

Aus der Klinik für Schweine
in Oberschleißheim
(Vorstand: Prof. Dr. Dr. Karl Heinritzi)
der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

**Untersuchungen zur Prävalenz von *Mycoplasma suis* in
Deutschland sowie vergleichende Untersuchungen
zwischen real-time Polymerasekettenreaktion und Akri-
din-Ausstrich bezüglich ihrer Sensitivität und Spezifität**

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

**von
Julia Grimm
aus Dinkelsbühl**

München 2008

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. J. Braun
Referent: Univ.-Prof. Dr. K. Heinritzi
Koreferent: Priv.-Doz. Dr. H. Kaltner

Tag der Promotion: 08.02.2008

Meinen Eltern

&

meinem Freund

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	4
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	7
1 EINLEITUNG	8
2 LITERATURÜBERSICHT	10
2.1 Geschichte der <i>Mycoplasma suis</i>-Infektion	10
2.2 Taxonomische Stellung von <i>Mycoplasma suis</i>	11
2.3 Morphologie von <i>Mycoplasma suis</i>	12
2.4 Vorkommen und Bedeutung von haemotropen Mycoplasmen	12
2.5 Verbreitung von <i>Mycoplasma suis</i>	13
2.6 Pathogenese und Immunologie	14
2.7 Klinisches Bild	16
2.8 Pathologie der <i>Mycoplasma suis</i>-Infektion	18
2.9 Differenzialdiagnose	19
2.10 Therapie und Prophylaxe	20
2.11 Diagnose	21
2.11.1 Klinische und hämatologische Veränderungen	21
2.11.2 Biologische Diagnose	23
2.11.3 Mikroskopischer Erregernachweis	24
2.11.4 Serologische Nachweisverfahren	25
2.11.5 Molekularbiologischer Nachweis von <i>Mycoplasma suis</i>	28
3 MATERIAL UND METHODEN	41
3.1 Ziel der Untersuchung	41
3.2 Probenmaterial	41
3.3 Probenverarbeitung	42
3.3.1 Hämatologische und klinisch-chemische Blutuntersuchungen	42
3.3.2 Blutausstriche	43
3.3.3 Extraktion der <i>Mycoplasma suis</i> -DNA	43
3.3.4 Automatisierte Extraktion der <i>Mycoplasma suis</i> -DNA mit dem MagNA Pure LC™ Automaten	47
3.3.5 Agarosegelelektrophorese	48
3.3.6 Quantitative real-time PCR	50
3.3.7 Aufbau und Funktion des LightCyclers®	51
3.3.8 Durchführung der quantitativen real-time PCR	52
3.3.9 Statistische Auswertung	55
4 ERGEBNISSE	56

4.1	Anzahl und Verteilung der untersuchten Proben	56
4.2	Evaluierung der DNA-Extraktionsmethode	58
4.3	Spezifität der DNA-Extraktionsmethode	58
4.4	Anzahl und Verteilung der real-time PCR-positiven Proben	60
4.5	Anzahl und Verteilung der im Akridin-Ausstrich positiven Proben	63
4.6	Verteilung positiver Betriebe	64
4.7	Regionale Verteilung der <i>M. suis</i>-positiven Betriebe in Bayern	66
4.8	Regionale Verteilung der <i>M. suis</i>-positiven Betriebe in Baden-Württemberg	67
4.9	Prozentuale Verteilung <i>M. suis</i>-infizierter Tiere innerhalb positiver Betriebe	68
4.10	Reproduzierbarkeit der real-time PCR Ergebnisse	69
4.11	Vergleich der Ergebnisse von real-time PCR und Akridin-Ausstrich	69
4.12	Ermittlung der empfohlenen Stichprobengröße zur Identifizierung positiver Betriebe	71
4.13	Ergebnisse der hämatologischen und klinisch-chemischen Untersuchungen	71
4.13.1	Erythrozytenanzahl	71
4.13.2	Hämoglobinkonzentration	73
4.13.3	Hämatokrit	74
4.13.4	MCH, MCHC und MCV	76
4.13.5	Leukozytenanzahl	77
4.13.6	Thrombozytenanzahl	79
4.13.7	Bilirubinkonzentration	80
4.13.8	Glukosekonzentration	81
4.13.9	Eisenkonzentration	82
4.13.10	Untersuchungen zur Signifikanz und Korrelation	83
5	DISKUSSION	85
5.1	Diagnoseverfahren	85
5.2	DNA-Extraktion	89
5.3	Prävalenz von <i>M. suis</i>	90
5.4	Hämatologische und klinisch-chemische Parameter	93
6	SCHLUSSFOLGERUNG	96
7	ZUSAMMENFASSUNG	98
8	SUMMARY	100
	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	102
	TABELLENVERZEICHNIS	104
	LITERATURVERZEICHNIS	105

DANKSAGUNG 116

LEBENS LAUF 117

Abkürzungsverzeichnis

Ag	Antigen
Ak	Antikörper
BAL	bronchoalveoläre Lavage
bp	Basenpaare
Cp	Crossing Point
dNTP	Desoxynucleotidtriphosphat
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FRET	Fluoreszenz-resonanz-energy-transfer
GAPDH	Glyceraldehyd-Phosphat-Dehydrogenase
HspA1	Heat shock protein A1
Ig	Immunglobulin
IHA	Indirekter Hämagglutinationstest
KBR	Komplementbindungsreaktion
LM	Lebendmasse
M	molar, Mol pro Liter
M. suis	Mycoplasma suis
MMA	Mastitis-Metritis-Agalaktie
MSG1	<i>M. suis</i> GAPDH-like Protein 1
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
PE	Porcine Eperythrozoonose
pg	Pikogramm
SDS	Sodium-Dodecyl-Sulfat
t	Threshold Cycle
Taq	Thermus aquaticus
Tris	Tri-(hydroxymethyl)-aminomethan

1 Einleitung

Die durch *Mycoplasma suis* verursachte porcine Eperythrozoonose ist eine weltweit verbreitete Faktorenkrankheit beim Schwein (HEINRITZI, 1989). Sie wurde erstmals in den USA von KINSLEY (1932) als Ikteroanämie bzw. von DOYLE (1932) als “anaplasmosis-like disease“ beschrieben.

1960 wurde der Erreger von SPLITTER und WILLIAMSON anhand morphologischer und pathogenetischer Untersuchungen als *Eperythrozoon suis* identifiziert. Vergleichende Sequenzanalysen des 16S rRNA Gens von *Eperythrozoon suis* mit *Haemobartonella muris* und *Mycoplasma spp.* haben gezeigt dass *Haemobartonella spp.* und *Eperythrozoon suis* eine nahe Verwandtschaft zu der Familie *Mycoplasmataceae* aufweisen (NEIMARK und KOCAN, 1997; RIKIHISA et al., 1997). *Eperythrozoon suis* wurde 2002 der Gattung *Mycoplasma* zugeordnet und als eine eigene neue Spezies *Mycoplasma suis comb. nov. nom. nov.* beschrieben (MESSICK et al., 2002; NEIMARK et al., 2002). *Mycoplasma (M.) suis* ist ein epizellulär sitzender Erreger, der sich an der Erythrozytenoberfläche anheftet und dadurch die roten Blutkörperchen deformiert und schädigt (ZACHARY und BASGALL, 1985).

Die porcine Eperythrozoonose kann bei Schweinen aller Altersgruppen auftreten und verläuft in der Regel subklinisch. Begünstigend auf den Ausbruch der Erkrankung wirken Stressoren wie Umstallen, Absetzen sowie schlechte Haltungs- und Fütterungsbedingungen. Bei der akuten porcinen Eperythrozoonose prägen Fieber, hämolytische Anämie mit Ikterus, Blässe, Anorexie und zyanotische Verfärbungen an den Extremitäten das Krankheitsbild. Von ökonomischer Bedeutung für die Schweinehaltung ist vor allem die chronische Infektion, die mit Wachstumsstörungen bei Mastschweinen, verlängerten Aufzucht- und Mastzeiten, Fertilitätsstörungen, sowie einer gesteigerten Anfälligkeit gegenüber infektiösen Erregern des Respirations- und Digestionstraktes einhergeht (ZACHARY und SMITH, 1985; HEINRITZI, 1989; HENDERSON et al., 1997).

Trotz intensiver Weiterentwicklung der diagnostischen Verfahren gestaltet sich der Nachweis einer *M. suis*-Infektion nach wie vor schwierig. Die Tatsache dass haemotrophe Mycoplasmen im Labor bislang nicht kultivierbar sind, schränkt die Möglichkeiten der mikrobiologischen Diagnostik erheblich ein.

Der mikroskopische Erregernachweis gelingt nur während eines akuten Krankheitsgeschehens und zeichnet sich durch niedrige Sensitivität und Spezifität aus. Die Splenektomie eines möglicherweise infizierten Einzeltieres gilt bisher als das einzig sichere Nachweisverfahren, durch

das auch subklinisch infizierte Tiere erfasst werden können. Der erhöhte Zeit- und Kostenfaktor, als auch der Aspekt des Tierschutzes, limitieren den Einsatz dieser Methode in der Routinediagnostik. Die serologischen Nachweisverfahren eignen sich für eine Bestandsdiagnostik, sind aufgrund der kurzzeitigen Antikörperpersistenz bei *M. suis*-Infektionen jedoch häufig mit falsch-negativen Ergebnissen verbunden. Neue serologische Testverfahren auf der Basis von *M. suis*-spezifischen Antigenen stellen eine vielversprechende Verbesserung der Sensitivität und Spezifität des indirekten Erregernachweises dar und ermöglichen den Einsatz der *M. suis*-Serologie in Routinelabors. Ein erheblicher Fortschritt in der Diagnostik der *M. suis*-Infektion konnte durch Etablierung einer Polymerasekettenreaktion (PCR), die sowohl akut und chronisch erkrankte Tiere, als auch asymptomatische Trägartiere erfasst, erzielt werden. Das vor kurzem entwickelte real-time PCR-Verfahren zur Quantifizierung von *M. suis* verspricht neue bedeutende Einblicke in die Pathogenese, Epidemiologie und Prävalenz der *M. suis*-Infektion. Das real-time PCR-Verfahren erlaubt aufgrund seiner hohen Standardisierung, Automatisierung, Reproduzierbarkeit sowie des geringen Kontaminationsrisikos eine Etablierung der *M. suis* PCR-Diagnostik in Routinelabors (HOELZLE et al., 2007b).

Da in der Literatur unterschiedliche Angaben über die Prävalenz von *M. suis* bestehen, soll in der vorliegenden Arbeit die Verbreitung von *M. suis* in Deutschland mittels real-time PCR untersucht werden. Des Weiteren sollen die Nachweisverfahren real-time PCR und der mikroskopische Erregernachweis mittels Akridinorange-Färbung bezüglich ihrer Sensitivität und Spezifität miteinander verglichen werden sowie eine Veränderung der labordiagnostischen Parameter bei *M. suis*-infizierten Tieren erfasst werden.

2 Literaturübersicht

2.1 Geschichte der *Mycoplasma suis*-Infektion

SCHILLING findet 1928 zum ersten Mal in Blutausstrichen von splenektomierten Mäusen ringförmige Gebilde auf der Oberfläche der Erythrozyten, die er als *Eperythroozoon coccoides* bezeichnet. Die ersten Berichte über das Vorkommen von *M. suis* beim Schwein stammen aus dem mittleren Westen der USA. Im Oktober 1931 wird dort eine bis dato scheinbar unbekannte Erkrankung beschrieben, die bei zwei Monate alten Schweinen Ikterus, Hämorrhagien in Lunge, Herz und Nieren, Schwellung von Milz und Leber sowie eine dunkelrote Verfärbung der Milz verursacht. Weiterhin beobachtet KINSLEY (1932) Anaplasmen-ähnliche Körper in Blutausstrichen von erkrankten Tieren. Die klinischen Leitsymptome Anämie und Ikterus in Verbindung mit Apathie, Schwäche und Dyspnoe werden erstmals von DOYLE (1932) erwähnt. Ebenso wie KINSLEY bezeichnet er die in den Blutausstrichen vorkommenden Gebilde als Anaplasmen- oder Rickettsien-ähnlich.

KINSLEY und RAY (1934) stellen einen Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Ohrspitzennekrosen und der als "anaplasmosis-like disease" oder "swine icterioanemia" bezeichneten Erkrankung fest. In den folgenden Jahren werden immer wieder Fälle mit ähnlicher klinischer Symptomatik, sowie mikroskopischen und pathologischen Veränderungen in Verbindung mit Anaplasmen-ähnlichen Körpern beschrieben.

1960 kann der Erreger aus dem Blut akut erkrankter Tiere isoliert werden (SPLITTER und WILLIAMSON, 1960). Der für die Ikterioanämie des Schweines verantwortliche Erreger wird aufgrund seiner Ähnlichkeit mit bereits identifizierten Eperythrozoen von Wiederkäuern als *Eperythroozoon suis* bezeichnet.

Die porcine Eperythroozoonose (PE) wird, im Rahmen der Abklärung eines Schweinepestverdachtes, in Deutschland erstmals 1968 von KORN und MUSSGAY diagnostiziert. Weitere Krankheitsfälle in Deutschland werden erst wieder ab 1977 von HOFFMANN und SAALFELD veröffentlicht.

2.2 Taxonomische Stellung von *Mycoplasma suis*

Der Erreger der porcinen Eperythrozoonose wird von RISTIC und KREIER (1984) in die Ordnung der *Rickettsiales* eingegliedert. Bis 1993 gehören drei Familien zur Ordnung der *Rickettsiales*: *Rickettsiaceae*, *Bartonellaceae* und *Anaplasmataceae*. Die haemotrophen Bakterien *Haemobartonella spp.* und *Eperythrozoon spp.* werden der Familie *Anaplasmataceae* zugeordnet. *Haemobartonella spp.* und *Eperythrozoon spp.* heften sich an der Erythrozytenoberfläche an und dringen nicht -wie Anaplasmen- in die Erythrozyten ein. Im Gegensatz zu Anaplasmen sind sie außerdem von einer einfachen Membran umgeben (POSPISCHIL und HOFFMANN, 1982).

Lange Zeit besteht bereits die Vermutung, dass *Eperythrozoon spp.* und *Haemobartonella spp.* nicht den Rickettsien angehören, sondern in der Klasse der *Mollicutes* anzusiedeln sind. Die phänotypischen Eigenschaften der beiden Genera *Eperythrozoon* und *Haemobartonella* (kein intrazellulärer Parasitismus, geringe Grösse, keine Zellwand, keine Flagellen, Resistenz gegen Penicillin, Empfindlichkeit gegenüber Tetrazyklinen) stützen diese These.

Mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion kann das 16S rRNA Gen von *Haemobartonella spp.*- und *Eperythrozoon spp.*-Organismen amplifiziert, sequenziert und mit Sequenzen bereits erforschter Bakterien verglichen werden. Hierbei ist eine höhere Übereinstimmung der Gensequenzen von *Haemobartonella spp.* und *Eperythrozoon suis* mit *Mycoplasma spp.* als mit den Gensequenzen von *Anaplasma marginale* feststellbar. *Haemobartonella spp.* und *Eperythrozoon spp.* werden daraufhin dem Genus *Mycoplasma* zugeordnet (NEIMARK und KOCAN, 1997; RIKIHISA et al., 1997).

Phylogenetische Untersuchungen haben gezeigt, dass eine enge Verwandtschaft zwischen den haemotrophen Mycoplasmen und den Vertretern der Pneumonie-Gruppe der Mycoplasmen besteht. Die haemotrophen Mycoplasmen repräsentieren jedoch einen neuen Cluster innerhalb des Genus *Mycoplasma* und werden auch als *Haemoplasmen* bezeichnet (NEIMARK et al., 2001).

Mycoplasma suis ist speziesspezifisch und kann daher nicht auf andere Tierarten übertragen werden (SMITH, 1992). Ebenso wenig ist eine Infektion von Schweinen mit den beim Rind (*Eperythrozoon wenyonii*) beziehungsweise beim Schaf (*Eperythrozoon ovis*) vorkommenden Spezies möglich (SPLITTER, 1950b).

2.3 Morphologie von *Mycoplasma suis*

Mycoplasma suis ist ein rundlich bis ovales Bakterium mit einem Durchmesser von 0,3 bis 3 µm und wird von einer einzelnen Zellmembran umschlossen. Im Cytoplasma sind kleine Granula und einige filamentöse Strukturen vorzufinden. Einen Kern besitzen die haemotrophen Mycoplasmen jedoch nicht (MESSICK, 2004).

Während ihres Entwicklungszyklus, von der unreifen über die jugendliche zur reifen Form, treten die Erreger in unterschiedlicher Gestalt auf. In elektronenmikroskopischen Untersuchungen können mindestens drei verschiedene Vermehrungsstadien nachgewiesen werden: (1) kleine kokkoide, unreife, (2) jugendliche diskusförmige und (3) reife ringförmige Bakterien (ZACHARY und BASGALL, 1985; LIEBICH und HEINRITZI, 1992). Während eines akuten *M. suis*-Anfalls können unreife und adulte Formen nebeneinander auf der Erythrozytenoberfläche gefunden werden (ZACHARY und BASGALL, 1985; LIEBICH und HEINRITZI, 1992).

Das Genom besteht aus einer zirkulären, doppelsträngigen DNA mit einer Größe von 745 kbp (MESSICK et al., 2000). Aufgrund der geringen Genom- und Bakteriengröße zählt *M. suis* zu den kleinsten Organismen, die noch in der Lage sind, sich selbst zu replizieren. Für die Vermehrung der Mycoplasmen ist der enge Kontakt mit der Erythrozytenoberfläche essentiell.

Haemotrophe Mycoplasmen sind in Vertiefungen und Eindellungen der Erythrozytenmembran anzutreffen. Mit Hilfe von feinen fibrillären Strukturen gelingt es ihnen, eine enge Bindung mit der Erythrozytenoberfläche einzugehen. Ein im Elektronenmikroskop erkennbarer, ca. 15-30 nm breiter Spalt, trennt die Bakterien von der Erythrozytenoberfläche (ZACHARY und BASGALL, 1985; MESSICK, 2004). Bisherigen Erkenntnissen zufolge dringen haemotrophe Mycoplasmen nicht in die Erythrozyten ein.

2.4 Vorkommen und Bedeutung von haemotrophen Mycoplasmen

Haemotrophe Mycoplasmen sind weltweit verbreitet und kommen bei einer Vielzahl von Wirbeltieren, wie z. B. Katze, Hund, Maus, Schwein, Schaf, Ziege, Rind, Lama, Opossum (MESSICK, 2004) und beim Rentier (STOFFREGEN et al., 2006) vor. Auch beim Pferd und bei Zootieren sind neueren Untersuchungen zufolge Haemoplasmen-ähnliche Bakterien zu finden. Die derzeit bekannten Erreger weisen eine hohe Wirtsspezifität auf (RISTIC und KREIER, 1984). Haemotrophe Mycoplasmen können bei ihren Hauptwirten lebensbedrohli-

che akute hämolytische Anämien, als auch chronische Anämien und Immunsuppression hervorrufen. Obwohl bereits nachgewiesen ist, dass haemotrophe Mycoplasmen auch bei Primaten und beim Menschen auftreten, kann zurzeit noch keine Aussage über ein mögliches zoonotisches Potential der veterinärmedizinisch relevanten Haemoplasmen getroffen werden.

In der Kleintierpraxis erlangen Haemoplasmen in den letzten Jahren eine immer größer werdende Bedeutung. Bei Katzen existieren weltweit drei verschiedene Spezies (*M. haemofelis*, *Candidatus M. haemomintum* und *Candidatus M. turicensis*), die sich hinsichtlich ihrer Virulenz und ihrer klinischen Bedeutung erheblich voneinander unterscheiden (WILLI et al., 2005).

M. haemofelis, die virulenteste der drei bei Katzen vorkommenden Spezies, verursacht insbesondere bei immunkompetenten Tieren schwere, zum Teil lebensbedrohliche Anämien.

2.5 Verbreitung von *Mycoplasma suis*

Zahlreichen Veröffentlichungen zufolge ist die *M. suis*-Infektion weltweit verbreitet. Aufgrund des meist klinisch inapparenten Verlaufs der Erkrankung und der Probleme in der Diagnosestellung geht schon SPLITTER (1950a) davon aus, dass die porcine Eperythrozoonose wesentlich häufiger vorkommt als sie diagnostiziert wird.

In den USA werden in einem Problembestand 24% der Tiere mittels indirektem Hämagglutinationstest (IHA) als positiv getestet. In späteren Untersuchungen von 1000 Serumproben aus unverdächtigen Herden zeigen 20% der Tiere einen positiven Titer im IHA (SMITH, 1975). SISK et al. (1980) überprüfen in Georgia 6381 Blutproben mittels IHA auf das Vorhandensein von *M. suis*-Antikörpern. 16% der untersuchten Tiere weisen hierbei positive Titer auf.

Nach Untersuchungen des Tiergesundheitsdienstes Bayern aus den Jahren 1980/81 liegt der Durchseuchungsgrad in Bayern bei 5,7%. Bei Untersuchungen mit Hilfe des mikroskopischen Erregernachweises bleibt die Dunkelziffer der Infektionsträger hoch (HOFFMANN, 1984). Von KRAUS (1990) werden 644 Blutproben von Schweinen aus bayerischen Herkunftsbetrieben auf *M. suis*-Antikörper mittels Komplementbindungsreaktion (KBR) und ELISA untersucht. Im ELISA weisen 12,6% der Schweine ein positives Ergebnis auf, in der KBR nur 10,2%. Auf die Herkunftsbetriebe umgerechnet sind somit 43,7% der Betriebe in Bayern *M. suis*-infiziert (KRAUS, 1990).

Bei PATSCHKE (2002) liegt der Prozentsatz an positiv getesteten Tieren deutlich niedriger. Von den 2000 aus Bayern stammenden Proben reagieren lediglich 4% im ELISA und 1,35% im Akridin-Ausstrich positiv. Auch die Anzahl der Betriebe, in denen positive Reagenten nachgewiesen werden konnten liegt mit 26% deutlich unter den von KRAUS (1990) ermittelten Werten. Bei den Untersuchungen von PATSCHKE (2002) variiert die Anzahl an infizierten Tieren innerhalb der Bestände stark. Der durchschnittliche Prozentsatz an infizierten Tieren in einem Bestand beträgt im ELISA 20% und im Akridin-Ausstrich 12%. Prävalenzstudien von *M. suis* mit Hilfe der PCR als Nachweisverfahren werden erstmals von GUIMARAES et al. (2007) durchgeführt. Bei 18,2% der insgesamt 121 aus verschiedenen Betrieben in Brasilien stammenden Sauen kann *M. suis* in der PCR nachgewiesen werden. Die Prävalenz innerhalb der Betriebe unterliegt in diesen Untersuchungen einer Schwankungsbreite von 13,3% bis 24%.

Ausgehend von der Tatsache, dass bei einer *M. suis*-Infektion eine für Infektionskrankheiten atypisch kurzzeitige Antikörperpersistenz besteht und daher bei serologischen Nachweisverfahren immer wieder falsch-negative Ergebnisse auftreten, muss davon ausgegangen werden, dass der wahre Durchseuchungsgrad von *M. suis* höher, als in den erwähnten Untersuchungen, anzusetzen ist.

2.6 Pathogenese und Immunologie

Die Übertragung von *Mycoplasma suis* erfolgt hämatogen. Als Hauptübertragungsweg gilt die iatrogene Infektion im Rahmen von zootechnischen Eingriffen (kontaminierte Injektionskanülen, Instrumente, Oberkieferschlingen) (HENRY, 1979). Blutsaugende Arthropoden, wie die Schweinelaus (*Haematopinus suis*), Mosquitos (*Aedes aegypti*), Stallfliegen (*Stomoxys calcitrans*) und Räudemilben (*Sarcoptes suis*) können als Vektoren fungieren (HOFFMANN und SAALFELD, 1977; PRULLAGE et al., 1993). Eine orale Übertragung z.B. durch Urin wird ebenfalls beschrieben (HEINRITZI, 1990b). Auch eine vertikale Übertragung des Erregers wird diskutiert (HENDERSON et al., 1997).

Mycoplasma suis lagert sich über fibrilläre Strukturen an der Zelloberfläche der Erythrozyten an und verursacht schwerwiegende Deformationen der Erythrozytenmembranstruktur (ZACHARY und BASGALL, 1985). Der genaue Mechanismus der Adhäsion und Replikation von *M. suis* auf der Erythrozytenoberfläche ist bisher jedoch ungeklärt. Durch Proteom- und Immunom-Analysen mit anschließendem Screening einer *M. suis*-Genom-Datenbank können

zwei *M. suis* Proteine, MSG1 (*M. suis* GAPDH-like protein 1) und HspA1 (Heat shock protein A1), die maßgeblich am Adhäsionsvorgang beteiligt sind, gefunden werden (HOELZLE, 2007; HOELZLE et al., 2007a; HOELZLE et al., 2007c). Mittels Immunelektronenmikroskopischen Untersuchungen kann die Lokalisation dieser Proteine auf der Oberfläche der *M. suis*-Zellmembran gezeigt werden. Beide Proteine besitzen immunogene Eigenschaften und binden an die Oberfläche der Zellmembran von porcinen Erythrozyten (HOELZLE et al., 2007a; HOELZLE et al., 2007c). Nicht adherente *E. coli* erhalten durch oberflächen-ständige Expression eines der beiden Proteine die Fähigkeit an Erythrozyten zu binden (HOELZLE et al., 2007c). Ziel zukünftiger Studien ist es, die Rolle der beiden Proteine bei der *M. suis*-Pathogenese weiter aufzuklären.

Als Folge der Alteration der Erythrozytenmembran wird die Induktion von sog. Kälteagglutininen, Immunglobuline vom Typ M (IgM-Antikörper), hervorgerufen (ZACHARY und SMITH, 1985; JÜNGLING et al., 1994). Ziel der Kälteagglutinine ist nicht der Erreger selbst, sondern ein Carbohydrat-Antigen auf der Erythrozytenmembran. Die Kälteantikörper binden bei sinkenden Temperaturen an die Erythrozytenmembran und bewirken, vor allem im Bereich der Akren, eine Agglutination der roten Blutkörperchen. Als Folge treten Durchblutungsstörungen in der Peripherie, Akrenzyanosen und bei Fortbestehen der Erkrankung Nekrosen auf (BUGNOWSKI et al., 1986). Da die Kälteagglutinine gegen die Erythrozyten gerichtet sind, zählt die *Mycoplasma suis*-Infektion somit zu den autoimmunvermittelten hämolytischen Anämien (HOFFMANN et al., 1981).

Die veränderten Erythrozyten bleiben in der wie ein Filter wirkenden Milz hängen. Die Erreger und die geschädigten Erythrozyten werden von dem mononuklearen Phagozytosesystem erkannt und eliminiert (POSPISCHIL und HOFFMANN, 1982). Die vermehrte Phagozytose und Erythrozytolyse führt zu einer vorübergehenden Bilirubinämie, sowie bedingt durch die erhöhte Eisenablagerung zu einer Hämosiderose in Milz, Leber und Lymphknoten (THIEL, 1983).

Durch Unterdrückung der T-Zell-Blastogenese, insbesondere der T-Helfer-Zellen, spielen die Kälteagglutinine bei der Immunsuppression eine herausragende Rolle (ZACHARY und SMITH, 1985). Neben autoreaktiven Kälteagglutininen können HOELZLE et al. (2007c) erstmals auch Autoantikörper der Klasse IgG bei Schweinen mit PE nachweisen. Im Blutserum akut erkrankter Schweine kann ein signifikanter Abfall der erregerspezifischen Antikörper und parallel dazu ein drastischer Anstieg von IgG Antikörpern, die gegen Autoantigene gerichtet sind, verzeichnet werden. In experimentellen Untersuchungen werden Reaktionen

der Autoantikörper gegen das Aktin von porcinen Erythrozyten beobachtet (HOELZLE et al., 2006). Ob bei einer *M. suis*-Infektion das wirtseigene Aktin modifiziert wird oder ob der Erreger über orthologe Strukturen verfügt, deren immunologische Beantwortung zum Phänomen des sog. Molecular mimicry (ALBERT und INMAN, 1999) führt, ist Gegenstand aktueller Untersuchungen. Bereits ZACHARY und SMITH (1985) gehen davon aus, dass im Verlauf einer *M. suis*-Infektion eine Modifizierung von Proteinen in der porcinen Erythrozytenmembran stattfindet.

Während der akuten Phase kann der Blutglukosespiegel radikal absinken. Da reife Erythrozyten impermeabel für Glukose sind, ist der erhöhte Glukoseverbrauch auf den Metabolismus von *Mycoplasma suis* zurückzuführen (HEINRITZI et al., 1990; SMITH et al., 1990). Der Erreger verbraucht viel schneller Glukose, als es auf dem Wege der Glukoneogenese neu gebildet werden kann. HOELZLE et al. (2007c) können in ihren Untersuchungen Homologien für das *M. suis*-Protein MSG1 zu einer bakteriellen Glycerinaldehyd-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), einem Enzym innerhalb der Glycolyse-Kaskade, nachweisen. In den Untersuchungen kann gezeigt werden, dass *E. coli* - durch oberflächen-ständige Expression von rekombinanten MSG1 - GAPDH-Aktivitäten erhalten (HOELZLE et al., 2007c).

Die Tatsache, dass haemotrophe Mycoplasmen bislang in vitro nicht kultivierbar sind, erschwert die vollständige Aufklärung der mikrobiellen sowie der immunologischen Eigenschaften des Erregers.

2.7 Klinisches Bild

Die durch *Mycoplasma suis* verursachte porcine Eperythrozoonose kann bei Schweinen aller Altersgruppen auftreten. Das klinische Bild ist bei den erkrankten Tieren weder einheitlich noch charakteristisch (BUGNOWSKI et al., 1986).

Von der akuten Erkrankung, die sich in Form von anfallsartigen Iktereanämien äußert, sind v.a. Absetzferkel und Mastschweine betroffen (SPLITTER, 1950a). Zu den klinischen Symptomen eines akuten Geschehens zählen Fieber bis 42°C, Blässe und Zyanosen an den Akren, v.a. an den Ohrrändern (HEINRITZI, 1984a). Des Weiteren kann bei den betroffenen Tieren, je nach Schweregrad der Anämie, Apathie, Dyspnoe mit bevorzugter Bauchlage und Anorexie beobachtet werden (BUGNOWSKI et al., 1986).

Als Folge der oben genannten Symptome kommt es bei der chronischen Form der porcinen Eperythrozoonose zu Ohrspitzen- und Ohrrandnekrosen, Blässe, Kümern und ikterischen Hautverfärbungen (BUGNOWSKI, 1988). HEINRITZI (1990a) beschreibt allergische Hautreaktionen, die in Form von Urtikaria oder Morbus maculosus, mit zahlreichen Petechien und Ekchymosen, in Erscheinung treten können.

Bei den an Eperythrozoonose erkrankten Sauen wird der Zusammenhang zwischen Krankheitsausbruch und auslösenden Stressoren besonders deutlich. Meist 3-4 Tage nach dem Umstallen in Abferkelboxen oder nach dem Absetzen kommt es zum Auftreten von klinischen Symptomen (HEINRITZI, 1984a). Bei den erkrankten Tieren können über einen Zeitraum von 1-3 Tagen Anorexie, Fieber und ödematöse Schwellungen an der Vulva und den Mammarkomplexen beobachtet werden (BRÖMEL und ZETTL, 1985). Bei den betroffenen Sauen wird Milchmangel und abnormales maternales Verhalten beschrieben. Da sich das Fieber oft bis in das Puerperium hineinzieht, wird die Diagnose orginärer Puerperalkrankheiten erschwert (HEINRITZI, 1984a). Der zum „thin sow syndrom“ führende Gewichtsverlust tritt bei der chronischen Form der Eperythrozoonose in Erscheinung.

Ob *Mycoplasma suis* eine tragende Rolle bei Reproduktionsstörungen spielt wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Während ZINN et al. (1983) in ihren Untersuchungen keinen Einfluß der *Mycolasma suis*-Infektion auf das Reproduktionsgeschehen feststellen können, berichten BROWBACK (1981) und SISK et al. (1980) vom Gegenteil. Sie beobachten eine signifikante Zunahme an Aborten, Totgeburten, kleinen, lebensschwachen Ferkeln, Umrauschen, Anöstrie und Agalaktie bei serologisch positiven Herden.

SCHWEIGHARDT et al. (1986) stellen in einem Fall Fruchtbarkeitsstörungen in Form von Anöstrie, Umrauschen und verlängerten Absetz-Östrus-Intervallen bei bis zu 60% der Muttertiere fest. Bei 70% der Zuchtsauen sind post partum über mehrere Monate hinweg „MMA-Syndrom“ ähnliche Symptome mit Ödematisierung des Gesäuges zu erkennen. Die Ferkel von seropositiven Sauen weisen in den Untersuchungen von ZINN et al. (1983) ein geringeres Geburtsgewicht, sowie eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber weiteren Infektionskrankheiten auf. Bei den betroffenen Würfen kann eine erhöhte Saugferkelmortalität beobachtet werden.

Infizierte Saugferkel fallen bereits in der ersten Lebenswoche durch Blässe, Ikterus und verringerte Zunahmen im Vergleich zu ihren gesunden Wurfgeschwistern auf. Da die betroffenen Tiere in ihrem Wachstum zurückbleiben, kommt es zu einem Auseinanderwachsen des Wurfes.

Mycoplasma suis ist, wie alle haemotrophen Mycoplasmen, in der Lage das Immunsystem des Wirts zu supprimieren, so dass bei den erkrankten Tieren eine gesteigerte Anfälligkeit gegenüber infektiösen Erregern des Respirations- und Verdauungstraktes besteht (ZACHARY und SMITH, 1985). Eine *M. suis*-Infektion kann trotz Induktion einer starken Immunantwort und auch nach antibiotischer Behandlung jahrelang in asymptomatischen Trägertieren persistieren und unter Stressbedingungen jederzeit eine akute Erkrankung auslösen. Diese Trägertiere sind von großer Bedeutung für die Epidemiologie und die Bekämpfung der porcinen Eperythrozoonose.

Über die Morbidität, die Mortalität und die Letalität einer akuten *M. suis*-Infektion ist bisher wenig bekannt. Die Morbidität bei Saugferkeln liegt zwischen 15% und 30% (MÜLLER und NEDDENRIEP, 1979; KLOSTER et al., 1987). Die Letalität wird in der Literatur zwischen 5% und 24% angegeben (KLOSTER et al., 1987). Durch den weit verbreiteten Einsatz von Tetrazyklinen in der Schweineproduktion ist die Inzidenz von akuten *M. suis*-Infektionen in den letzten Jahren zurückgegangen (SMITH, 1992).



Abbildung 1: Schwein mit akuter Eperythrozoonose: zyanotische Veränderungen an den Ohren

2.8 Pathologie der *Mycoplasma suis*-Infektion

Mycoplasma suis-infizierte Tiere weisen in der Sektion Anämie und einen generalisierten Ikterus auf, der sich besonders deutlich an Gefäßintima, Leber und Nierenpapille erkennen lässt (KINSLEY, 1932; ROBB, 1943; THIEL, 1983). Das Blut erscheint hell und ist von wässriger Konsistenz. In der Lunge, den Nieren und dem Herz sind Hämorrhagien zu finden (KINSLEY, 1932). Die meist vergrößerte Leber weist herdförmige Aufhellungen bis hin zu generalisierten gelbbraunen Verfärbungen auf (BUGNOWSKI et al., 1986). Die Milz kann bis auf das Sechsfache ihres ursprünglichen Volumens vergrößert sein (CAMPBELL, 1945). Vereinzelt treten Aszites, Hydrothorax und Hydroperitoneum auf (DOYLE, 1932). Diese serösen Flüssigkeiten können Galle beinhalten. Eine galleartige Verfärbung des Magen- und

Darminhalts ist ebenfalls zu beobachten (ROBB, 1943). Die Lymphknoten können geschwollen und ödematös verändert erscheinen (QUIN, 1938). SPLITTER (1950b) beschreibt bei splenektomierten Schweinen petechiale Blutungen auf der Oberfläche der Harnblase. Bei KORN und MUSSGAY (1968) ist das Sektionsbild von extrem starken hämorrhagischen Diathesen der Haut und allen Organen, sowie einer Marmorierung der Lymphknoten beherrscht. Im Gegensatz zur Schweinepest werden jedoch keine hyperplastischen oder nekrotischen Veränderungen der Lymphorgane, speziell des Verdauungstraktes beobachtet. Ferner liegen weder Ödembildung noch Magen- und Darmentzündung oder Lungenveränderungen vor.

In den veränderten Leberläppchen können histologisch zentrolobuläre Nekrosen festgestellt werden. In den Gallenkapillaren in der Peripherie der Nekrosebereiche sind zahlreiche Gallethromben zu erkennen. Die Kupfferschen Sternzellen im Bereich der zentrolobulären Lebernekrose sowie in den Mesangiumbereichen der Nierenglomerula und den Retikulumzellen der Milzpulpa beinhalten große Mengen an Hämosiderin (THIEL, 1983; BUGNOWSKI et al., 1986; BUGNOWSKI, 1987). Eine deutliche Myelopoese und eine besonders intensive Erythropoese im Knochenmark werden von HOFFMANN und SAALFELD (1977) beschrieben.

2.9 Differenzialdiagnose

Bei der Eperythrozoonose können sehr unterschiedliche Krankheitsbilder beobachtet werden. Deshalb sind differenzialdiagnostisch abhängig vom Alter der Tiere verschiedene Krankheiten abzuklären.

Die bei Saugferkeln vorkommende Thrombozytopenische Purpura kann sich nach wiederholten Paarungen mit demselben Eber aufgrund einer Sensibilisierung und Immunisierung der Sau gegen paternale Thrombozytenantigene der Ferkel manifestieren. In den meisten Fällen ist der gesamte Wurf von der Erkrankung betroffen. Es tritt eine biphasische Thrombozytopenie auf, die sich zum einen in den ersten Lebenstagen, zum anderen in der zweiten Lebenswoche als Folge der zuvor eingetretenen Megakaryozytendegeneration zeigt. Blässe, Mattigkeit und petechiale bis flächenhafte Blutungen in der Unterhaut bestimmen das Krankheitsbild.

Die Leptospirose kann bei Ferkeln von infizierten Sauen eine ausgeprägte Iktereanämie verursachen (KEMENES, 1966). Bei der Sektion dieser Ferkel sind kleinherdige Lebernekrosen zu beobachten.

Intoxikationen mit Dinitroverbindungen, Kohleleerderivaten, photosensibilisierenden Pflanzen, toxischen Unkrautsamen, Gossypol, Cyanamid, sowie zu hohe Kupfergaben können ebenfalls einen Ikterus auslösen (HEINRITZI, 1986). Akute Aflatoxinvergiftungen, die sich durch Ikterus und starke Hämorrhagien auszeichnen, kommen in Europa nur vor wenn importiertes Getreide verfüttert wird (HEINRITZI, 1990b).

Zyanotische Ohrtrandverfärbungen können bei Rechts-Herz-Insuffizienz, Thromboendokarditis oder septikämischen Rotlauf, Pneumonie, Salmonellose und Vergiftungen durch Ricin oder Nitrat-Nitrit auftreten (HEINRITZI, 1984a; BUGNOWSKI et al., 1986). Eine Vergiftung mit Mutterkornalkaloiden (Ergotismus), Erfrierungen und paravenöse Applikationen führen ebenso wie wiederholt auftretende eperythrozoonotische Anfälle zu nekrotischen Ohrtrandveränderungen (HEINRITZI, 1990b).

Das während der chronischen Phase auftretende Krankheitsbild des Morbus maculosus mit zahlreichen Petechien und Ekchymosen ist differenzialdiagnostisch hinsichtlich des Verdachts auf Schweinepest von herausragender Bedeutung. Bei der Eperythrozoonose kommt es zum Anstieg der Leukozytenwerte im Blut, wohingegen bei der Schweinepest eine Leukopenie mit relativer Lymphozytose zu beobachten ist. Flächenhafte Blutungen sind auch bei der Dicumarolvergiftung, die nach der Aufnahme von Rattengift oder nach der Verfütterung von verschimmeltem Steinkleeheu auftritt, zu beobachten. Bei der chronischen Form der Eperythrozoonose ist vor allem das chronische Magengeschwür klinisch abzugrenzen.

2.10 Therapie und Prophylaxe

Bei der Behandlung einer akuten *Mycoplasma suis*-Infektion hat sich Oxytetracyclin bisher als einzig wirksames Arzneimittel erwiesen. Die Verabreichung des Antibiotikums erfolgt parenteral mit einer Dosierung von 20-30 mg pro kg LM über einen Zeitraum von 5 Tagen (HEINRITZI, 1984a). Bei Tieren mit lebensbedrohlicher Hypoglykämie sollte eine orale oder parenterale Gabe von Glukose erfolgen. Ferkel und chronisch erkrankte Tiere sollten zusätzlich ausreichend mit Eisen versorgt werden (HENRY, 1979).

Durch die Therapie kann eine Linderung der klinischen Symptome, jedoch keine Erregerfreiheit erzielt werden. Behandelte Tiere werden zu chronischen *M. suis*-Trägern und fungieren als Reservoir (SMITH, 1992). Aus diesem Grund kommt der Prävention der porcinen Eperythrozoonose eine besondere Bedeutung zu. In den Betrieben sollten konsequente Hygiene- und Desinfektionsmaßnahmen angestrebt werden. Um eine Verbreitung des Erre-

gers von Bucht zu Bucht zu verhindern, wird die Verwendung von Einmalkanülen und neuem sterilem Instrumentarium für jeden Wurf dringend angeraten (HEINRITZI, 1984a). Weiterhin ist es wichtig, eine umfassende Ekto- und Endoparasitenbekämpfung durchzuführen und erkrankte Tiere aus dem Bestand zu entfernen. Eine Verbesserung der Haltungsbedingungen trägt zu einer stressfreien Umwelt bei und minimiert somit die Inzidenz von Wiederausbrüchen.

Eine Vakzine steht bislang noch nicht zur Verfügung. Grund hierfür ist vermutlich die Tatsache, dass *M. suis* nicht kultivierbar ist und somit potentielle Impfstoffe aus dem Blut von infizierten Schweinen aufgereinigt werden müssen (HOELZLE, 2007). Diese Methode bringt gewisse Einschränkungen und Risiken mit sich, die im Folgenden kurz erwähnt werden:

- (1) Die im Impfstoff enthaltenen Komponenten des Schweineblutes können bei dem Impfling Autoimmunprozesse induzieren.
- (2) Eine Attenuierung der isolierten, voll virulenten *M. suis*-Zellen ist derzeit noch nicht möglich.
- (3) Um geeignete Impfantigene zu bestimmen, bedarf es weiterer Informationen über die Antigenstruktur von *M. suis* und die Immunantwort im Schwein.

Die in verschiedenen Forschungsarbeiten aufgeklärten *M. suis*-Proteine MSG1 und HspA1 stellen sehr vielversprechende Kandidaten für die Entwicklung einer Vakzine dar (HOELZLE, 2007; HOELZLE et al., 2007a; HOELZLE et al., 2007c).

2.11 Diagnose

2.11.1 Klinische und hämatologische Veränderungen

Die Diagnose anhand von klinischen Symptomen ist nur während eines akuten Anfalls sicher möglich (HEINRITZI, 1990a). Fieber bis 42°C, Anämien, Ikterus und Zyanosen an den Akren sind als charakteristisch anzusehen. Auch bei gehäuftem Auftreten von allergischen Hautreaktionen sollte differenzialdiagnostisch an Eperythrozoonose gedacht werden (HEINRITZI, 1984a). Der Einfluss verschiedenster Stressoren wirkt sich bevorzugt bei Absetzferkeln, Mastschweinen und Sauen begünstigend auf das Auftreten von klinischen Symptomen aus.

Während einer *M. suis*-Bakteriämie findet man das typische Bild einer normochromen und normozytären Anämie. Im roten Blutbild zeigt sich dies in einem parallel verlaufenden Abfall der Erythrozytenzahl, des Hämatokritwertes und des Hämoglobingehaltes (BOLLWAHN, 1982; HEINRITZI, 1984a; HEINRITZI, 1990a). Veränderungen im weißen Blutbild sind in Form einer neutrophilen Leukozytose zu erkennen (BOLLWAHN, 1982). Die Leukozytose tritt meist 1-2 Tage vor oder kurz nach einem Fieberanfall in Erscheinung (HEINRITZI, 1990a).

Während eines akuten Anfalls erscheint das Blut dünnflüssig, wässrig und lackfarben. Das Blut haftet nicht an der Wand des Reagenzglases (HEINRITZI, 1984a). Bei Abkühlung auf Raumtemperatur lassen sich eine Spontanagglutination und dadurch eine erhöhte Blutsenkung beobachten (HEINRITZI, 1990a; SCHMIDT et al., 1992). Die feingrieselige Mikroagglutination verstärkt sich bei abkühlendem Blut und verschwindet nahezu bei Erwärmung auf 37°C. Grund hierfür ist das Auftreten von Kälteagglutininen, die bei einer *M. suis*-Infektion induziert werden. Im Hämatokritröhrchen sind neben einem niedrigen Anteil an Erythrozyten oftmals auch ein breiter Leukozytensaum und eine deutliche ikterische Verfärbung des Plasmas erkennbar (HEINRITZI, 1984a).

Bei experimentell infizierten Schweinen können während der akuten Erkrankung hämatologisch zwei Phasen unterschieden werden (ZACHARY und SMITH, 1985). Ein frühes Stadium, das mit sehr hohen Erregermengen im Blut, einer lebensbedrohlichen Hypoglykämie, einer leichten Bilirubinämie und einer mäßigen Anämie einhergeht und ein spätes Stadium, bei dem man eine schwere Anämie, geringe Erregerzahlen im Blut, eine Spontanagglutination der Erythrozyten bei niedrigen Temperaturen (4-25°C), eine vorübergehende Thrombozytämie sowie eine milde Bilirubinämie vorfindet.

Im Stadium der akuten Phase lässt sich als Folge einer intravasalen Gerinnung (DIC) und einer anschließenden Verbrauchskoagulopathie eine erhöhte Blutungsneigung beobachten. Die partielle Thromboplastin- und Prothrombinzeit (Quick) ist verlängert und die Thrombozytenzahl vermindert (PLANK und HEINRITZI, 1990). Latente *M. suis*-Infektionen haben keinen Einfluss auf die Blutgerinnung (PLANK und HEINRITZI, 1990).

Die Glukosekonzentration im Serum kann während eines akuten Anfalls, bedingt durch den erhöhten Glukoseverbrauch des Erregers, auf Werte von unter 10 mg/dl abfallen (PETERANDERL, 1988; HEINRITZI et al., 1990; SMITH et al., 1990). Mit dem Anstieg der Erregerzahl im Blut nimmt der Glukosespiegel umgekehrt proportional ab (PETERANDERL, 1988).

Meist 2-3 Tage vor dem Krankheitshöhepunkt kommt es zu einem enormen Anstieg der Bilirubinkonzentration, da die Leber nicht mehr in der Lage ist, das in hohen Mengen anfallende Bilirubin zu glukoronidieren. Nach Behandlung ist ein rascher Abfall der Bilirubinkonzentration im Serum zu beobachten. Neben einer erhöhten Serumeisenkonzentration kann man bei *M. suis*-infizierten Tieren eine metabolische und respiratorische Azidose vorfinden (HEINRITZI et al., 1990; HEINRITZI, 1990b). Verantwortlich für das Auftreten der Azidose ist zum einen der Anstieg der Laktatkonzentration im Blut, zum anderen der verminderte pulmonale Gasaustausch. Die Veränderungen der Blutparameter können allerdings nicht als pathognomonisch angesehen werden.

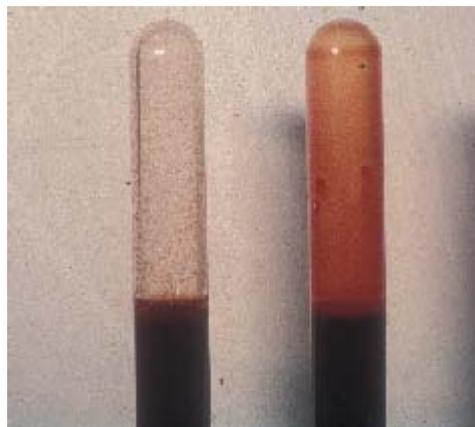


Abbildung 2: Mikroagglutination (links) beim Kippen von ungerinnbar gemachtem Blut eines an Eperythrozoonose erkrankten Schweines im Vergleich zum Blut eines gesunden Tieres

2.11.2 Biologische Diagnose

Bisher gilt die Splenektomie von verdächtigen Tieren als das sicherste Nachweisverfahren für *M. suis*-Infektionen. Es wird bis heute noch als Goldstandard angesehen, da es sich zur Einzeltier- und Bestandsdiagnose eignet und auch subklinisch infizierte Tiere erfasst. Innerhalb von sechs bis 14 Tagen nach Splenektomie treten bei *M. suis*-infizierten Tieren die Symptome einer akuten PE auf. Einfacher ist die Übertragung von frischem Blut von verdächtigen Schweinen auf bereits splenektomierte Schweine. Das Spendertier gilt als *M. suis*-infiziert, wenn beim Empfängertier innerhalb des oben genannten Zeitraums Symptome einer akuten *M. suis*-Infektion auftreten (BOLLWAHN, 1982; HEINRITZI, 1984b).

Der Grund für die Vermehrung der Erreger nach Splenektomie ist in der nun fehlenden Filterfunktion der Milz zu sehen. Nach Entfernung der Milz können die befallenen Erythrozyten nicht mehr in ausreichendem Maß eliminiert werden, so dass es zu einer massenhaften Ver-

mehrung der Mycoplasmen kommen kann. Der biologische Nachweis ist als Routineverfahren nicht zweckmäßig, da die Methode sehr aufwendig und kostspielig ist und nur die Detektion von Einzeltieren gewährleistet (ADELT, 1999).

2.11.3 Mikroskopischer Erregernachweis

Der direkte Erregernachweis im Blutaussstrich eignet sich zur Bestätigung einer *M. suis*-Infektion während des akuten, hämolytischen Anfalls, da während des Anfalls hohe Erregermengen im Blut vorhanden sind (BOLLWAHN, 1982; ZACHARY und SMITH, 1985).

Vor dem Anfertigen eines Ausstrichs sollte das Blut auf 38°C angewärmt werden, da infolge einer Agglomeration der roten Blutkörperchen die Mycoplasmen unter Umständen nur schwer zu erkennen sind (HEINRITZI, 1990a). Die am weitesten verbreitete Färbung zur Sichtbarmachung von *M. suis* stellt die Färbemethode nach Giemsa dar (HEINRITZI, 1990a). Ein erheblicher Nachteil dieser Anfärbung ist, dass Artefakte wie Farbausfällungen und Verunreinigungen fälschlicherweise als *M. suis* angesehen werden können. Auch beim Nachweis mit Schnellfärbemethoden, z.B. Testsimplets® (Boehringer, Mannheim), besteht die Gefahr, dass die in der Anfärbung dunkelorange bis schwarz dargestellten Erreger nicht von Verunreinigungen unterschieden werden können. Bei Giemsa- und Pappenheim-Färbungen können chronische Formen von *M. suis* nicht von der Erythrozytenmembran differenziert werden (LIEBICH und HEINRITZI, 1992). Mit der Akridinorange-Färbung kann *M. suis* in seiner unterschiedlichen Form unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden (KREIER und GOTHE, 1976). Die Erreger stellen sich während der akuten Phase als hell- bis dunkelorange Punkte, im chronischen Verlauf als hellgelbe bis hellgrüne kleine Punkte an den Erythrozytenrändern oder frei im Plasma liegend dar (HEINRITZI, 1990a; HEINRITZI, 1990b; LIEBICH und HEINRITZI, 1992). Vorteil dieser Färbemethode ist, dass die hellorange gefärbten Erreger auch bei schwachem Befall vor dem dunkelgrünen Hintergrund leicht erkannt werden können. Eine weitere Darstellungsmöglichkeit von *M. suis* im Fluoreszenzmikroskop ist die intravenöse Applikation von Tetrazyklinen kurz vor der Blutentnahme. Die Erreger sind hierbei als hellgelbe bis weiße Punkte am grün-gefärbten Erythrozyten sichtbar (HEINRITZI, 1990a).

Die niedrige Sensitivität und Spezifität schränken jedoch den Einsatz des mikroskopischen Erregernachweises ein. Verwechslungen mit angefärbten unreifen Erythrozyten und Jolly-Körperchen führen zum Auftreten von falsch-positiven Ergebnissen (HEINRITZI, 1990a).

Der mikroskopische Erregernachweis erlaubt eine ausreichend sichere Diagnosestellung nur während der akuten Phase der Infektion (BOLLWAHN, 1982; ZACHARY und SMITH, 1985).

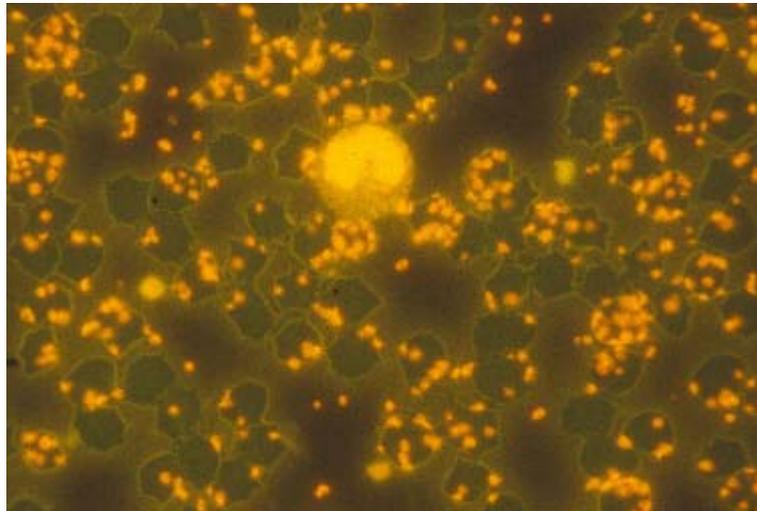


Abbildung 3: Akridinorange-Ausstrich zum Zeitpunkt des akuten Anfalls

2.11.4 Serologische Nachweisverfahren

Es existieren derzeit drei etablierte serologische Verfahren zur Antikörperbestimmung: die Komplementbindungsreaktion (KBR) (SPLITTER, 1958), der indirekte Hämagglutinationstest (IHA) (SMITH und RAHN, 1975; BALJER et al., 1989) und der ELISA (SCHULLER et al., 1990; HSU et al., 1992).

Die serologischen Testverfahren stellen einen entscheidenden Fortschritt in der Diagnostik der *M. suis*-Infektion dar. Mit ihrer Hilfe können auch *M. suis*-Infektionen ohne Symptome einer akuten PE und mit geringen Erregermengen im Blut erkannt werden.

Komplementbindungsreaktion

SPLITTER (1958) gelingt erstmals die Anwendung der Komplementbindungsreaktion (KBR) als Nachweisverfahren bei einer *M. suis*-Infektion. Ein positiver Titer, der jedoch nur 14 bis 21 Tage anhält, kann ab dem ersten bis siebten Tag nach einer akuten Eperythrozoonose festgestellt werden. Ein großer Nachteil dieses Nachweisverfahrens ist die Tatsache, dass latent infizierte Tiere nicht erfasst werden.

Infizierte splenektomierte Schweine weisen in der KBR höhere Antikörpertiter (Ak-Titer) als infizierte nicht splenektomierte Tiere auf. SCHULLER et al. (1990) führen dies auf eine Ab-

hängigkeit zwischen Erregervermehrung im Tier und der Ausprägung des Antikörpertiters zurück.

Indirekter Hämagglutinationstest

SMITH und RAHN (1975) können in ihrer Studie mit Hilfe des indirekten Hämagglutinationstest (IHA) auch latent infizierte Tiere erfassen. Es werden jedoch nur splenektomierte Tiere verwendet.

Mit der IHA werden IgM-Antikörper (Kälteagglutinine), die gegen die durch den Erreger geschädigte Erythrozytenmembran gerichtet sind, nachgewiesen (SMITH und RAHN, 1975; HEINRITZI, 1990a). Die Antikörperbildung steht im zeitlichen Zusammenhang zur *M. suis*-Bakteriämie. Nicht splenektomierte und latent infizierte Tiere ohne hämolytischen Anfall zeigen in der IHA keine oder nur sehr geringe Ak-Titer (BALJER et al., 1989).

Etwa 10 Tage nach der klinischen Manifestation der Erkrankung kann ein Anstieg des Ak-Titers, der nach etwa 25 Tagen seinen Höhepunkt erreicht, verzeichnet werden. Nach circa 2-3 Monaten fällt der Antikörpertiter unter die Nachweisgrenze von 1:40 ab. Bei den infizierten Tieren zeigt sich ein wellenförmiger Verlauf der Ak-Titer. Dies ist darauf zurückzuführen, dass bei jedem Anfall eine erneute Ak-Produktion ausgelöst wird. Ein Boostereffekt im Sinne einer schnelleren und stärkeren Antikörperbildung bleibt bei der *M. suis*-Infektion jedoch aus (BALJER et al., 1989). Aus den Untersuchungen von HEINRITZI (1989) geht hervor, dass die Zeitabstände sowohl zwischen den intermittierenden Anfällen, als auch zwischen den Phasen, in denen positive Antikörperreaktionen im IHA nachweisbar sind, mit zunehmender Anfallshäufigkeit immer länger und die Intensität der Fieberphasen immer schwächer werden. Es kommt zu einem Gleichgewicht zwischen Erreger und Wirt, das jederzeit durch Stressoren gestört werden kann.

Im Rahmen der Bestandsdiagnostik ist der IHA aufgrund der befristeten Antikörperpersistenz bei erkrankten Tieren und des fehlenden bzw. geringen Antikörpertiters bei latent infizierten Tieren oft mit falsch-negativen Ergebnissen verbunden. Falsch-positive Ergebnisse können jedoch nicht festgestellt werden.

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Eine weitere Verbesserung der Sensitivität der serologischen Nachweismethoden wird durch den von SCHULLER et al. (1990) etablierten ELISA erreicht. Die Aufreinigung des *M. suis*-

Antigens erfolgt nach der Methode von SPLITTER (1958). Um eine unspezifische Reaktion der im Serum enthaltenen IgM-Kälteagglutinine mit den in den Antigenpräparationen (Ag-Präparationen) vorhandenen Erythrozyten zu vermeiden werden die zu untersuchenden Seren mit Schweineerythrozyten präadsorbiert (SCHULLER et al., 1990).

Ab dem 14. Tag p.i. kann bei splenektomierten Tieren im ELISA ein Titeranstieg nachgewiesen werden. Nicht splenektomierte Tiere zeigen erst zwischen der dritten und fünften Woche eine positive Reaktion. Die Titerhöhe differiert zwischen splenektomierten und nicht splenektomierten Tieren, was auf einen direkten Zusammenhang zwischen Titeranstieg und Bakteriämie zurückzuführen ist.

Da auch im ELISA falsch-negative Ergebnisse auftreten, wird von SCHULLER et al. (1990) empfohlen, dieses Testverfahren nur zum Auffinden von infizierten Beständen zu verwenden. Eine Bestandssanierung sollte hiermit nicht durchgeführt werden, da Einzeltiere nicht mit ausreichender Sicherheit erkannt werden.

Um eine möglichst hohe Sensitivität und Spezifität bei den serologischen Nachweisverfahren zu erreichen, sollten die Ag-Präparationen nach der Aufreinigung frei von Erythrozytenmembranbestandteilen sein. HALL et al. (1988) erreichen durch den Zusatz von EDTA die Trennung der *M. suis*-Organismen von den nicht lysierten Erythrozytenmembranen.

Die Problematik der serologischen Testverfahren besteht in der für Infektionskrankheiten atypisch kurzen Antikörperpersistenz und des damit verbundenen Auftretens von falsch-negativen Ergebnissen (BALJER et al., 1989). Ein weiterer entscheidender Nachteil bei allen drei Nachweisverfahren ist die Tatsache, dass die Tests mit komplexen, nicht genau definierten *M. suis*-Antigenen durchgeführt werden, die aus dem Blut von experimentell infizierten Schweinen aufgereinigt werden müssen. Ferner beschränken sich alle drei Testsysteme auf die Messung von Kälteagglutininen der Klasse IgM. Näher spezifizierte *M. suis*-spezifische Immunglobuline der Klasse G werden hierbei nicht erfasst.

Um neue serologische Testsysteme etablieren zu können, beschäftigt sich die Forschungsgruppe von HÖLZLE et al. (2006) derzeit mit der detaillierten Analyse der humoralen Immunantwort gegen *M. suis* und der Antigenstruktur von *M. suis*.

Hierbei ist es ihnen gelungen, acht *M. suis*-spezifische Antigene (p33, p40, p45, p57, p61, p70, p73, p83) als Zielproteine einer IgG- Immunantwort nachzuweisen. Drei dieser Proteine (p40, p45, p70) gelten als Hauptantigene. Sie sind bevorzugt an der Immunantwort beteiligt,

da bei allen infizierten Tiere deutliche Reaktionen mit mindestens einem der drei Proteine ab dem 7. Tag p.i. bis in der späten Phase der Infektion im ELISA gezeigt werden können.

Die Spezifität und Sensitivität eines auf Blutpräparationen basierenden ELISAs wird durch Entfernung von porcinen Immunglobulinen signifikant verbessert. Für die Erreger-spezifische Serologie werden derzeit zwei neue Testsysteme etabliert:

- (1) ELISA mit Ig-depletierten *M. suis*-Antigenen und
- (2) *M. suis*-spezifischer Western Blot.

Bei der Western Blot-Analyse wird durch Auftrennung des heterogenen Proteingemisches in der SDS-Page der Nachweis von *M. suis*-spezifischen Partialantigenen gewährleistet.

Im Gegensatz zum ELISA ist die Western Blot-Analyse ein qualitativer Test, d.h. sie ist ab einer bestimmten Nachweisgrenze unabhängig von der Erregeranzahl und der daraus resultierenden Ak-Bildung. Die Western-Blot-Analyse hat gegenüber der KBR, dem IHA und dem ELISA den Vorteil, dass sie spezifisch gegen *M. suis*-Partialantigene gerichtete Antikörper und keine Kälteagglutinine misst.

Zwei der Hauptantigene (p40=MSG1, p70=HspA1) werden in zwei Studien rekombinant in *Escherichia coli* exprimiert und als Testantigene im ELISA eingesetzt (HOELZLE et al., 2007a, HOELZLE et al., 2007c). Somit kann in Zukunft bei der Präparation der *M. suis*-Antigene auf den Tierversuch verzichtet werden (HOELZLE et al., 2006). Ein entscheidender Vorteil, der künftig auch den Einsatz der *M. suis*-Serologie in Routinelabors erlauben wird.

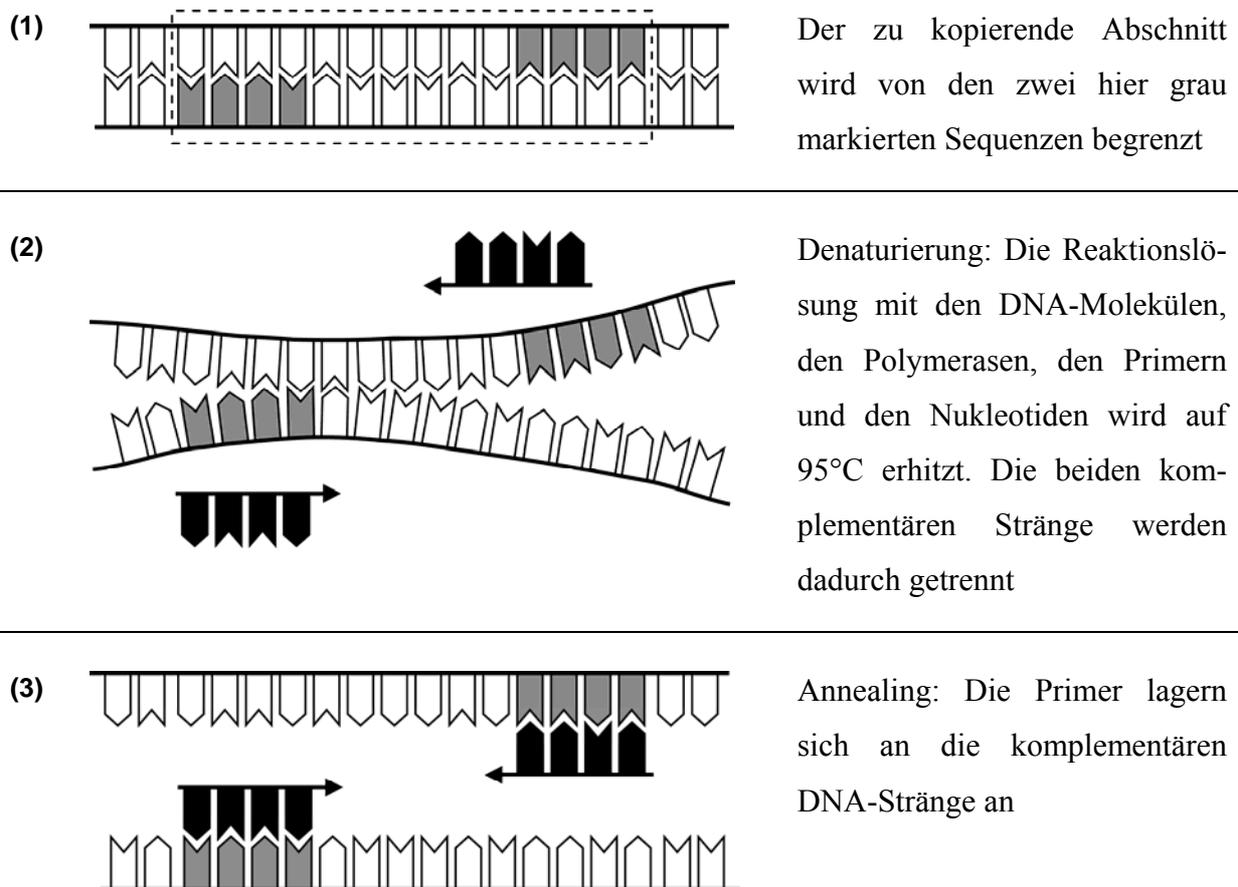
2.11.5 Molekularbiologischer Nachweis von *Mycoplasma suis*

Grundlagen der PCR

Die PCR ist ein Verfahren zur Vervielfältigung (Amplifikation) von spezifischen DNA-Sequenzen. Das Prinzip der PCR lässt sich wie folgt beschreiben: Zunächst erfolgt die Denaturierung der doppelsträngigen DNA bei Temperaturen zwischen 94-96°C (Abb. 4.2). Nach Abkühlung der Temperatur auf 45-60°C (Temperatur abhängig von den eingesetzten Primern) hybridisieren spezifische Oligonukleotide (Primer) mit der nach der Denaturierung einzelsträngig vorliegenden komplementären Matrizen-DNA. Dieser Vorgang wird als Annealing bezeichnet (Abb. 4.3). Anschließend werden durch die DNA-Polymerase die fehlenden Stränge mit freien Nukleotiden aufgefüllt (Elongation) (Abb. 4.4). Die DNA-Polymerase be-

ginnt am 3`-Ende des angelagerten Primers und folgt dann dem DNA-Strang. Dieser Schritt findet bei 72° C statt.

Die Abfolge dieser drei Reaktionsschritte wird als Zyklus bezeichnet. Durch kontrollierte Änderung der Reaktionstemperatur können mehrere Zyklen hintereinander durchlaufen werden. In jedem Zyklus wird dabei theoretisch die Anzahl an Ziel-DNA verdoppelt, da die neu gebildeten DNA-Stränge in den Folgezyklen wieder als Matrize dienen. Die Menge an Amplifikat nimmt also exponentiell mit der Anzahl an Zyklen zu (STRYER, 1999). Die Reaktion wird limitiert durch den Oligonukleotid, dNTP und Taq-Polymerase Verbrauch (KAINZ, 2000). Die vervielfältigten DNA-Sequenzen können über eine Gelelektrophorese aufgetrennt und sichtbar gemacht werden.



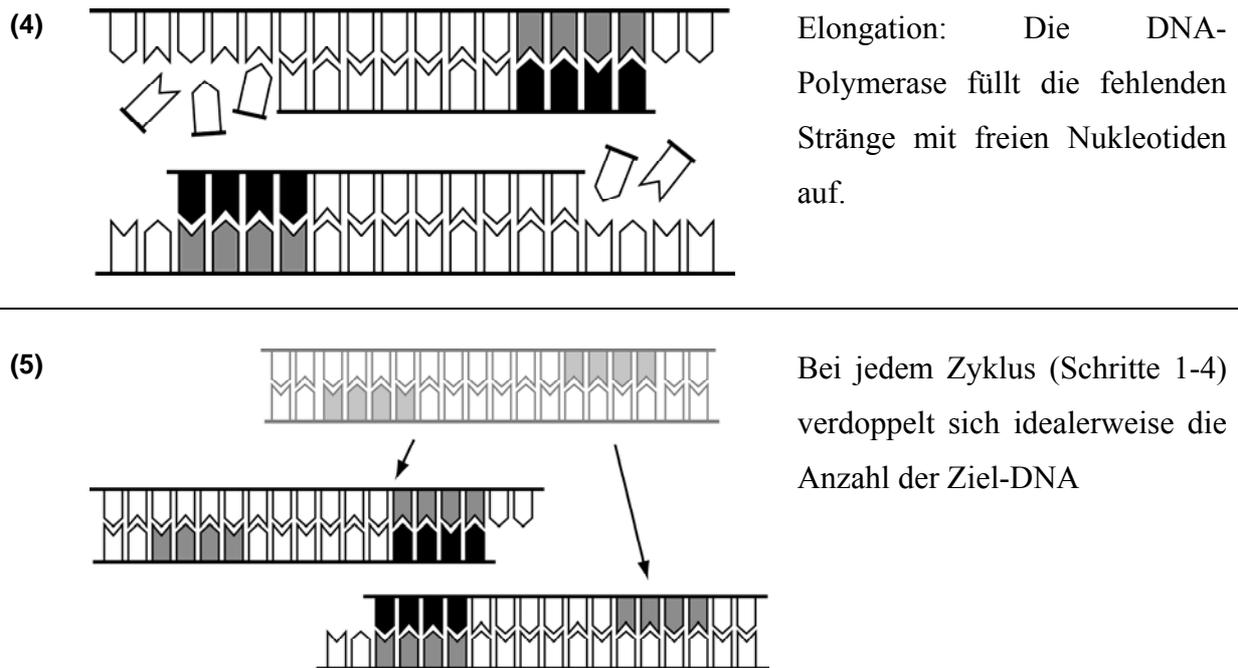


Abbildung 4: Funktionsprinzip der PCR

Aufgrund der hohen Sensitivität der PCR besteht bei der Durchführung eine große Gefahr von falsch-positiven Ergebnissen durch Kontaminationen. Kontaminationen können bei der PCR durch den unbeabsichtigten Transfer von Ziel-DNA (sog. „cross over“-Kontaminationen) von Probe zu Probe oder von der Positivkontrolle auf die Probe, der auch durch aerogene Übertragung innerhalb des Labors möglich ist, zustande kommen (PERSING, 1993). Um einen erfolgreichen Einsatz der PCR in der Routinediagnostik zu gewährleisten, sollten folgende Vorsichtsmaßnahmen beachtet werden (PERSING und CIMINO, 1993; NEWTON und GRAHAM, 1994; WINK und WEHLER, 1994):

(1) Räumliche Trennung:

Probenaufbereitung, Vorbereitung der PCR (Pipettieren des Reaktionsansatzes), Probenzugabe mit Amplifikationsschritt und gelelektrophoretischer Analyse in jeweils isolierten Bereichen

(2) Benutzung von Sterilwerkbanken für die Pipettierschritte nach dreißigminütiger Bestrahlung mit UV-Licht

(3) Autoklavieren der verwendeten Lösungen

(4) Verwendung von Einmalhandschuhen bei jedem neuen Arbeitsschritt, Einwegmaterialien, gestopfte Pipettenspitzen, konsequenter Wechsel der Arbeitskleidung

Ein weiteres Problem stellen PCR-Inhibitoren dar, die die Amplifikationseffizienz beeinflussen und zu falsch-negativen Resultaten führen. Verschiedene Bestandteile von Körperflüssigkeiten oder Bakterienzellen, die keine Ziel-DNA besitzen, Nahrungsmittelbestandteile aber auch Laborgegenstände, wie z.B. Laborplastikwaren können inhibitorische Wirkungen entfalten. Verschiedene Stoffe wie Phenole, nichtionische und ionische Detergentien, Hämoglobin und deren Abbau-Produkte gelten als PCR-Hemmstoffe (ROSSEN et al., 1992; WIEDBRAUK et al., 1995). PCR-Inhibitoren können durch einen oder mehrere der folgenden Mechanismen wirken:

- (1) Störung der Zelllyse
- (2) Abbau der DNA bzw. Anlagerung an die DNA, oder
- (3) Inaktivierung der hitzebeständigen DNA-Polymerase (Taq-Polymerase)

Das in Blutröhrchen enthaltene EDTA kann als Chelatbildner die freien Magnesiumionen des Puffers binden, wodurch die Taq-Polymerase nicht mehr optimal arbeiten kann (WILLIAMS, 1989). Auch Berichten von HIGUCHI (1989) zufolge werden bei der DNA-Präparation Blutbestandteile mitaufgereinigt, die die Taq-Polymerase inhibieren. Laut Studien von SYVANEN et al. (1988) können auch zu hohe Konzentrationen an Ziel-DNA die Effizienz der Amplifikation der DNA vermindern. Der Grund hierfür ist, dass die bereits zu Beginn der Reaktion in großer Anzahl vorliegenden Matrizenstränge häufiger untereinander als mit den Primern hybridisieren (SYVANEN et al., 1988).

Die Konzentration der Hemmstoffe kann im einfachsten Fall durch Verdünnung der zu untersuchenden Proben oder mit Hilfe von mehr oder weniger aufwendigen Reinigungsverfahren herabgesetzt werden (HIGUCHI, 1989). Eine Entfernung von Inhibitoren kann schon während der DNA-Isolierung durch Bindung entweder der DNA oder der Inhibitoren an eine geeignete Matrix (Silicagelmembran) erreicht werden.

Molekularbiologischer Nachweis von *M. suis*

Erste Berichte über den molekularbiologischen Nachweis von *M. suis* stammen von OBERST et al. (1990a). Mit Hilfe von radioaktiv markierten genomischen Sonden ist ihnen der Nachweis von *M. suis* im Vollblut experimentell infizierter Schweine gelungen. Die Spezifität der DNA wird anhand von Slot-blot Hybridisierungen und herkömmlichen Southern-blot-Hybridisierungen bestimmt. Eine Standardisierung dieser Methode erweist sich als prob-

lematisch, da die aus infizierten, splenektomierten Schweinen gewonnene DNA in der Quantität abhängig von der Schwere der Bakteriämie variiert.

Die Arbeitsgruppe von OBERST et al. (1990b) entwickelt noch im gleichen Jahr eine Hybridisierung mit rekombinanter *M. suis*-DNA. Mittels verdauter *M. suis*-DNA kann eine Gendatenbank konstruiert werden. Durch Hybridisierung mit radioaktiv markierter *M. suis*-DNA kann hieraus ein *M. suis*-spezifischer rekombinanter Klon (KSU-2) identifiziert werden. Die rekombinante DNA hybridisiert spezifisch mit der DNA von gereinigten *M. suis*-Organismen, sowie mit der DNA aus dem Blut infizierter Schweine (OBERST et al., 1990b). Der Nachweis einer *M. suis*-Infektion ist jedoch erst ab dem 7. Tag p.i. möglich. *M. suis*-Infektionen in der präpatenten Phase werden nicht erfasst.

Um eine Steigerung der Sensitivität zu erreichen wird von GWALTNEY et al. (1993a) eine Polymerasekettenreaktion entwickelt. Die Primer werden aus der Sequenz der KSU-2-Klons nach Restriktionsenzymverdau mit *Bam*HI ausgewählt. Das Amplifikat weist eine Länge von 492 Basenpaaren (bp) auf (GWALTNEY et al., 1993a). Durch Hybridisierung des Amplifikats mit dem KSU-2-Klon als Sonde kann bereits 24 Stunden p.i. im Blut infizierter Schweine *M. suis* nachgewiesen werden. Die Hybridisierung wird sowohl als Southern-blot als auch als Dot-blot durchgeführt (GWALTNEY et al., 1993a; OBERST et al., 1993). Diese Methode wird als Verbesserung gegenüber der direkten Hybridisierung von nicht amplifizierter DNA angesehen (OBERST et al., 1993). Mit Hilfe der PCR kann genomische *M. suis*-DNA ab 450 pb amplifiziert werden, was in etwa 5000 *M. suis*-Organismen entspricht (GWALTNEY et al., 1993a).

Die PCR weist im Gegensatz zu den serologischen Testverfahren eine höhere Sensitivität und Spezifität auf und kann zur Identifizierung einzelner infizierter Tiere und somit bei epidemiologischen Studien eingesetzt werden (GWALTNEY et al., 1993a). Nach Modifizierung des PCR-Protokolls kann *M. suis*-DNA auch im Blut experimentell infizierter, nicht splenektomierter Schweine nachgewiesen werden (GWALTNEY und OBERST, 1994).

In der Studie kann bei zwei von vier Schweinen bereits vor der experimentellen Infektion *M. suis*-DNA amplifiziert werden, was auf eine latente, natürliche Infektion schließen lässt. Mittels der IHA wird während des gesamten Versuchszeitraums (43 Tage) nur ein Tier als positiv erkannt. Dies bestätigt die von SMITH (1992) durchgeführten Untersuchungen, bei denen Tiere unter 3 Monaten keine oder nur eine geringe, nicht messbare Antikörperproduktion im Verlauf einer *M. suis*-Infektion zeigen. RIKIHISA et al. (1997) entwickeln eine auf 16S rRNA-Gensequenzen basierende PCR. Durch vergleichende Sequenzanalysen auf Grund-

lage des 16S rRNA-Gens kann gezeigt werden, dass *M. suis* und *Haemobartonella spp.* eine engere Verwandtschaft zu *Mycoplasma spp.* (79-83% Übereinstimmung) als zu *Anaplasma marginale* (72-75% Übereinstimmung) aufweisen (RIKIHISA et al., 1997).

HOELZLE et al. (2003) ist die Etablierung einer *M. suis*-spezifischen PCR auf der Basis von neuen definierten Erregersequenzen gelungen. Aus dem Blut experimentell infizierter Schweine wird ein 1.8 kb großes EcoRI DNA-Fragment des *M. suis*-Genoms isoliert. Das Fragment wird anschließend kloniert und nach erfolgter Rückhybridisierung sequenziert. Durch Vergleiche der Sequenz mit Datenbankeinträgen wird gezeigt, dass die Sequenz spezifisch für *M. suis* ist. Die Sequenzdaten dienen als Grundlage für die Auswahl der Primer für die *M. suis*-PCR (ADELT, 1999). Die Spezifität der PCR-Reaktion für *M. suis* wird durch Southern-blot und Dot-blot Analysen überprüft. Die aus dem PCR-Produkt hergestellte Sonde hybridisiert nur mit *M. suis*-spezifischen DNA-Präparationen, nicht aber mit der DNA anderer Erreger oder mit der DNA aus Blut- oder Organproben von gnotobiotischen Schweinen. Die untere Nachweisgrenze dieser PCR beträgt $1,7 \times 10^{-7}$ ng DNA pro Mikroliter Probe. Mit Hilfe dieser PCR kann auch die Existenz verschiedener Stämme auf Genomebene bestätigt werden (ADELT, 1999). Bei einem Restriktionsenzymverdau mit EcoRI von *M. suis*-DNA-Präparationen aus dem Blut von zwei verschiedenen Schweinen kann ein Restriktionslängenpolymorphismus nachgewiesen werden. Beide DNA-Präparationen erzeugen ein Amplifikat der erwartenden Größe von 782 bp. Mit Hilfe dieser PCR können folglich verschiedene PCR-Stämme detektiert werden (ADELT, 1999). Die oben beschriebene PCR ermöglicht den Nachweis von *M. suis*-Infektionen, sowohl zum Zeitpunkt der klinisch akuten PE, als auch während der chronisch latenten Phase.

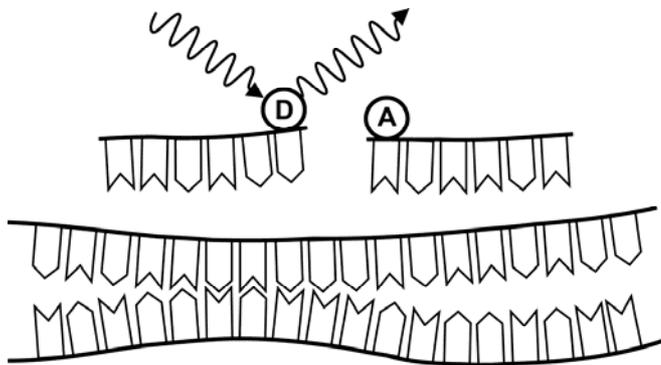
Grundlagen der real-time PCR

Herkömmliche PCR-Verfahren ermöglichen eine Identifizierung des PCR-Produktes erst am Ende der Reaktion durch Gelelektrophorese. Neben einem verhältnismäßig großen Zeit-, Material- und Arbeitsaufwand, besteht hierbei das Risiko von Kreuzkontaminationen und falsch-positiven Ergebnissen. Bei der real-time PCR hingegen werden die amplifizierten DNA-Sequenzen bereits während der PCR mittels fluoreszenzmarkierter Farbstoffe sichtbar gemacht. Die Fluoreszenzdetektion ermöglicht eine schnelle Analyse der gebildeten PCR-Produkte, sowie eine Quantifizierung der amplifizierten DNA-Kopien in Blut- und Knochenmarkspuren (WITTEWERT et al., 1997a). Die Detektion bei der real-time PCR erfolgte zunächst unter Verwendung von interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffen (Ethidiumbromid, SYBR[®] Green I) (HIGUCHI et al., 1993; WITTEWERT et al., 1997b). Durch Anlagerung bzw.

Bindung an die doppelsträngige DNA steigt die Fluoreszenz dieser Farbstoffe an. Die Zunahme der Ziel-DNA korreliert mit der Zunahme der Fluoreszenz von Zyklus zu Zyklus. Das Verfahren zeichnet sich durch eine geringe Spezifität aus, da zwischen den verschiedenen PCR-Produkten nicht unterschieden werden kann. Die Farbstoffe können ebenso Primerdimeren und unspezifische PCR-Produkte interkalieren, so dass auch bei negativen Proben ein Anstieg der Fluoreszenz auftreten kann (BROWNIE et al., 1997; MC KILLIP und DRAKE, 2004). Eine Differenzierung zwischen spezifischem Produkt und Primerdimeren beziehungsweise auch Mutationsanalysen ist im Anschluss an die PCR mit Hilfe einer Schmelzkurvenanalyse möglich. Dabei wird die Temperatur langsam schrittweise erhöht, so dass es zu einer Auftrennung der DNA-Doppelstränge in ihre Einzelstränge, entsprechend der jeweiligen Schmelzpunkte (Schmelzpunkt = Temperatur bei der 50% der DNA als Einzelstrang vorliegt) kommt. Die daraus resultierende Fluoreszenzabnahme wird aufgezeichnet. Aufgrund der Schmelztemperaturen kann man zwischen spezifischen Produkten und Primerdimeren oder Mutationen unterscheiden, da Primerdimere/Mutationen bei geringeren Temperaturen schmelzen als die spezifischen, größeren PCR-Produkte (BUSTIN, 2000). Die Entwicklung von sequenzspezifischen Fluoreszenzsonden erbringt eine weitere Verbesserung der Spezifität der real-time PCR. Derzeit kommen hauptsächlich zwei Systeme zum Einsatz, die TaqMan- sowie die LightCycler[®]-Technologie. Im Gegensatz zur TaqMan-Technologie, die eine mit zwei Farbstoffen beladene Hydrolysierungssonde verwendet, detektiert der Light-Cycler[®] (Roche Diagnostics, Mannheim) die PCR-Produkte mit einem Sondenformat, das auf zwei sequenzspezifischen Fluoreszenzsonden beruht. Eine der Oligonukleotidsonden ist am 3'-Ende mit Fluoreszein markiert (Donor-Fluorophor, Rezeptor) (Abb. 5.1). Die andere Sonde ist am 5'-Ende mit dem Fluoreszenzfarbstoff Light-Cycler[®]-Rot 640 (Akzeptor-Fluorophor, Quencher) markiert und am 3'-Ende zur Verhinderung einer Kettenverlängerung phosphoryliert. Die Hybridisierungssonden binden in jeder Annealing-Phase zwischen den beiden Primern an nachbarschaftliche interne Sequenzen (1-5 Nukleotide Abstand) des amplifizierten DNA-Fragmentes (Abb. 5.2). Nur nach der Hybridisierung an die DNA-Matrize kommen die beiden Sonden in eine direkte Nachbarschaft (typischerweise 10-100 Å), die einen Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) zwischen den beiden Farbstoffen ermöglicht. Während des FRET transferiert der Donorfluorophor, der von der Light-Cycler[®] LED-Lichtquelle angeregt wird (Abb. 5.2), einen Teil seiner Exzitationsenergie auf den roten Akzeptorfluorophor LC-Rot 640 (WITTEWERT et al., 1997b). Dieser emittiert in der Folge einen Teil der Energie als langwelligere elektromagnetische Strahlung (rotes Licht), die in spezifischen Kanälen des LightCyclers[®] gemessen wird und deren Intensität insgesamt direkt proportional zur

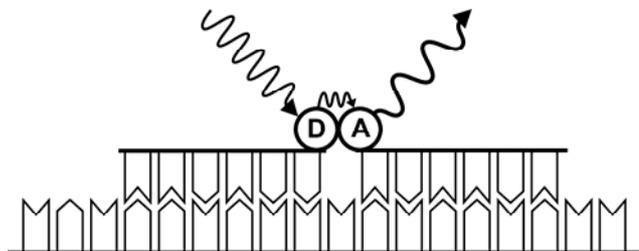
Menge an Ziel-DNA ist. Die Messung des Signals erfolgt einmal pro Zyklus nach dem Primer-Annealing. Zu diesem Zeitpunkt sind beide Sonden an die Zielsequenz gebunden und es erfolgt ein Energietransfer. An die Annealing Phase schließt sich die Elongation an (Abb. 5.3). Bei diesem Vorgang werden die Sonden vom Einzelstrang wieder verdrängt, wodurch kein Licht mehr ausgesendet wird, und folglich kein Signal mehr gemessen werden kann. So lange keine spezifische DNA vorhanden ist, diffundieren die Hybridisierungssonden frei in der Lösung und es findet kein signalgebender FRET statt. Dies gewährleistet eine hohe Spezifität des Assays, da entstehende unspezifische PCR-Produkte im Gegensatz zu einer konventionellen PCR nicht nachgewiesen werden. Mit steigender Anzahl an PCR-Produkten nimmt auch die Menge an hybridisierten Sonden zu, so dass sich das Signal proportional zur Amplifikonmenge verhält. Durch die Fluoreszenzdetektion erhöht sich die Sensitivität dieser Methode im Vergleich zur konventionellen Einschritt-PCR. Die Sensitivität der real-time PCR ist um das 100 bis 1000-fache höher als bei der konventionellen PCR. Die Nachweisgrenze eines Amplifikates im Agarose-Gel liegt bei 2-4 ng, während in der real-time PCR-Nachweisgrenzen von 2-20 pg angegeben werden (BUSTIN, 2000; MACKAY et al., 2002).

(1)



Denaturierung: Die fluoreszenzmarkierten Sonden binden nicht an die DNA. Sie befinden sich in größerem Abstand zueinander

(2)



Annealing: Die Sonden binden an den DNA-Strang. Es findet ein FRET statt. Die Fluoreszenzemission kann detektiert werden (D=Fluoreszien, A=LC red 640)

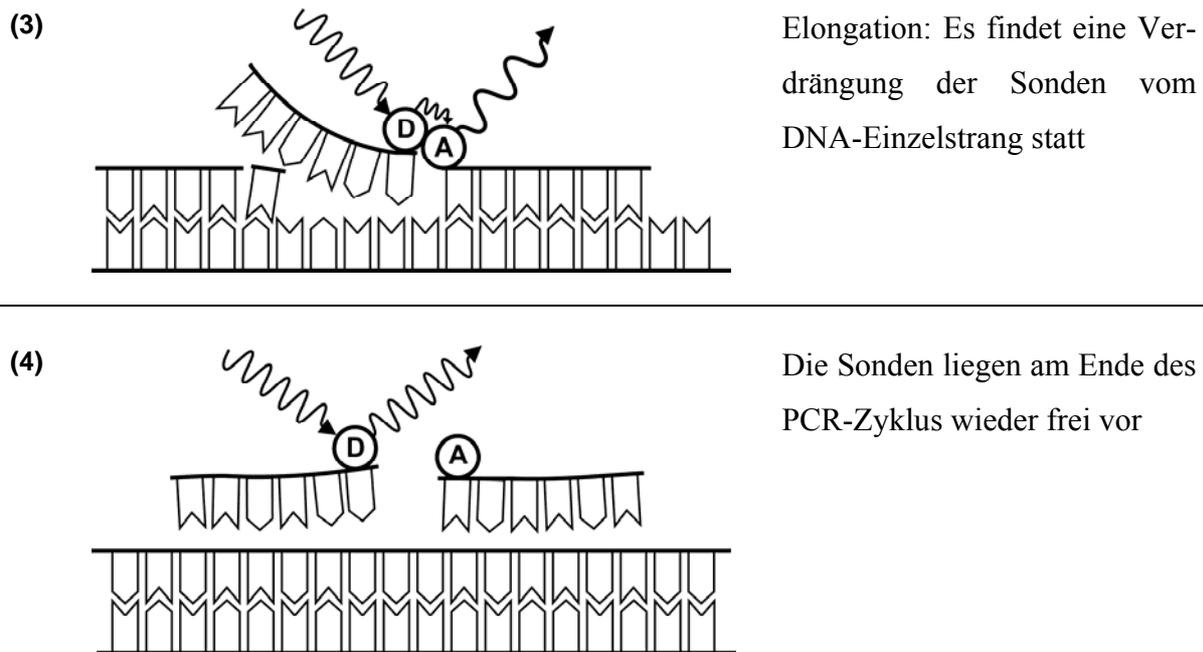


Abbildung 5: Funktionsweise der real-time PCR

Die gemessene Fluoreszenzintensität kann mittels Software gegenüber der Zyklenzahl dargestellt werden. Das Reaktionsprofil einer PCR besteht aus drei Phasen, die RASMUSSEN (2001) wie folgt beschreibt: a.) die frühe Phase (oder auch background-Phase), b.) die Phase des exponentiellen Wachstums (oder auch log-Phase) und c.) die Plateau-Phase. In der frühen Phase dominieren zunächst die Rauschsignale des Detektors. Die frühe Phase ist abgeschlossen, wenn die Signale des PCR-Produkts die Hintergrundsignale übertreffen. In Abhängigkeit von der initialen Menge an Ziel-DNA im Reaktionsansatz heben sich nach einer bestimmten Zyklenzahl die Fluoreszenzsignale des PCR-Produkts drastisch von denen des Hintergrundes ab. Diese Stelle wird als sogenannter Crossing Point (C_p) bezeichnet. Der C_p - bzw. C_t -Wert (*engl. threshold cycle*) markiert den Zyklus, bei dem der Amplifikationsgraph einer positiven Probe den Fluoreszenzschwellenwert kreuzt. Er steht in direktem Zusammenhang mit der Ausgangsmenge der Zielsequenz und bildet so die Grundlage der Quantifizierung. Im Anschluss erfolgt die Phase des exponentiellen Wachstums (log-Phase). In dieser Phase verhält sich die Intensität der Fluoreszenzsignale proportional zur Anzahl der PCR-Produkte, d.h. sie steigt exponentiell an. In der späten Phase der Reaktion verläuft die Amplifikation zunehmend weniger effizient oder kommt sogar vollständig zum Erliegen. An dieser Stelle findet ein fließender Übergang von der Phase des exponentiellen Wachstums in die Plateau-Phase statt. Für den sogenannten Plateau-effekt werden verschiedene Faktoren verantwortlich gemacht:

- Durch die Zunahme von weiteren Reaktionsprodukten wird die PCR-Reaktion behindert.
- Ineffektives Primer-Annealing: durch die zunehmende Konzentration steht die DNA mit den Primern bei der Bindung an die Ziel-DNA durch sog. Re-Annealing des PCR-Produkts in Konkurrenz.
- Enzym-Limitierung: während die Reaktion fortschreitet, nimmt die Anzahl der zu amplifizierenden Ziel-Moleküle zu, wobei die Zahl der sich in Lösung befindlichen DNA-Polymerase Moleküle gleich bleibt.

Somit lässt nur die Phase des exponentiellen Wachstums (log-Phase) eine quantitative Aussage über die Ausgangskonzentration an Ziel-DNA zu. Die Phase des exponentiellen Wachstums kann innerhalb weniger Zyklen näherungsweise mathematisch erfasst werden.

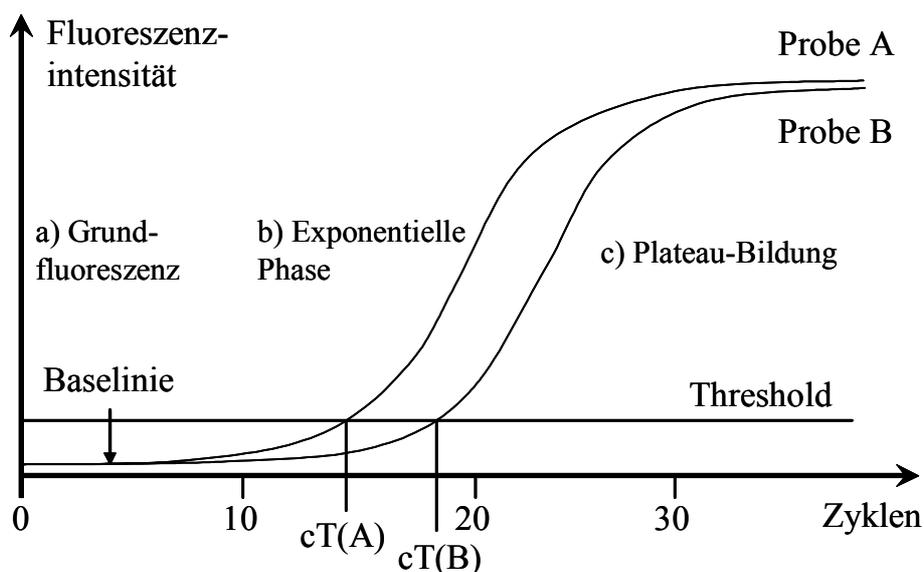


Abbildung 6: Intensitätsverlauf der Fluoreszenz bei der real-time PCR

Die real-time PCR erlaubt neben verschiedenen relativen Quantifizierungsstrategien auch die absolute Quantifizierung von Ziel-DNA. Bei der absoluten Quantifizierung wird die absolute Menge der Zielsequenz in einer unbekannt Probe (Kopienzahl pro Reaktion) bestimmt. Dazu werden mehrere Standards mit bekannten Mengen der Zielsequenz in separaten Reaktionen mitgeführt (externe Standards). Der Standard kann generell jede DNA-Probe sein, die die Sequenz des Ziel-Gens enthält und deren Konzentration bekannt ist. Über eine Verdünnungsreihe dieser Probe, die in der PCR mitgeführt wird, lässt sich eine Standardkurve kon-

struieren und so absolute Werte (z.B. Kopienzahlen) für die Ausgangskonzentrationen unbekannter Proben ermitteln. Zwischen Ct -Wert und dem Logarithmus der Ausgangsmenge n_0 wird hierzu ein linearer Zusammenhang hergeleitet:

$$\begin{aligned}n(Ct) &= T = n_0 E^{Ct} \\ \log T &= \log n_0 + Ct \log E \\ \log n_0 &= \log T - Ct \log E\end{aligned}$$

$n(Ct)$ ist hierbei die Anzahl an Kopien nach Ct Zyklen, T die Anzahl Kopien am Crossing Point (Threshold) und E die Effizienz der PCR.

Die unbekannt Parameter T und E lassen sich theoretisch aus zwei bekannten Kombinationen für Ct und n_0 (Standards) bestimmen. Um Messtoleranzen auszugleichen werden jedoch sechs externen Standards (jeweils zwei Proben mit den Verdünnungen 10^3 , 10^4 und 10^5 GE) verwendet, aus denen der LightCycler[®] die Standardkurve berechnet.

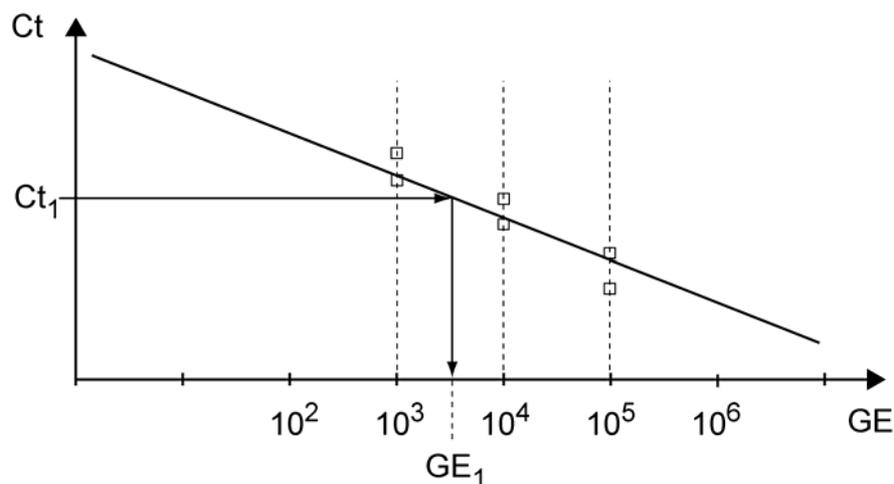


Abbildung 7: Standardkurve zur absoluten Quantifizierung

Quantitativer Nachweis von *M. suis*

Mit Hilfe der LightCycler[®] real-time PCR ist der quantitative Nachweis einer *M. suis*-Infektion gelungen (HOELZLE et al., 2007b). Das entwickelte real-time PCR-Verfahren basiert auf zwei Primern für die Amplifikation und zwei Hybridisierungssonden für die spezifische Detektion von *M. suis* (HOELZLE et al., 2007b). Das immunogene, glycolytisch aktive *M. suis*-Protein MSG1, das an der Bindung des Erregers an die Wirtserythrozyten beteiligt ist,

dient als Grundlage dieser real-time PCR (HOELZLE et al., 2007c). Die Konstruktion der LightCycler[®] Primer und Sonden erfolgt anhand der Sequenz des MSG1 Proteins.

Für die Bestimmung der analytischen Sensitivität und Spezifität der LightCycler[®] MSG1-PCR wird die DNA von *M. suis*-Isolaten, *M. suis*-negativen Blut- und Gewebeproben, verschiedenen Mycoplasmen-Spezies und anderen Bakterien in der PCR eingesetzt. Keine der Bakterien außer *M. suis* erzeugen ein Amplifikat der entsprechenden Größe. Alle 30 *M. suis*-positiven Proben werden von der real-time PCR als positiv erkannt, was einer Sensitivität von 100% entspricht. Von 30 *M. suis*-negativen, mit anderen Erregern infizierten, Proben zeigen 29 keine Reaktion in der PCR. Daraus ergibt sich eine Spezifität der Methode von 96,7%. Für die Erkennung von asymptomatischen *M. suis*-Infektionen ist eine niedrige Detektionsgrenze von ausschlaggebender Bedeutung. Durch Messung der DNA-Konzentration mittels Spektralphotometrie und Berechnung der Anzahl von Bakterien anhand des Genom-Gewichts kann eine Verdünnungsreihe bekannter Konzentration hergestellt werden, aus der sich eine untere Nachweisgrenze von 10-100 DNA-Kopien ergibt. Die real-time PCR zeichnet sich somit im Vergleich zu herkömmlichen PCR-Verfahren durch eine 4-40-fach höhere Sensitivität aus. In einem Vergleich der real-time PCR mit der herkömmlichen PCR ergibt sich eine hohe Korrelation bei Proben mit hoher Erregermenge. Bei Infektionen mit niedrigen Erregermengen im Blut kann die herkömmliche PCR nur 90% detektieren. Die real-time PCR detektiert bei akut infizierten Tieren eine durchschnittliche Erregeranzahl von 1.5×10^6 pro Milliliter Blut, während Tiere in der chronischen Phase der *M. suis*-Infektion eine durchschnittliche Erregerzahl von 1.1×10^3 pro Milliliter Blut aufweisen.

Zum Ausschluss etwaiger PCR-Inhibitoren werden 25 Blutproben mit negativem PCR-Ergebnis sowie 20 PCR-negative Gewebeproben mit 10^3 und 10^4 GE (Genomäquivalente) *M. suis*-DNA versetzt. Die Ct-Werte und die PCR-Effizienz dieser Proben werden mit den Werten von reinen DNA-Proben gleicher Konzentration verglichen. Durch diesen Test kann gezeigt werden, dass bei der Extraktion der DNA mit dem MagNA pure Compact Nucleic Acid Kit (Roche Diagnostics, Penzberg) keine PCR-Inhibitoren coextrahiert werden und somit die Effizienz der PCR durch Inhibitoren nicht beeinflusst wird.

Die getestete LightCycler[®] real-time PCR kann auch auf Gewebeproben angewendet werden. Dies erlaubt eine detaillierte Analyse der Pathogenese der *M. suis*-Infektion zu Zeiten geringer Erregermengen im Blut (HOELZLE et al., 2003).

Aufgrund der hohen Standardisierung, Reproduzierbarkeit und Automatisierung, sowie dem geringen Kontaminationsrisiko ermöglicht das real-time PCR-Verfahren den Einsatz der PCR-Diagnostik in Routinelabors.

Die Quantifizierung von *M. suis* ermöglicht sowohl eine genaue Analyse der Pathogenese der porcinen Eperythrozoonose und des Therapieerfolgs, als auch eine Standardisierung von serologischen Testantigenen. Durch die quantitative Analyse der tatsächlichen Erregeranzahl zu verschiedenen Phasen der *M. suis*-Infektion (akut, chronisch, inapparent) können neue Erkenntnisse über einen Zusammenhang zwischen Erregeranzahl und Ausprägung der klinischen Symptome, beziehungsweise dem Schweregrad der porcinen Eperythrozoonose gewonnen werden. Ein verlässlicher und praktikabler quantitativer Nachweis von symptomatischen und asymptomatischen *M. suis*-Trägern ist ferner für die Ermittlung der aktuellen Verbreitung und Bedeutung von *M. suis*-Infektionen in Schweineherden, für die Bestandsüberwachung, sowie für die Eradikation von *M. suis* von außerordentlicher Bedeutung.

3 Material und Methoden

Für die im Folgenden beschriebenen Untersuchungen wurden Blutproben von Schweinen an einem Schlachthof in Süddeutschland entnommen. Die Auswertung der Blutproben erfolgte an der Klinik für Schweine der Ludwig-Maximilians-Universität München. Die Polymerasekettenreaktion wurde am Institut für Veterinärbakteriologie der Vetsuisse Fakultät der Universität Zürich durchgeführt. Die Probenentnahme und -verarbeitung erfolgte im Zeitraum von Mai 2006 bis März 2007.

3.1 Ziel der Untersuchung

Anhand der gewonnenen Ergebnisse wird die Prävalenz von *M. suis* in Deutschland ermittelt werden. Hierzu wurden die Blutproben mittels real time Polymerasekettenreaktion auf *M. suis* untersucht. Im Rahmen der durchgeführten Untersuchungen wurden die beiden Nachweisverfahren real-time PCR und der mikroskopische Erregernachweis mittels Akridinorange-Färbung hinsichtlich ihrer Sensitivität und Spezifität miteinander verglichen. Des Weiteren wurde überprüft, ob bei *M. suis*-infizierten Tieren eine Veränderung der hämatologischen und klinisch-chemischen Parameter auftritt.

3.2 Probenmaterial

Zur Festlegung der Probenanzahl wurde zu Beginn der Versuchsreihe ein Vorversuch mit 160 Tieren durchgeführt. Die Proben wurden anhand der durch die Schlachtung vorgegebenen Reihenfolge entnommen. Bei der Auswahl der Tiere wurde darauf geachtet, dass die Tiere aus verschiedenen Betrieben stammten. Anhand der Bestandsohrmarke wurden die Tiere dem jeweiligen Bundesland zugeordnet.

Die Probenentnahme fand während des unmittelbar nach der Betäubung erfolgten Blutentzugs des Schlachtkörpers am Schlachtband statt. Es wurden mindestens 20 ml Blut in einem Papierbecher aufgefangen. Davon wurden jeweils 2 ml Blut in ein EDTA-Röhrchen (Sarstedt, Nümbrecht), 8 ml Blut in ein weiteres EDTA-Röhrchen (KABE Labortechnik, Nümbrecht-Elsenroth) und 10 ml Blut in eine Serummonovette (Primavette[®]V, KABE Labortechnik) umgefüllt. Um eine Gerinnung des Bluts zu verhindern, wurden die EDTA-Röhrchen anschließend geschwenkt.

Die Tiere, die im Schlachthof angeliefert wurden, stammten aus verschiedenen Teilen Deutschlands. Die Bundesländer Hamburg, Berlin und Bremen wurden aufgrund der geringen Schweinedichte von den Untersuchungen ausgeschlossen. Bereits zu Beginn der Probenentnahme stellte sich heraus, dass der Schlachthof nicht mit Schweinen aus allen Bundesländern beliefert wurde. An dem Schlachthof fand keine Schlachtung von Tieren aus Rheinland-Pfalz und dem Saarland statt, so dass die beiden Bundesländer bei dem Probenschema ebenfalls nicht berücksichtigt wurden. Da die Anlieferung aus den einzelnen Bundesländern und Betrieben sehr inhomogen und unvorhersehbar war, musste das Probenschema den Gegebenheiten angepasst werden. Aus Regionen mit einer hohen Schweinedichte wurden dementsprechend mehr, aus Regionen mit geringer Schweinedichte weniger Proben entnommen.

Aus Gründen des Datenschutzes durften die Betriebe nicht näher verfolgt werden. Eine Ermittlung der jeweiligen Betriebsform (Mastbetrieb, Zuchtbetrieb, geschlossener Betrieb) sowie des genauen Betriebsstandorts konnte somit nicht erfolgen. Bei der Auswahl der Schweine, von denen die Blutproben entnommen wurden, wurde darauf geachtet, dass die Tiere ein Gewicht zwischen 20-30 kg aufwiesen. Um keine Vorselektion zu betreiben, wurde bei der Auswahl der Tiere ausschließlich deren Herkunft und Gewicht berücksichtigt. Eine eventuell vorhandene klinische Symptomatik wurde außer Betracht gelassen.

3.3 Probenverarbeitung

3.3.1 Hämatologische und klinisch-chemische Blutuntersuchungen

Die Verarbeitung aller Blutproben fand am Tag der Entnahme im Labor der Klinik für Schweine der Ludwig-Maximilians-Universität München statt. Die Blutröhrchen wurden vom Schlachthof zum Labor stehend und gekühlt transportiert. Die Bestimmung der Erythrozytenzahl, des Hämoglobingehalts, des Hämatokritwertes, des MCV-, MCH-, und MCHC-Wertes, der Leukozyten- sowie Thrombozytenzahl erfolgte mit einem automatischen Blutkörperchenzählgerät (Vet ABC, Scill). Es wurde durch EDTA-Zusatz ungerinnbar gemachtes Blut verwendet. Das Gerät Vet ABC wurde täglich bei Inbetriebnahme kalibriert. Die mit 8 ml Blut gefüllten EDTA-Röhrchen wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei -70°C aufbewahrt. Die Serummonovetten[®] wurden 10 min bei 3000 U/min zentrifugiert (Hettich Rotixa/AP, Hettich, Tuttlingen). Anschließend wurde das Serum entnommen und aliquotiert.

Die Bestimmung der Parameter Glukose, Eisen und Bilirubin wurde im Labor der Nutztierklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München mit einem vollselektiven, diskreten Mehrfachanalysesystem (Hitachi 911, Roche, Mannheim) durchgeführt. Die Messung der Parameter erfolgte photometrisch. Das restliche Serum wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

3.3.2 Blutausstriche

Material:

Acridinorange-Stammlösung: 1,5% 3,6-Bis(dimethylamino)-acridin-hydrochlorid Zinkchlorid Doppelsalz (Certistain[®], Merck, Darmstadt) in Aqua dest.

Acridinorange-Gebrauchslösung: 25 ml Acridinorange-Stammlösung
125 ml Aqua dest.

Von jeder EDTA-Blutprobe wurde nach Anwärmen des Blutes auf 38°C ein Ausstrich auf einem Objektträger angefertigt. Nach Trocknung an der Luft wurde der Ausstrich eine Minute in 96% Ethanol fixiert und nach erneuter Trocknung 20-60 min in Akridinorange-Gebrauchslösung gefärbt. Nach dem Abspülen mit Aqua dest. wurde der Ausstrich luftgetrocknet und im Fluoreszenzmikroskop bei 600-facher Vergrößerung unter Ölimmersion beurteilt.

Mit der Akridinorange-Färbung ist es im akuten Krankheitsgeschehen möglich, die Erreger als hell- bis dunkelorange Punkte oder Kreise von ca. 0,5-0,8 µm Durchmesser auf den Erythrozyten deutlich darzustellen (HEINRITZI, 1990b).

3.3.3 Extraktion der *Mycoplasma suis*-DNA

Material:

BEL-Puffer: 500 µl 1 M Tris, pH 7,4
250 µl MgCl₂
500 µl Triton X
16 ml 1 M Sucrose
32.75 ml Aqua bidest.

Ethanol absol. (Merck, Darmstadt)

Aqua bidest. (Seidel medipool, Buchendorf b. München)

GenElute Bacterial Genomic DNA Kit (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

Chemikalie/Lösung	Chemischer Vorgang
Lysis-Puffer	Zellauflösung
Wash Solution 1	Entfernung von ungebundenen Substanzen, Zellmembranen und PCR-Inhibitoren (Heparin, Hämoglobin)
Wash Solution 2	Entfernung von Verunreinigungen (Zellreste), Salzen
Proteinase K	Verdau von Proteinen
Elution solution	Lösungsmittel für die DNA

Tabelle 1: Chemikalien und Lösungen zur DNA-Extraktion

Vorbereitung:

Herstellung der Wash Solution 2: Konzentrat vor dem ersten Gebrauch mit Ethanol (95%) verdünnen (10er Kit: 10 ml; 70er Kit: 80 ml; 350er Kit: 360 ml)

Herstellung der Proteinase K: mit Aqua bidest. rekonstituieren (20 mg/ml Aqua bidest.)
Proteinase K wurde aliquotiert und in Eppendorf-Tubes bei -20°C gelagert

Die Lösungen wurden vor Gebrauch gemischt und auf Präzipitate geprüft. Bei Präzipitatbildung wurden die Lösungen auf 55-60°C erhitzt.

Durchführung:

Die Durchführung der DNA-Extraktion erfolgte nach Vorschrift des Herstellers. Das gesamte Verfahren der Isolierung und Reinigung der *M. suis*-DNA unterteilte sich in folgende vier Phasen:

- (1) Lyse der Zellen
- (2) Bindung der DNA an die Silicagel-Membran der Filtersäule
- (3) Waschvorgang zur Entfernung von Verunreinigungen
- (4) Elution der gereinigten DNA

Die Extraktion wurde nach dem Protokoll für die DNA-Isolierung aus grampositiven Bakterien durchgeführt und ist nachstehend beschrieben. Über die Zusammensetzung der enthaltenen Reagenzien wurden vom Hersteller keine Angaben gemacht. Die einzelnen Schritte werden im Folgenden genauer erläutert.

Lyse:

Zu Beginn wurden 200 µl des mit EDTA ungerinnbar gemachten Blutes in ein beschriftetes Eppendorf-Tube 1,5 ml (Eppendorf, Wesseling) pipettiert, mit 200 µl BEL-Puffer versetzt und in einer Tischzentrifuge 1 min bei 10.000 U/min und Raumtemperatur zentrifugiert (Biofuge pico, Heraeus). Der Überstand wurde verworfen und das verbleibende Pellet anschließend in 500 µl BEL-Puffer resuspendiert und wie oben aufgeführt zentrifugiert. Dieser Schritt wurde so lange wiederholt, bis das Pellet annähernd weiß war. Anschließend wurde das Pellet in 200 µl Lysis solution T (Sigma-Aldrich) durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren resuspendiert. Durch Zugabe von 20 µl Proteinase K kam es zu einem proteolytischen Abbau der Zellproteine. Als positiver Nebeneffekt inaktivierte die Proteinase K störende Enzyme, wie DNAsen, die den Abbau von PCR-Produkte bewirken. Die Probe wurde mit Hilfe eines Vortex-Gerätes (MS2 Minishaker, IKA[®] Process Equipment) bei 2500 U/min gemischt und anschließend für 30 min bei 55°C und 450 U/min auf einem Thermomixer (Thermomixer compact, Eppendorf) inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit wurden 200 µl Lysis Solution C hinzupipettiert. Die Probe wurde ca. 15 sec lang wie oben beschrieben gemischt und erneut bei 55°C und 450 U/min 10 min lang inkubiert. Alle Zentrifugationsschritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

DNA-Isolierung:

Im nächsten Schritt erfolgte die Säulenvorbereitung, die eine maximale Bindung der DNA an die Silicagel-Membran zur Folge hatte. Dazu wurden 500 µl Column Preparation Solution auf die Filtersäule (Nucleic Acid Binding Column) pipettiert. Die Filtersäule wurde 1 min bei 13.000 U/min zentrifugiert und der entstandene Durchfluss verworfen.

Anschließend wurden 200 µl Ethanol (98%) zu dem inkubierten Lysat gegeben. Um eine homogene Probe zu erhalten, wurde das Lysat 10 sec. mit dem Vortex-Gerät gemischt. Durch die Zugabe von Ethanol wurde der DNA Wasser entzogen. Hierdurch kommt zu einer Aggregation mit nachfolgender Präzipitation der Nukleinsäuremoleküle. Das gesamte Lysat wurde im Folgenden auf die Filtersäule pipettiert und 1 min bei 10.000 U/min zentrifugiert. Um eine

Kontamination der DNA durch den Pipettiervorgang zu vermeiden, wurden von diesem Schritt an Pipettenspitzen mit integriertem Filter verwendet. Nach der Zentrifugation wurde die Filtersäule in ein neues 2,0 ml Auffanggefäß überführt.

Die Kombination der im Folgenden verwendeten Waschpuffer gewährleistete eine hohe Reinheit der eluierten DNA, während die Waschbedingungen eine komplette Entfernung der übriggebliebenen Verunreinigungen ohne Beeinträchtigung der DNA-Membran-Bindung bewirkten. Zunächst wurden 500 µl Wash Solution 1 auf die Filtersäule gegeben und 1 min bei 10.000 U/min zentrifugiert. Die Filtersäule wurde danach in ein neues, beschriftetes 2,0 ml Auffanggefäß eingebracht und 500 µl Wash Solution 2 hinzugegeben. Die Probe wurde 3 min bei 13.000 U/min zentrifugiert, der Durchfluss verworfen und anschließend zur Entfernung des restlichen Puffers nochmals zentrifugiert. Die Filtersäule wurde wieder in ein neues, beschriftetes 2,0 ml Auffanggefäß überführt. Im letzten Schritt erfolgte die Elution der gereinigten genomischen DNA. Auf die Filtersäule wurden 200 µl Elution Solution gegeben. Abschließend wurde die Probe 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und 1 min bei 10.000 U/min zentrifugiert.

Die Proben wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C gelagert. Um eine Scherung der DNA zu verhindern, wurde das wiederholte Auftauen und Einfrieren der Proben vermieden.

Es wurden in einem Arbeitsdurchgang von maximal 24 Blutproben DNA isoliert. Nach jedem Durchgang wurden die Arbeitsflächen, sowie alle verwendeten Geräte gereinigt und desinfiziert (Melliseptol, Braun Melsungen AG). Um das Kontaminationsrisiko zu minimieren, wurden pro Tag maximal 48 Blutproben bearbeitet. Nach jeder 48. Blutprobe wurde eine Verfahrenskontrolle durchgeführt, um zu überprüfen, ob eine Kontamination der verwendeten Materialien stattgefunden hatte. Als Ausgangssubstanz wurde hierzu anstelle von Blut Aqua bidest. verwendet. Die Arbeitsschritte wurden unter Verwendung aller Reagenzien wie oben beschrieben durchgeführt.

Zur Vermeidung von Kontaminationen wurden sämtliche, im Rahmen der Extraktion verwendete Puffer, an einem Reinarbeitsplatz in kleinen Mengen (2-10 ml) in sterile Reaktionsgefäße aliquotiert. Für die Extraktion wurden kommerziell abgepackte, sterile Filterpipettenspitzen benutzt. Die Pipettenspitzen wurden nach jedem Arbeitsschritt und nach jeder Probe verworfen. Zum Kontaminationsschutz wurden Handschuhe getragen. Während der Durchführung der DNA-Isolierung wurde darauf geachtet, dass jeweils nur ein Reaktionsgefäß geöffnet war und die Membran der Filtersäule nicht mit der Pipettenspitze berührt wurde. Außerdem wurde der Kontakt von Probenmaterial mit dem Rand der Filtersäule vermieden. Die

Isolierung und Reinigung der DNA fand in einem von dem normalen Laborbetrieb separierten Raum statt.

3.3.4 Automatisierte Extraktion der *Mycoplasma suis*-DNA mit dem MagNA Pure LC™ Automaten

Um die Effizienz der DNA-Extraktion mit dem GenElute Bacterial Genomic DNA Kit zu überprüfen, wurde von 100 Proben zusätzlich eine DNA-Extraktion mit dem MagNA Pure LC™ Automaten (Roche Diagnostics, Penzberg) durchgeführt. Nach Amplifikation der extrahierten DNA mit dem LightCycler® 2.0 System wurde die Sensitivität der beiden Extraktionsverfahren verglichen.

Probenvorbereitung:

200 µl des EDTA antikoagulierten Blutes wurden mit 200 µl BEL-Puffer versetzt und 1 min bei 8000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet anschließend in 400 µl BEL-Puffer resuspendiert und erneut zentrifugiert. Dieser Schritt wurde einige Male wiederholt bis das Pellet eine weiße Farbe aufwies. Anschließend wurde das Pellet mit 300 µl Bacterial Lysis Puffer (Roche Diagnostics) und 15 µl Proteinase K (Roche Diagnostics) versetzt. Die Lyse der Zellen fand in einem Wasserbad bei 56°C und einer Dauer von 30 min statt. Zur Inaktivierung der Proteinase K wurden die Proben für weitere 10 min bei 95° im Wasserbad inkubiert. Die DNA-Extraktion erfolgte unter Verwendung des MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit (Roche Diagnostics) nach Angaben des Herstellers.

Nach der Vorbereitung wurden die Proben einschließlich sämtlicher im MagNA Pure Nucleic Acid Isolation Kit enthaltenen Reagent Tubes und Sample Cartridges in den MagNA Pure LC™ Automaten (Roche Diagnostics) eingesetzt und das Programm für die DNA-Extraktion gestartet.

Der MagNA Pure LC™ Automat der Firma Roche Diagnostics stellt einen vollautomatischen Extraktionsautomaten dar, der in der Lage ist, aus Proben wie Blut, Serum, Plasma, bronchoalveolären Lavagen (BAL) und Liquor Nukleinsäuren (DNA, RNA und mRNA) zu gewinnen. Da der MagNA Pure LC™ als geschlossenes System arbeitet und manuelle Schritte während des Arbeitsprozesses nicht stattfinden, ist das Risiko der Kontamination während der Extraktion deutlich reduziert. Sämtliche Aufreinigungsschritte werden computergesteuert vom Automaten durchgeführt, so dass von 32 Proben innerhalb kürzester Zeit (in weniger als 60 min) qualitativ hochwertige DNA gewonnen wird. Hierbei wird die Eigenschaft der Nukleinsäuren,

sich bei hohen Salzkonzentrationen und Ionenstärken an Glas zu binden, genutzt. Durch die poröse Oberfläche des Glases wird die Bindung verstärkt. Magnetische Silicapartikel, die einen Eisenkern, auf den Magnetit aufkristallisiert ist, und eine Außenschicht aus Glasschuppen besitzen, werden bei der Extraktion eingesetzt. Mit Hilfe des Magneten können die magnetischen Glaspartikel und die daran gebundenen Nukleinsäuren isoliert werden. Vor der eigentlichen DNA-Extraktion mit dem MagNA Pure LC™ erfolgt eine Lyse der Zellen. Durch Konzentrationen von Guanidiniumsalzen und Proteinase K wird ein Aufbrechen der Zellwände erreicht. Danach werden die nun frei zugänglichen Nukleinsäuren an die magnetischen Glaspartikel gebunden. Um noch anhaftende Verunreinigungen zu entfernen, durchlaufen die gebundenen Nukleinsäuren zusammen mit den Glaspartikeln mittels eines im Pipettierarm befindlichen Magneten eine Reihe von Waschvorgängen mit unterschiedlichen Waschlösungen. Im letzten Schritt wird die Lösung bei hoher Temperatur in einem Medium mit niedriger Ionenstärke inkubiert. Die nun ungebundenen Partikel werden mit dem Magneten aus der Lösung entfernt. Man erhält eine Lösung aus gereinigten Nukleinsäuren.

3.3.5 Agarosegelelektrophorese

Um zu überprüfen, ob bei der DNA-Extraktion mit Hilfe des GenElute Bacterial Genomic DNA Kit tatsächlich DNA isoliert wurde, wurden 50 zufällig ausgewählte Proben nach der Extraktion in einer Agarosegelelektrophorese analysiert.

Material:

DNA-Größenstandard-Marker (1 kb-ladder, NewEngland, Biolabs)

Ladepuffer (6 x) (New England Biolabs)

Agarose NEEO (Roth, Karlsruhe)

TAE-Puffer (50x):	Tris (Roth, Karlsruhe)	2 M
	Eisessig (Merck, Darmstadt)	1 M
	EDTA (Serva, Heidelberg)	50 mM
	pH-Wert 7,6 autoklavieren	

3 µl Ethidiumbromid-Lösung (1%ig, Biorad, München) pro 100 ml 1x TAE-Puffer

Vorbereitung:

Die Agarose (1%) wurde mit 1 x TAE-Puffer suspendiert und durch Aufkochen in der Mikrowelle vollständig gelöst. Die so gelöste Agarose wurde nach Abkühlen auf ca. 60 °C mit Ethidiumbromidlösung versetzt und in einen Gelträger gegossen. Unmittelbar danach wurden zwei Kämme mit 20 Taschen für die Proben eingesetzt. Nach 30 min Abkühlen wurden die Kämme vorsichtig entfernt und das Gel mit 1 x TAE-Puffer überschichtet, so dass das Flüssigkeitsniveau etwa 1 mm über dem Gel lag.

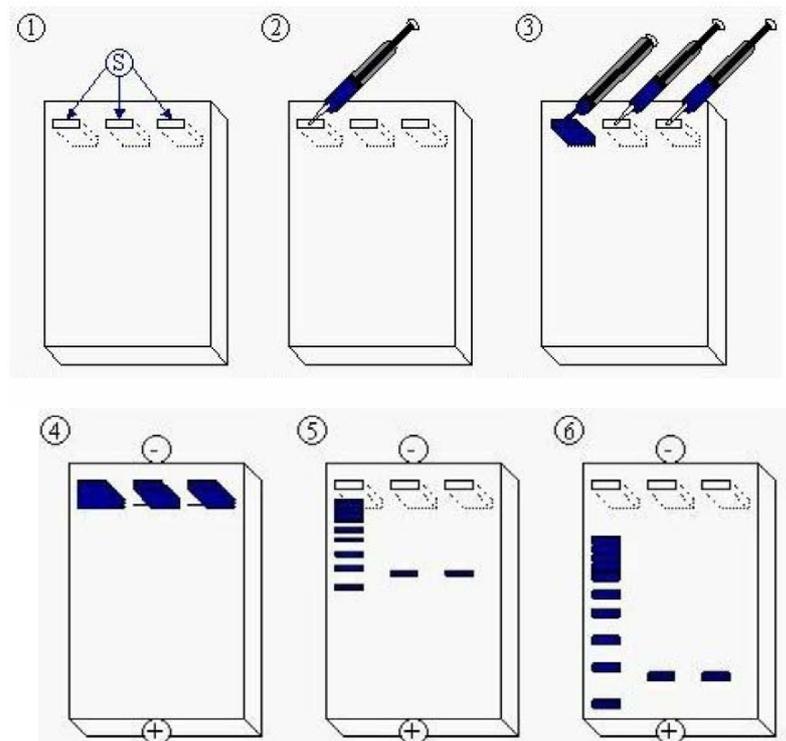
Durchführung:

Abbildung 8: Arbeitsschritte der Agarosegelelektrophorese

(1) fertiges Agarosegel mit 3 Taschen

(2) Auftragen eines DNA-Größenstandards in die Tasche 1

(3) Auftragen der DNA-Proben in die Taschen 2 und 3

(4) Anlegen der Spannung (70 V)

(5) Wandern der negativ geladenen DNA-Fragmente zum positiven Pol

Kleine DNA-Fragmente wandern schnell, große langsam durch das Gel. Die DNA ist währenddessen normalerweise nicht sichtbar. Daher wird der Fortschritt an der Farbfront abgelesen, die sich schneller als selbst kleinste DNA-Fragmente durch das Gel bewegt

(6) Ende der Elektrophorese nach 60 min

Zur Bestimmung der Fragmentgröße wurden 5 µl des 1 kb-DNA-Standards, vermischt mit 1 µl Ladepuffer, in die erste Tasche des Gels pipettiert. 5 µl der zu untersuchenden Proben wurden mit 1 µl Ladepuffer gemischt, kurz zentrifugiert und in die Geltaschen pipettiert. Die Auftrennung der DNA erfolgte über 30 min bei einer Spannung von 70 V. Die DNA-Banden wurden durch Anfärbung mit dem Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid und durch Fotografieren unter UV-Licht (302 nm) sichtbar gemacht. Die Größe der Amplifikate wurde mit Hilfe des Computerprogramms Bio Profile 3.1 ermittelt und photographisch dokumentiert. Stellen, an denen sich Nukleinsäuren befinden, leuchten im Agarosegel hell (Fluoreszenz), wohingegen Stellen ohne Nukleinsäuren dunkel erscheinen. Die Lichtintensität ist dabei proportional zur vorliegenden DNA-Konzentration (bei gleicher Fragmentlänge) als auch zur Länge der Nukleinsäure.

Die DNA-Extraktion mit Hilfe des GenElute Bacterial Genomic DNA Kit wurde als erfolgreich bewertet, wenn im Agarosegel DNA sichtbar war.

3.3.6 Quantitative real-time PCR

Die quantitative real-time PCR beruht auf der Aussendung von Lichtsignalen bei Anlagerung von fluorochrom-markierten komplementären Genomabschnitten. Hierbei korreliert die Menge der Lichtsignale mit der Menge der amplifizierten DNA und wird mit einer Standardverdünnungsreihe in Relation gebracht.

3.3.7 Aufbau und Funktion des LightCyclers®

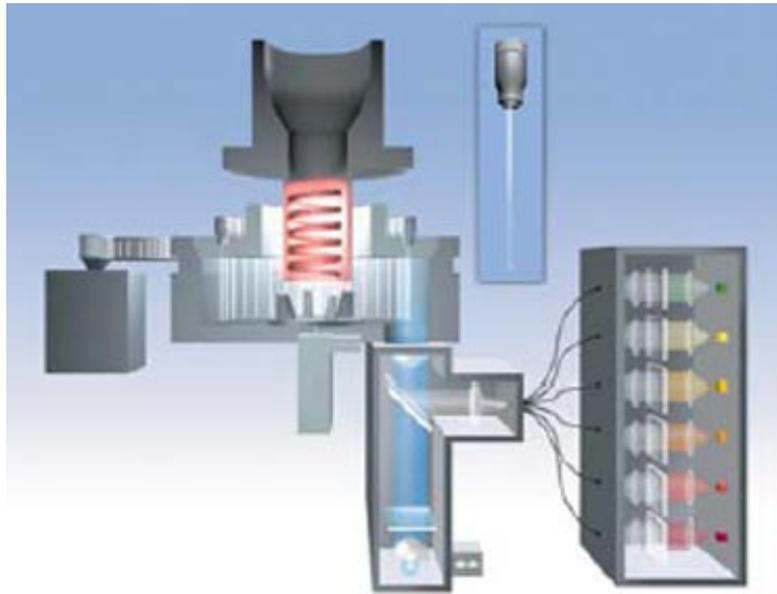


Abbildung 9: Schematischer Aufbau des LightCyclers® 2.0 Systems modifiziert nach Roche Diagnostics

Der LightCycler® ermöglicht durch Kombination von Thermocycler und Fluorimeter, Daten schon während der laufenden PCR in „realtime“ anzuzeigen und zu analysieren. Das Probenkarusell (Roche Diagnostics) als zentrales Element fasst 32 Proben in Glaskapillaren, die als Küvetten für die fluorimetrische Bestimmung der gebildeten PCR-Produkte dienen. In der thermischen Kammer sorgt ein Ventilator für die gleichmäßig schnelle Ausbreitung der von der Heizspirale in die Kammer geblasenen Luft. Die Energiequelle der optischen Fluoreszenzkomponente besteht aus einer blauen Diode, deren Licht mittels einer Spezialoptik auf 1 mW bei 470 nm Wellenlänge gefiltert wird und in der Folge auf die einzelnen Proben in den Glaskapillaren fokussiert wird. Bei Vorliegen spezifischer PCR-Produkte bewirkt das einfallende Licht einen FRET zwischen den verwendeten Hybridisierungssonden, wobei Lichtemissionen bestimmter Wellenlängen (530, 560, 610, 640, 670 und 710nm) in sechs verschiedenen Detektionskanälen analysiert werden können. Die Amplifikation in Echtzeit kann auf dem Monitor simultan dargestellt und verfolgt werden, da der Motor im Probenkarusell jede einzelne Kapillare in die richtige Position zur optischen Einheit bringt.

3.3.8 Durchführung der quantitativen real-time PCR

Die Durchführung der quantitativen real-time PCR fand am Institut für Veterinär bakteriologie der Vetsuisse Fakultät der Universität Zürich statt. Die real-time PCR erfolgte auf Grundlage des von HOELZLE et al. (2007b) etablierten LightCycler[®] MSG1 PCR Protokolls.

LightCycler[®] MSG1 PCR Protokoll:

Für die Ermittlung und Quantifizierung der *M. suis*-DNA wurde das LightCycler[®] 2.0 System verwendet (Roche Diagnostics). Die Primer und Hybridisierungs sonden wurden für die Amplifikation eines 178-bp großen Fragments des *M. suis* MSG1 Gens konzipiert. Speziell angefertigte PCR Primer, Fluorescein- und LightCycler[®] Red 640-markierte Hybridisierungs sonden wurden von der Firma Metabion GmbH (Martinsried) bezogen. Die real-time PCR wurde unter Verwendung des LightCycler[®] Fast Start DNA Master^{PLUS} Hybridisierungs son den Testkits (Roche Diagnostics) durchgeführt. Die enthaltene FastStart Taq Polymerase basiert auf der „Hot-Start“-Technologie und minimiert die Amplifikation von unspezifischen PCR-Produkten (KELLOG et al., 1994; BIRCH, 1996).

In jedes Glaskapillarröhrchen wurden 5 µl der extrahierten DNA und 15 µl PCR Mischung gegeben. Die PCR-Mischung enthielt 4 µl Master Mix (bestehend aus Reaktionspuffer, „Hot-start“ Taq Polymerase, dNTPs und MgCl₂), Primer-Sonden-Mischung (bestehend aus 2 Primern und 2 Sonden) und Aqua bidest. (PCR-grade). Die genauen Konzentrationen setzten sich wie folgt zusammen:

Reaktionsvolumen gesamt: 20 µl (=1 Kapillare)

- Proben 5 µl DNA
- PCR-Mix 15 µl

Reagenz	Volumen/Konzentration
H ₂ O	9 µl
Primer 1	0,5 µM
Primer 2	0,5 µM
Sonde 1	0,2 µM
Sonde 2	0,2µM
Master Mix (5-fach)	4 µl

Tabelle 2: Konzentration der verwendeten Reagenzien

Bei jedem Versuch mit einer Probenzahl x wurde jeweils der Master-Mix für $(x + 1)$ Proben angesetzt, um eine Master-Mix-Reserve zu erhalten. Diese Reserve erlaubte es, bei einem möglichen Pipettierfehler oder Bruch einer Kapillare einen unnötigen Zeitverlust durch Erstellung eines neuen Master-Mix zu verhindern. Beim Erstellen des Master-Mix wurde auf ein sorgfältiges Mischen des $MgCl_2$ geachtet. Die PCR wurde mit einer 15-minütigen Inkubation bei $95^\circ C$ begonnen, um die FastStart Taq DNA Polymerase zu aktivieren („Hot-Start“-Polymerase). Die Amplifikation erfolgte nach dem real-time PCR-Protokoll von HOELZLE et al. (2007b) und kann der nachfolgenden Tabelle entnommen werden.

Prozess		Dauer	Temperatur
Initiale Denaturierung/Aktivierung der Taq-Polymerase		15 min	$95^\circ C$
Amplifikation	Denaturierung	15 sec	$95^\circ C$
	Annealing	10 sec	$60^\circ C$
	Elongation	10 sec	$40^\circ C$
Zyklen: 40			

Tabelle 3: Temperaturprofil der Light Cycler® PCR

Pro PCR-Durchlauf wurden 25 Proben bearbeitet. Zusätzlich wurden bei jedem Durchlauf sechs Positivkontrollen zur Erstellung einer Standardkurve und eine Negativkontrolle (Aqua bidest) mitgeführt. In der Positivkontrolle wurde als Template DNA des *M. suis*-Isolates 01/06 verwendet. Das *M. suis*-Isolat 01/06 stammte von einem Schwein mit akuter porciner Eperythrozoonose. Die Positivkontrollen stellten eine Verdünnungsreihe mit den Verdünnungen 10^5 , 10^4 und 10^3 *M. suis* Genomäquivalente/5 μl dar. Jede Verdünnung wurde doppelt verwendet. Die Verdünnungsreihe diente der Bestimmung einer Standardkurve, die eine absolute Quantifizierung ermöglichte. Die Software ermittelte aus den definierten DNA-Verdünnungen eine lineare Funktion, die den Zusammenhang von C_t -Wert und Anzahl an DNA-Kopien darstellte.

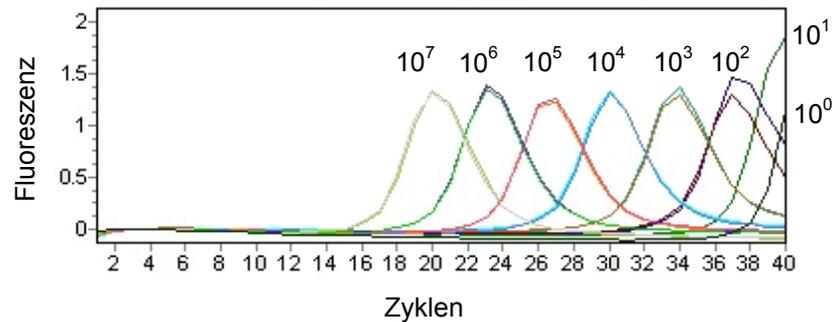


Abbildung 10: Amplifikationskurven der real-time PCR für unterschiedliche Standardkonzentrationen

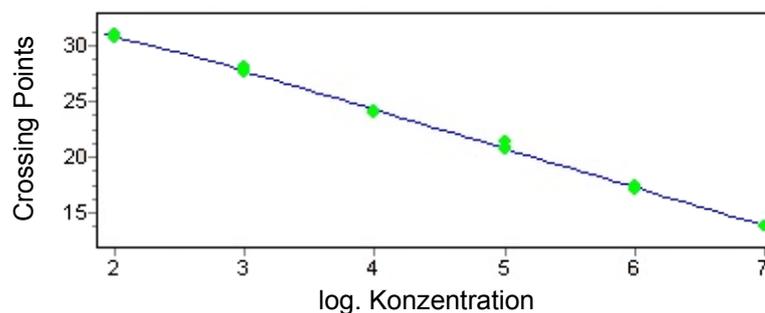


Abbildung 11: Standardkurve für die real-time PCR

Eine Probe wurde als *M. suis*-positiv bewertet, wenn in der PCR innerhalb der ersten 32 Amplifikationszyklen ein exponentieller Anstieg der Fluoreszenz zu verzeichnen war (crossing-point: $Ct \leq 32$). Proben, die einen crossing-point zwischen 32 und 35 Zyklen besaßen, wurden zur Bestätigung des Ergebnisses noch zweimal in der PCR wiederholt. Eine Probe galt als negativ, wenn entweder keine Amplifikation stattfand oder der crossing-point Wert > 35 Zyklen war. Zur Bestätigung der PCR-Ergebnisse wurden alle Proben, die beim ersten PCR-Durchlauf positiv waren, ein zweites Mal getestet. Die gleiche Anzahl an Proben mit negativem Ergebnis wurde zum Nachweis eventuell vorhandener PCR-Inhibitoren mit der Positivkontrolle versetzt und erneut amplifiziert.

Für die Amplifikationsreaktionen, die Messdatenerfassung und -analyse wurde das LightCycler[®] Zubehör verwendet. Um Kreuzkontaminationen und Verunreinigungen zu vermeiden, wurden die Arbeitsschritte vor und nach der PCR in unterschiedlichen Räumen durchgeführt. Für alle Pipettiervorgänge wurden Pipettenspitzen mit Filter verwendet.

3.3.9 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit dem Computerprogram SPSS 14.0 für Windows. Im Rahmen der Auswertung wurden bei den Blutparameter die Mittelwerte, die Medianwerte, die Minimum- und Maximumwerte sowie die Quantile jeweils für *M. suis*-positive und -negative Tiere berechnet und dargestellt. Zur Untersuchung der Auswirkung von *M. suis* auf die Blutparameter wurde deren Verteilung als Kurven visualisiert. Zur Überprüfung der Signifikanz von Unterschieden der Mittelwerte der hämatologischen und klinisch-chemischen Parameter zwischen positiven und negativen Proben wurde für jeden Parameter ein verbundener t-Test durchgeführt. Unterschiede galten als signifikant ab einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p \leq 0,05$.

Zur Überprüfung der im Probeversuch ermittelten Prävalenzen wurde ein exakter Binomialtest mit dem Signifikanzniveau 0,05 durchgeführt. Die Abhängigkeit von PCR-Ergebnis und Akridin-Ausstrich wurde mittels χ^2 -Test untersucht. Um die Signifikanz der Unterschiede zwischen den Prävalenzen in den einzelnen Bundesländern zu untersuchen, wurde ebenfalls ein exakter Binomialtest durchgeführt. Es wurde jeweils die Abweichung zwischen der Prävalenz in den einzelnen Bundesländern und der durchschnittlichen Prävalenz über alle Bundesländer untersucht.

Zur Ermittlung von linearen Zusammenhängen zwischen hämatologischen Parametern und dem Logarithmus der Erregermenge im Blut wurde der Korrelationskoeffizient nach Bravais-Pearson zwischen dem jeweiligen Parameter und der logarithmierten Erregeranzahl berechnet. Die Zusammenhänge wurden als Scatter-Plots visualisiert. Zur Überprüfung der Signifikanz der Korrelation wurde jeweils ein Test mittels t-Verteilung durchgeführt.

4 Ergebnisse

4.1 Anzahl und Verteilung der untersuchten Proben

Anhand der Ergebnisse des Vorversuchs konnte die endgültige Probenanzahl wie folgt festgelegt werden: Die 160 Tiere des Vorversuchs stammten aus 46 verschiedenen Betrieben. Es wurden also im Durchschnitt 3,48 Proben pro Betrieb entnommen. Bei insgesamt 17 Tieren konnte in der real-time PCR ein *M. suis*-positives Ergebnis nachgewiesen werden. Dies entspricht einer Prävalenz von 10,6%. Von den insgesamt 46 untersuchten Betrieben waren sechs Betriebe *M. suis*-positiv. Dies bedeutet, dass 13% der untersuchten Betriebe *M. suis*-infiziert waren. Für die Festlegung der Probenanzahl wurde ausgehend von diesem Ergebnis angenommen, dass ca. 15% der Betriebe in Deutschland *M. suis*-positiv sind. Es wurde statistisch berechnet, wie viele Betriebe pro Bundesland untersucht werden müssen, um mit einer Wahrscheinlichkeit von 95% (=statistische Konfidenz) mindestens einen positiven Betrieb zu finden, unter der Annahme, dass insgesamt 15% der Betriebe in Deutschland *M. suis*-infiziert sind. Bei dem beschriebenen Vorversuch betrug die Prävalenz innerhalb positiver Betriebe 41,5%. Die genaue Anzahl der positiven Tiere pro Betrieb kann der nachfolgenden Grafik entnommen werden.

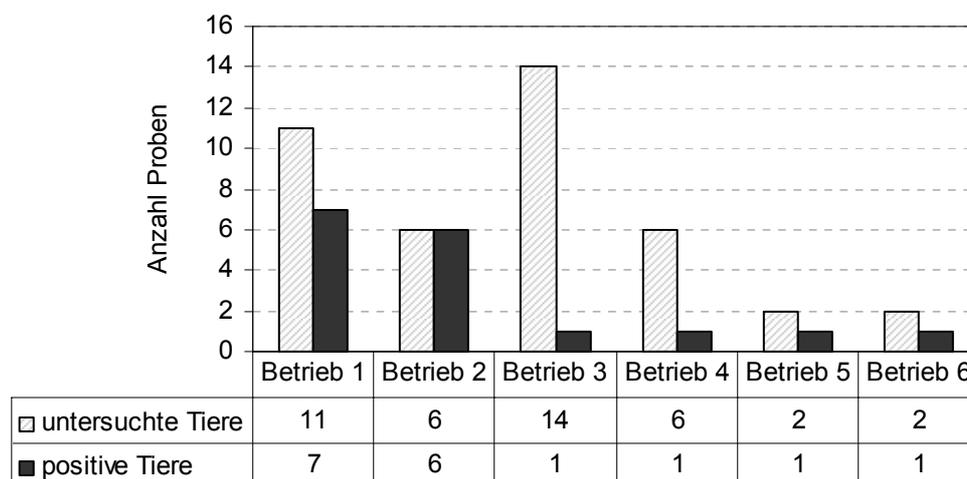


Abbildung 12: Anzahl positiver Tiere pro Betrieb

Da die Prävalenz innerhalb eines *M. suis*-positiven Betriebs auch laut Angaben in der Literatur zwischen 30-40% liegt, wurde für die Berechnung der Tierzahl pro Betrieb angenommen, dass ca. 40% der Tiere pro Betrieb *M. suis*-infiziert sind. Es wurde statistisch berechnet, von

wie vielen Tieren pro Betrieb Blutproben entnommen werden müssen, um mit einer Wahrscheinlichkeit von 95% mindestens ein positives Tier zu finden, unter der Annahme, dass 40% der Tiere innerhalb eines Bestandes infiziert sind. Bei den 17 in der real-time PCR-positiv getesteten Proben variierte die Erregeranzahl pro Milliliter Blut zwischen $2,5 \times 10^3$ und $7,25 \times 10^6$. Der logarithmierte Mittelwert betrug 5,31.

Die Bundesländer Bremen, Berlin, Hamburg, Rheinland-Pfalz und Saarland wurden aufgrund der dort kaum vorhandenen Schweineproduktion bereits im Vorfeld von den Untersuchungen ausgeschlossen. Aus den restlichen 11 Bundesländern sollten jeweils 20 Betriebe pro Bundesland untersucht werden. Pro Betrieb sollten von sechs Tieren Blutproben entnommen werden, was einer Gesamtprobenanzahl von 1320 entspricht. Im Verlauf der Probenentnahme am Schlachthof stellte sich jedoch heraus, dass aus den Bundesländern Brandenburg, Schleswig-Holstein und Mecklenburg-Vorpommern keine, beziehungsweise nur eine ungenügende Anzahl von Tieren geschlachtet wurden. Die Proben aus den drei Bundesländern wurden aufgrund der zu geringen und deshalb nicht repräsentativen Probenanzahl statistisch nicht ausgewertet und von dem Probenschema ausgeschlossen. Die größte Vielfalt an Betrieben stammte aus den Bundesländern Bayern, Baden-Württemberg und Sachsen. Aus den schweinedichten Regionen im Norden Deutschlands wurde zwar eine sehr große Anzahl an Schweinen angeliefert, diese kamen jedoch, der Betriebsstruktur im Norden entsprechend, aus einigen wenigen Betrieben. Um eine detailliertere Aussage über die regionale Verteilung von *M. suis* in Bayern und Baden-Württemberg zu treffen, wurden aus den beiden Bundesländern jeweils 30 Betriebe untersucht. Die Gesamtprobenanzahl betrug am Ende des Versuchs 1176. Die Proben stammten aus 196 verschiedenen Betrieben. Es wurde aus den jeweiligen Betrieben Blut von den ersten sechs Tieren, die am Schlachtband angeliefert wurden entnommen. Die genaue Verteilung der Betriebe pro Bundesland, die letztendlich für die Untersuchungen zur Verfügung standen ist nachstehend in Abbildung 13 aufgeführt.

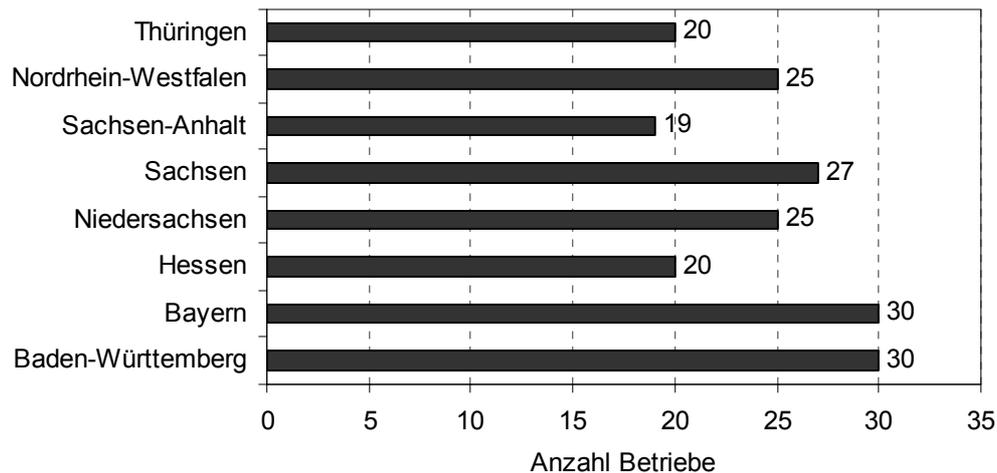


Abbildung 13: Anzahl der Betriebe pro Bundesland

4.2 Evaluierung der DNA-Extraktionsmethode

In der vorliegenden Arbeit wurde ein neues Kit für die Extraktion von *M. suis*, das GenElute Bacterial Genomic DNA Kit, eingesetzt. Als Extraktionsvergleich diente die automatisierte Extraktion mit dem bisher verwendeten MagNA Pure LCTM Automat. 100 Proben wurden zu Beginn der Untersuchung parallel mit dem MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit bearbeitet. Die gewonnene DNA wurde mit dem LightCycler[®] 2.0 System amplifiziert und detektiert. Anschließend wurden die beiden Extraktionsverfahren mit Hilfe der real-time PCR hinsichtlich ihrer Spezifität und Sensitivität miteinander verglichen. Zwischen beiden Extraktionsverfahren konnte kein Unterschied bei der Auswertung der Proben festgestellt werden. Alle *M. suis*-positiven bzw. *M. suis*-negativen Proben, die mit dem MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit bearbeitet wurden, konnten auch nach Extraktion mit dem GenElute Bacterial Genomic DNA Kit in der real-time PCR als positiv bzw. negativ identifiziert werden. Die gemessene Erregermenge in der real-time PCR hat bei beiden Extraktionsverfahren weitestgehend übereingestimmt. Daraus konnte geschlossen werden, dass das GenElute Bacterial Genomic DNA Kit eine vergleichbare Extraktionsqualität wie das MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit besitzt. Aus Kostengründen wurde für die weiteren Untersuchungen das GenElute Bacterial Genomic DNA Kit verwendet.

4.3 Spezifität der DNA-Extraktionsmethode

Zur Überprüfung der Spezifität der DNA-Extraktionsmethode mit dem GenElute Bacterial Genomic DNA Kit wurde außerdem von 50 extrahierten Proben eine Agarosegelelektropho-

rese durchgeführt. Bei allen 50 Proben war in der Agarosegelelektrophorese DNA sichtbar. Das Bandenmuster der extrahierten DNA von 19 Proben und der DNA-Standard sind exemplarisch in der nachfolgenden Grafik dargestellt.

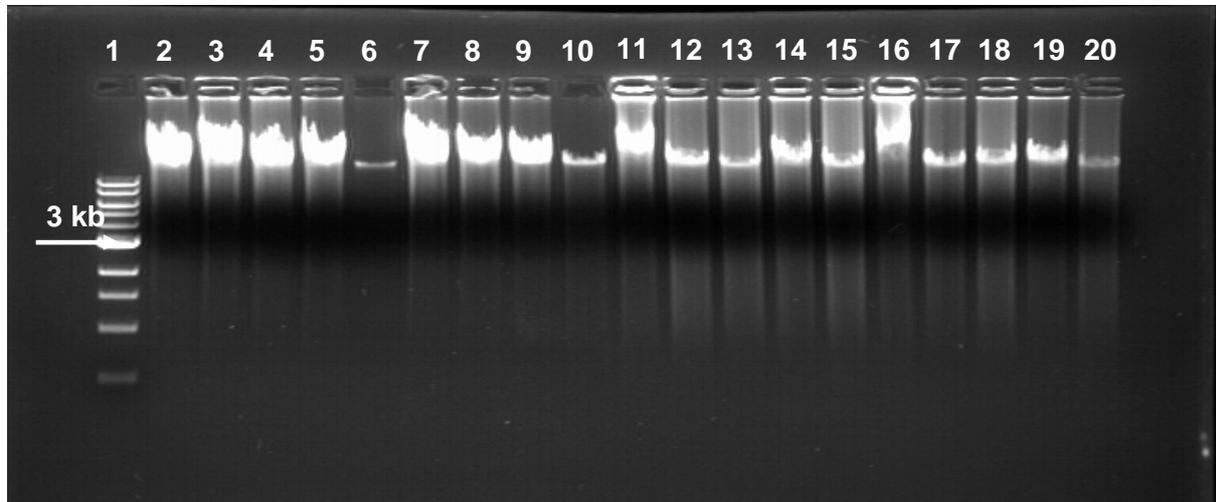


Abbildung 14: Agarosegelelektrophorese der extrahierten DNA

1	1kb-DNA-Standard
2	Genomische DNA von Schwein 17
3	Genomische DNA von Schwein 20
4	Genomische DNA von Schwein 21
5	Genomische DNA von Schwein 22
6	Genomische DNA von Schwein 23
7	Genomische DNA von Schwein 24
8	Genomische DNA von Schwein 25
9	Genomische DNA von Schwein 26
10	Genomische DNA von Schwein 28

11	Genomische DNA von Schwein 29
12	Genomische DNA von Schwein 30
13	Genomische DNA von Schwein 31
14	Genomische DNA von Schwein 32
15	Genomische DNA von Schwein 33
16	Genomische DNA von Schwein 34
17	Genomische DNA von Schwein 35
18	Genomische DNA von Schwein 36
19	Genomische DNA von Schwein 37
28	Genomische DNA von Schwein 38

4.4 Anzahl und Verteilung der real-time PCR-positiven Proben

Insgesamt wurden in der vorliegenden Arbeit (die Blutproben vom Vorversuch ausgenommen) 1176 Blutproben von Läufer Schweinen auf *Mycoplasma suis* untersucht. Die Untersuchung dieser Proben beinhaltete die Extraktion mit dem GenElute Bacterial Genomic DNA Kit und die anschließende Amplifikation und Detektion der gewonnenen DNA mit dem LightCycler® 2.0 System.

Von den 1176 untersuchten Blutproben wiesen 164 (13,9%) ein positives Ergebnis in der real-time PCR auf. Die Anzahl der in Baden-Württemberg insgesamt untersuchten Proben betrug 180. Davon konnte bei 27 Proben (15%) *M. suis* nachgewiesen werden. Aus Bayern wurden ebenfalls 180 Proben untersucht. Davon zeigten 36 (20%) ein positives Ergebnis in der real-time PCR. Von den 150 untersuchten Proben aus Niedersachsen wiesen 19 (12,7%) eine positive Reaktion auf. In Nordrhein-Westfalen waren 22 (14,7%) der insgesamt 150 untersuchten Proben *M. suis*-infiziert. In Hessen wurden 120 Proben untersucht. Davon konnte bei 16 (13,3%) Proben *M. suis* nachgewiesen werden. Von den 162 aus Sachsen stammenden Proben konnte bei 18 (11,1%) eine *M. suis*-Infektion festgestellt werden. In Sachsen-Anhalt wiesen 12 (10,5%) der insgesamt 114 Tiere *M. suis* in der real-time PCR auf. Von den 120 aus Thüringen untersuchten Proben konnte bei 14 (11,7%) Proben *M. suis* nachgewiesen werden. Die Prävalenz bei den Einzeltieren in den untersuchten Bundesländern ist in den beiden nachfolgenden Abbildungen zusammenfassend dargestellt. In Bayern konnte die höchste, in Sachsen-Anhalt hingegen die niedrigste Prävalenz an *M. suis*-infizierten Tieren ermittelt werden. Die Prävalenz in Bayern wich signifikant vom Durchschnitt der Prävalenzen aller Bundesländer ab (p-Wert: 0,025). Für die restlichen Bundesländer konnte keine signifikante Abweichung vom Durchschnitt ermittelt werden. Die Ergebnisse des durchgeführten Tests auf unterschiedliche Proportionen sind in Tabelle 4 dargestellt.

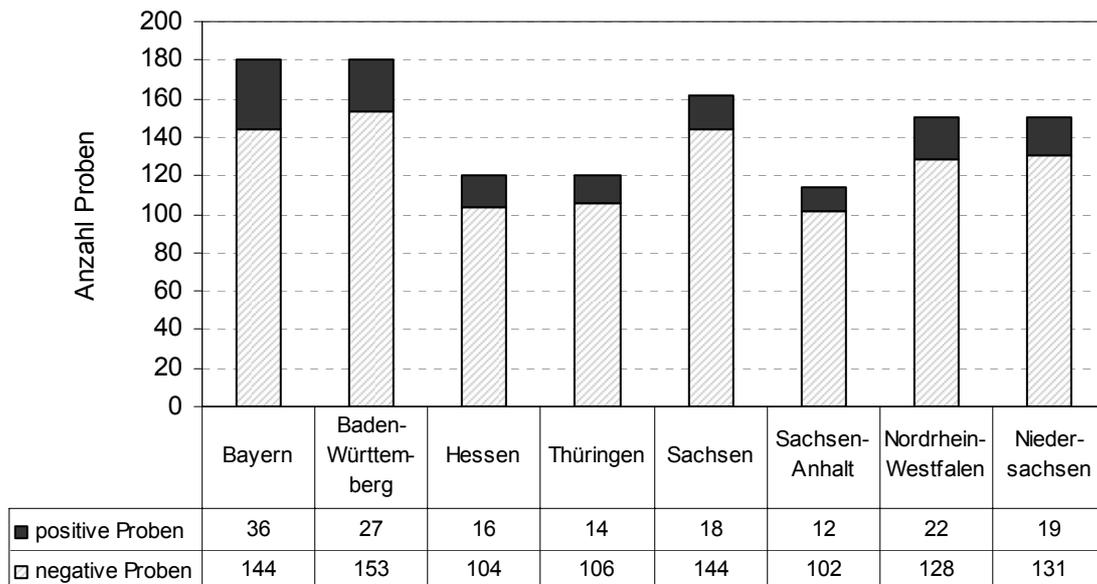


Abbildung 15: PCR Ergebnis je Bundesland

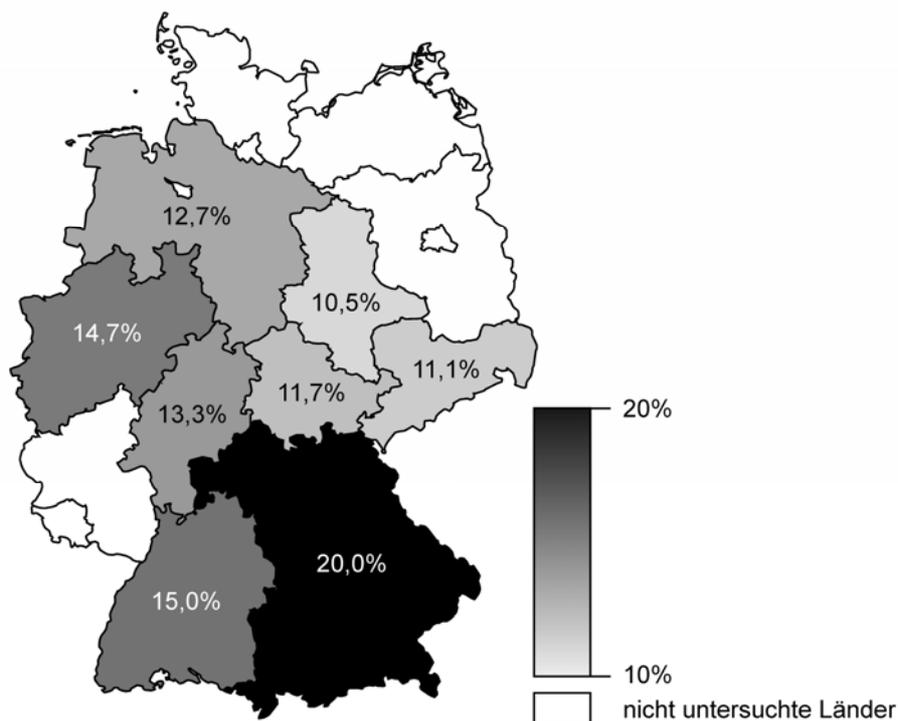


Abbildung 16: Prävalenz an *M. suis*-positiven Tieren in den einzelnen Bundesländern

Für die Prävalenzen in den einzelnen Bundesländern wurden jeweils die 95%-Konfidenzintervalle berechnet, welche in Abbildung 17 dargestellt sind.

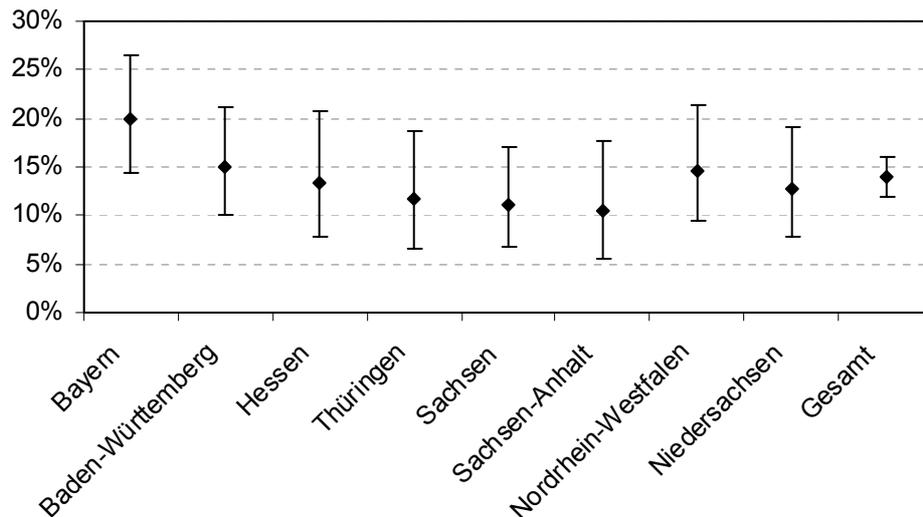


Abbildung 17: Prävalenz pro Bundesland mit 95%-Konfidenzintervall

Bayern	0,025	Sachsen	0,353
Baden-Württemberg	0,775	Sachsen-Anhalt	0,358
Hessen	0,95	Nordrhein-Westfalen	0,892
Thüringen	0,555	Niedersachsen	0,737

Tabelle 4: Ergebnisse des Tests auf unterschiedliche Proportionen an *M. suis*-positiven Tieren pro Bundesland in Relation zum Gesamtdurchschnitt (p-Wert)

Des Weiteren wurde untersucht, ob bei *M. suis*-positiven Proben Unterschiede in den Erregermengen zwischen den einzelnen Bundesländern zu erkennen sind. Die in der real-time PCR ermittelten Erregermengen pro Milliliter Blut variierte zwischen $1,4 \times 10^2$ und $1,1 \times 10^{10}$.

Wie in der nachfolgenden Abbildung 18 dargestellt, wiesen die *M. suis*-positiven Proben aus Bayern die geringste Erregermenge pro Milliliter Blut auf. In Sachsen wurde die größte Variabilität bei der Erregermenge beobachtet.

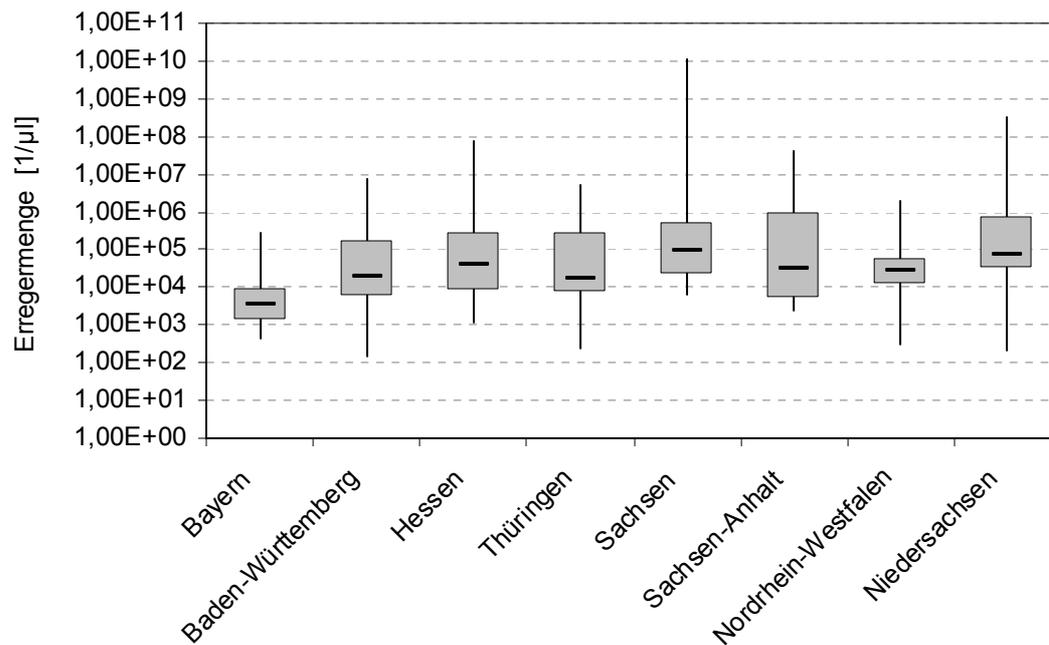


Abbildung 18: Verteilung der Erregermenge bei positiven Proben in den einzelnen Bundesländern (Min, 25% Quantil, Median, 75% Quantil, Max)

4.5 Anzahl und Verteilung der im Akridin-Ausstrich positiven Proben

Im Vorversuch konnte bei sechs (3,7%) der insgesamt 160 untersuchten Blutproben *M. suis* im Akridin-Ausstrich nachgewiesen werden. Von den 17 in der real-time PCR positiven Proben konnten nur 35,2% im Akridin-Ausstrich als *M. suis*-infiziert erkannt werden. Bei 35 (3%) der 1176 untersuchten Ausstriche konnte *M. suis* mikroskopisch festgestellt werden. In Baden-Württemberg wiesen 9 (5%) der insgesamt 180 untersuchten Ausstriche ein positives Ergebnis auf. In Bayern wurde nur bei 2 Proben (1,1%) *M. suis* im Akridin-Ausstrich nachgewiesen. In Hessen konnte nur ein Tier (0,8%) von insgesamt 120 Tieren im Akridin-Ausstrich als *M. suis* infiziert identifiziert werden. In Thüringen konnte bei 4 (3,3%) von 120 Tieren eine *M. suis*-Infektion nachgewiesen werden. Bei 5 (3,1%) von 162 in Sachsen untersuchten Proben konnte *M. suis* im Akridin-Ausstrich festgestellt werden. Von den 114 in Sachsen-Anhalt untersuchten Proben wiesen 4 (3,5%) ein positives Ergebnis im Akridin Ausstrich auf. In Nordrhein-Westfalen wiesen 3 (2%) von 150 Proben ein positives Ergebnis im Akridin-Ausstrich auf. Die Anzahl der im Akridin-Ausstrich positiven Proben in Niedersachsen betrug 7 (4,7%).

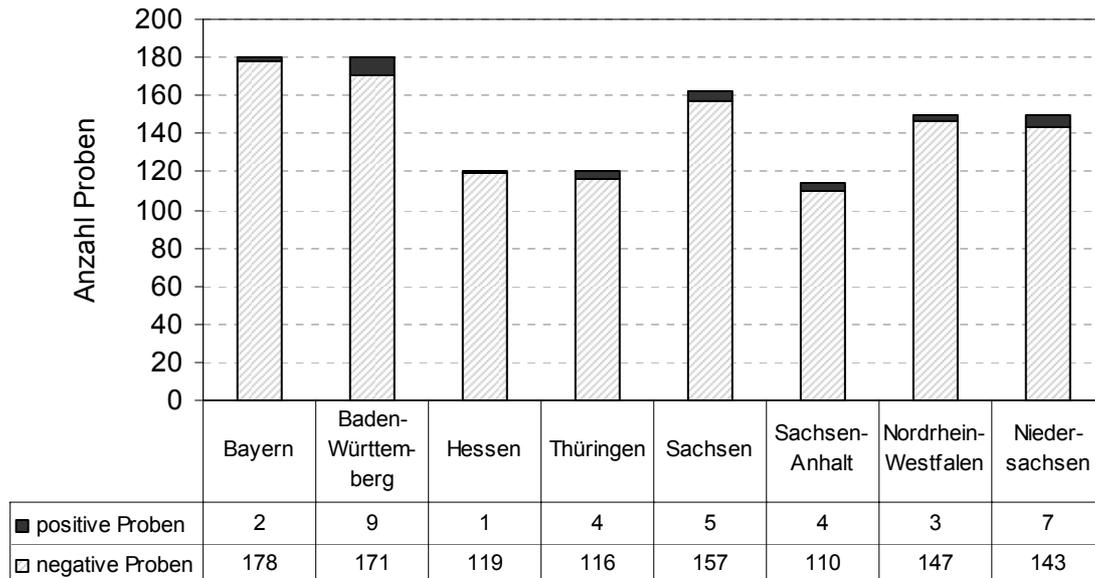


Abbildung 19: Positive Proben im Akridin-Ausstrich

4.6 Verteilung positiver Betriebe

Ein Betrieb wurde als *M. suis*-infiziert angesehen, wenn mindestens ein Tier der insgesamt sechs untersuchten Tieren ein positives Ergebnis in der real-time PCR aufwies. Von den 196 Herkunftsbetrieben konnte bei insgesamt 80 Betrieben (40,8%) positive Reagenten in der real-time PCR nachgewiesen werden.

In Bayern konnte bei 13 (43,3%) der insgesamt 30 untersuchten Betriebe *M. suis* festgestellt werden. Auch in Baden-Württemberg zeigten 13 (43,3%) der 30 untersuchten Betriebe ein positives Ergebnis in der real-time PCR. In Niedersachsen wurden insgesamt 25 Betriebe untersucht. Davon konnten 12 Betriebe (48%) als *M. suis*-positiv identifiziert werden. In Nordrhein-Westfalen waren 9 (36%) von 25 Betrieben *M. suis*-infiziert. 7 (35%) der 20 in Hessen untersuchten Betriebe wiesen ein positives Ergebnis in der real-time PCR auf. Von den 20 in Thüringen untersuchten Betrieben konnte bei 9 (45%) *M. suis* nachgewiesen werden. In Sachsen-Anhalt konnten 8 (42,1%) der 19 untersuchten Betriebe als *M. suis*-infiziert identifiziert werden. In Sachsen waren 9 (33,3%) der insgesamt 27 untersuchten Betriebe *M. suis*-positiv. Sachsen wies somit die niedrigste Dichte an *M. suis*-infizierten Betrieben auf. Die höchste Dichte an *M. suis*-positiven Betrieben wurde in Niedersachsen beobachtet. Für kein Bundesland konnte jedoch eine signifikante Abweichung der Prävalenz von der durchschnittlichen Prävalenz über alle Bundesländer ermittelt werden.

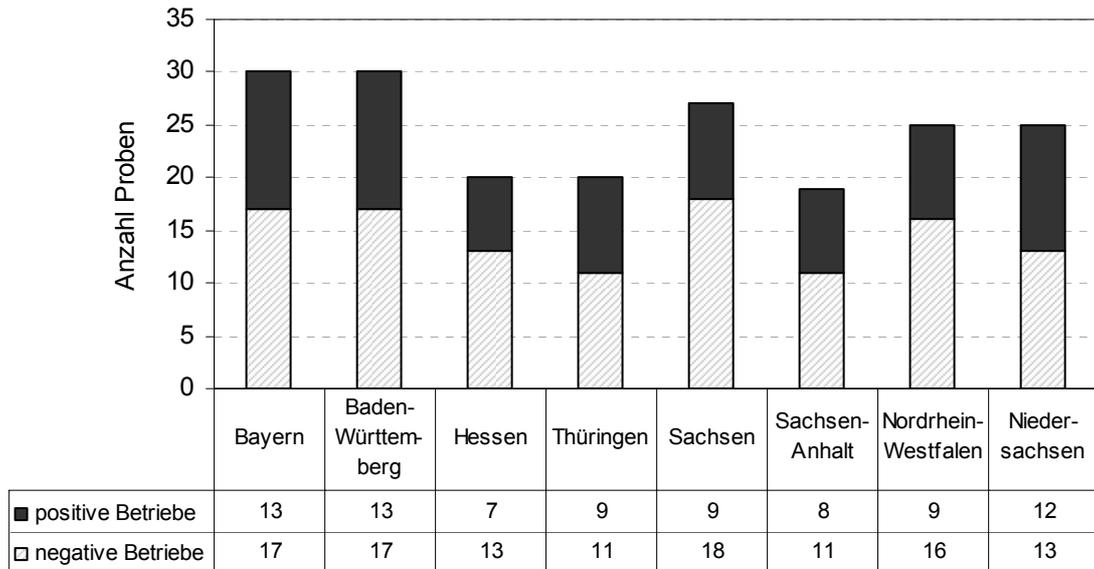


Abbildung 20: Anzahl positiver Betriebe in den einzelnen Bundesländern

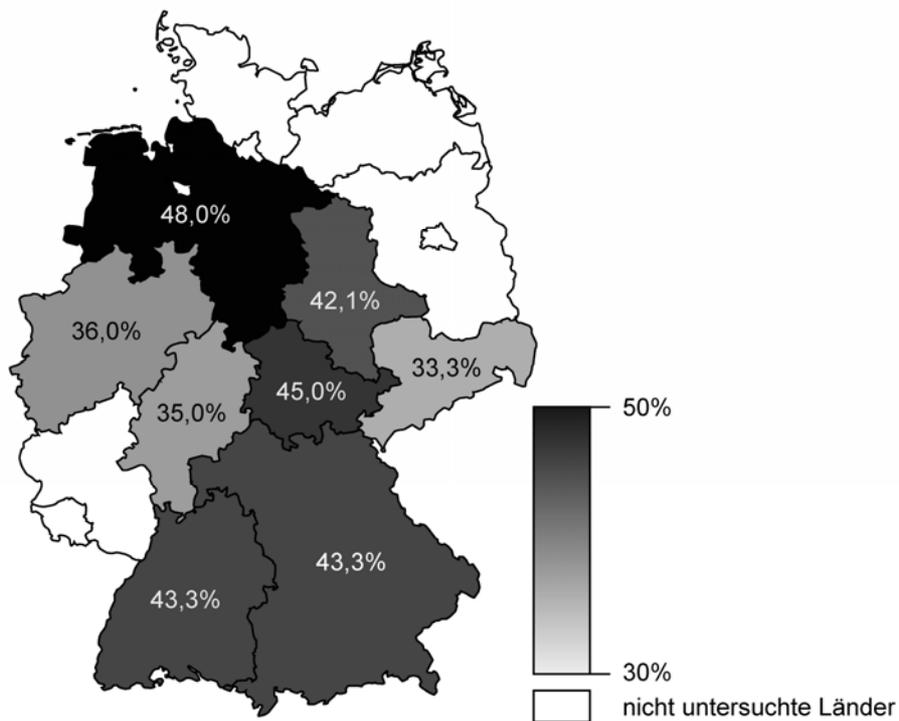


Abbildung 21: Prävalenz der Betriebe pro Bundesland

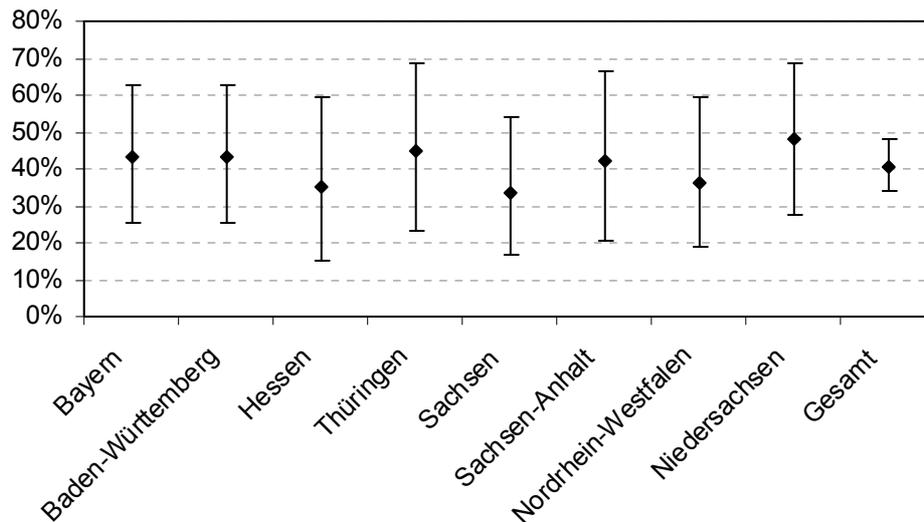


Abbildung 22: Prävalenz der *M. suis*-positiven Betrieben pro Bundesland mit 95%-Konfidenzintervall

Bayern	0,92	Sachsen	0,55
Baden-Württemberg	0,92	Sachsen-Anhalt	0,91
Hessen	0,76	Nordrhein-Westfalen	0,77
Thüringen	0,88	Niedersachsen	0,60

Tabelle 5: Ergebnisse des Tests auf unterschiedliche Proportionen an *M. suis*-positiven Betrieben pro Bundesland in Relation zum Gesamtdurchschnitt (p-Wert)

4.7 Regionale Verteilung der *M. suis*-positiven Betriebe in Bayern

In Bayern wurden insgesamt 30 Betriebe aus 5 Regierungsbezirken untersucht. Davon wiesen 13 Betriebe (43,3%) in der real-time PCR ein positives Ergebnis auf. Die genaue Verteilung der positiv getesteten Betriebe in den einzelnen Regierungsbezirken ist der Abbildung 23 zu entnehmen. An dem Schlachthof fand keine Schlachtung von Tieren aus den Regierungsbezirken Oberfranken und Oberpfalz statt.

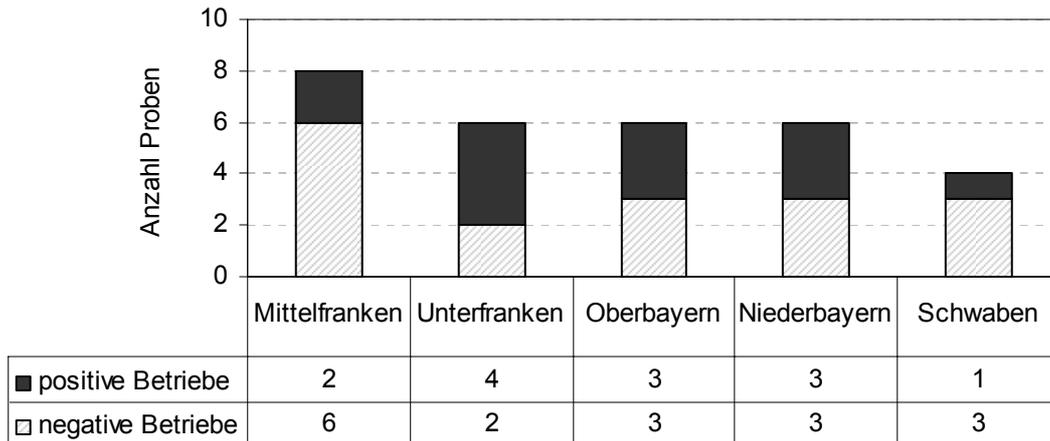


Abbildung 23: Verteilung der PCR-positiven Betriebe in Bayern

4.8 Regionale Verteilung der *M. suis*-positiven Betriebe in Baden-Württemberg

In Baden-Württemberg wurden 30 Betriebe aus den vier Regierungsbezirken auf *M. suis* untersucht. Von den 30 untersuchten Betrieben konnte bei 13 Betrieben (43,3%) *M. suis* in der real-time PCR festgestellt werden. Die Anzahl der untersuchten Betriebe in den jeweiligen Regierungsbezirken, sowie die genaue Verteilung der positiven Betriebe sind in Abbildung 24 dargestellt.

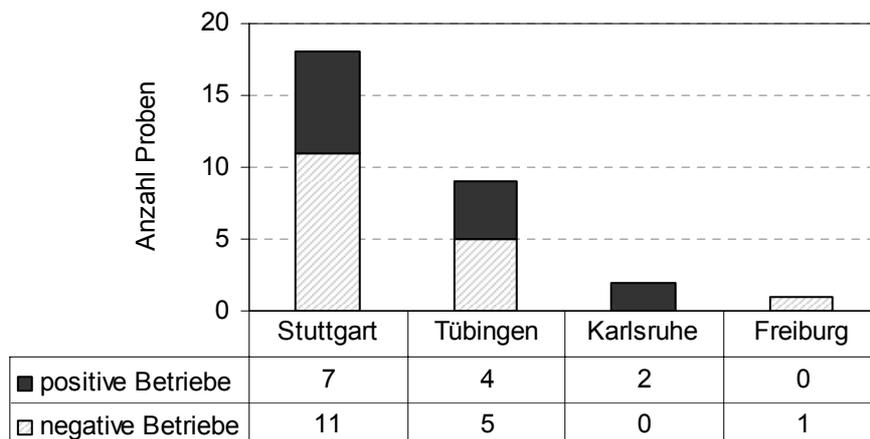


Abbildung 24: Verteilung der PCR-positiven Betriebe in Baden-Württemberg

4.9 Prozentuale Verteilung *M. suis*-infizierter Tiere innerhalb positiver Betriebe

Von jedem Betrieb wurden stets sechs Blutproben untersucht. Der Prozentsatz an infizierten Tieren innerhalb der positiven Betriebe variierte zwischen 25% und 46,2% und betrug im Durchschnitt 34,2%. In Bayern konnte eine signifikant höhere Prävalenz innerhalb positiver Betriebe als beim Durchschnitt festgestellt werden. (p-Wert: 0,035). Für die restlichen Bundesländer konnte keine signifikante Abweichung der Prävalenz innerhalb positiver Betriebe vom Durchschnitt ermittelt werden.

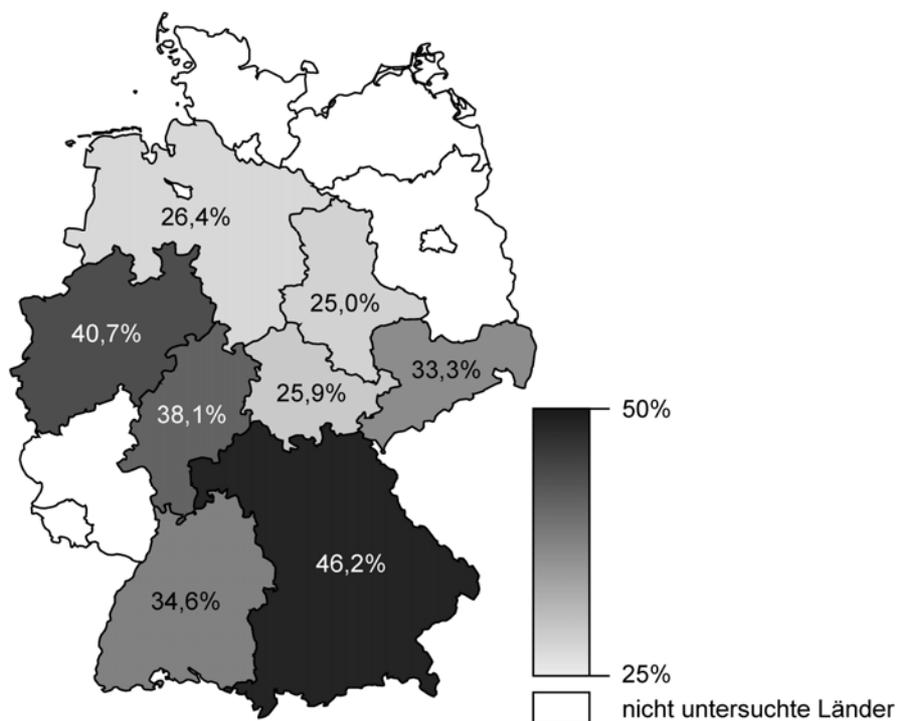


Abbildung 25: Prävalenz innerhalb positiver Betriebe pro Bundesland

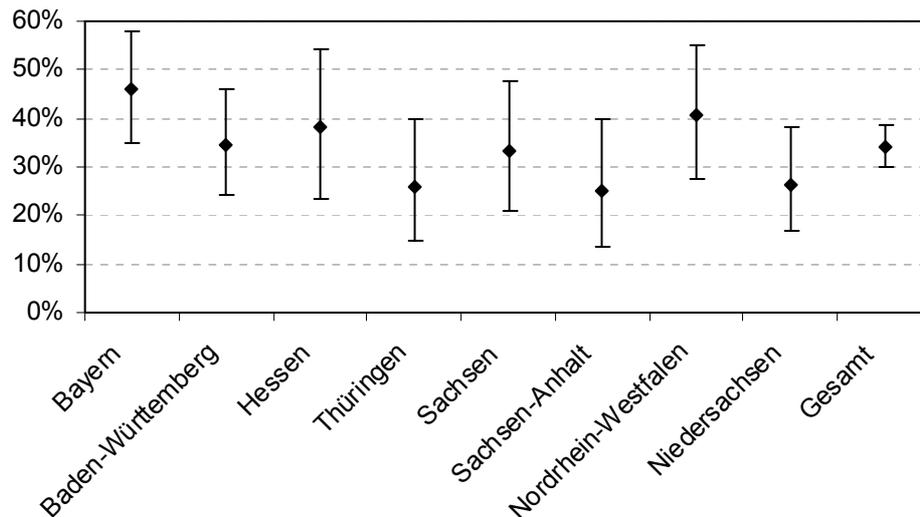


Abbildung 26: Prävalenz innerhalb positiver Betriebe mit 95%-Konfidenzintervall

Bayern	0,035	Sachsen	0,989
Baden-Württemberg	0,971	Sachsen-Anhalt	0,235
Hessen	0,709	Nordrhein-Westfalen	0,382
Thüringen	0,257	Niedersachsen	0,205

Tabelle 6: Ergebnisse des Tests auf unterschiedliche Proportionen an *M. suis*-infizierten Tieren innerhalb positiver Betriebe pro Bundesland in Relation zum Gesamtdurchschnitt (p-Wert)

4.10 Reproduzierbarkeit der real-time PCR Ergebnisse

Alle 164 Proben die in der real-time PCR eine positive Reaktion aufwiesen wurden zur Kontrolle des Ergebnisses erneut amplifiziert. Bei keiner der Proben unterschied sich das Ergebnis des zweiten Durchlaufs von dem der ersten Amplifikation. Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse wurde stichprobenartig von der gleichen Anzahl an negativen Proben eine erneute Amplifikation durchgeführt. Auch hierbei konnte keine Abweichung der Resultate zwischen erstem und zweitem Durchlauf festgestellt werden.

4.11 Vergleich der Ergebnisse von real-time PCR und Akridin-Ausstrich

Die nachfolgende Abbildung stellt die Ergebnisse der beiden Nachweisverfahren vergleichend dar. Von den in der real-time PCR detektierten 164 Proben wurden 31 im Akridin-Ausstrich als positiv beurteilt. Insgesamt vier der im Akridin-Ausstrich-positiven Ergebnisse wurden in der real-time PCR nicht bestätigt. Bei den vier Proben, die in der real-time PCR nicht als

M. suis-infiziert erkannt wurden, handelt es sich wahrscheinlich um falsch-positive Ergebnisse im Akridin-Ausstrich, die durch Verwechslung mit Jolly-Körperchen zustande gekommen sind. Mit einem χ^2 -Test konnte die Abhängigkeit von real-time PCR-Ergebnis und Akridin-Ausstrich gezeigt werden ($p < 0,0001$).

		Akridin-Ausstrich		
		pos.	neg.	
PCR	pos.	31	133	164
	neg.	4	1008	1012
		35	1141	1176

Abbildung 27: Vierfeldertafel für den Vergleich von real-time PCR und Akridin-Ausstrich

Beim Vergleich der Ergebnisse von real-time PCR und Akridin-Ausstrich konnte auch gezeigt werden, dass Proben die in der real-time PCR eine Erregermenge von weniger als 10^5 pro Milliliter Blut aufwiesen im Akridin-Ausstrich nicht als *M. suis*-infiziert erkannt wurden. *M. suis*-Infektionen, die Erregermengen von 10^5 pro Milliliter Blut aufwiesen, konnten mit Hilfe des Akridin-Ausstrichs nur teilweise detektiert werden. Ab einer Erregermenge von 10^7 pro Milliliter Blut wurden, wie in Abbildung 28 dargestellt, alle *M. suis*-positiven Proben auch im Akridin-Ausstrich erfasst.

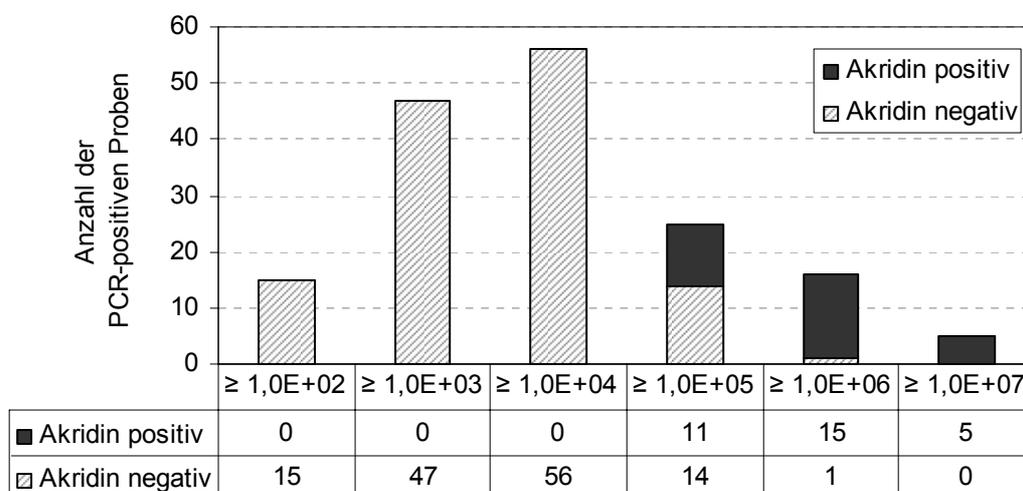


Abbildung 28: Verteilung der im Akridin-Ausstrich-positiven Proben unter den in der real-time PCR-positiven Proben

4.12 Ermittlung der empfohlenen Stichprobengröße zur Identifizierung positiver Betriebe

Um zukünftig *M. suis*-infizierte Betriebe mit ausreichender Sicherheit identifizieren zu können, wurde ausgehend von den oben beschriebenen Ergebnissen statistisch bestimmt, wie viele Blutproben von einem positiven Betrieb untersucht werden müssen, um mindestens ein infiziertes Tier zu erfassen. Um mit 95% Sicherheit mindestens ein positives Tier in der Stichprobe zu finden, wenn 34,2% der Tiere innerhalb eines Betriebs infiziert sind, muss die Stichprobengröße 8 zufällig ausgewählte Tiere betragen. Wenn man davon ausgeht, dass wie in Sachsen-Anhalt nur 25% der Tiere innerhalb eines Betriebs infiziert sind, müssen 11 zufällig ausgewählte Tiere pro Betrieb untersucht werden.

4.13 Ergebnisse der hämatologischen und klinisch-chemischen Untersuchungen

Von allen 1176 Blutproben wurde die Erythrozytenanzahl, der Hämoglobinwert, der Hämatokrit, MCHC-, MCH- und MCV-Wert, die Leukozytenanzahl und die Anzahl der Thrombozyten in einem automatischen Zellcounter bestimmt. Zusätzlich wurde von allen Proben die Glukose-, die Bilirubin- sowie die Eisenkonzentration erfasst.

4.13.1 Erythrozytenanzahl

Der Vergleich der Erythrozytenanzahl von *M. suis*-positiven und *M. suis*-negativen Tieren ergab deutliche Unterschiede. Bei Tieren, die in der real-time PCR ein negatives Ergebnis aufwiesen, betrug die mittlere Erythrozytenanzahl $6,87 \times 10^6/\mu\text{l}$. Die insgesamt 164 *M. suis*-infizierten Tiere besaßen mit einer durchschnittlichen Erythrozytenanzahl von $6,21 \times 10^6/\mu\text{l}$ eine signifikant niedrigere Erythrozytenanzahl als nicht-infizierte Tiere.

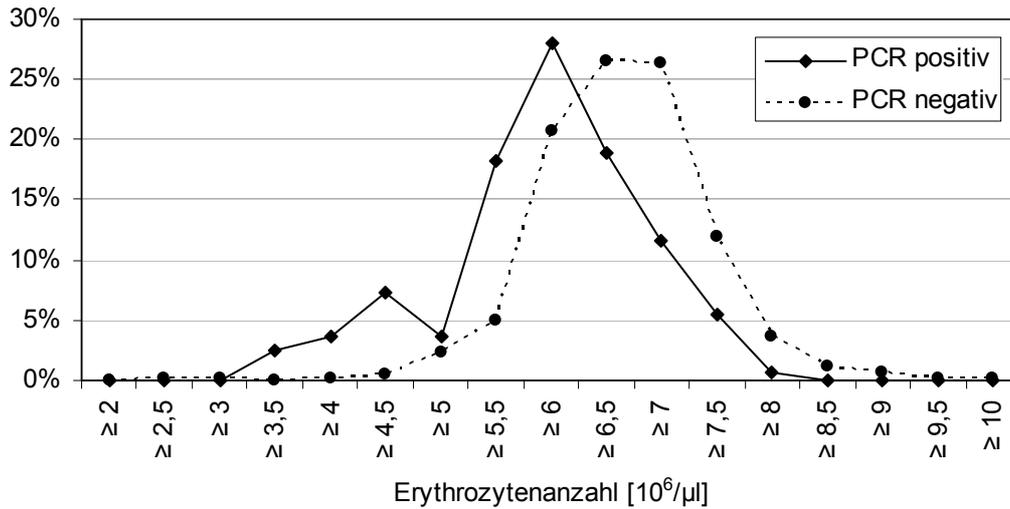


Abbildung 29: Verteilung der Erythrozytenanzahl bei positiven und negativen Tieren

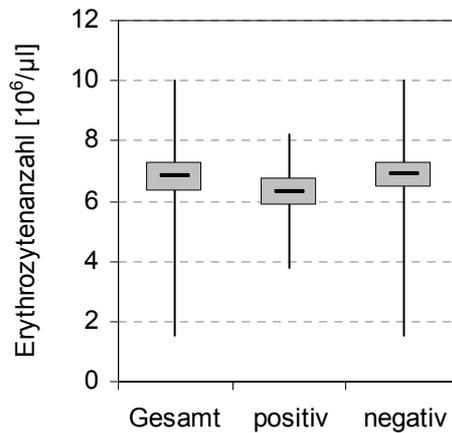


Abbildung 30: Boxplot der Erythrozytenanzahl (Median, 25%-, 75%-Quantil, Min, Max)

Die nachfolgende Abbildung 31 veranschaulicht den Zusammenhang zwischen Erregermenge pro Milliliter Blut und dem Schweregrad der Anämie. Mit steigender Erregermenge im Blut nahm die Anzahl an Erythrozyten signifikant ab. Der Korrelationskoeffizient zwischen dem Logarithmus der Erregermenge und der Erythrozytenanzahl betrug -0,43.

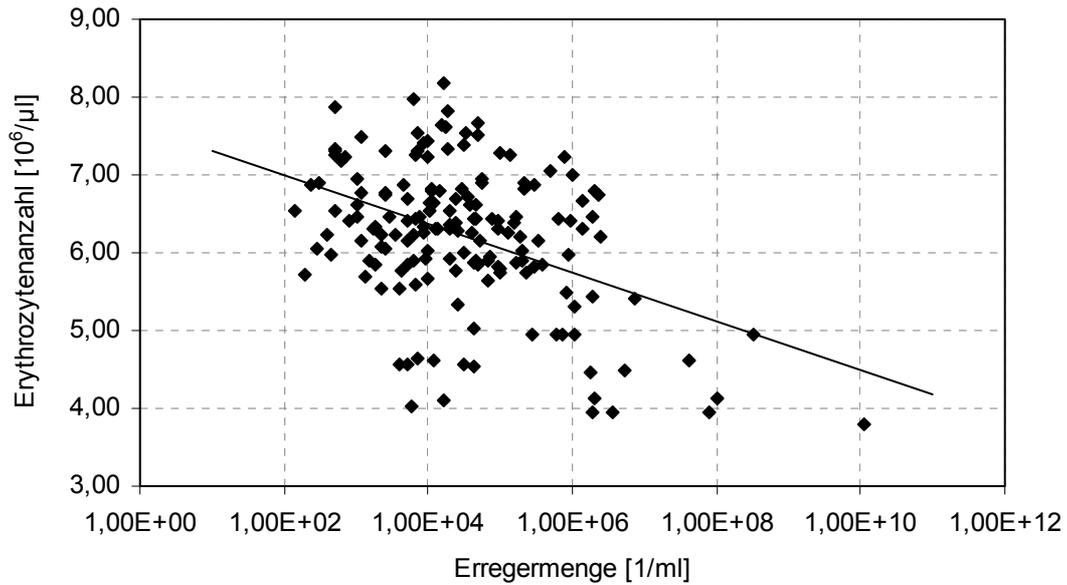


Abbildung 31: Korrelation zwischen Erregermenge und Erythrozytenzahl

4.13.2 Hämoglobinkonzentration

Die Auswertung der Hämoglobinkonzentration ergab im Vergleich *M. suis*-positiver und -negativer Proben einen signifikanten Unterschied. Bei *M. suis*-infizierten Tieren lag die mittlere Hämoglobinkonzentration mit 9,99 mmol/l signifikant niedriger als bei nicht infizierten Tieren (10,75 mmol/l).

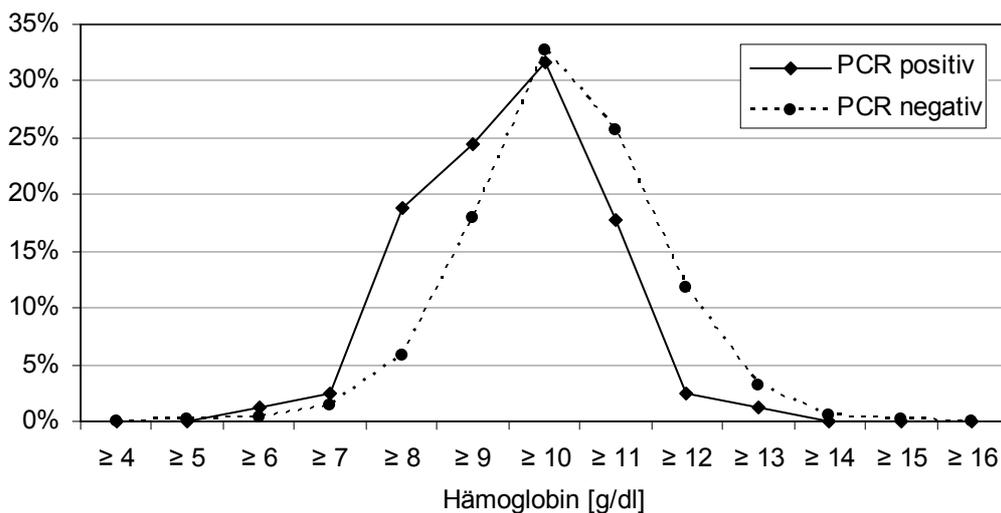


Abbildung 32: Verteilung der Hämoglobinkonzentration bei positiven und negativen Tieren

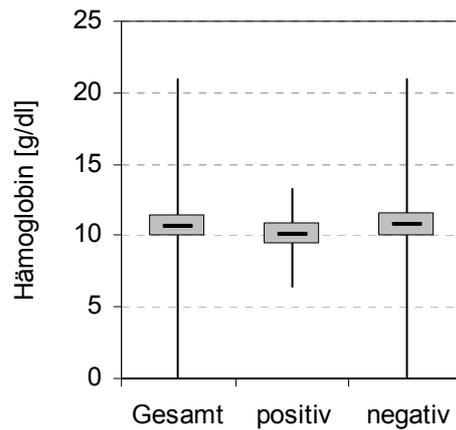


Abbildung 33: Boxplot der Hämoglobinkonzentration (Median, 25%-, 75%-Quantil, Min, Max)

Zwischen Erregermenge und Hämoglobinkonzentration war eine signifikante Korrelation erkennbar. Die Hämoglobinkonzentration nahm mit steigender Erregermenge signifikant ab. Der Korrelationskoeffizient zwischen dem Logarithmus der Erregermenge und der Hämoglobinkonzentration betrug -0,26.

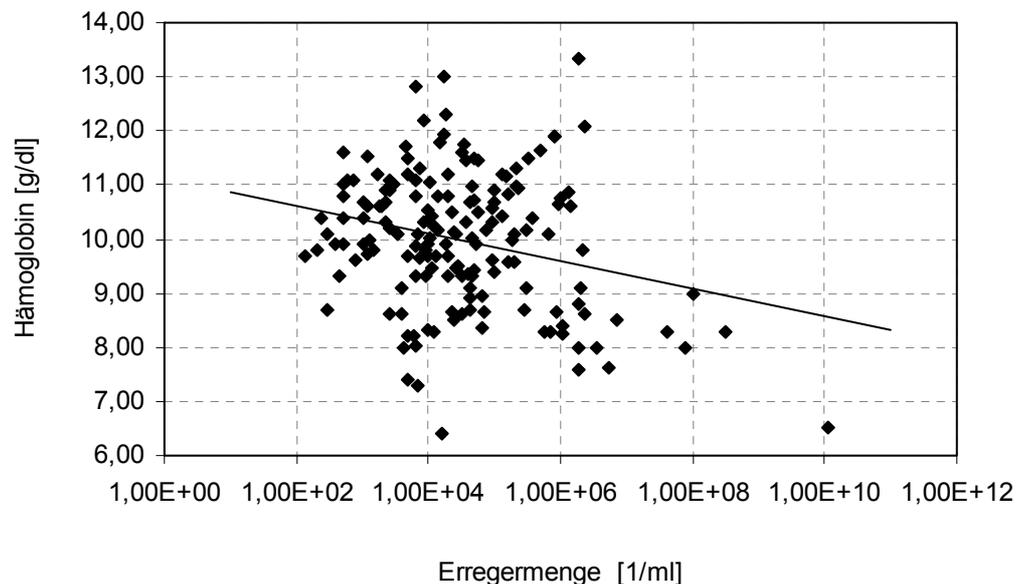


Abbildung 34: Korrelation zwischen Erregermenge und Hämoglobinkonzentration

4.13.3 Hämatokrit

Beim Hämatokritwert stellten sich signifikante Unterschiede zwischen *M. suis*-positiven und -negativen Tieren dar. Bei *M. suis*-infizierten Tieren betrug der mittlere Hämatokritwert 31,98%, bei *M. suis*-negativen Tieren hingegen 34,23%.

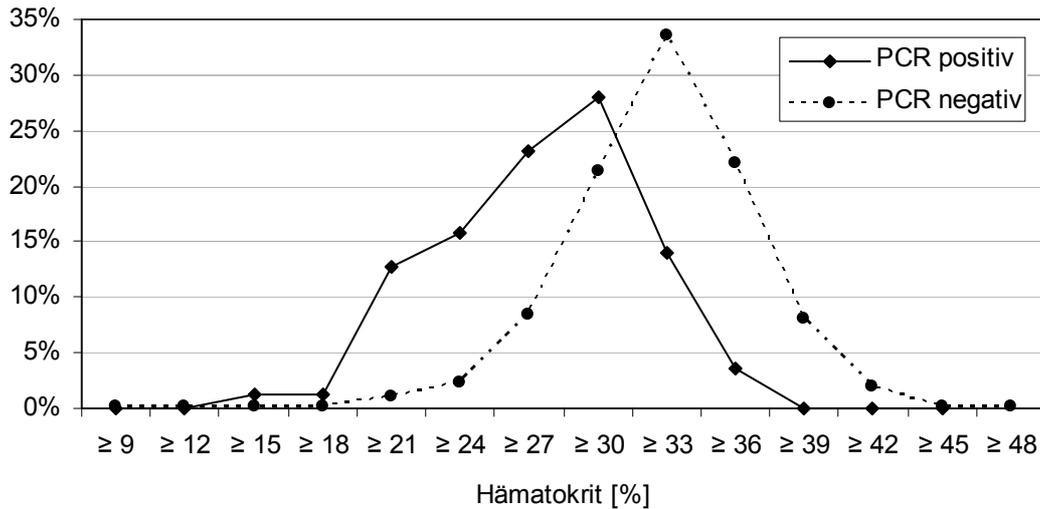


Abbildung 35: Verteilung der Hämatokritwerte bei positiven und negativen Tieren

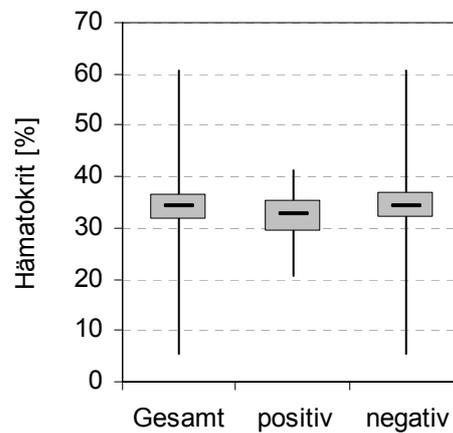


Abbildung 36: Boxplot der Hämatokritwerte (Median, 25%-, 75%-Quantil, Min, Max)

Auch beim Hämatokritwert konnte ein Zusammenhang mit der Erregermenge gezeigt werden. Ein Anstieg der Erregermenge pro Milliliter Blut hatte eine signifikante Abnahme des Hämatokritwertes zur Folge. Zwischen dem Logarithmus der Erregermenge und dem Hämatokritwert konnte ein Korrelationskoeffizient von $-0,39$ errechnet werden.

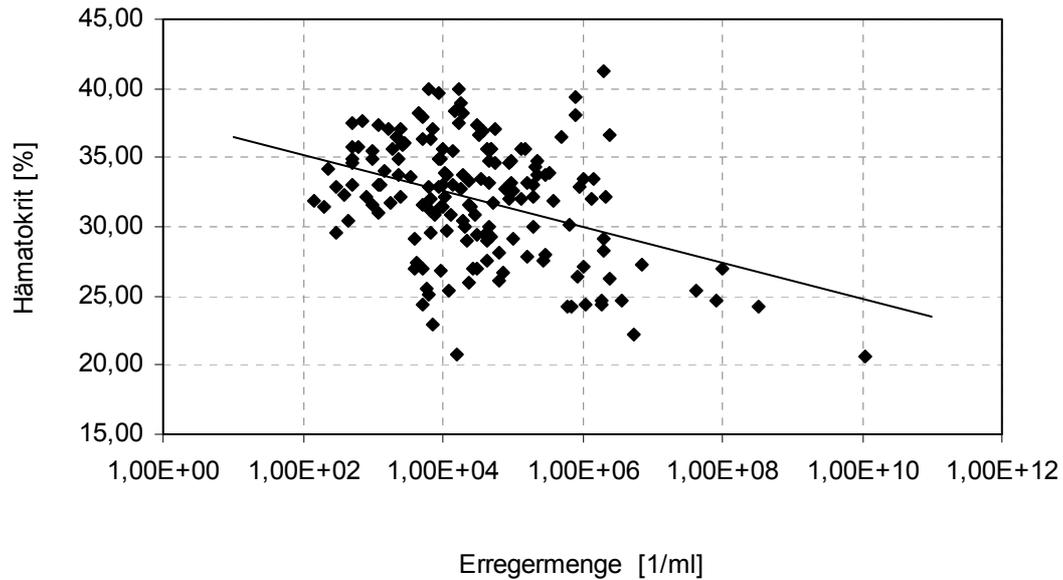


Abbildung 37: Zusammenhang zwischen Erregermenge und Hämatokrit

4.13.4 MCH, MCHC und MCV

Bei der Betrachtung der MCH-, MCHC- und MCV-Konzentrationen konnten, wie in den nachfolgenden Abbildungen ersichtlich, keine signifikanten Abweichungen bei *M. suis*-positiven und -negativen Tieren festgestellt werden.

Der mittlere MCH-Wert betrug bei *M. suis*-positiven Tieren 16,19 pg, bei *M. suis*-negativen Tieren 15,70 pg.

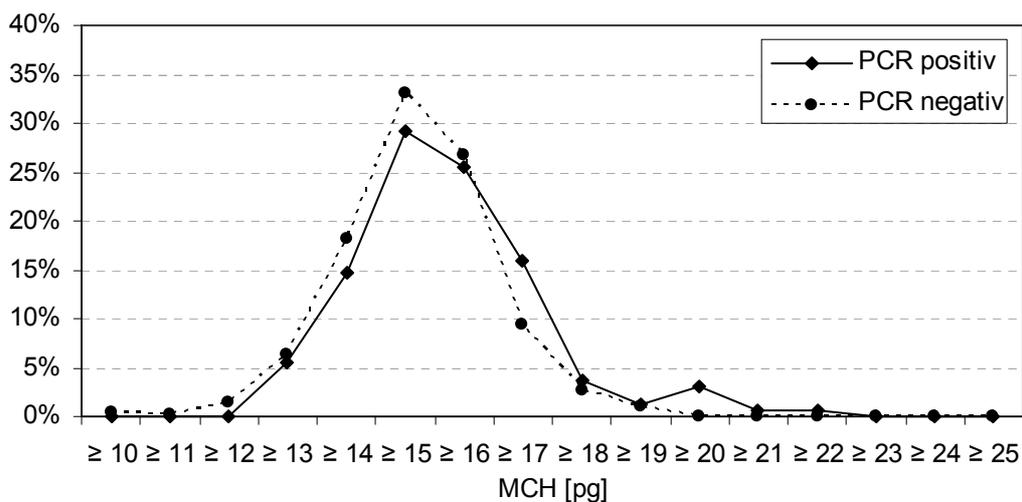


Abbildung 38: Verteilung der MCH-Werte bei positiven und negativen Proben

Bei Tieren mit positivem real-time PCR Ergebnis konnte ein mittlerer MCHC-Wert von 31,14 g/dl ermittelt werden. Tiere mit negativem real-time PCR Ergebnis wiesen einen mittleren MCHC-Wert von 31,67 g/dl auf.

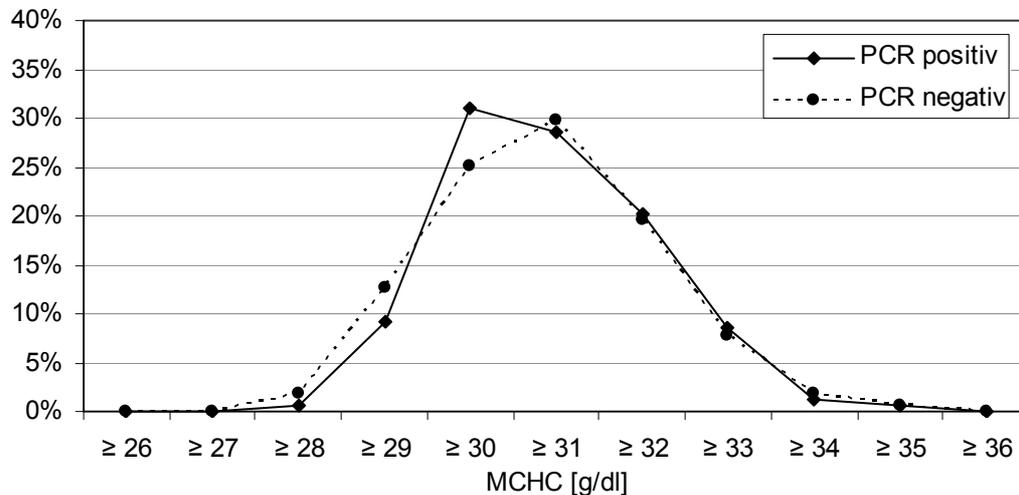


Abbildung 39: Verteilung der MCHC-Werte bei positiven und negativen Proben

Bei der Untersuchung der MCV-Werte konnte bei *M. suis*-positiven Tieren ein mittlerer MCV-Wert von 51,54 fl festgestellt werden. *M. suis*-negative Tiere wiesen einen mittleren MCV-Wert von 50,02 fl auf.

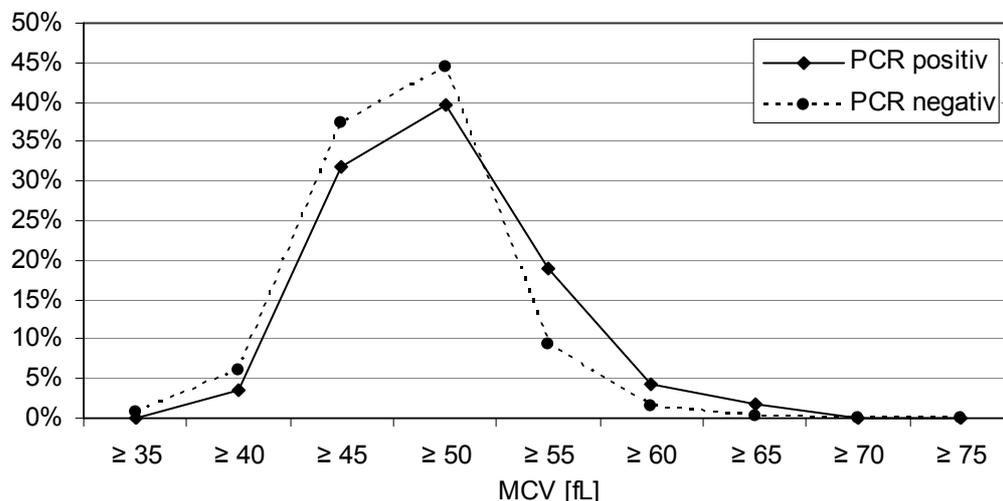


Abbildung 40: Verteilung der MCV-Werte bei positiven und negativen Proben

4.13.5 Leukozytenanzahl

Bei der Betrachtung der durchschnittlichen Leukozytenanzahl konnte, wie in Abbildung 41 dargestellt, kein signifikanter Unterschied zwischen *M. suis*-positiven und -negativen Tieren

festgestellt werden. Bei *M. suis*-negativen Tieren betrug die durchschnittliche Leukozytenanzahl $25,03 \times 10^3/\mu\text{l}$. *M. suis*-positive Tiere wiesen eine mittlere Leukozytenanzahl von $24,88 \times 10^3/\mu\text{l}$ auf.

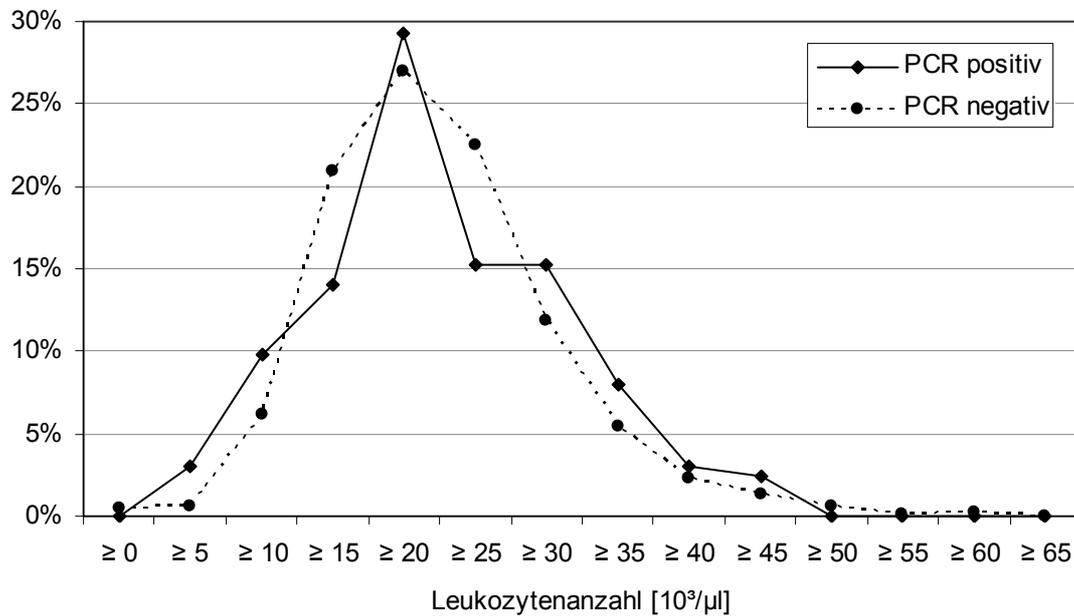


Abbildung 41: Verteilung der Leukozytenanzahl bei positiven und negativen Tieren

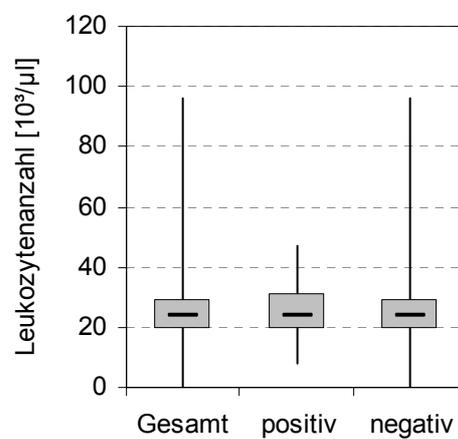


Abbildung 42: Boxplot der Leukozytenanzahl (Median, 25%-, 75%-Quantil, Min, Max)

Zwischen Erregermenge pro Milliliter Blut und der Leukozytenanzahl war hingegen ein geringer Zusammenhang feststellbar. Mit zunehmender Erregermenge konnte ein signifikanter Anstieg der Leukozytenanzahl beobachtet werden. Der Korrelationskoeffizient zwischen dem Logarithmus der Erregermenge und der Leukozytenanzahl betrug 0,23.

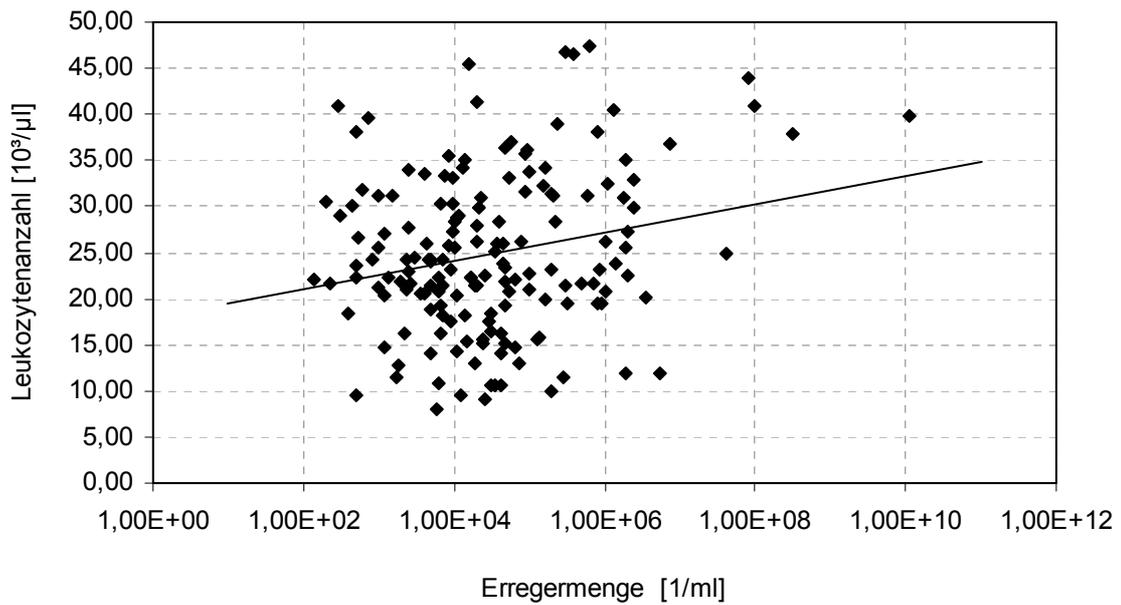


Abbildung 43: Zusammenhang zwischen Erregermenge und Leukozytenanzahl

4.13.6 Thrombozytenanzahl

Die Thrombozytenanzahl bei *M. suis*-infizierten Tieren lag in den durchgeführten Untersuchungen im Durchschnitt bei $442,81 \times 10^3/\mu\text{l}$. Tiere, bei denen keine *M. suis*-Infektion nachgewiesen wurde, wiesen eine mittlere Thrombozytenanzahl von $423,63 \times 10^3/\mu\text{l}$ auf. Es konnte daher kein signifikanter Unterschied zwischen *M. suis*-positiven und -negativen Tieren festgestellt werden.

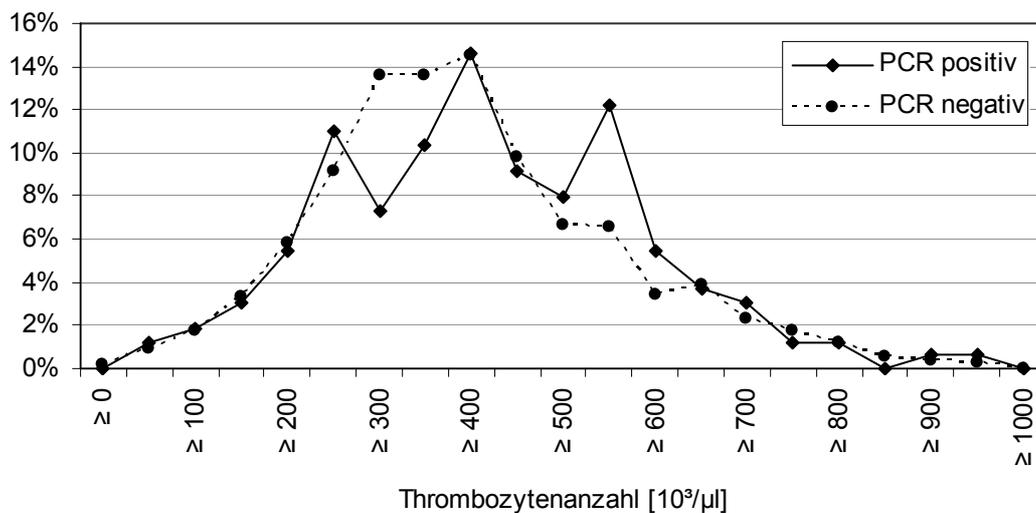


Abbildung 44: Verteilung der Thrombozytenanzahl bei positiven und negativen Tieren

Die Auswertung der Thrombozytenanzahl ergab keine signifikante Abhängigkeit zwischen Erregermenge und Thrombozytenanzahl.

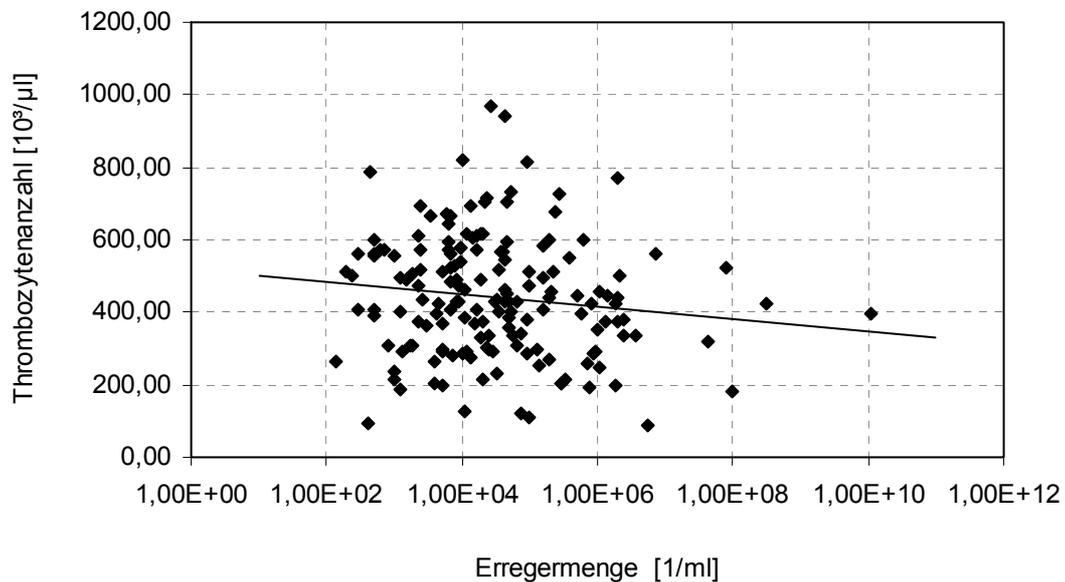


Abbildung 45: Korrelation zwischen Erregermenge und Thrombozytenanzahl

4.13.7 Bilirubinkonzentration

Bei der Untersuchung der mittleren Bilirubinkonzentration wurden bei *M. suis*-positiven Proben signifikant höhere Werte als bei *M. suis*-negativen Proben gemessen. Bei *M. suis*-infizierten Tieren konnte eine durchschnittliche Bilirubinkonzentration von 5,89 μmol/l ermittelt werden. Die mittlere Bilirubinkonzentration bei nicht-infizierten Tieren betrug hingegen 4,35 μmol/l.

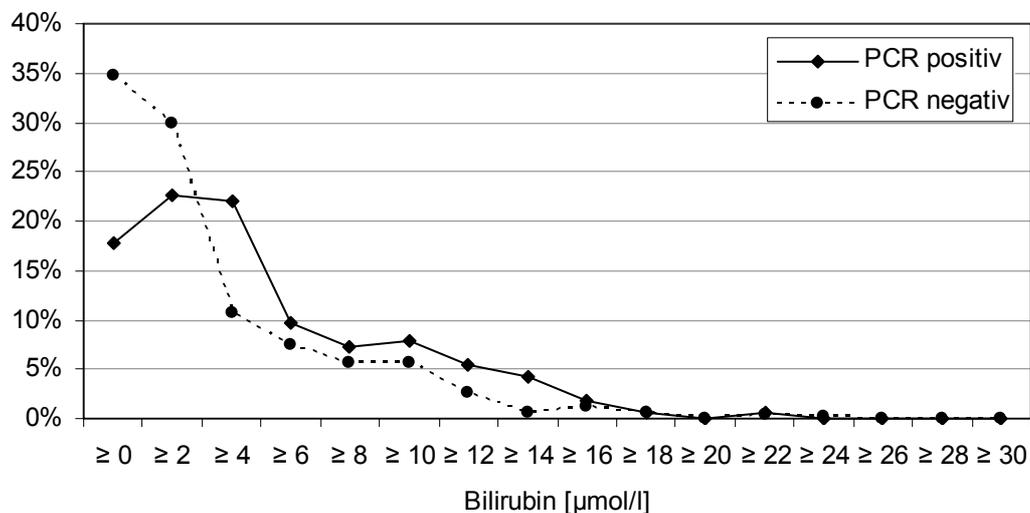


Abbildung 46: Verteilung der Bilirubinkonzentration bei positiven und negativen Tieren

Beim Vergleich von Erregermenge pro Milliliter Blut und Bilirubinkonzentration konnte jedoch keine signifikante Korrelation festgestellt werden.

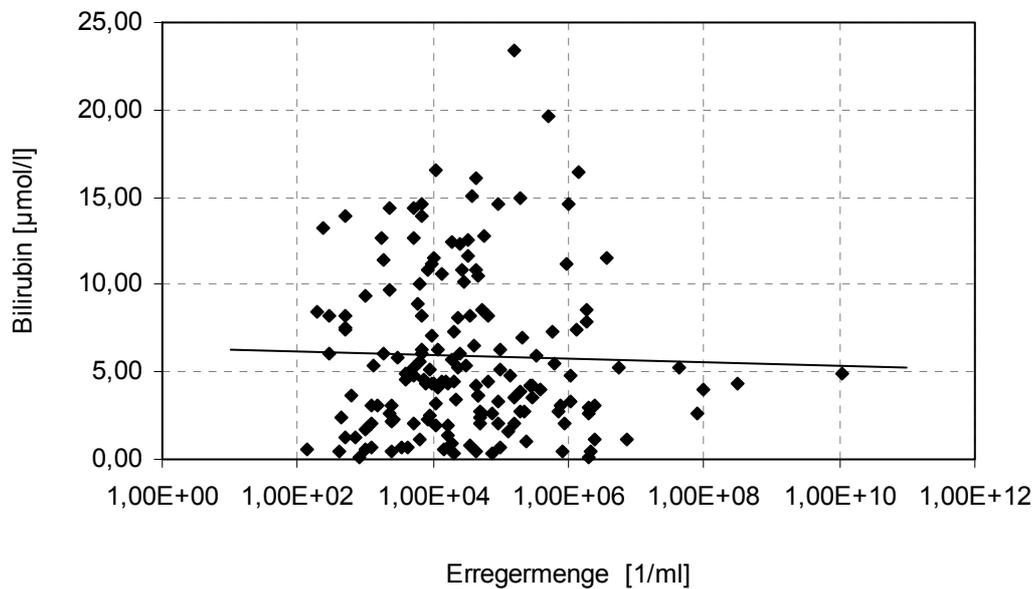


Abbildung 47: Korrelation zwischen Erregermenge und Bilirubinkonzentration

4.13.8 Glukosekonzentration

Bei der Betrachtung der Glukosekonzentration war kein signifikanter Unterschied zwischen *M. suis*-positiven und *M. suis*-negativen Proben zu erkennen. Die mittlere Glukosekonzentration bei *M. suis*-positiven Tieren lag bei 3,97 mmol/l. Bei *M. suis*-negativen Tieren konnte eine durchschnittliche Glukosekonzentration von 4,08 mmol/l errechnet werden.

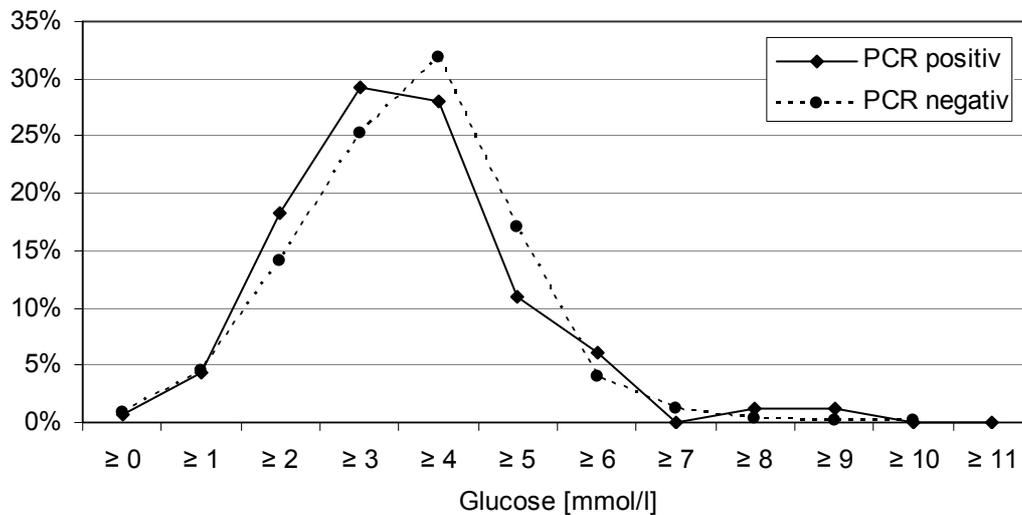


Abbildung 48: Verteilung der Glukosekonzentration bei positiven und negativen Tieren

Zwischen Erregermenge pro Milliliter Blut und der Glukosekonzentration konnte keine signifikante Korrelation ermittelt werden.

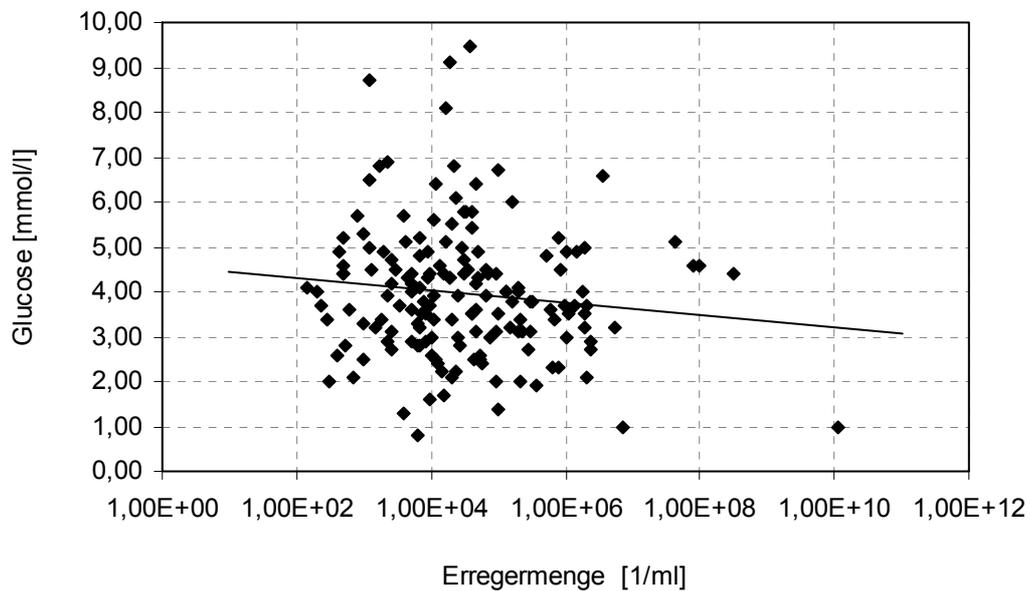


Abbildung 49: Korrelation zwischen Erregermenge und Glukosekonzentration

4.13.9 Eisenkonzentration

Bei der Gegenüberstellung der mittleren Eisenkonzentrationen im Blut von *M. suis*-infizierten und nicht-infizierten Tieren konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Proben mit real-time PCR-positivem Ergebnis wiesen eine durchschnittliche Eisenkonzentration von 16,84 $\mu\text{mol/l}$ auf. Bei negativen Proben konnte eine durchschnittliche Eisenkonzentration von 16,06 $\mu\text{mol/l}$ ermittelt werden.

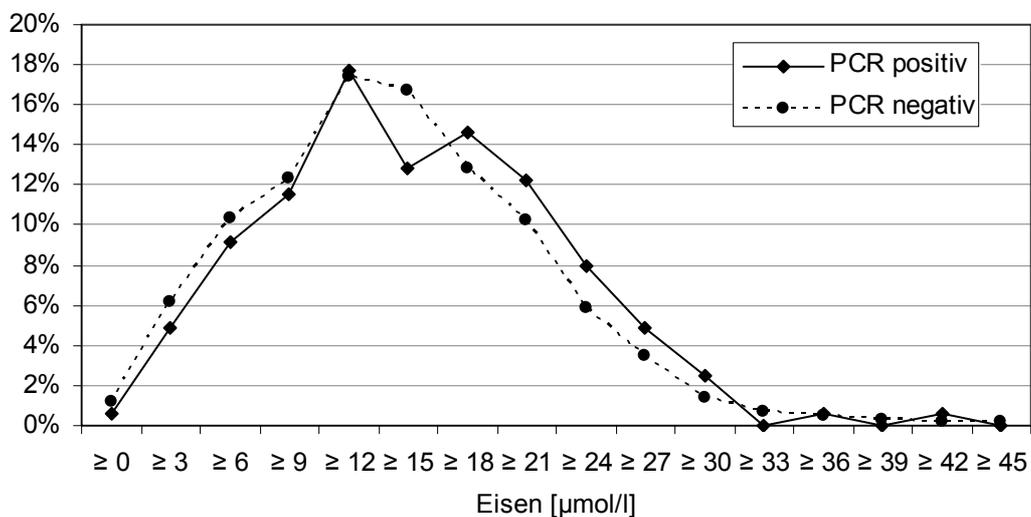


Abbildung 50: Verteilung der Eisenkonzentration bei positiven und negativen Tieren

Eine signifikante Korrelation zwischen Erregermenge pro Milliliter Blut und Eisenkonzentration war nicht erkennbar.

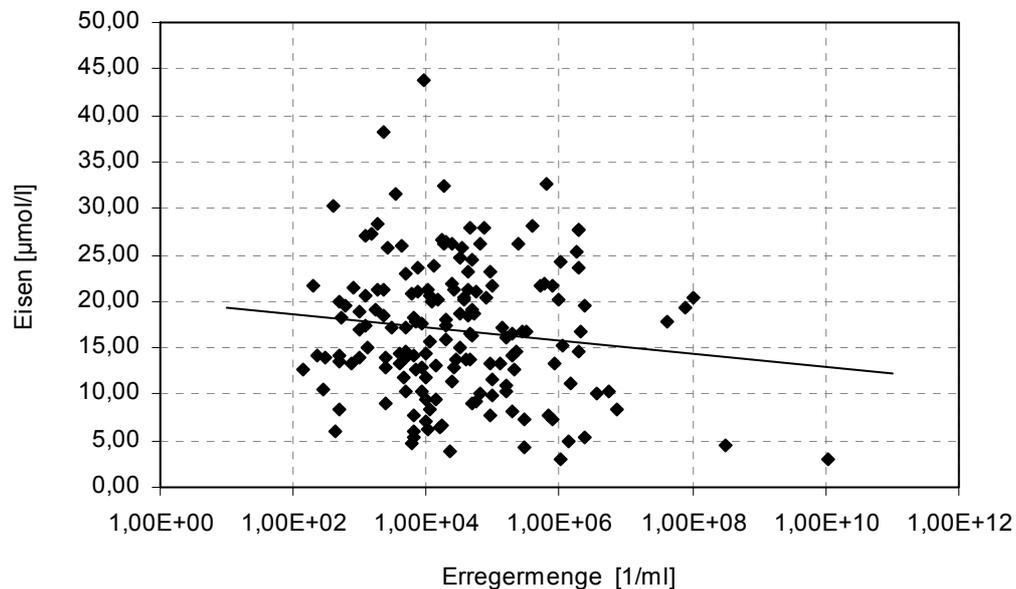


Abbildung 51: Korrelation zwischen Erregermenge und Eisenkonzentration

4.13.10 Untersuchungen zur Signifikanz und Korrelation

Zur Überprüfung der Signifikanz zwischen Blutparametern und Erregermenge wurde jeweils ein einseitiger t-Test durchgeführt. In der nachfolgenden Tabelle ist die Korrelation zwischen Erregermenge und den hämatologischen und klinisch-chemischen Parametern sowie die Signifikanz der Korrelation zusammenfassend dargestellt.

Hämatologische Parameter	Korrelationskoeffizient nach Pearson	Signifikanz der Korrelation (p-Wert, einseitig)
Erythrozyten	-0,43	4×10^{-9}
Hämoglobin	-0,26	$4,3 \times 10^{-4}$
Hämatokrit	-0,39	$1,7 \times 10^{-7}$
Leukozyten	0,23	$1,8 \times 10^{-3}$
Thrombozyten	-0,13	0,04
Bilirubin	-0,03	0,36
Glukose	-0,12	0,06
Eisen	-0,12	0,06

Tabelle 7: Korrelation zwischen Erregermenge und hämatologischen Parametern

Zur Überprüfung der Signifikanz der Unterschiede bei den Blutparametern wurde ein zweiseitiger t-Test durchgeführt. Der Vergleich der Mittelwerte der hämatologischen und klinisch-chemischen Parameter bei *M. suis*-positiven und -negativen Proben ist in Tabelle 8 aufgeführt.

Hämatologische Parameter	Mittelwert PCR-positiv	Mittelwert PCR-negativ	Signifikanz für Mittelwertgleichheit (p-Wert, 2-seitiger t-Test)
Erythrozyten	6,21	6,87	$1,2 \times 10^{-21}$
Hämoglobin	9,99	10,75	$8,3 \times 10^{-11}$
Hämatokrit	31,98	34,23	$3,4 \times 10^{-10}$
Leukozyten	24,88	25,03	0,84
Thrombozyten	442,81	423,63	0,17
Bilirubin	5,89	4,35	$2,1 \times 10^{-5}$
Glukose	3,97	4,08	0,37
Eisen	16,84	16,06	0,24

Tabelle 8: Vergleich der Mittelwerte von *M. suis*-positiven und -negativen Proben

5 Diskussion

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Untersuchungen zur Prävalenz von *Mycoplasma suis* in Deutschland durchgeführt. Des Weiteren wurden die beiden Nachweisverfahren real-time PCR und mikroskopischer Erregernachweis mittels Akridinorange-Färbung hinsichtlich ihrer Sensitivität und Spezifität miteinander verglichen und die hämatologischen und klinisch-chemischen Blutparameter ausgewertet.

5.1 Diagnoseverfahren

Die Auswahl einer geeigneten Untersuchungsmethode zur Erfassung der Verbreitung von *M. suis* in Deutschland gestaltete sich schwierig, da bisher kein geeignetes Kultursystem für haemotrophe Mycoplasmen zur Verfügung steht. Die Problematik der herkömmlichen serologischen Diagnoseverfahren für *M. suis* wie ELISA, KBR und IHA liegt in der für Infektionskrankheiten atypisch kurzen Antikörperpersistenz und des damit verbundenen Auftretens von falsch-negativen Ergebnissen (BALJER et al., 1989). Von SPLITTER (1958) wurde ab dem 1.-7. Tag nach einer klinisch manifesten Erkrankung ein positiver Titer in der KBR nachgewiesen, der jedoch nur 2-3 Wochen anhielt. Latente Träger von *M. suis*-Infektionen konnten mit Hilfe der KBR nicht detektiert werden. Der indirekte Hämagglutinationstest wurde als Verbesserung der KBR angesehen, da in einer Studie auch latent infizierte Trägertiere erfasst wurden (SMITH und RAHN, 1975). In den von SMITH und RAHN (1975) durchgeführten Untersuchungen wurden jedoch nur splenektomierte Tiere verwendet. Nicht splenektomierte, latent infizierte Tiere wiesen in der IHA keine oder nur sehr geringe Antikörpertiter auf (BALJER et al., 1989). Erst nach klinischer Manifestation der Erkrankung kam es zu einem Anstieg des Antikörper-Titers, der über 2-3 Monate anhielt und anschließend wieder abfiel. Jeder weitere Anfall führte zu einer erneuten Antikörperproduktion, wodurch sich der wellenförmige Verlauf der Antikörper-Titer erklären lässt (BALJER et al., 1989). Bei der Bestandsdiagnostik muss beachtet werden, dass der IHA aufgrund der geringen Antikörperpersistenz bei erkrankten Tieren und des fehlenden bzw. geringen Antikörpertiters bei latent infizierten Tieren oft mit falsch-negativen Ergebnissen verbunden ist. Im Vergleich zur IHA wies der von SCHULLER et al. (1990) etablierte ELISA eine höhere Sensitivität auf. Der Grund hierfür ist vermutlich, dass im ELISA die leichten Ketten aller Immunglobuline detektiert wurden, während in der IHA vorwiegend Immunglobuline vom Typ M (IgM) nachgewiesen wurden. Bei splenektomierten Tieren kam es ab dem 14. Tag p.i. zu einem Titeranstieg. Die Titer

bei splenektomierten und nicht splenektomierten Tieren divergierten in ihrer Höhe, was auf einen direkten Zusammenhang zwischen Titeranstieg und Bakteriämie schließen lässt. Auch im ELISA konnten falsch-negative, jedoch keine falsch-positiven Ergebnisse verzeichnet werden. Die serologischen Testverfahren können bei einer genügend großen Probenanzahl für die Bestandsdiagnostik eingesetzt werden (BALJER et al., 1989). Aufgrund des häufigen Auftretens von falsch-negativen Ergebnissen eignen sie sich jedoch nicht zum Auffinden von infizierten Einzeltieren. Ein wesentlicher Nachteil der herkömmlichen serologischen Nachweisverfahren ist, dass sie nicht mit *M. suis*-spezifischen Antigenen, sondern mit komplexen, nicht näher definierten *M. suis*-Antigenen, die aus dem Blut von experimentell infizierten Schweinen aufgereinigt werden müssen, durchgeführt werden. Die Gewinnung von reinem Antigen ist daher nicht möglich. Außerdem werden mit allen drei Testsystemen nur Kälteagglutinine der Klasse IgM und keine näher spezifizierten *M. suis*-spezifischen Immunglobuline der Klasse G nachgewiesen. In jüngsten Studien konnte die Spezifität und Sensitivität des ELISA durch Entfernung von porcinen Immunglobulinen signifikant verbessert werden (HOELZLE, 2007). Die von FISCHER (2003) etablierte Western-Blot-Analyse ermöglicht durch Auftrennung des heterogenen Proteingemisches in der SDS-Page den Nachweis von *M. suis*-spezifischen Partialantigenen. Die Problematik der neuen, verbesserten Nachweisverfahren besteht jedoch darin, dass sie die akute Phase der Eperythrozoonose zum Zeitpunkt der höchsten Bakteriämie im Blut nicht mit ausreichender Sicherheit erfassen. Während der akuten Phase der *M. suis*-Infektion werden v.a. Plasmazellen stimuliert, die autoreaktive Antikörper exprimieren. Damit herrscht während der höchsten Bakteriämie im Blut die autoreaktive Immunantwort vor, d.h. es werden vor allem autoreaktive und nur wenige erregerspezifische Antikörper gefunden. Die in hohen Mengen vorhandenen autoreaktiven Antikörper maskieren die *M. suis*-spezifische Immunantwort. Da bei dem ELISA mit Immunglobulin-depletiertem *M. suis*-Antigen und dem *M. suis*-spezifischen Western Blot nur *M. suis*-spezifische Antigene und keine autoreaktiven Antigene erfasst werden, können akute *M. suis*-Infektionen mit Hilfe dieser neuen Nachweisverfahren nicht immer erkannt werden. Die neuen serologischen Nachweisverfahren sind bisher noch nicht standardisiert und stehen daher nicht für den Einsatz in der Routinediagnostik zur Verfügung.

Der mikroskopische Erregernachweis zeichnet sich durch eine niedrige Sensitivität und Spezifität aus. Chronisch latente Infektionen außerhalb der Anfallsphasen können nicht mit ausreichender Sicherheit erkannt werden. Mitangefärbte, unreife Erythrozyten und Jolly-Körperchen, die fälschlicherweise als *Mycoplasma suis* angesehen werden, können zum Auftreten von falsch-positiven Ergebnissen führen (LIEBICH und HEINRITZI, 1992). Der mik-

roskopische Erregernachweis eignet sich als zuverlässiges Diagnoseverfahren nur während der akuten Phase der Infektion. Da die Detektion von latent infizierten Tieren für eine genaue Ermittlung der Verbreitung von *M. suis* von außerordentlicher Bedeutung ist, wurde der mikroskopische Erregernachweis in den durchgeführten Untersuchungen nicht als Nachweisverfahren gewählt.

Die Splenektomie von verdächtigen Tieren gilt als Goldstandard für die Einzeltier- und Bestandsdiagnostik. Der Einsatz des biologischen Nachweises in der Routinediagnostik ist aufgrund des erhöhten Arbeitsaufwands sowie aus Gründen des Tierschutzes jedoch erheblich eingeschränkt. Aufgrund der hohen Tieranzahl bei der vorliegenden Arbeit kam die Splenektomie als Untersuchungsmethode nicht in Betracht.

Der molekularbiologische Nachweis von *M. suis* auf der Basis von PCR-Systemen stellt eine gute Alternative zu den bereits genannten Diagnoseverfahren dar. Die von HOELZLE et al. (2003) entwickelte PCR zum Nachweis von *M. suis*-Infektionen besitzt den erheblichen Vorteil, dass auch latent infizierte Trägartiere erfasst werden. Durch den Nachweis bereits geringer Erregermengen können alle infizierten Tiere eines Bestands ermittelt werden, wodurch eine gezieltere Aussage über die Prävalenz von *M. suis* auch innerhalb eines Betriebs getroffen werden kann.

Mit Hilfe der konventionellen PCR ist es jedoch nicht möglich, die Erregermenge im Ausgangsmaterial zu quantifizieren. Die Interpretation eines positiven PCR-Ergebnisses gestaltet sich oft schwierig, da die PCR-Resultate eines schwach virulenten Erregerstammes nicht zwangsläufig mit den klinischen Befunden übereinstimmen. Es kann daher nicht unterschieden werden, ob ein Erregerstamm mit hoher Virulenz für das klinische Bild verantwortlich ist, oder ob ein schwach virulenter Stamm vorherrscht und folglich Faktoren anderer Genese die klinische Symptomatik verursachen.

Da die real-time PCR sowohl eine qualitative als auch eine quantitative Analyse der Proben erlaubt und außerdem eine sehr hohe Sensitivität und Spezifität besitzt, wurde diese Untersuchungsmethode zur Erfassung der Prävalenz von *M. suis* in Deutschland gewählt. Im Vergleich zur konventionellen PCR bietet die real-time PCR eine Reihe von Vorteilen. Durch den Einsatz des sog. Closetube Systems können die Schritte Amplifikation, Produkt-Detektion und -Quantifizierung miteinander verknüpft werden. Das Entfallen der zeitaufwendigen Agarsegel-Auswertung nach der PCR, sowie das verkürzte Thermoprofil ermöglichen eine erhebliche Zeitersparnis. Weiterhin wird durch dieses Verfahren das Risiko der Kontamination durch post-PCR-Manipulation umgangen (HIGUCHI et al., 1993). Durch die Minimierung

der Denaturierungs- und Amplifizierungszeit wird nicht nur die Durchführungszeit verringert, sondern auch die Spezifität und die Effizienz der Reaktion verbessert. Bei der auf fluoreszenzfarbstoffmarkierten Sonden basierenden real-time PCR hybridisieren neben den beiden Primern zusätzlich zwei Oligonukleotide. Durch diesen zweiten Hybridisierungsschritt wird eine Erhöhung der Spezifität und Sensitivität erreicht. Die Verwendung von fluoreszenzfarbstoffmarkierten-Sonden und einer speziell entwickelten Software erlaubt die direkte Detektion der PCR-Produkt-Akkumulation. Die Quantifizierung erfolgt bei der real-time PCR über die Crossing Points, die am Beginn der loglinearen Phase des PCR Verlaufs liegen. Hierdurch ist die Vergleichbarkeit von Proben mit unterschiedlicher Effizienz wesentlich besser als bei der konventionellen PCR mit Endpunktanalyse. Die über die real-time PCR ermittelten Werte weisen so eine höhere Reproduzierbarkeit auf (YIN et al., 2001; BUSTIN, 2000). Zu geringe DNA-Konzentrationen im Extrakt können bei der konventionellen PCR zum Auftreten von falsch-negativen Ergebnissen führen. Bei der real-time PCR wird dieses Risiko aufgrund der hohen Sensitivität der Methode reduziert. Die hohe Sensitivität der real-time PCR birgt jedoch auch die Gefahr von falsch-positiven Ergebnissen durch Kontamination bei der manuellen DNA-Extraktion. Bei geringen Erregermengen kann somit nicht mit ausreichender Sicherheit bestimmt werden, ob es sich um eine latente *M. suis*-Infektion handelt, oder ob das positive Ergebnis die Folge einer eventuellen Kontamination ist. Das Risiko von falsch-positiven Resultaten kann reduziert werden, indem bei der DNA-Extraktion stets eine Verfahrenskontrolle mitgeführt wird, durch die überprüft werden soll, ob eine Kontamination der verwendeten Materialien stattgefunden hat. Bei einem positiven Ergebnis der Kontrolle kann davon ausgegangen werden, dass auch weitere Proben kontaminiert wurden und diese erneut extrahiert werden müssen. In der vorliegenden Arbeit konnte bei keiner der Verfahrenskontrollen eine Kontamination festgestellt werden.

Die quantitative Analyse der zu untersuchenden Proben fand in der vorliegenden Arbeit unter Verwendung des von HOELZLE et al. (2007b) etablierten LightCycler[®] MSG1 Protokolls im LightCycler[®] 2.0 Systems statt. Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit der real-time PCR Ergebnisse wurde eine bestimmte Anzahl an Proben wiederholt. Hierbei konnten bei allen Proben mit positivem Ergebnis beim zweiten Durchlauf wieder *M. suis* in der real-time PCR festgestellt werden. Die Ergebnisse aller beim ersten PCR-Durchlauf negativ getesteten Proben konnten bei wiederholter Amplifikation ebenfalls bestätigt werden.

Der Nachteil des LightCycler[®] 2.0 Systems ist die schwierige Handhabung der sehr zerbrechlichen Glaskapillaren und der limitierte Platz von nur 32 Proben pro Durchlauf. Die schnelle

Durchführung der PCR im LightCycler[®] in weniger als 1 Stunde gewährleistet jedoch trotzdem einen hohen Probenumsatz. Das real-time PCR-Verfahren erlaubt aufgrund der hohen Standardisierung, Reproduzierbarkeit und Automatisierung den Einsatz der PCR-Diagnostik in Routinelabors. Aufgrund des hohen Anschaffungspreises findet das LightCycler[®] 2.0 System bisher vor allem in Speziallabors Anwendung.

5.2 DNA-Extraktion

Der DNA-Extraktion kommt bei einem PCR-Nachweis wie bereits erwähnt eine nicht zu unterschätzende Rolle zu. Um eine optimale Sensitivität der PCR zu gewährleisten, ist eine hohe DNA Konzentration im Extrakt wünschenswert. In der vorliegenden Arbeit wurde ein neues Testkit zur Extraktion von *M. suis*-DNA, das GenElute Bacterial Genomic DNA Kit (Sigma-Aldrich), verwendet. Es handelt sich um eine sehr sensitive aber auch sehr zeitaufwendige Methode zur Isolierung von DNA. Die automatisierte DNA-Isolierung und Reinigung mit Hilfe des MagNA Pure LCTM Systems bringt gegenüber der manuellen Extraktion eine erhebliche Zeitersparnis mit sich. Da bei der automatisierten Extraktion der gesamte Isolationsprozess in einem geschlossenen System stattfindet und die eluierten Nukleinsäuren direkt in die PCR-Gefäße überführt werden können, wird außerdem das Risiko der Kontamination erheblich reduziert. Ein großer Nachteil des MagNA Pure LCTM Systems ist der hohe Kostenaufwand, sowohl für die Anschaffung des Geräts, als auch für die bei der Extraktion benötigten Testkits. Die Extraktion mit dem GenElute Bacterial Genomic DNA Kit wies in den hier durchgeführten Untersuchungen in Bezug auf die Empfindlichkeit (DNA-Konzentration) als auch auf die Effizienz (DNA-Menge/Blutvolumen) vergleichbare Ergebnisse wie der MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit auf. Aufgrund des erheblichen Kostenunterschiedes bei dem vorliegenden großen Probenumfang wurde in dieser Arbeit die Extraktion mit dem GenElute Bacterial Genomic DNA Kit durchgeführt. Bei der DNA-Extraktion können Kontaminationen auftreten, die zu falsch-positiven Ergebnissen in der PCR führen. Die Kontamination kann direkt, durch versehentliche Vermischungen, oder indirekt durch Materialien wie z. B. Pipetten oder verwendete Chemikalien zustande kommen. Das größte Risiko für falsch-positive Ergebnisse ist die Verunreinigung von negativen Proben mit bereits amplifizierten positiven Proben. Zur Vermeidung solcher Kreuzkontaminationen sollten die einzelnen PCR-Stationen strikt räumlich voneinander getrennt werden. Ein Autoklavieren sowie Aliquotieren der verwendeten Lösungen, das Verwenden von Einmalhandschuhen und die Auswahl eines geeigneten Pipettiersystems, das kein kontaminierbares Totvolumen aufweist, wird dringend

angeraten (ADELT, 1999). Bei dem in der Arbeit verwendeten Extraktionskit ist zur Entfernung von PCR-Inhibitoren ein Waschpuffer enthalten. Durch die Verwendung einer Silicagel-Membran wird außerdem eine selektive Bindung der extrahierten DNA an die verwendeten Säulen erreicht. Des Weiteren wurden zum Nachweis eventuell vorhandener PCR-Inhibitoren alle Proben mit negativem Ergebnis mit der Positivkontrolle versetzt und erneut amplifiziert. Da alle negativen Proben nach Zugabe der Positivkontrolle ein positives Resultat in der PCR aufwiesen, konnte eine Coextraktion von PCR Inhibitoren bei der verwendeten Extraktionsmethode ausgeschlossen werden. Auch bei der Extraktion der DNA mit dem MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I wurden keine PCR-Inhibitoren, die die Effizienz der PCR beeinflussen, coextrahiert.

5.3 Prävalenz von *M. suis*

Die porcine Eperythrozoonose wurde zum ersten Mal 1976 in Deutschland von KORN und MUSSGAY im Rahmen der Abklärung eines Schweinepestverdachts beschrieben. Bezüglich der Verteilung von *Mycoplasma suis* in Deutschland bestehen in der Literatur unterschiedliche Angaben. Vom Tiergesundheitsdienst Bayern wurden in den Jahren 1980/81 570 Blutproben mit Hilfe von Akridin-Ausstrichen auf *Mycoplasma suis* untersucht. Bei 5,7 % der aus Bayern stammenden Tiere konnte hierbei *Mycoplasma suis* nachgewiesen werden. In den Untersuchungen von KRAUS (1990) reagierten 12,6% der aus bayerischen Schlachthöfen stammenden Blutproben im ELISA positiv. In der KBR wiesen 10,2% der untersuchten Proben ein positives Ergebnis auf. Bei PATSCHKE (2002) lag der Prozentsatz an positiv getesteten Tieren deutlich niedriger. Von den 2000 aus Bayern stammenden Proben konnte bei lediglich 4% im ELISA und 1,35% im Akridin-Ausstrich ein positives Ergebnis verzeichnet werden. Die Begründung für die geringe Rate an positiven Tieren im ELISA liegt in der bei *M. suis* auftretenden kurze Antikörperpersistenz und der wellenförmig verlaufenden Antikörpertiter (PATSCHE, 2002).

In den eigenen Untersuchungen konnte im Vergleich zu PATSCHKE (2002) ein deutlich höherer Prozentsatz an positiven Tieren ermittelt werden. In einem vor den eigentlichen Untersuchungen durchgeführten Vorversuch zur Festlegung der endgültigen Probenanzahl wurden von 160 zufällig ausgewählten Tieren Blutproben entnommen. Bei insgesamt 17 Tieren (10,63%) konnte ein positives Ergebnis in der real-time PCR ermittelt werden. Von den 46 untersuchten Betrieben konnten sechs als *M. suis*-infiziert identifiziert werden. Die Prävalenz innerhalb der Betriebe stimmte im Vorversuch mit 41,5% sehr gut mit den in der Literatur

veröffentlichen Werten überein. Anhand der Ergebnisse des Vorversuchs und den in verschiedenen Studien ermittelten Werten wurde die Anzahl der zu gewinnenden Proben für die Hauptuntersuchung festgelegt. Von den 1176 untersuchten Läuferschweinen wiesen 164 (13,9%) ein positives Ergebnis in der real-time PCR auf. Um die Sensitivität und Spezifität der real-time PCR mit anderen Nachweisverfahren zu vergleichen, wurde von allen Proben auch ein mikroskopischer Erregernachweis mittels Akridinorange-Färbung durchgeführt. Die Anzahl an positiven Proben im Akridin-Ausstrich lag mit 35 signifikant unter den in der PCR ermittelten Werten. 31 der im Akridin-Ausstrich-positiven Proben wurden auch von der real-time PCR detektiert. Bei den vier Proben die von der real-time PCR nicht erkannt wurden handelte es sich vermutlich um falsch-positive Ergebnisse im Akridin-Ausstrich. Selbst geübte Untersucher können solche falsch-positiven Bewertungen nicht ausschließen. Der niedrige Prozentsatz an *M. suis*-positiven Tieren im Akridin-Ausstrich liegt darin begründet, dass eine ausreichende sichere Diagnosestellung mit Hilfe des mikroskopischen Erregernachweises nur in einem begrenzten Zeitraum während des akuten, hämolytischen Anfalls möglich ist. Der Vergleich von Akridin-Ausstrich und PCR-Ergebnissen ergab, dass nur positive Proben, die in der quantitativen PCR eine Erregermenge von mindestens 10^5 pro ml Blut aufwiesen, auch im Akridin-Ausstrich als *M. suis*-infiziert identifiziert werden konnten. Hieraus wird ersichtlich, dass chronisch infizierte Schweine mit geringen Erregermengen im Blut mit Hilfe des Akridin-Ausstrichs nicht erkannt wurden. Bei den in der real-time PCR positiv getesteten Proben variierte die Erregeranzahl pro Milliliter Blut zwischen $1,4 \times 10^2$ und $1,1 \times 10^{10}$. Der Median betrug $2,11 \times 10^4$ pro Milliliter Blut. Da die meisten der hier untersuchten *M. suis*-Infektionen Erregermengen von weniger als 10^5 pro ml Blut aufwiesen kann der mikroskopische Erregernachweis zur Erfassung der Prävalenz von *M. suis* sowie zum Auffinden von infizierten Betrieben nur bedingt eingesetzt werden.

In eigenen Untersuchungen konnten Unterschiede in den Prävalenzen zwischen den Bundesländern gezeigt werden. Die Prävalenz an *M. suis*-infizierten Tieren in Bayern wich signifikant vom Durchschnitt aller Prävalenzen ab. Der Prozentsatz an *M. suis*-positiven Tieren innerhalb eines Betriebs unterlag einer Schwankungsbreite von 25% bis 46,2%. In Bayern konnte eine signifikant höhere Prävalenz innerhalb positiver Betriebe als beim Durchschnitt festgestellt werden. Die Verteilung der *M. suis*-positiven Betriebe in den einzelnen Bundesländern variierte zwischen 33,3% und 48%. Für kein Bundesland konnte jedoch eine signifikante Abweichung vom Durchschnitt ermittelt werden.

Die Abweichungen der Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit im Vergleich zu den von PATSCHKE (2002) durchgeführten Studien lassen sich durch folgende Aspekte erklären: Zum einen wurden in den beiden Arbeiten verschiedene Nachweismethoden verwendet. Die real-time PCR weist im Vergleich zu den von PATSCHKE (2002) verwendeten serologischen Verfahren ELISA und Western-Blot eine höhere Sensitivität und Spezifität auf. Außerdem herrscht bei den von PATSCHKE (2002) untersuchten Mastschweinen meist die chronische Form der Eperythrozoonose vor. Da nach mehreren akuten Anfällen die Antikörpertiter unter den Grenztiter absinken, können diese *M. suis*-Infektionen mit Hilfe der serologischen Nachweisverfahren nicht mehr erfasst werden. Dies führt zu falsch-negativen Ergebnissen und somit zu einer zu niedrig ermittelten Prävalenz.

Die im Vorversuch ermittelte Annahme, dass circa 15% der Betriebe in Deutschland *M. suis* infiziert sind, konnte in weiteren Untersuchungen nicht bestätigt werden. Bei den 196 verschiedenen Herkunftsbetrieben wiesen 80, was einem Prozentsatz von 40,8% entsprach, ein positives Ergebnis in der real-time PCR auf. Ein exakter Binomialtest zeigt, dass der Unterschied signifikant ist ($p < 0,0001$). Aufgrund des Vorversuchs und der Angaben in der Literatur wurde die Prävalenz innerhalb eines Betriebs auf 40% geschätzt. In den weiteren Untersuchungen konnte ein signifikanter Unterschied zu dieser Annahme festgestellt werden (p-Wert: 0,0104). Die Differenz zur ermittelten Prävalenz von 34,2% ist jedoch relativ gering. Anschließend wurde ausgehend von einer Prävalenz von 34,2% innerhalb positiver Betriebe berechnet, dass acht zufällig ausgewählte Blutproben von einem *M. suis*-positiven Betrieb entnommen werden müssen, um mindestens ein infiziertes Tier zu finden. Nachdem in drei Bundesländern die Prävalenz innerhalb positiver Betriebe zwischen 25% und 27% lag, wäre es sicherer eine Stichprobengröße von 11 Tieren zu untersuchen. Des Weiteren sollte beachtet werden, dass bei manchen Betrieben nur ein Tier von sechs untersuchten Tieren ein positives Ergebnis in der real-time PCR aufwies. Um solche positiven Betriebe zu detektieren, müsste man von 18 zufällig ausgewählten Tieren Blutproben auf *M. suis* untersuchen.

In weiterführenden Studien sollte überprüft werden, ob sich die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit auch auf andere Altersklassen (Mastschweine, Sauen) übertragen lassen, oder ob bei diesen Tiergruppen Abweichungen in der Prävalenz vorherrschen.

5.4 Hämatologische und klinisch-chemische Parameter

Die hämatologischen Ergebnisse bei den untersuchten Schlachtschweinen weichen zum Teil von den in der Literatur beschriebenen physiologischen Werten ab. Der Referenzbereich für die Erythrozytenanzahl wird in der Literatur abhängig von der jeweiligen Rasse mit einer weiten Spanne angegeben. Bei KIXMÖLLER (2004) lag der ermittelte Mittelwert bei deutschen Landrasseschweinen bei $6,5 \times 10^6/\mu\text{l}$. In den eigenen Untersuchungen wiesen Blutproben mit negativem real-time PCR Ergebnis eine mittlere Erythrozytenzahl von $6,87 \times 10^6/\mu\text{l}$ auf. Bei Tieren, die in der real-time PCR als *M. suis*-positiv identifiziert wurden, konnten signifikant niedrigere Erythrozytenzahlen von durchschnittlich $6,21 \times 10^6/\mu\text{l}$ festgestellt werden. Es lies sich außerdem eine Korrelation zwischen Erregermenge pro ml Blut und dem Schweregrad der Anämie erkennen. Die Anzahl der Erythrozyten nahm mit steigender Erregermenge im Blut signifikant ab. Der Hämoglobingehalt wird in der Literatur in einem Referenzwertbereich zwischen 6,2 und 9,3 mmol/l angegeben. Der Mittelwert in den eigenen Untersuchungen lag bei *M. suis*-negativen Tieren bei 10,75 mmol/l. Bei *M. suis*-positiven Tieren konnte eine signifikant niedrigere Hämoglobinkonzentration von 9,99 mmol/l ermittelt werden. Der mittlere Hämatokritwert war bei den in der real-time PCR-positiv getesteten Proben signifikant niedriger als bei PCR-negativen Proben. Sowohl beim Hämoglobingehalt als auch bei dem Hämatokritwert konnte eine signifikante Korrelation mit der Erregermenge festgestellt werden. Mit steigender Erregermenge war sowohl eine Abnahme des Hämoglobingehalts als auch des Hämatokritwertes erkennbar. In der vorliegenden Arbeit konnte die bei der PE beschriebene normochrome, normozytäre Anämie, die sich in einem parallel verlaufenden Abfall der Erythrozytenzahl, des Hämatokritwertes und des Hämoglobingehaltes zeigt, bestätigt werden. Die mittlere Corpuskuläre Hämoglobin-Concentration (MCHC), mit deren Hilfe eine quantitative Veränderung des Hämoglobingehaltes im Erythrozyten festgestellt werden kann, beträgt im Referenzwertbereich zwischen 19 und 22 mmol/l (KRAFT, 1999a). Aufgrund der Abhängigkeit des MCHC von Hämoglobin und Hämatokrit ergab sich keine Abweichung der MCHC-Konzentration bei *M. suis*-positiven gegenüber *M. suis*-negativen Tieren. Da es sich bei der Eperythrozoonose um eine normochrome, normozytäre Anämie handelt, konnte bei der Betrachtung der MCH- und MCV-Konzentration ebenfalls kein Unterschied zwischen *M. suis*-positiven und *M. suis*-negativen Tieren festgestellt werden. Der Normbereich für Thrombozyten wird mit $175-587 \times 10^3/\mu\text{l}$ angegeben (HEINRITZI und PLONAIT, 2001). In der vorliegenden Arbeit lag die Thrombozytenanzahl mit durchschnittlich $426 \times 10^3/\mu\text{l}$ im Referenzbereich. Es konnte keine Differenz in der Thrombozytenanzahl zwischen *M. suis*-positiven und -negativen Tieren festgestellt werden. Der Grund hierfür könnte darin liegen,

dass vor allem latente *M. suis*-Infektionen zu beobachten waren, die keinen Einfluss auf die Blutgerinnung und damit auch keine Abnahme der Thrombozytenanzahl zur Folge haben. Die Leukozytenzahl wird in der Literatur in einem Referenzwertbereich von 11,6 bis 32,9 angegeben (FRIENDSHIP und HENRY, 1992). In eigenen Untersuchungen lag der Mittelwerte der Leukozyten mit $25,01 \times 10^3/\mu\text{l}$ deutlich höher als der von GLAWISCHNIG et al. (1977) angegebenen Mittelwert von nur $13,0 \times 10^3/\mu\text{l}$ bei Läuferschweinen. Die bei der porcinen Eperythrozoonose auftretende neutrophile Leukozytose konnte in eigenen Untersuchungen nicht gezeigt werden. Eine Begründung hierfür könnte sein, dass die Leukozytose meist 1-2 Tage vor oder kurz nach einem Fieberanfall in Erscheinung tritt (HEINRITZI, 1990a) und es sich bei den hier identifizierten *M. suis*-Infektionen, der Erregermenge nach zu urteilen, meist um eine chronisch latente Infektion handelte. Ein weiterer Grund für die nicht abweichenden Leukozytenwerte bei *M. suis*-positiven und -negativen Tieren könnte in der Auswahl der Tiere liegen. Die Blutproben stammten ausschließlich von Spanferkeln. Diese wiesen zum Teil vielfältige klinische Krankheitsbilder auf (Durchfall, Husten, Abszesse, Wundinfektion). Die erhöhte Leukozytenzahl bei *M. suis*-negativen Tieren wurde aller Wahrscheinlichkeit nach durch diverse andere Infektionskrankheiten ausgelöst und "maskierte" somit die bei *M. suis*-positiven Tieren auftretende Leukozytose. Die zu verzeichnende Korrelation zwischen steigender Erregermenge und Anstieg der Leukozytenanzahl stützten diese These.

Bei Betrachtung der Bilirubinkonzentration konnte ein Unterschied zwischen *M. suis*-positiven und -negativen Tieren festgestellt werden. Der durchschnittliche Bilirubingehalt von *M. suis*-positiven Tieren lag in den durchgeführten Untersuchungen bedingt durch eine vermehrte Phagozytose und Erythrozytolyse bei *M. suis*-infizierten Tieren mit $5,89 \mu\text{mol/l}$ signifikant höher als der Bilirubingehalt von *M. suis*-negativen Tieren ($4,36 \mu\text{mol/l}$). Die durchschnittliche Gesamtglukosekonzentration lag in eigenen Untersuchungen mit $4,07 \text{ mmol/l}$ im unteren Referenzbereich. Die bei der akuten Eperythrozoonose beschriebene Hypoglykämie konnte in der vorliegenden Arbeit nicht gezeigt werden. Bei *M. suis*-positiven und -negativen Tieren konnte keine signifikante Abweichung in der Glukosekonzentration nachgewiesen werden. Ein Grund hierfür ist vermutlich, dass es sich bei den nachgewiesenen *M. suis*-Infektionen meist um latente Infektionen außerhalb der akuten "hypoglykämischen" Phase handelte. Da bei den Untersuchungen wie bereits erwähnt nur Schlachtschweine verwendet wurden, könnte die niedrige Glukosekonzentration bei *M. suis*-negativen Tieren auch auf das lange Fasten während des Transports und vor der Schlachtung zurückzuführen sein. Diese Tiere "maskieren" somit die bei *M. suis*-positiven Tieren auftretende Hypoglykämie. Die zu beobachtende Korrelation zwischen steigender Erregermenge und Hypoglykämie bestätigen

diese Vermutung. Bei den Eisenkonzentrationen konnte ebenfalls kein signifikanter Unterschied zwischen *M. suis*-positiven und *M. suis*-negativen Schweinen gezeigt werden.

6 Schlussfolgerung

Da in der Literatur nur wenige Angaben über die Prävalenz von *M. suis* in Deutschland existierten, war das Ziel der vorliegenden Arbeit die Erfassung der aktuellen Verbreitung von *M. suis* in Deutschland unter Verwendung der real-time PCR. Mit Hilfe der real-time PCR konnten auch latent infizierte Trägertiere detektiert werden, was keinem der bisher zur Verfügung stehenden Nachweisverfahren für *Mycoplasma suis* mit ausreichender Sicherheit gelungen ist. Durch Auffinden und Beseitigung der infizierten Trägertiere könnte eine Sanierung von *M. suis*-infizierten Schweinebeständen erfolgen.

In der vorliegenden Arbeit konnten hinsichtlich der Prävalenz von *M. suis* in Deutschland Unterschiede zwischen den einzelnen Bundesländern gezeigt werden. Insgesamt war jedoch eine flächendeckende Verbreitung von *M. suis* zu erkennen. Angesichts der ermittelten Gesamtprävalenz von 13,9% und der Prävalenz an *M. suis*-infizierten Betrieben von 40,8% kann davon ausgegangen werden, dass durch die porcine Eperythrozoonose zum Teil hohe wirtschaftlichen Verlusten in der Schweineproduktion ausgelöst werden können. Verlängerte Mastdauer, erhöhte Futterkosten, gesteigerte Anfälligkeit gegenüber infektiösen Erregern des Respirations- und Digestionstraktes oder eine vorzeitige Schlachtung vor Mastende können zu erheblichen Gewinneinbußen in Mastbetrieben führen. Aus diesen Gründen sollte einer sicheren Diagnostik und einer effektiven Bekämpfung der porcinen Eperythrozoonose eine größere Bedeutung beigemessen werden. Um eine wirksame Bekämpfung der porcinen Eperythrozoonose zu ermöglichen, sollten weiterführende Studien zur Aufklärung der Pathogenese von *M. suis* auf Grundlage der real-time PCR betrieben werden.

Durch quantitative Analyse der tatsächlichen Erregermenge zu verschiedenen Zeiten der Infektion (akut, chronisch, inapparent) erlaubt die real-time PCR die genaue Interpretation eines positiven PCR-Ergebnisses. In den eigenen Untersuchungen konnte eine Korrelation zwischen Erregermenge und dem Grad der Anämie festgestellt werden. In weiteren Studien sollte deshalb überprüft werden, ob sich ein Zusammenhang zwischen Erregermenge und Ausprägung der klinischen Symptome beziehungsweise dem Schweregrad der porcinen Eperythrozoonose bestätigen lässt.

Der quantitative Nachweis von *M. suis* unter Verwendung des LightCycler[®] 2.0 Systems stellt ein verlässliches und praktikables Verfahren zur Ermittlung der aktuellen Verbreitung von *M. suis*-Infektionen dar. Die real-time PCR könnte durch Standardisierung von serologischen Testantigenen künftig auch den Einsatz von serologischen Testverfahren bei umfangreichen

Prävalenzstudien ermöglichen. Serologische Screening-Methoden stellen im Vergleich zur real-time PCR kostengünstigere Verfahren zur Erfassung der Verbreitung von *M. suis* und zur Herdendiagnose dar. Es sollte jedoch beachtet werden, dass auch mit Hilfe von neuen verbesserten serologischen Testsystemen nicht alle infizierten Tiere eines Bestandes erfasst werden. Infektionen zu Zeiten der höchsten Bakteriämie im Blut bleiben bei der *M. suis*-spezifischen Serologie unerkannt. Um die Sensitivität der neuen serologischen Testsysteme zu evaluieren, sollte in zukünftigen Studien ein Vergleich zwischen real-time PCR und der erregerspezifischen *M. suis*-Serologie angestrebt werden. In weiterführenden Untersuchungen sollte außerdem herausgefunden werden, ob die porcine Eperythrozoonose gehäuft bei bestimmten Betriebsformen (geschlossener Betrieb, Systembetrieb) zu beobachten ist.

7 Zusammenfassung

Da die porcine Eperythrozoonose meist als eine chronisch latente Infektion verläuft, ist zur Erfassung der gegenwärtigen Verteilung von *Mycoplasma suis* in Deutschland ein äußerst sensitives Verfahren notwendig. Aufgrund der hohen analytischen Sensitivität und Spezifität wurde die real-time PCR als Nachweisverfahren gewählt. Gegenüber der konventionellen PCR-Technik gestaltet sich die real-time PCR als ein schnelleres, exakteres, sensitiveres und bequem durchführbares Verfahren. In der vorliegenden Arbeit wurde im LightCycler® Instrument unter Anwendung eines immer identischen Reaktionsansatzes und eines konstanten real-time PCR Protokolls die Prävalenz von *Mycoplasma suis* in Deutschland bestimmt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein neues Verfahren für die Extraktion der DNA, das GenElute Bacterial Genomic DNA Kit getestet. Das GenElute Bacterial Genomic DNA Kit wies in Bezug auf Sensitivität und Effizienz der DNA-Extraktion vergleichbare Ergebnisse wie die automatisierte Extraktion mit Hilfe des MagNA Pure LC™ Systems auf.

Es wurden insgesamt 1176 Blutproben von Läuferschweinen aus 196 verschiedenen Herkunftsbetrieben entnommen. Zusätzlich zur real-time PCR-Analyse wurden von allen Proben die hämatologischen und klinisch-chemischen Parameter bestimmt. Des Weiteren wurde von jeder Blutprobe ein Akridin-Ausstrich angefertigt.

Von den 1176 untersuchten Blutproben wiesen 164 (13,9%) ein positives Ergebnis in der real-time PCR auf. Mit Hilfe des Akridin-Ausstrichs konnten hingegen nur 35 *M. suis*-positive Tiere identifiziert werden. Hiervon waren 31 Proben auch in der real-time PCR-positiv. Im Akridin-Ausstrich konnten nur *M. suis*-Infektionen nachgewiesen werden, die in der real-time PCR eine Erregermenge von mindestens 10^5 pro ml Blut aufwiesen. Bei insgesamt 80 (40,8%) der 196 Herkunftsbetriebe konnten positive Reagenten in der real-time PCR nachgewiesen werden. Die Anzahl an positiven Betrieben in den einzelnen Bundesländern variierte zwischen 33,3% und 48%. Die Prävalenz innerhalb der Betriebe wies eine große Schwankungsbreite von 25% bis 46,2% auf und betrug im Durchschnitt 34,2%. Zwischen Erregermenge pro Milliliter Blut und dem Schweregrad der Anämie konnte eine signifikante Korrelation gezeigt werden. Bei steigender Erregermenge war eine Abnahme der Erythrozytenanzahl, der Hämoglobinkonzentration sowie des Hämatokritwertes zu beobachten.

Beim Vergleich der Spezifität und Sensitivität der beiden Nachweisverfahren konnte gezeigt werden, dass mit der real-time PCR selbst latent infizierte *M. suis* Tiere detektiert werden, die bei Untersuchung mit Hilfe von Akridin-Ausstrichen unerkant bleiben. Zudem treten beim

Akridin-Ausstrich falsch-positive Ergebnisse durch Verwechslung von *M. suis* mit unreifen Erythrozyten und Jolly-Körperchen auf. Dies wird bei der real-time PCR durch Verwendung von *M. suis*-spezifischen Hybridisierungssonden vermieden. Das LightCycler[®] MSG1 real-time PCR Protokoll erwies sich als hoch sensitiv, war rasch wie einfach durchführbar und ist daher für den Einsatz in der Routinediagnostik geeignet.

8 Summary

Investigation of the distribution of *Mycoplasma suis* and comparing investigations of real-time PCR and acridine orange-stained blood smears concerning sensitivity and specificity

As the porcine Eperythrozoonosis is most commonly a latent chronic infection, a high sensitive assay is required to evaluate the distribution of *Mycoplasma suis* in Germany. Due to its high sensitivity and specificity the real-time PCR was chosen for this study. In comparison to conventional PCR assays the real-time PCR is a rapid, easy-doing, more accurate and more sensitive system. In the present study the prevalence of *M. suis* in Germany was measured by using the LightCycler[®] System and a constant real-time PCR-protocol. Additionally a new method of DNA-Extraction, the Gen Elute Bacterial Genomic DNA Kit, was evaluated during this study. The Gen Elute Bacterial Genomic DNA Kit showed the same results concerning sensitivity and efficiency of DNA extraction as the automatical extraction with the MagNA Pure LC[™] System.

1176 blood samples of slaughtered post-weaning pigs from 196 different pig herds were collected. In addition to PCR analysis a haemogram was made from any sample and clinico-chemical parameter were determined. Moreover an acridine orange-stained blood smear was analysed from each sample.

Real-time PCR showed a positive result for 164 out of 1176 samples (13,9%). With the acridine stain only 35 pigs were identified as infected with *M. suis*. 31 of these samples were also positive in the real-time PCR. In the present study microscopic examination on stained blood smears only detected *M. suis* infections with a bacterial load of at least 10^5 per ml blood. 80 (40,8%) out of 196 pig herds were detected positive for *M. suis* by real-time PCR. The number of *M. suis* infected herds in the different districts of Germany varied from 33,3% to 48%. The prevalence within one herd varied from 25% to 46,2% and showed an average value of 34,2%. A significant correlation between the bacterial load per ml blood and the degree of severity of anemia was shown. A decrease of the number of erythrocytes, hemoglobin concentration and hematocrit was observed when the bacterial load increased.

By comparing real-time PCR and microscopic examination of acridine orange-stained blood smears it was shown that the real-time PCR system is able to detect even latent *M. suis* infections that are missed out in the microscopic examination. Furthermore immature erythrocytes and Howell-Jolly-bodies may lead to false positive results. With the use of the *M. suis* spe-

cific hybridisation probe system in the real-time PCR false positive results can be avoided. The LightCycler[®] MSG1 protocol has proven to be a high sensitive and easy-doing system that allows the integration in routine laboratories.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schwein mit akuter Eperythrozoonose: zyanotische Veränderungen an den Ohren	18
Abbildung 2: Mikroagglutination (links) beim Kippen von ungerinnbar gemachtem Blut eines an Eperythrozoonose erkrankten Schweines im Vergleich zum Blut eines gesunden Tieres	23
Abbildung 3: Akridinorange-Ausstrich zum Zeitpunkt des akuten Anfalls	25
Abbildung 4: Funktionsprinzip der PCR.....	30
Abbildung 5: Funktionsweise der real-time PCR	36
Abbildung 6: Intensitätsverlauf der Fluoreszenz bei der real-time PCR	37
Abbildung 7: Standardkurve zur absoluten Quantifizierung.....	38
Abbildung 8: Arbeitsschritte der Agarosegelelektrophorese	49
Abbildung 9: Schematischer Aufbau des LightCyclers [®] 2.0 Systems modifiziert nach Roche Diagnostics	51
Abbildung 10: Amplifikationskurven der real-time PCR für unterschiedliche Standardkonzentrationen	54
Abbildung 11: Standardkurve für die real-time PCR.....	54
Abbildung 12: Anzahl positiver Tiere pro Betrieb.....	56
Abbildung 13: Anzahl der Betriebe pro Bundesland	58
Abbildung 14: Agarosegelelektrophorese der extrahierten DNA	59
Abbildung 15: PCR Ergebnis je Bundesland	61
Abbildung 16: Prävalenz an <i>M. suis</i> -positiven Tieren in den einzelnen Bundesländern.....	61
Abbildung 17: Prävalenz pro Bundesland mit 95%-Konfidenzintervall	62
Abbildung 18: Verteilung der Erregermenge bei positiven Proben in den einzelnen Bundesländern (Min, 25% Quantil, Median, 75% Quantil, Max).....	63
Abbildung 19: Positive Proben im Akridin-Ausstrich	64
Abbildung 20: Anzahl positiver Betriebe in den einzelnen Bundesländern	65
Abbildung 21: Prävalenz der Betriebe pro Bundesland	65
Abbildung 22: Prävalenz der <i>M. suis</i> -positiven Betrieben pro Bundesland mit 95%-Konfidenzintervall	66
Abbildung 23: Verteilung der PCR-positiven Betriebe in Bayern.....	67
Abbildung 24: Verteilung der PCR-positiven Betriebe in Baden-Württemberg	67
Abbildung 25: Prävalenz innerhalb positiver Betriebe pro Bundesland	68
Abbildung 26: Prävalenz innerhalb positiver Betriebe mit 95%-Konfidenzintervall	69
Abbildung 27: Vierfeldertafel für den Vergleich von real-time PCR und Akridin-Ausstrich. 70	
Abbildung 28: Verteilung der im Akridin-Ausstrich-positiven Proben unter den in der real-time PCR-positiven Proben	70

Abbildung 29: Verteilung der Erythrozytenanzahl bei positiven und negativen Tieren.....	72
Abbildung 30: Boxplot der Erythrozytenanzahl (Median, 25%-, 75%-Quantil, Min, Max) ...	72
Abbildung 31: Korrelation zwischen Erregermenge und Erythrozytenanzahl	73
Abbildung 32: Verteilung der Hämoglobinkonzentration bei positiven und negativen Tieren	73
Abbildung 33: Boxplot der Hämoglobinkonzentration (Median, 25%-, 75%-Quantil, Min, Max).....	74
Abbildung 34: Korrelation zwischen Erregermenge und Hämoglobinkonzentration.....	74
Abbildung 35: Verteilung der Hämatokritwerte bei positiven und negativen Tieren.....	75
Abbildung 36: Boxplot der Hämatokritwerte (Median, 25%-, 75%-Quantil, Min, Max)	75
Abbildung 37: Zusammenhang zwischen Erregermenge und Hämatokrit	76
Abbildung 38: Verteilung der MCH-Werte bei positiven und negativen Proben.....	76
Abbildung 39: Verteilung der MCHC-Werte bei positiven und negativen Proben	77
Abbildung 40: Verteilung der MCV-Werte bei positiven und negativen Proben.....	77
Abbildung 41: Verteilung der Leukozytenanzahl bei positiven und negativen Tieren.....	78
Abbildung 42: Boxplot der Leukozytenanzahl (Median, 25%-, 75%-Quantil, Min, Max)	78
Abbildung 43: Zusammenhang zwischen Erregermenge und Leukozytenanzahl	79
Abbildung 44: Verteilung der Thrombozytenanzahl bei positiven und negativen Tieren.....	79
Abbildung 45: Korrelation zwischen Erregermenge und Thrombozytenanzahl.....	80
Abbildung 46: Verteilung der Bilirubinkonzentration bei positiven und negativen Tieren	80
Abbildung 47: Korrelation zwischen Erregermenge und Bilirubinkonzentration	81
Abbildung 48: Verteilung der Glukosekonzentration bei positiven und negativen Tieren.....	81
Abbildung 49: Korrelation zwischen Erregermenge und Glukosekonzentration	82
Abbildung 50: Verteilung der Eisenkonzentration bei positiven und negativen Tieren	82
Abbildung 51: Korrelation zwischen Erregermenge und Eisenkonzentration.....	83

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Chemikalien und Lösungen zur DNA-Extraktion.....	44
Tabelle 2: Konzentration der verwendeten Reagenzien.....	52
Tabelle 3: Temperaturprofil der Light Cycler [®] PCR	53
Tabelle 4: Ergebnisse des Tests auf unterschiedliche Proportionen an <i>M. suis</i> -positiven Tieren pro Bundesland in Relation zum Gesamtdurchschnitt (p-Wert)	62
Tabelle 5: Ergebnisse des Tests auf unterschiedliche Proportionen an <i>M. suis</i> -positiven Betrieben pro Bundesland in Relation zum Gesamtdurchschnitt (p-Wert)	66
Tabelle 6: Ergebnisse des Tests auf unterschiedliche Proportionen an <i>M. suis</i> -infizierten Tieren innerhalb positiver Betriebe pro Bundesland in Relation zum Gesamtdurchschnitt (p-Wert)	69
Tabelle 7: Korrelation zwischen Erregermenge und hämatologischen Parametern	84
Tabelle 8: Vergleich der Mittelwerte von <i>M. suis</i> -positiven und -negativen Proben	84

Literaturverzeichnis

Adelt, D. (1999):

Etablierung einer Polymerasekettenreaktion (PCR) zum Nachweis von Eperythrozoon suis.
Vet. med. Diss., München

Albert, L. J., R. D. Inman (1999):

Molecular mimicry and autoimmunity
N. Engl. J. Med. **341**, 2068-2074

Al-Soud, W.A., P. Radstrom (1998):

Capacity of nine thermostate DNA Polymerase to mediate DNA amplification in the presence of PCR-inhibiting samples
Appl. Environ Microbiol. **64**, 3748-3753

Baljer, G., K. Heinritzi, L. Wieler (1989):

Untersuchungen mit der indirekten Hämagglutination zum Eperythrozoon-suis Nachweis in experimentell und spontan infizierten Schweinen
J. Vet. Med.B Infect. Dis. Vet. Public Health **36**, 417-423

Becker-Foltmann, J., D. Baas (2004):

PCR-Eine Methode, drei Schritte
Biospektrum 10. Jahrgang, 1/2004, 86-91

Birch, D.E. (1996):

Simplified hot Start PCR
Nature 381. 445-446

Bollwahn, W. (1982):

Die Eperythrozoonose (Ikterooanämie) der Schweine
Prakt. Tierarzt **63**, 1043-1045

Brömel, J., Zettl, K. (1985):

Die Eperythrozoonose-Ein Bildbericht mit Literaturübersicht
Prakt. Tierarzt **9**, 689-698

Brownback, A. (1981):

Eperythrozoonosis as a cause of infertility in swine
Vet. Med. **76**, 375-378

Brownie, J., S. Shawcross, J. Theaker, D. Whitcombe, R. Ferrie, C. Newton, S. Little (1997):

The elimination of primer-dimer accumulation in PCR
Nucleic Acids Res. **25**, 3235-3241

Bugnowski, H. (1987):

Untersuchungen über die Eperythrozoonose des Schweines
Vet. Med. Diss. B., Humboldt-Universität Berlin

Bugnowski, H. (1988):

Dynamik der Eperythrozoonämie-Anfälle beim Schwein
Mh. Vet.-Med. **43**, 274-278

Bugnowski, H., F. Horsch, D. Müller, V. Zepezauer (1986):

Eperythrozoonose (Ikteroanämie) des Schweines
Mh. Vet. Med. **41**, 145-148

Bustin, S.A. (2000):

Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays
J. Mol. Endocrinol. **25**, 169-193

Campbell, R.L. (1945):

Icteric condition found in hogs in northern Missouri
North Am. Vet. **26**, 347-348

Doyle, L.P. (1932):

A rickettsia-like or anaplasmosis-like disease in swine
J. Am. Vet. Med. Ass. **81**, 668-671

Friendship, R.M., S.C. Henry (1992):

Cardiovaskular System, Hematology and clinical chemistry
In: Leman, A.D., B.E. Straw, W.L. Mengeling, S.D'Allaire, D.J. Taylor (Hrsg.):
Diseases of Swine
7. Auflage, Iowa State University Press Ames, Iowa, 3-11

Fischer, P. (2003):

Etablierung einer Western-Blot-Analyse zum Nachweis von *Mycoplasma suis*-
Infektionen beim Schwein
Vet. Med. Diss., Zürich

Glawischnig, E., K. Schlerka, W. Schuller, W. Baumgartner (1977):

Arbeitswerte in der Laboratoriumsdiagnostik beim Schwein
Wien. Tierärztl. Mschr. **64**, 341-346

Guimaraes, A.M.S., A.W. Biondo, A.C. Lara, J.B. Messick (2007):

Exploratory study of *Mycoplasma suis* (*Eperythrozoon suis*) on four commercial pig farms in southern Brazil
Vet. Rec. **160**, 50-53

Gwaltney, S.M., M.P. Hays, R.D. Oberst (1993a):

Detection of *Eperythrozoon suis* using the polymerase chain reaction
J. Vet. Diagn. Invest. **5**, 40-46

Gwaltney, S.M., L.H. Willard, R.D. Oberst (1993b):

In situ hybridization of *Eperythrozoon suis* visualized by electron microscopy
Vet. Microbiol. **36**, 99-112

Gwaltney, S.M., R.D. Oberst (1994):

Comparison of an improved polymerase chain reaction protocol and the hemagglutination assay in the detection of *Eperythrozoon suis* infection
J. Vet. Diagn. Invest. **6**, 321-325

- Hall, S.M., J.A. Cipriano, D.A. Schoneweis, J.E. Smith, B.W. Fenwick (1988):**
Isolation of infective and non-infective Eperythrozoon suis bodies from whole blood of infected swine
Vet. Rec. **123**, 651
- Heinritzi, K. (1984a):**
Klinik, Hämatologie und Metabolismus des eperythrozoonotischen Anfalls
Prakt. Tierarzt **65** „Collegium Veterinarium XIV“, 40-44
- Heinritzi, K. (1984b):**
Ein Beitrag zur Splenektomie beim Schwein
Tierärztl. Prax. **12**, 451-454
- Heinritzi, K. (1986):**
Vergiftungen beim Schwein
Tierärztl. Prax. **14**, 219-230
- Heinritzi, K. (1989):**
Eperythrozoon-Infektion beim Schwein als Faktorenkrankheit
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. **102**, 337-342
- Heinritzi, K. (1990a):**
Zur Diagnostik der Eperythrozoon-suis-Infektion
Tierärztl. Prax. **18**, 477-481
- Heinritzi, K. (1990b):**
Untersuchung zur Pathogenese und Diagnostik der Infektion mit Eperythrozoon suis
Habilitationsschrift, München
- Heinritzi, K., G. Plank, W. Peteranderl, N. Sander (1990):**
Untersuchungen zum Säure-Basen-Haushalt und Kohlenhydratstoffwechsel bei der Infektion mit Eperythrozoon suis
J. Vet. Med. B **37**, 412-417
- Heinritzi, K., H. Plonait (2001):**
Blutkrankheiten
In: Waldman K.H., M. Wendt (Hrsg.):
Lehrbuch der Schweinekrankheiten
3. Auflage, Parey Buchverlag, Berlin, 169-196
- Henderson, J.P., J.O`Hagan, S.M. Hawe, M.C.H. Pratt (1997):**
Anaemia and low viability in piglets infected with Eperythrozoon suis
Vet. Rec. **140**, 144-146
- Henry, S.C. (1979):**
Clinical observation on Eperythrozoonosis
J. Am. Vet. Med. Ass. **174**, 601-603
- Higuchi, R. (1989):**
Simple and rapid preparation of samples for PCR
In: EHRLICH, H. A. (Hrsg.):
PCR technology—principles and applications for DNA amplification
Stockholm Press, New York, S. 31-38

- Higuchi, R., C. Fockler, G. Dollinger, R. Watson (1993):**
Kinetic PCR Analysis: Real-time Monitoring of DNA Amplification Reactions
Bio/Technology **11**, 1026-1030
- Hoelzle, L.E. (2007):**
Zur Bedeutung der haemotrophen Mycoplasmen in der Veterinärmedizin unter besonderer Berücksichtigung der Mycoplasmen suis-Infektion beim Schwein
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. **120**, 34-41
- Hoelzle, L.E., D. Adelt, K. Heinritzi, M.M. Wittenbrink (2000):**
Polymerasekettenreaktion (PCR) zum Nachweis von Eperythrozoon suis beim Schwein
Tierärztl. Prax. **28**, 47-50
- Hoelzle, L.E., D. Adelt, K. Hoelzle, K. Heinritzi, M.M. Wittenbrink (2003):**
Development of a diagnostic PCR assay based on novel DNA sequences for the detection of *Mycoplasma suis* (Eperythrozoon suis) in porcine blood
Vet. Microbiol. **93**, 185-196
- Hoelzle, L.E., K. Hoelzle, M. Ritzmann, K. Heinritzi, M.M. Wittenbrink (2006):**
Mycoplasma suis antigens recognized during humoral immune response in experimentally infected pigs
Clin Vaccine. Immunol. **13**, 116-122
- Hoelzle, L.E., K. Hoelzle, A. Harder, M. Ritzmann, H. Aupperle, H.A. Schoon, K. Heinritzi, M.M. Wittenbrink (2007a):**
First identification and functional characterisation of an immunogenic protein in unculturable haemotrophic Mycoplasmas (*Mycoplasma suis* MSA1)
FEMS Immunol. Med. Microbiol. **49**, 215-223
- Hoelzle, L.E., M. Helbling, K. Hoelzle, M. Ritzmann, K. Heinritzi, M.M. Wittenbrink (2007b):**
Development of a LightCycler Real-Time PCR Assay for the quantitative Detection of *Mycoplasma suis*
Journal of Microbiological Method, accepted
- Hoelzle, L.E., K. Hoelzle, K. Felder, M. Helbling, H. Aupperle, H.A. Schoon, M. Ritzmann, K. Heinritzi, M.M. Wittenbrink (2007c):**
MSG1, a Surface Localized Protein of *Mycoplasma suis* is Involved in the Adhesion to Erythrocytes
Microbes Infect. **9**, 466-474
- Hoffmann, H. (1984):**
Symptomatologie und Diagnostik der Eperythrozoonose in Ferkelerzeugerbetrieben
Tierärztl. Umschau **6**, 474-479
- Hoffmann, R., K. Saalfeld (1977):**
Ausbruch einer Eperythrozoonose in einem Schweinemastbestand
Dtsch. Tierärztl. Wschr. **84**, 7-9
- Hoffmann, R., D.O. Schmid, G. Hoffmann-Fezer (1981):**
Erythrocyte Antibodies in Porcine Eperythrozoonosis
Vet. Immunol. Immunopathol. **2**, 111-119

Hsu, F.S., M.C. Liu, S.M. Chou, J.F. Zachary, A.R. Smith (1992):

Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for detection of Eperythrozoon suis antibodies in swine
Am. J. Res. **53**, 352-354

Jüngling, A. (1990):

Isolation, Charakterisierung und Bedeutung eines Kälteagglutinins bei der Eperythrozoon suis-Infektion des Schweines
Vet. med. Diss., München

Jüngling, A., M.H. Erhard, K. Heinritzi, U. Losch (1994):

Significance and course of a cold agglutinin in Eperythrozoon suis infection of swine
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. **107**, 271-275

Kainz, P. (2000):

The PCR plateau phase-towards an understanding of its limitations.
Biochim Biophys Acta, **1494**, 23-7

Kellogg, D.E., L. Rybalkin, N. Mukhamedova, T. Vlasik, P.D. Siebert,**A. Chenchik (1994):**

TaqStart Antibody: "hot start" PCR facilitated by a neutralizing antibody directed against Taq DNA polymerase.
Biotechniques.**16**, 1134-1137

Kemenes, F. (1966):

Die Leptospirose des Schweins
Mh. Vet. Med. **22**, 224-233

Kinsley, A.T. (1932):

Protozoan-like body in the blood of swine
Vet. Med. **27**, 196

Kinsley, A.T., J.D. Ray (1934):

Anaplasmosis-like disease in swine
J. Am. Vet. Med. Ass. **84**, 391-392

Kixmüller, M. (2004):

Labordiagnostische Referenzbereiche bei unterschiedlichen Schweinerassen sowie histopathologische und immunhistochemische Untersuchungen von Gehirnen älterer Sauen und Eber auf transmissible spongiforme Enzephalopathie im Rahmen der TSE-Studie
Vet. Med. Diss., München

Kloster, A.M., C.O. Descarga, P. Davies, H.G. Piscitelli, L.R. Diaz, G.C. Zielinski (1987):

Eperythrozoonosis porcina: Observaciones sobre la infección natural y experimental
Vet. Arg. **31**, 27-40

Korn, G., M. Mussgay (1968):

Ein Fall von Eperythrozoon suis mit differentialdiagnostischer Bedeutung bei einem Schweinepestverdacht
Zbl. Vet. Med. B **15**, 617-630

Kraft, W., U.M. Dürr, M. Füll, H. Bostedt, K. Heinritzi (1999a):

Hämatologie

In: Kraft, W., U.M. Dürr (Hrsg.):

Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin

5. Auflage, Schattauer Verlag, 43-77

Kraus, B.D. (1990):

Untersuchungen zum Nachweis und zur Verbreitung der Eperythrozoon suis-Infektion in Bayern mittels Komplementbindungsreaktion und Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

Vet. med. Diss., München

Kreier, J.P., R. Gothe (1976):

Aegyptianellosis, Eperythrozoonosis, Grahamellosis and Haemobartonellosis

Vet. Parasitol. **2**, 83-95**Liebich, H.G., K. Heinritzi (1992):**

Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen an Eperythrozoon suis

Tierärztl. Prax. **20**, 270-274**Mackay, I.M., K.E. Arden, A. Nitsche (2002):**

Real-time PCR in virology

Nucl. Acids Res. **30**, 1292-1305**Mc Killip, J., M. Drake (2004):**

Real-time nucleic acid-based detection methods for pathogenic bacteria in food

J. Food Protection **67**, 823-832**Messick, J.B. (2004):**

Hemotrophic mycoplasmas (hemoplasmas). A review and new insights into pathogenic potential

Vet. Clin. Pathol. **33**, 2-13**Messick, J.B., G. Smith, L. Berent, S. Cooper (2000)**

Genome size of Eperythrozoon suis and hybridization with 16S rRNA gene

Can. J. Microbiol. **46**, 1082-1086**Messick, J.B., P.G. Walker, W. Raphael, L. Berent, X. Shi (2002):**`Candidatus Mycoplasma haemodidelphidis` sp. nov., `Candidatus Mycoplasma haemolamae` sp. nov. and Mycoplasma haemocanis comb. nov., haemotrophic 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 mycoplasmasInt. J. Syst. Evol. Microbiol. **52**, 693-698**Müller, E., G. Neddenriep (1979):**

Eperythrozoonose in einem Ferkelerzeugerbetrieb in Norddeutschland

Prakt. Tierarzt **8**, 662-665**Neimark, H., K.M. Kocan (1997):**The cell wall-less rickettsia *Eperythrozoon wenyonii* is a mycoplasmaFEMS Microbiol Lett **156**, 287-291

Neimark, H., K.E. Johansson, Y. Rikihisa, J.G. Tully (2001):

Proposal to transfer some members of the genera Haemobartonella and Eperythrozoon to the genus Mycoplasma with description of 'Candidatus Mycoplasma haemofelis', 'Candidatus Mycoplasma haemomuris', 'Candidatus Mycoplasma haemosuis' and 'Candidatus Mycoplasma wenyonii'
Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **51**, 891-899

Neimark, H., K.E. Johansson, Y. Rikihisa, J.G. Tully (2002):

Revision of haemotrophic Mycoplasma species names
Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **52**, 683

Newton C.R., A. Graham (1994):

PCR
2. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag; Heidelberg, Berlin, Oxford

Oberst, R.D., S.M. Hall, D.A. Schoneweis (1990a):

Detection of Eperythrozoon suis DNA from swine blood by whole organism DNA hybridizations
Vet. Microbiol. **24**, 127-134

Oberst, R.D., S.M. Hall, R.A. Jasso, T. Arndt, L. Wendt (1990b):

Recombinant DNA probe detecting Eperythrozoon suis in swine blood
Am. J. Vet. Res. **51**, 1760-1764

Oberst, R.D., S.M. Gwaltney, M.P. Hays, S. Morgan, E.L. Stair (1993):

Experimental infections and natural outbreaks of eperythrozoonosis in pigs identified by PCR-DNA hybridizations
J. Vet. Diagn. Invest. **5**, 351-358

Patschke, A. (2002):

Untersuchungen zur Prävalenz von Eperythrozoon suis sowie vergleichende Untersuchungen zwischen ELISA und Western Blot bezüglich ihrer Sensitivität und Spezifität
Vet. Med. Diss, München

Persing, D. H., G. D. Cimino (1993):

Amplification products inactivation methods.
In: D. H. Persing, T. S. Smith, F.C. Tenover, T. J. White (Hrsg):
Diagnostic molecular microbiology: principles and applications.
American Society for Microbiology, Washington D. C., USA, S. 105-121

Peteranderl, W. (1988):

Untersuchungen über den Glucose-, Lactat- und Pyruvatgehalt sowie den Säure-Basenhaushalt im venösen Blut bei der Eperythrozoonose des Schweines
Vet. med. Diss., München

Plank, G., Heinritzi, K. (1990):

Disseminierte intravasale Gerinnung bei der Eperythrozoonose des Schweines
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. **103**, 03-018

Pospischil, A., R. Hoffmann (1982):

Eperythrozoon suis in naturally infected pigs: A light and electron microscopic study
Vet. Pathol. **19**, 651-65

Prullage J.B., R.E. Williams, S.M. Gaafar (1993):

On the transmissibility of Eperythrozoon suis by Stomoxys calcitrans and Aedes aegypti
Vet. Parasitol. **50**, 125-135

Quin, A.H. (1938):

A herd condition of swine characterized by icterus and anemia
J. Am. Vet. Med. Ass. **93**, 327-328

Rasmussen, R. (2001):

Quantification on the LightCycler
In: S. Meurer, C. Wittwer, K. Nakagawara (Hrsg.):
Rapid Cycle Real-Time PCR: Methods and Applications
1. Auflage Springer, Heidelberg, S. 21-34

Rikihisa, Y., Kawahara, B. Wen, G. Kociba, P. Fuerst, F. Kawamori, C. Suto, S. Shibata, M. Futohashi (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**, 823-829

Ristic, M., J.P. Kreier (1984)

Family III. Anaplasmataceae
In: N.R. Krieg, J.G. Holt (Hrsg.):
Williams & Wilkins Baltimore, London
Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol.1, 719-729

Robb, A.D. (1943):

Ictero-anemia in growing swine
Vet. Med. **38**, 271-274

Rossen, L., P. Norskov, K. Holstrom, O. F. Rassmusen (1992):

Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA extraction solutions.
Int. J. Food Microbiol. **17**, 37-45

Schilling V. (1928):

Eperythrozoon coccoides, eine neue durch Splenektomie aktionierbare Dauerinfektion der weissen Maus
Klein. Wochenschr. 1853-1855

Schmidt, P., B. Kaspers, A. Jüngling, K. Heinritzi, U. Lösch (1992):

Isolation of cold agglutinins in Eperythrozoon suis-infected pigs
Vet. Immunol. Immunopathol. **31**, 196-201

Schuller, W., K. Heinritzi, S. Al-Nuktha, S. Kölbl, M. Schuh (1990):

Serologische Verlaufsuntersuchungen mittels KBR und ELISA zum Nachweis von Antikörpern gegen die Eperythrozoon-Infektion des Schweines
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. **103**, 9-12

Schweighardt, H., A. Fellner, P. Pechan, E. Lauer mann (1986):

Eperythrozoonose beim Schwein-ein Fallbericht
Wien. Tierärztl. Mschr. **73**, 250-253

Sisk, D.B., J.R. Cole, A.R. Pursell (1980):

Serologic incidence of eperythrozoonosis in Georgia swine
Proc.: 13. Amer. Ass. Vet. Laboratory Diagnosticans, 91-99

Smith, A.R. (1975):

Eperythrozoonosis
J. Am. Vet. Med. Ass. **166**, 964

Smith, A.R., T. Rahn (1975):

An indirect hemagglutination test for the diagnosis of Eperythrozoon infection in swine
Am. J. Vet. Res. **36**, 1319-1321

Smith, A.R. (1992):

Eperythrozoonosis
In: Leman, A.D., B. Straw, R.D. Glock, W.L. Mengeling, R.H.C. Penny, E. Scholl (Hrsg.):
Diseases of Swine
7. Auflage, Iowa State University Press Ames, Iowa, 470-474

Smith, J.E., J.E. Cipriano, S.M. Hall (1990):

In vitro and in vivo glucose consumption in swine eperythrozoonosis
J. Vet. Med. B. **37**, 587-592

Splitter, E.J. (1950a):

Eperythrozoon suis, the etiologic agent of ictero-anemia or an anaplasmosis-like disease in swine
Am. J. Vet. Res. **11**, 324-330

Splitter, E.J. (1950b):

Eperythrozoon suis n. sp. and Eperythrozoon parvum n. sp., two new blood parasites of swine
Science **111**, 513-514

Splitter, E.J. (1958):

The complement-fixation test in diagnosis of eperythrozoonosis in swine
J. Am. Vet. Med. Ass. **116**, 360-364

Splitter, E.J., R.L. Williamson (1960):

Eperythrozoonosis in swine. A preliminary report.
J. Am. Vet. Med. Ass. **116**, 360-364

Stoffregen, W.C., D.P. Alt, M.V. Palmer, S.C. Olsen, W.R. Waters, J.A. Stasko (2006):

Identification of a haemomycoplasma species in anemic reindeer (*Rangifer tarandus*)
J. Wildl. Dis. **42**, 258

Stryer, L. (1999):

Biochemie
4. Auflage Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg-Berlin, 1125

- Syvanen, A.C., M. Bengtstrom, J. Tenhunen, H. Soderlund (1988):**
Quantification of polymerase chain reaction products by affinity-based hybrid collection
Nucl. Acids Res. **16**, 11327-11338
- Thiel, W. (1983):**
Zur Pathologie und Diagnostik der Eperythrozooninfektion der Schweine
Prakt. Tierarzt **64**, 692-697
- Williams, J.F. (1989):**
Optimization strategies for the polymerase chain reaction
Biotechniques **7**, 762-769
- Wiedbrauk, D.L., J.C. Werner, A.M. Drevon (1995):**
Inhibition of PCR by aqueous and vitreous fluids
J. Clin. Microbiol. **33**, 2643-2646
- Willi, B., S.F. Boretti, V. Cattori, S. Tasker, M.L. Meli, C. Reusch, H. Lutz, R. Hofmann-Lehmann (2005):**
Identification, molecular characterization, and experimental transmission of a new hemoplasma isolate from a cat with hemolytic anemia in Switzerland
J. Clin. Microbiol. **43**, 2581-2585
- Wink, M., H. Wehler (1994):**
PCR im medizinischen und biologischen Labor
Handbuch für den Praktiker
GIT Verlag GmbH, Darmstadt
- Wittwer C.T., K.M. Ririe, R.V. Andrew, D.A. David, R.A. Gundry, U.J. Balis (1997a):**
The LightCycler: a microvolume ultrasample fluorimeter with rapid temperature control.
Biotechniques **22**, 176-181
- Wittwer C.T., M.G. Hermann, A.A. Moss, R.P. Rasmussen (1997b):**
Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification
Biotechniques **22**, 130-134
- Yin, J.L., N.A. Shakel, A. Zekry, P.H. McGuinness, C. Richards, K.V. Putten, G.W. McCaughan, J.M. Eris, G.A. Bishop (2001):**
Real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) for measurement of cytokine and growth factor mRNA expression with fluorogenic probes or SYBR Green I.
Immunol. Cell. Biol. **79**, 213-221
- Zachary, J.F., Basgall, E.J. (1985):**
Erythrocyte membran alterations associated with the attachment and replication of Eperythrozoon suis: a light and electron microscopic study
Vet. Pathol. **22**, 164-170
- Zachary, J.F., A.R. Smith (1985):**
Experimental porcine eperythrozoonosis: T-lymphocyte suppression and misdirected immune responses
Am. J. Vet. Res. **46**, 821-830

- Zinn, G.M., G.W. Jesse, A.W. Dobson (1983):**
Effect of eperythrozoonosis on sow productivity
J. Am. Vet. Med. Assoc. **182**, 369-371

Danksagung

Mein ganz besonderer Dank geht an Herrn Prof. Dr. K. Heinritzi für die Überlassung dieses interessanten Themas. Ich möchte ihm sehr herzlich für die stets freundliche und sehr gute Betreuung und Unterstützung während Planung, Durchführung und Anfertigung dieser Arbeit und ebenso für die lehrreiche und interessante Zeit an der Klinik für Schweine danken.

Herrn Dr. M. Ritzmann danke ich sehr für die immer freundliche und verlässliche Unterstützung, für die Hilfe bei der Textkorrektur und für das außerordentlich gute und angenehme Arbeitsklima.

Herrn Dr. P. Ritzmann gilt mein ganz herzlicher Dank für die sehr tatkräftige und unermüdliche Hilfe bei der Blutprobenentnahme.

Mein ganz großer Dank gilt Herrn Dr. Ludwig Hoelzle und Frau Dr. Katharina Hoelzle für die real-time PCR Untersuchung und Auswertung meiner Proben und ihre sehr große Unterstützung und Hilfsbereitschaft bei der Anfertigung der Doktorarbeit.

Herrn Dr. Palzer danke ich herzlich für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung der Daten, sowie die wertvollen Ratschläge bei der Anfertigung der Arbeit.

Frau Dr. Sauter-Louis möchte ich besonders für die statistische Betreuung dieser Arbeit danken.

Für die Auswertung der Serumproben möchte ich mich bei Frau C. Bayer und Frau I. Hartmann aus dem Labor der Klinik für Wiederkäuer besonders bedanken. Außerdem gilt mein herzlicher Dank Frau B. Garner für die Unterstützung bei der Bearbeitung der Blutproben und die netten Stunden im Labor.

Ich möchte mich herzlichst bei allen Mitarbeitern der Klinik für das gute Arbeitsklima, die freundliche Hilfe und die interessante, lehrreiche und nette Zeit in der Klinik bedanken.

Ich danke meiner einmaligen Familie für die Rücksicht, die sie mir während des Studiums und auch während der Doktorarbeit entgegen gebracht hat.

Ein ganz besonders großer Dank gilt meinen Eltern, die mich immer uneingeschränkt und bedingungslos unterstützen, an mich glauben und mir mit Rat und ganz besonders mit „Tat“ zur Seite stehen.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich auch bei Anke Zankl für die Unterstützung bei der Korrektur der Arbeit und für die tolle Freundschaft.

Last but not least danke ich Dir Joachim für die große Hilfe bei der statistischen Auswertung, die Lösung all meiner Computer-Probleme, aber ganz besonders danke ich Dir für Deine Unterstützung und deine unendliche Geduld, die ich bis an die Grenzen strapaziert habe.

Lebenslauf

Julia Grimm

geb. 21.10.1980

in Dinkelsbühl

ledig

Ausbildung/Beruf

1987-1991 Grundschule Schopfloch

1991-2000 Gymnasium Dinkelsbühl

10/2000-03/2006 Studium der Tiermedizin an der LMU München

03/2006 Tierärztliche Approbation

04/2006 Beginn der Dissertation

04/2006-06/2007 Wissenschaftliche Hilfskraft an der Klinik für Schweine der LMU München

Seit 07/2007 Tierärztin beim Schweinegesundheitsdienst Baden-Württemberg