shedding patterns of feline hemotropic mycoplasmas', *Appl Environ Microbiol*, 73: 3798-802.

LITERATURVERZEICHNIS

Wolf-Jäckel, G. A., Jäckel, C., Museux, K., Hoelzle, K., Tasker, S., Lutz, H., and Hofmann-Lehmann, R. 2010. 'Identification, characterization, and application of a recombinant antigen for the serological investigation of feline hemotropic *Mycoplasma* infections', *Clin Vaccine Immunol*, 17: 1917-25.

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., and Hua, X. G. 2009. 'Prevalence of *Mycoplasma suis* (*Eperythrozoon suis*) infection in swine and swine-farm workers in Shanghai, China', *Am J Vet Res*, 70: 890-4.

Zachary, J. F., and Smith, A. R. 1985. 'Experimental porcine eperythrozoonosis: T-lymphocyte suppression and misdirected immune responses', *Am J Vet Res*, 46: 821-30.

Zhao, Y., Ren, Z., Kang, Q., Chen, Y., Wang, X., Tang, X., Zhang, F., and Qin, J. 2017. 'Development of an antigen specific colloidal gold immunochromatographic assay for detection of antibody to *M. wenyonii* in bovine sera', *J Microbiol Methods*, 143: 58-62.

Zhongyang, L., Jiansong, Z., Yijuan, S., Yuting, X., Yufeng, L., and Jiarong, X. 2017. 'Seroprevalence of *Mycoplasma suis* infection in pigs in eastern China as estimated by a blocking enzyme-linked immunosorbent assay', *Can J Vet Res*, 81: 313-17.

Zulty, J. C., and Kociba, G. J. 1990. 'Cold agglutinins in cats with haemobartonellosis', *J Am Vet Med Assoc*, 196: 907-10.

DANKSAGUNG

DANKSAGUNG

Mein Dank gilt an dieser Stelle allen Personen, die diese Arbeit ermöglicht und zu deren Gelingen beigetragen haben.

An erster Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei Prof. Dr. Ludwig E. Hölzle für die Überlassung des Themas sowie die Betreuung der Arbeit bedanken.

Prof. Dr. Mathias Ritzmann danke ich für die unkomplizierte Übernahme der Betreuung seitens der tierärztlichen Fakultät.

Ganz besonders möchte ich mich an dieser Stelle bei Frau Dr. Katharina Hölzle für die immer verfügbare Hilfe und vor allem ihre langanhaltende Geduld bedanken.

Ein ebenso großer Dank gilt Frau Dr. Julia Stadler für unsere tolle Zusammenarbeit, die Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit und unsere Freundschaft.

Allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Fachgebietes für Infektions- und Umwelthygiene der Uni Hohenheim danke ich für die Unterstützung des laborpraktischen Teils dieser Arbeit. Den Kolleginnen und Kollegen der Klinik für Schweine danke ich ganz herzlich für die Unterstützung bei der Probennahme und dem Probenmanagement.

Ohne die Unterstützung meiner einmaligen Familie und meinen Freunden wären weder das Studium, noch diese Arbeit möglich gewesen. Insbesondere gilt dieser Dank meinen Eltern, meinen Geschwistern Alexandra und Philipp sowie Charlotte, Sarah-Lena und Sabrina für unsere gemeinsamen Uni-Zeiten und allen anderen, für die einfach zu wenig Platz auf dieser Seite ist. Danke dass ihr mich immer wieder motiviert habt und mich immer so nehmt, wie ich bin.