

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

**Untersuchung zur Möglichkeit einer Vakzination gegen
*Mycoplasma suis***

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

**von
Susanne Doser
aus Füssen
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

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. J. Hirschberger

Tag der Promotion: 08.02.2008

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
2	LITERATURÜBERSICHT.....	2
2.1	Historischer Überblick über die <i>Mycoplasma suis</i>-Infektion des Schweines	2
2.2	Taxonomische Stellung von <i>Mycoplasma suis</i>.....	3
2.3	Morphologie von <i>Mycoplasma suis</i>	3
2.4	Vorkommen und Bedeutung von haemotrophen Mycoplasmen	4
2.5	Pathogenese und Immunologie	5
2.6	Klinisches Bild	7
2.7	Pathologisch-anatomische und –histologische Veränderungen	8
2.8	Differentialdiagnose	9
2.9	Diagnose	10
2.9.1	Klinische Diagnose	10
2.9.2	Hämatologische und serologische Veränderungen	10
2.9.3	Mikroskopischer Erregernachweis	11
2.9.4	Biologische Diagnose.....	12
2.9.5	Serologische Nachweisverfahren	13
2.9.6	Molekularbiologischer Nachweis von <i>Mycoplasma suis</i> mittels PCR.....	16
2.10	Therapie und Hygienemaßnahmen	19
2.11	Impfung	19
2.11.1	Immunologische Grundlagen der erworbenen Immunität	20
2.11.2	Impfstoffarten im Überblick.....	22
3	MATERIAL UND METHODEN	27
3.1	Durchführung des Tierversuchs	27
3.1.1	Versuchstiere	27
3.1.2	Versuchsablauf	28
3.1.3	Impfstoffe	29
3.1.4	Adjuvans.....	31
3.1.5	Impstoffapplikation und klinische Untersuchung	31
3.1.6	Splenektomie	32
3.1.7	Belastungsinfektion	33
3.1.8	Therapie.....	34
3.2	Hämatologische und klinisch-chemische Blutuntersuchungen.....	34
3.3	Mikroskopischer Erregernachweis.....	35
3.4	Erregernachweis mittels quantitativer Polymerase-Ketten-Reaktion	35
3.4.1	DNA Extraktion	35
3.4.2	Quantitative LightCycler PCR	36
3.5	Nachweis der humoralen Immunantwort	36
3.5.1	rMSG1/rHspA1 ELISA.....	36

3.5.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot	37
3.6	Nachweis der T-Zell vermittelten Immunantwort	40
3.6.1	Lymphozyten-Isolierung aus der Milz	40
3.6.2	Isolierung peripherer Blutlymphozyten	40
3.6.3	Lymphozyten-Proliferationstest	40
3.7	Patho-morphologische Untersuchungen	41
4	ERGEBNISSE	42
4.1	Klinische Parameter nach der Impfung.....	42
4.1.1	Lokale Reaktionen.....	42
4.1.2	Systemische Reaktionen.....	46
4.2	Ergebnisse der klinischen Untersuchung und allgemeinen Labordiagnostik nach der Belastungsinfektion	48
4.2.1	Ergebnisse der Blutparameter	50
4.2.2	Ergebnisse der patho-morphologischen Untersuchungen	56
4.2.3	Zelluläre Immunantwort nach Immunisierung.....	57
4.2.4	Humorale Immunantwort nach Immunisierung und Belastungsinfektion	59
4.2.5	<i>M. suis</i> -Konzentration im Blut während der Belastungsinfektion	61
5	DISKUSSION	62
6	SCHLUSSFOLGERUNG	69
7	ZUSAMMENFASSUNG	71
8	SUMMARY.....	73
9	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	75
10	TABELLENVERZEICHNIS	76
11	LITERATURVERZEICHNIS	77
12	ANHANG	87
	DANKSAGUNG	105
	LEBENS LAUF	106

Abkürzungsverzeichnis

A.	<i>Arteria</i>
A. (bi)dest	Aqua (bi)destillata
absol.	absolut
Ag	Antigen
Ak	Antikörper
CpG-Dinukleotide	Cytosin-phosphatidyl-Guanosin-Dinukleotide
d	Tag
DIVA	differentiating infected from vaccinated animals
DNA	Desoxyribonukleinsäure
<i>E.</i>	<i>Eperythroozoon</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzym-linked immunosorbent assay
h	Stunde
HspA1	Heat shock protein A1
Ig	Immunglobulin
IHA	Indirekter Hämagglutinationstest
IL	Interleukin
i.m.	intramuskulär
i.v.	intravenös
KBE	Kolonie bildende Einheiten
kbp	Kilobasenpaare
KBR	Komplementbindungsreaktion
KGW	Körpergewicht
LC	LightCycler [®]
<i>M.</i>	<i>Mycoplasma</i>
spp.	Spezies
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µmol	Mikromol
M	Molar, Mol pro Liter
MAC	Minimale alveoläre Konzentration
mg	Milligramm
ml	Milliliter

MHC	major histocompatibility complex
MMA	Mastitis-Metritis-Agalaktie
mmol	Millimol
MSG1	<i>M. suis</i> GAPDH-like Protein 1
nm	Nanometer
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (phosphate buffered saline)
PCR	Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction)
pg	Pikogramm
p.i.	post infectionem
p.vacc.	post vaccinationem
r	rekombinant
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
s.c.	subkutan
SDS	Sodium-dodecyl-sulfat
Th-Zellen	T-Helfer-Zellen
Tris	Tri-(hydroxymethyl)-aminomethan
U/min	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
V.	<i>Vena</i>
Vol.	Volumen

1 Einleitung

Die porcine Eperythrozoonose, verursacht durch *Mycoplasma suis*, ist eine weltweit verbreitete Infektionskrankheit und verläuft meist als latente Infektion. Zum Ausbruch der Erkrankung kommt es nach Belastungen wie Geburt, Umstallen, Absetzen, schlechten Haltungs- und Fütterungsbedingungen oder weiteren Infektionskrankheiten. Ebenso zählen zootechnische Eingriffe und Rankämpfe zu den auslösenden Ursachen. Das Krankheitsbild wird bestimmt von einer hämolytischen Anämie, Ikterus und je nach Schweregrad Apathie, Anorexie, Dyspnoe und Fieber bis 42°C. Die erkrankten Tiere zeigen zyanotische Veränderungen an den Akren, bevorzugt an den Rändern der Ohrmuscheln. Durch die lebenslange Persistenz des Erregers im Körper kann es zu wiederholten Infektionsschüben kommen. Aufgrund dessen treten verzögertes Wachstum und somit verlängerte Aufzucht- und Mastperioden sowie erhöhte Anfälligkeit gegenüber anderen Krankheiten auf. Die Tiere zeigen erhöhte Empfänglichkeit für Durchfall- und Respirationskrankheiten.

Die vergangenen Jahrzehnte haben die unbestreitbare Einsicht gebracht, dass der Grossteil der Infektionskrankheiten besser durch präventive als durch therapeutische Maßnahmen beherrschbar ist. Die Durchführung von Impfprogrammen ist einer der entscheidenden Faktoren im modernen Management der Schweinehaltung. Die allgemeine Widerstandsfähigkeit gegen Krankheitserreger wird stark verbessert und der notwendige Medikamenteneinsatz kann deutlich reduziert werden. Die Tageszunahmen und Futtermittelverwertung werden gesteigert. Die durch die Impfung erzielten Verbesserungen übersteigen dabei die Impfkosten deutlich. Neben den wirtschaftlichen Zwängen schieben sich die immer höher werdenden Anforderungen der Konsumenten an ein „biologisches Produkt“ in das Blickfeld der verarbeitenden Betriebe und damit mittelbar auch der Schweineerzeuger. Nur mittels Impfungen ist es heute möglich, den Konsumentenwunsch nach weitestgehend Antibiotika-frei erzeugtem Fleisch zu erfüllen. Zudem lässt sich weder durch parenterale noch durch orale Applikation von potentiell wirksamen Antibiotika wie z.B. Tetrazyklin eine Eliminierung der Mykoplasmen erreichen.

Somit sollte im Rahmen einer Pilotstudie eine Impfung etabliert und überprüft werden, die es ermöglicht, in Zukunft prophylaktisch gegen *M. suis* vorzugehen. Die daraus resultierenden Ergebnisse könnten die Basis für neuartige prophylaktische und therapeutische Behandlungsmethoden sowie für die Sanierung von Beständen darstellen.

2 Literaturübersicht

2.1 Historischer Überblick über die *Mycoplasma suis*-Infektion des Schweines

Im Jahre 1928 beobachtet SCHILLING zum ersten Mal in Blutausstrichen von splenektomierten Mäusen ringförmige Gebilde auf der Oberfläche der Erythrozyten, die er deshalb *Eperythrozoon coccoides* nannte. Im Oktober 1931 wurden im Mittelwesten der USA erstmals ähnliche Erreger im Blut von Schweinen gefunden. Diese, bis zu diesem Zeitpunkt unbekannte Krankheit, betraf Schweine im Alter von acht Wochen. KINSLEY (1932) beschreibt diese als eine mit Ikterus und Anämie, dünnflüssigem Blut, Hämorrhagien in Lunge, Herz und Nieren, geschwollener dunkler Milz und gelbverfärbter vergrößerter Leber einhergehende Erkrankung. Im Blutausstrich von erkrankten Tieren sind Anaplasmen-ähnliche Körper zu sehen (KINSLEY, 1932). DOYLE (1932) beschreibt erstmals die klinischen Symptome Anämie und Ikterus zusammen mit Apathie, Dyspnoe und Schwäche. Auch DOYLE (1932) bezeichnet die in Giemsa-gefärbten Blutausstrichen sichtbaren Körper als Anaplasmen- oder Rickettsien-ähnlich.

KINSLEY und RAY (1934) berichten erstmals im Zusammenhang mit *Eperythrozoon suis*-Infektionen von Ohrspitzennekrosen. In den folgenden Jahren werden immer wieder Fälle mit ähnlichen klinischen Symptomen sowie mikroskopisch und pathologischen Veränderungen in Verbindung mit Anaplasmen-ähnlichen Gebilden beschrieben.

SPLITTER und WILLIAMSON (1950) bezeichnen erstmals den für die Iktereanämie des Schweines verantwortlichen Erreger aufgrund der Ähnlichkeit mit den bereits bekannten Eperythrozoon- *Eperythrozoon wenyoni* des Rindes und *Eperythrozoon ovis* des Schafes- als *Eperythrozoon suis*.

KORN und MUSSGAY (1968) diagnostizieren die Eperythrozoonose erstmals in Deutschland im Zusammenhang mit der Aufklärung eines Schweinepestverdachtetes. Weitere Krankheitsfälle in Deutschland werden erst wieder von HOFFMANN und SAALFELD (1977) publiziert.

2.2 Taxonomische Stellung von *Mycoplasma suis*

RISTIC und KREIER (1984) ordnen den Erreger der porcinen Eperythrozoonose der Ordnung der *Rickettsiales* und darin der Familie der *Anaplasmataceae* zu.

Während *Anaplasma* spp. in die Erythrozyten eindringen, heften sich die Eperythrozoen an die Zelloberfläche (NEIMARK et al., 2001). Außerdem weisen POSPISCHIL und HOFFMANN (1982) nach, dass *E. suis* im Gegensatz zu *Anaplasma* spp. von einer einfachen Membran umgeben ist.

Vergleiche von Sequenzanalysen des 16S rRNA-Gens von *E. suis* und *Haemobartonella* spp. mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion bestätigen die Vermutung, dass *Haemobartonella* spp. und *E. suis* nahe verwandt mit der Familie *Mycoplasmataceae* sind (RIKIHISA et al., 1997).

Aufgrund dieser phylogenetischen Verwandtschaft und ihren phänotypischen Eigenschaften (keine Zellwand, Parasiten der Erythrozyten, kein intrazellulärer Parasitismus, geringe Größe, keine Flagellen, Resistenz gegen Penicillin, Empfänglichkeit gegen Tetrazyklin) werden die beiden Genera *Eperythrozoon* und *Haemobartonella* aus der Ordnung *Rickettsiales* in die Familie *Mycoplasmataceae* umklassifiziert (TASKER et al., 2003; MESSICK et al., 2002; NEIMARK et al., 2002; 2001; RIKIHISA et al., 1997).

Die haemotrophen Mykoplasmen bilden eine neue Gruppierung innerhalb des Genus *Mycoplasma* und werden auch als Haemoplasmen bezeichnet (NEIMARK et al., 2001).

Mycoplasma suis ist speziesspezifisch und kann nicht auf andere Tierarten übertragen werden (THACKER, 2006). Ebenso ist es nicht möglich Schweine mit *E. ovis* oder *E. wenyoni* zu infizieren (SPLITTER, 1950b).

2.3 Morphologie von *Mycoplasma suis*

Der Erreger der Eperythrozoonose hat einen Durchmesser von 0,3 bis 3 µm. Er ist pleomorph und wird von einer einzelnen Zellmembran umschlossen. Die kernlosen haemotrophen Mykoplasmen besitzen kleine Granula und einige filamentöse Strukturen im Cytoplasma (MESSICK, 2004).

Das Genom baut sich aus einer zirkulären, doppelsträngigen DNA mit einer Größe von 745 kbp (*M. suis*; Messick et al., 2000) auf. *M. suis* ist aufgrund seiner sehr kleinen Genom- und Bakteriengröße gerade noch in der Lage sich selbst zu replizieren. Für die Vermehrung der

Mykoplasmen ist der enge Kontakt mit der Erythrozytenoberfläche essentiell. Für *M. suis* konnten mindestens drei verschiedene Vermehrungsstadien auf den Erythrozyten beobachtet werden: kleine kokkoide unreife, jugendliche diskusförmige und reife ringförmige Bakterien (LIEBICH und HEINRITZI, 1992; ZACHARY und BASGALL, 1985).

Haemotrophe Mykoplasmen sind in Vertiefungen und Eindellungen der Erythrozytenmembran zu finden. Im Elektronenmikroskop ist zu erkennen, dass ein ca. 15-30 nm breiter Spalt die Bakterien von der Erythrozytenoberfläche trennt. Die Bindung zwischen haemotrophen Mykoplasmen und der Erythrozytenmembran erfolgt mittels feiner fibrillärer Strukturen (ZACHARY und BASGALL, 1985; MESSICK, 2004).

2.4 Vorkommen und Bedeutung von haemotrophen Mykoplasmen

Weltweit findet man bei einer Vielzahl von Wirbeltieren, wie z. B. Katze, Hund, Maus, Schwein, Schaf und Ziege, Rind, Lama, Opossum (MESSICK, 2004) und beim Rentier (STOFFREGEN et al., 2006) haemotrophe Mykoplasmen. Auch beim Pferd und bei Zootieren wie z.B. Maras konnten bei neueren Untersuchungen Haemoplasmen-ähnliche Bakterien beobachtet werden.

Haemotrophe Mykoplasmen sind sehr wirtsspezifisch (RISTIC und KREIER, 1984) und können bei ihren Hauptwirten lebensbedrohende akute hämolytische Anämien und Immunsuppression verursachen. In einigen Untersuchungen wurden Hinweise darauf gefunden, dass haemotrophe Mykoplasmen auch bei Primaten und beim Menschen vorkommen (YANG et al., 2000; DUARTE et al., 1992; KALLICK et al., 1980).

Eine immer grösser werdende Bedeutung gewinnen die haemotrophen Mykoplasmen in der Kleintierpraxis. Bei Katzen findet man weltweit drei verschiedene Spezies (*M. haemofelis*, *Candidatus M. haemominutum* und *Candidatus M. turicensis*). Diese unterscheiden sich in ihrer Virulenz und dadurch auch in ihrer klinischen Bedeutung erheblich voneinander (WILLI et al., 2005). *M. haemofelis* ist die virulenteste der drei Spezies und verursacht schwere bis lebensbedrohende Anämien bei immunkompetenten Katzen.

Die durch *M. suis* verursachte porcine Eperythrozoonose ist zahlreichen Veröffentlichungen zufolge weltweit verbreitet. Da die Erkrankung überwiegend klinisch inapparent verläuft, vermutet SPLITTER (1950a), dass die Infektion wesentlich häufiger verbreitet ist, als sie nachgewiesen wird.

2.5 Pathogenese und Immunologie

Mycoplasma suis kann hämatogen im Rahmen von zootechnischen und therapeutischen Eingriffen (kontaminierte Injektionskanülen, kontaminiertes Operationbesteck, Oberkieferschlingen) oder durch blutsaugende Arthropoden (Schweinelaus *Hämatoipinus suis*, Rädemilbe *Sarcoptes suis* und Stechmücken) übertragen werden (HEINRITZI, 1990b). Orale Infektionen durch Urin wurden von HEINRITZI (1990b) beschrieben.

Aus elektronenmikroskopischen Untersuchungen ist bekannt, dass sich *Mycoplasma suis* mit einem Abstand von 30 nm an die Erythrozytenmembran anheftet. Mit Hilfe von fibrillären Strukturen bindet es an die Oberfläche der Wirtserythrozyten. Dadurch verändert sich die Erythrozytenoberfläche und es kommt zu Invaginationen und Umlagerungen im Zytoskelett (ZACHARY und BASGALL, 1985).

Es ist allerdings noch unklar, aus welchen Proteinen diese Adhärenz-Strukturen aufgebaut sind. Durch Proteom- und Immunom-Analysen mit anschließendem Screening einer *M. suis*-Genom-Datenbank konnten bislang zwei *M. suis*-Proteine aufgeklärt werden, die möglicherweise Bestandteil eines Adhäsionskomplexes sind (HOELZLE et al., 2007c; HOELZLE, 2007; HOELZLE et al., 2007a). Beide Proteine, MSG1 (*M. suis* GAPDH-like protein 1) und HspA1 (Heat shock protein A1), konnten durch immunoelektronenmikroskopische Untersuchungen auf der Oberfläche der *M. suis*-Zellmembran lokalisiert werden. Sie sind immunogen und heften sich an die Oberfläche der Zellmembran von Schweineerythrozyten (HOELZLE et al., 2007c; HOELZLE et al., 2007a). Nicht adherente *E.coli* erhalten durch Oberflächenständige Expression von MSG1 die Eigenschaft an porcine Erythrozyten zu binden (HOELZLE et al., 2007c).

Als Folge dieser Alterationen der Erythrozytenmembran wird während der akuten porcinen Eperythrozoonose eine milde lytische Anämie hervorgerufen, die später nach Induktion von Kälteagglutininen von einer schwerwiegenden immun-hämolytischen Anämie abgelöst wird (ZACHARY und SMITH, 1985; JÜNGLING et al., 1994). Die Kälteagglutinine sind Antikörper der Klasse IgM (Immunglobuline vom Typ M) (ZACHARY und SMITH, 1985; JÜNGLING et al., 1994) und richten sich nicht gegen den Erreger selbst, sondern gegen ein Carbohydrat-Antigen auf der Erythrozytenmembran (I-Antigen). In neueren Untersuchungen zur humoralen Immunantwort in mit *M. suis* infizierten Schweinen konnten neben autoreaktiven Kälteagglutininen erstmals auch Autoantikörper der Klasse IgG nachgewiesen werden (HOELZLE et al., 2006). Die erregerspezifischen Antikörper fallen im Blutserum kranker

Schweine bei der akuten Eperythrozoonose signifikant ab und parallel dazu kommt es zu einem drastischen Anstieg von IgG-Antikörpern, die gegen Autoantigene gerichtet sind. Es konnte in initialen Untersuchungen nachgewiesen werden, dass eine Reaktion der Autoantikörper gegen das Aktin von Schweineerythrozyten stattfindet (HOELZLE et al., 2007c). In aktuellen Studien wird derzeit die genaue Epitop-Struktur der Autoantigene erforscht und untersucht, ob eine *M. suis*-Infektion zur Modifikation des wirtseigenen Aktins führt oder ob der Erreger orthologe Strukturen besitzt, deren immunologische Beantwortung zum Phänomen des sogenannten Molecular mimicry beiträgt (ALBERT und INMAN, 1999). ZACHARY und SMITH (1985) diskutieren, ob durch eine *M. suis*-Infektion Modifikationen an der Erythrozytenmembran stattfinden. Die im Blutserum auftretenden Autoimmunantikörper der Klasse IgM führen bei niedrigen Temperaturen zu einer Agglutination. Durch ihre Anwesenheit in den unterhalb der Körpertemperatur liegenden Körperregionen, wie den Ohren, Extremitäten oder anderen, kommt es zu Mikroagglutination und als Folge davon zu Durchblutungsstörungen. Aus diesen resultieren Zyanosen und bei längerem Andauern Nekrosen an diesen Körperregionen (BUGNOWSKI et al., 1986). Die Kälteagglutinine richten sich gegen die Erythrozyten und beschleunigen deren Phagozytose, so dass die Eperythrozoonose zu den autoimmunhämolytischen Anämien gezählt werden kann (HOFFMANN et al., 1981). Durch das mononukleare Phagozytosesystem werden Erreger und geschädigte Erythrozyten erkannt und eliminiert (POSPISCHIL und HOFFMANN, 1982). Die verstärkte Phagozytose und Erythrozytolyse führt durch die erhöhte Eisenablagerung zu einer Hämosiderose in Milz, Leber und Lymphknoten sowie zu einer vorübergehenden Bilirubinämie (THIEL, 1983).

Neben den Zyanosen an den Akren sind die Kälteagglutinine für die Unterdrückung der T-Zell-Blastogenese, insbesondere der T-Helfer-Zellen verantwortlich. Ihr Haupteffekt kann somit in ihrer immunsupprimierenden Aktivität gesehen werden (ZACHARY und SMITH, 1985).

Die Schweine zeigen bei der akuten Eperythrozoonose einen lebensbedrohlichen Abfall der Blutglucosewerte, der mit dem Stoffwechsel von *M. suis* in Verbindung steht (HEINRITZI et al., 1990; SMITH et al., 1990). In neueren Studien konnte eine Übereinstimmung für das *M. suis*-Protein MSG1 zu einer bakteriellen Glyceraldehyd-Phosphat-Dehydrogenase (Enzym innerhalb des Kohlenhydratstoffwechsels) gefunden werden (HOELZLE et al., 2007c). Für rekombinantes MSG1 konnte *in vitro* eine GAPDH-Aktivität nachgewiesen werden.

Haemotrophe Mykoplasmen sind bislang nicht *in vitro* kultivierbar. Dies erschwert die vollständige Aufklärung der Pathogenese und Immunologie der porcinen Eperythrozoonose.

2.6 Klinisches Bild

Die porcine Eperythrozoonose verläuft in der Regel als latente Infektion (HEINRITZI, 1984a). Die *M. suis*-Infektion wird auch als Faktorenkrankheit bezeichnet (HEINRITZI, 1989), da es vor allem nach Belastungen, wie Geburt, Umställen, Absetzen, bei schlechten Haltungs- und Fütterungsbedingungen oder anderen Infektionskrankheiten zum Ausbruch der Krankheit kommt (BOLLWAHN, 1982; HEINRITZI, 1989; GRESHAM und ROGERS, 1994). HENRY (1979) berichtet von einem gehäuften Auftreten von Sekundärinfektionen wie bakterielle Pneumonien oder Enteritiden.

Schweine jeder Alters- und Nutzungsgruppe können sich mit *M. suis* infizieren (THACKER, 2006). Das Erscheinungsbild der porcinen Eperythrozoonose ist uneinheitlich und nicht immer charakteristisch bei allen erkrankten Tieren (BUGNOWSKI et al., 1986).

Infizierte und erkrankte Saugferkel entwickeln trotz Eisenapplikation Anämie, geringgradigen Ikterus, Saugunlust und bleiben in ihrer Entwicklung im Vergleich zu ihren Wurfgeschwistern zurück (BUGNOWSKI et al., 1986).

Die klinischen Symptome bei den Absatzferkeln, Läufern und Mastschweinen sind Anämie, Ikterus, Kurzatmigkeit, Anorexie, geringe Gewichtszunahme, struppiges Haarkleid, Anstieg der Körpertemperatur bis zu 42°C und zyanotische Veränderungen an den Akren, vor allem an den Rändern der Ohrmuscheln (HEINRITZI, 1990a). Anämie und Ikterus werden als charakteristische Symptome der Eperythrozoonose angesehen, so dass von einer Ikteroanämie gesprochen wird (ROBB, 1943; SPLITTER, 1950a).

Der chronische Verlauf der *M. suis*-Infektion kann neben Kümern und Blässe zu allergischen Hautveränderungen in Form von hämorrhagischen Diathesen führen. Diese entsprechen entweder dem Bild eines *Morbus maculosus* mit zahlreichen etwa stecknadelkopfgroßen Petechien, insbesondere an den Bauchseiten, sowie Ekchymosen an Ohren und Gliedmaßen, oder dem Bild einer Urtikaria (BUGNOWSKI et al., 1986; HEINRITZI, 1990a).

Bei den Sauen kann ein Zusammenhang zwischen Krankheitsausbruch und Belastungen beobachtet werden. Nach HENRY (1979) unterscheidet man zwischen der akuten und der chronischen Verlaufsform. Bei einer akuten *M. suis*-Infektion erkranken die Tiere meist drei bis vier Tage nach dem Umställen in den Abferkelstall (BUGNOWSKI et al., 1986; HEINRITZI, 1990a). Die Sauen zeigen für ein bis drei Tage Anorexie, Fieber bis 42°C, Mamma- und Vulvödeme, sowie ikterische Skleren (BRÖMEL und ZETTL, 1985). Chronische Infektionen führen zu dem sog. „thin sow syndrom“, das einhergeht mit Kümern, Blässe und Gewichts-

verlust (BRÖMEL und ZETTL, 1985). Der Einfluß einer *M. suis*-Infektion auf die Fruchtbarkeit wird in der Literatur unterschiedlich diskutiert. ZINN et al. (1983) und HEINRITZI (1990a) konnten keine merklichen Auswirkungen auf die Reproduktionsleistung feststellen. BROWNBACK (1981) berichtet von Umrauschen, Unfruchtbarkeit, Aborten sowie die Geburt von Mumien und kleine Wurfgrößen. In serologisch positiven Herden konnten SISK et al. (1980) ebenfalls Fruchtbarkeitsprobleme, unregelmäßige Zyklen, kleine Würfe, Aborten, Frühgeburten und lebensschwache Ferkel beobachten. SCHWEIGHARDT et al. (1986) berichtet von verlängerten Absetz-Östrus-Intervallen bei bis zu 60% der Muttertiere, Brunstlosigkeit und Umrauschen. 70% der Zuchtsauen zeigten post partum über mehrere Monate „MMA-Syndrom“ ähnliche Symptome mit ödematisiertem Gesäuge.

In experimentell infizierten Schweinen lassen sich hämatologisch während einer akuten Eperythrozoonose zwei Phasen unterscheiden (ZACHARY und SMITH, 1985):

- (1) Im frühen Stadium lassen sich sehr hohe Erregermengen im Blut, eine lebensbedrohliche Hypoglykämie, eine leichte Bilirubinämie und eine geringe Anämie beobachten
- (2) Das späte Stadium ist gekennzeichnet durch eine schwere Anämie, geringe Erregerzahlen im Blut, eine Spontanagglutination der Erythrozyten bei niedrigen Temperaturen, eine vorübergehende Thrombozytämie und eine milde Bilirubinämie

Über die Morbidität und Letalität wurde nur vereinzelt berichtet. Die Morbidität bei mit *M. suis*-infizierten Saugferkeln liegt zwischen 15% und 20% (PRESTON und GREVE, 1965; MÜLLER und NEDDENRIEP, 1979). BERRIER und GOUGE (1954) berichten von einer Letalität bei unter einer Woche alten Saugferkeln mit einem Ferkel pro Wurf. Die Letalität innerhalb eines Bestandes wird zwischen 1% und 30% angegeben (QUINN, 1938; ROBB, 1943).

2.7 Pathologisch-anatomische und –histologische Veränderungen

Bei der Sektion infizierter Tiere beobachten KINSLEY (1932) und DOYLE (1932) als auffälligstes Merkmal einen generalisierten Ikterus, dünnflüssiges, wässriges Blut sowie Hämorrhagien in der Lunge, im Herz und in den Nieren. THIEL (1983) berichtet von einer stark pulpösen Milzschwellung mit einer etwa vierfachen Volumenvermehrung des Organs. Die Leber, die ebenfalls vergrößert sein kann, weist herdförmige Aufhellungen oder generalisierte gelb-braune Verfärbungen bis zur mosaikartigen Zeichnung der Läppchenzentren auf (BUGNOWSKI et al., 1986). Die Gallenblase ist mit gelatineartiger Gallenflüssigkeit gefüllt

(BRÖMEL und ZETTL, 1985). Bei chronischem Krankheitsverlauf zeigen sich Hydrothorax, Hydropericard, sowie Ascites mit gelblicher Flüssigkeit. Magen- und Darminhalt sind gallenartig verfärbt (ROBB, 1943).

Pathologisch-histologisch weisen die Leberläppchen zentrale nekrotische Areale auf. In der Peripherie der Nekrosen sind die Gallenkapillaren mit zahlreichen Gallethromben gefüllt. Die Kupfferschen Sternzellen beinhalten grosse Mengen Hämosiderin, welches durch die Berliner-Blau-Reaktion im Bereich der zentrolobulären Lebernekrosen nachweisbar ist. Auch die Retikulumzellen der Milzpulpa speichern Hämosiderin (THIEL, 1983; BUGNOWSKI et al., 1986; BUGNOWSKI, 1987). Die Aktivierung der Myelopoese, insbesondere der Erythropoese, im Knochenmark führt zu einer Linksverschiebung mit nur wenigen Normoblasten (HOFFMANN und SAALFELD, 1977; THIEL, 1983).

2.8 Differentialdiagnose

Die porcine Eperythrozoonose zeichnet sich durch sehr unterschiedliche klinische Erscheinungsbilder aus. Daher sind differentialdiagnostisch, abhängig vom Alter und den Gewichtsklassen der Tiere, verschiedene Krankheiten zu untersuchen (HEINRITZI, 1984a). Die Thrombozytopenische Purpura der Saugferkel ist bei neugeborenen Ferkeln in Betracht zu ziehen. Sie ist auf eine Antigen-Antikörperreaktion zurückzuführen. Bei mehrmaliger Paarung mit demselben Eber ist eine Sensibilisierung und Immunisierung der Sau gegen paternale Thrombozyten-Antigene der Ferkel zu beobachten. Mit der Kolostrumaufnahme kommt es zu Unverträglichkeitsreaktionen mit den Thrombozyten des Ferkels. Die betroffenen Ferkel zeigen Blässe, Mattigkeit, petechiale bis flächenhafte Blutungen in der Subkutis und sterben nach wenigen Tagen (SCHMIDT et al., 1977).

In den Mittelmeerländern, in Afrika und Südosteuropa sind die dort vorkommenden Blutparasiten wie Trypanosomen und Babesien differentialdiagnostisch abzuklären (ROMMEL, 1992).

Beim Schwein ist eine der häufigsten Ursachen für Ikterus eine Intoxikation. Neben Kohlen- teerderivaten und Dinitroverbindungen verursachen photosensibilisierende Pflanzen, toxische Unkrautsamen, Gossypol und Cyanamid einen Ikterus (HEINRITZI, 1984a; HEINRITZI, 1986).

Die Durchblutungsstörungen der Akren sind kein pathognomisches Merkmal für die Eperythrozoonose. Zyanotische Veränderungen an der Ohrmuschel können auch durch Rechts-

Herz-Insuffizienz, Thromboendokarditis valvularis, bei schweren Pneumonien, bei einer Salmonellen-Infektion, aber auch bei Vergiftungen, wie Ricin- oder Nitrat-Nitrit-Vergiftung auftreten (HEINRITZI, 1984; BUGNOWSKI et al., 1986). Die ebenfalls bei langanhaltenden eperythrozoontischen Anfällen vorkommenden Nekrosen der Ohrhälften sind auch bei Ergotismus, nach Erfrierungen oder nach paravenöser Applikation reizender Medikamente anzutreffen (HEINRITZI, 1990b).

Bei allergischen Hautveränderungen, wie sie bei chronischen *M. suis*-Infektionen auftreten, muss differentialdiagnostisch an die Schweinepest gedacht werden (KORN und MUSSGAY, 1968). Die Eperythrozoonose geht einher mit einer Leukozytose und einer später auftretenden Anämie, während bei einer Schweinepest eine Leukopenie bei relativer Lymphozytose zu erwarten ist (HEINRITZI, 1990b).

2.9 Diagnose

2.9.1 Klinische Diagnose

Eine sichere Diagnose einer *M. suis*-Infektion kann nur zum Zeitpunkt des akuten Krankheitsgeschehens gestellt werden (HEINRITZI, 1990a). Neben den Leitsymptomen Fieber, Anämie und Ikterus können Apathie, Anorexie, Zyanosen und Nekrosen an den Akren sowie allergische Hautveränderungen ebenfalls eine Begleiterscheinung der Eperythrozoonose sein. Diese klinischen Symptome findet man bevorzugt bei Einzeltieren nach zootechnischen Eingriffen und anderen besonderen Belastungen wie Rankkämpfe und Umställen (BOLLWAHN, 1982; HEINRITZI, 1984a; HEINRITZI, 1990a).

2.9.2 Hämatologische und serologische Veränderungen

Klinisch gesehen findet man bei der Eperythrozoonose das typische Bild einer normochromen, normozytären Anämie. Dies wird im roten Blutbild durch den parallelen Abfall der Erythrozytenzahl, des Hämatokritwertes und des Hämoglobingehaltes während der bakteriämischen Phase deutlich (BOLLWAHN, 1982; HEINRITZI, 1984a; HEINRITZI, 1990a). Das Blut erscheint dünnflüssig, wässrig und lackfarben. Bei Abkühlung auf Raumtemperatur zeigt es eine Mikroagglutination, wobei der Blutfilm feingrieselig an der Wand des EDTA-Röhrchens herunterläuft (HEINRITZI, 1984a; HEINRITZI, 1990a). Die Spontanagglutination führt zu einer erhöhten Blutsenkung. Beide Erscheinungen werden durch die Kälteagglutinine hervorgerufen, die bei einer *M. suis*-Infektion gebildet werden.

Das weiße Blutbild verändert sich im Sinne einer neutrophilen Leukozytose (BOLLWAHN, 1982).

Während der klinisch akuten *M. suis*-Infektion kann man einen drastischen Abfall des Blutglukosespiegels mit Werten zwischen 10 bis 20 mg pro dl beobachten (ZACHARY und SMITH, 1985). Sogar Werte unter 10 mg/dl konnten festgestellt werden (PETERANDERL, 1988). Der Glukoseverlauf im Serum verhält sich umgekehrt proportional zur Anzahl der Erreger im Blut (PETERANDERL, 1988).

Der Gehalt an Bilirubin im Serum ist geringgradig erhöht. Der Säure-Basenhaushalt ist während eines akuten Anfalls im Sinne einer respiratorischen und metabolischen Azidose verändert (HEINRITZI et al., 1990; HEINRITZI, 1990b).

Es kommt ein bis zwei Tage vor dem Höhepunkt der Bakteriämie zu einer deutlichen Erhöhung der Mykoplasmen. Zum Höhepunkt des akuten Anfalls sind sie in Massen im Ausstrich feststellbar. Zeitgleich dazu kann eine langsame Abnahme des Hämoglobin- und Hämatokritgehaltes sowie der Erythrozytenzahl und ein Anstieg des Bilirubingehaltes beobachtet werden (BUGNOWSKI et al., 1986).

2.9.3 Mikroskopischer Erregernachweis

Der sichere Nachweis einer Eperythrozoonose im Blutaussstrich ist nur während eines akuten Anfalls möglich (HEINRITZI, 1990a).

Eine gute Ausstrichqualität ist nötig, damit *M. suis* mit ausreichender Sicherheit im Lichtmikroskop dargestellt werden kann. Um die bei einem akuten Anfall entstehende Erythrozyten-Agglomeration durch die Kälteagglutinine zu verhindern, muss das Blut und der Objektträger vor dem Ausstreichen auf 38°C erwärmt werden (HEINRITZI, 1990a).

Die Giemsa-Färbung ist die am weitesten verbreitete Färbemethode zur Sichtbarmachung von *M. suis* im Blutaussstrich (HEINRITZI, 1990a). Bei dieser Anfärbung als auch beim Nachweis mit Schnellfärbemethoden (Testsimplets®, Boehringer, Mannheim) ist es möglich, dass Artefakte wie Verunreinigungen oder Farbausfällungen fälschlicherweise als *M. suis* angesehen werden (HEINRITZI, 1990a). Ein weiterer Nachteil ist, dass bei einer chronischen Form der Eperythrozoonose die Bakterien mit Giemsa oder Pappenheim nicht von der Erythrozytenmembran abgegrenzt werden können (LIEBICH und HEINRITZI, 1992). Mit Hilfe der Akridinorange-Färbung lässt sich *M. suis* in seiner unterschiedlichen Form unter dem Fluoreszenzmikroskop darstellen (KREIER und GOTHE, 1976). Bei dieser Methode sind *M. suis*-

Partikel während der akuten Phase als hell- bis dunkelorange Punkte, im chronischen Verlauf als hellgelbe bis hellgrüne kleine Punkte am Rand der Erythrozyten oder frei im Plasma nachweisbar (HEINRITZI, 1990a; HEINRITZI, 1990b; LIEBICH und HEINRITZI, 1992). Auch bei schwachem Befall können die Erreger durch das orange Leuchten vor dem dunklen Hintergrund gut erkannt werden. Durch die Anfärbung der Kerne und Kernreste besteht die Gefahr, dass die unreifen Erythrozyten und Jolly-Körperchen zu Fehlinterpretationen führen können (HEINRITZI, 1990a).

Durch die intravenöse Applikation von Tetracyclin unmittelbar vor der Blutentnahme ist es möglich, *M. suis* als hellgelbe bis weiße Punkte am grün gefärbten Erythrozyten sichtbar zu machen (HEINRITZI, 1990a).

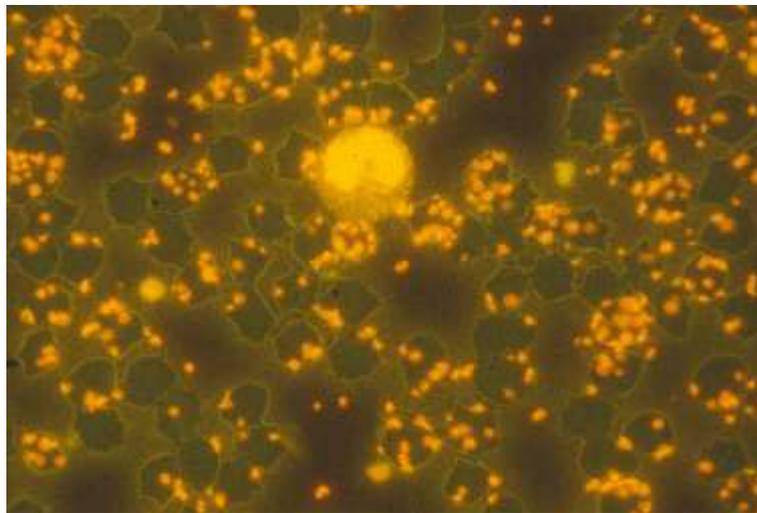


Abbildung 1: Akridinorange-Ausstrich während eines akuten Anfalls

Im Durchschnitt findet man im akuten Eperythrozoonose-Anfall zwischen 80 und 90 % der Erythrozyten als *M. suis*-infiziert. Der Nachteil der Mikroskopie liegt in ihrer niedrigen Sensitivität und Spezifität, da die Zeitspanne einer sicher identifizierbaren Bakteriämie sehr kurz ist. Zudem lässt sich bei stark anämischen als auch chronisch infizierten Tiere keine Bakteriämie diagnostizieren (HEINRITZI, 1990a).

2.9.4 Biologische Diagnose

In der Vergangenheit wird die Splenektomie verdächtiger Tiere als einzig sichere Methode genannt, um eine Eperythrozoonose nachzuweisen bzw. auszuschließen. Bei vorhandener *M. suis*-Infektion tritt bei den betroffenen Schweinen innerhalb von sechs bis zehn Tagen nach der Splenektomie das Erscheinungsbild eines akuten Anfalls auf. Alternativ ist es möglich,

Vollblut des zu testenden Tieres auf bereits splenektomierte Schweine zu übertragen. Das Spendertier gilt als positiv, wenn beim Empfängertier in einem Zeitraum von sechs bis zehn Tagen klinische Symptome einer akuten *M. suis*-Infektion beobachtet werden (BOLLWAHN, 1982; HEINRITZI, 1984b).

Die Diagnose kann durch einen Erregernachweis im Blut bestätigt werden.

Als Ursache für die drastische Vermehrung der Mykoplasmen nach der Splenektomie ist in der Filterfunktion der Milz zu sehen. Die befallenen Erythrozyten können nicht mehr zerstört werden, so dass es zu einer massenhaften Vermehrung des Erregers kommt (HEINRITZI, 1990b).

2.9.5 Serologische Nachweisverfahren

Mit Hilfe der serologischen Nachweisverfahren ist es möglich, *M. suis*-Infektionen außerhalb eines akuten Anfalls und damit in Phasen zu erkennen, in denen nur eine geringe Mykoplasmenzahl im Blut beobachtet werden kann.

In der Vergangenheit sind drei serologische Verfahren zur Bestimmung der serologischen Antikörper entwickelt worden: eine Komplementbindungsreaktion (KBR; SPLITTER, 1958; SCHULLER et al., 1990), ein indirekter Hämagglutinations-Test (IHA; SMITH und RAHN, 1975; BALJER et al., 1989) und ein ELISA (SCHULLER et al., 1990).

Komplementbindungsreaktion

Die Komplementbindungsreaktion (KBR) wird erstmals von SPLITTER (1958) als Nachweis einer *M. suis*-Infektion beschrieben. Das Ergebnis des KBR-Tests ist 1 bis 7 Tage nach einer akuten Eperythrozoonose und bei wiederholt auftretenden Krankheitsausbrüchen für 14 bis 21 Tage positiv (SPLITTER, 1958). Latent infizierte Tiere reagieren negativ.

SCHULLER et al. (1990) konnten bei infizierten, splenektomierten Schweinen einen höheren Antikörpertiter als bei infizierten, nicht splenektomierten Tieren feststellen. Dies wird auf eine Abhängigkeit zwischen Erregervermehrung im Tier und Ausprägung des Antikörpertiters zurückgeführt.

Indirekter Hämagglutinations-Test

Nach Untersuchungen von SMITH und RAHN (1975) können mit Hilfe des indirekten Hämagglutination-Tests (IHA) auch latent infizierte Tiere erkannt werden. Allerdings ist diese Studie nur an splenektomierten Tieren durchgeführt worden. Nach Untersuchungen von BALJER et al. (1989) können bei nicht splenektomierten, latent infizierten Tieren ohne akuten Anfall kein oder nur ein sehr geringer Antikörper-Titer in der IHA nachgewiesen werden.

Der IHA ist an das Vorhandensein von IgM-Antikörper gebunden. Es handelt sich um Kälteagglutinine, die nicht spezifisch gegen die Mykoplasmen, sondern gegen die durch den Erreger geschädigte Erythrozytenmembran gerichtet sind (SMITH und RAHN, 1975; ZACHARY und SMITH, 1985; HEINRITZI, 1990a).

Erst nach klinischer Manifestation der Erkrankung erfolgt der Anstieg des Antikörper-Titers, der über 2 bis 3 Monate persistiert und dann wieder abfällt. Bei infizierten Tieren ist ein charakteristischer wellenförmiger Verlauf des Antikörper-Titers zu beobachten. Grund dafür ist, dass jeder neue klinische Anfall eine erneute Antikörper-Produktion auslöst. Eine typische Boosterreaktion im Sinne eines immunologischen Gedächtnisses bleibt dabei aber aus (BALJER et al., 1989). Der Nachweis des Antikörper-Titers ist nur in einem kurzen Zeitraum möglich. Das ist für eine Infektionskrankheit untypisch. Als Grund dafür werden die IgM-Kälteagglutinine genannt, die in zeitlicher Abhängigkeit von einer *M. suis*-Bakteriämie und nicht bereits zum Zeitpunkt der Infektion gebildet werden.

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

SCHULLER et al. (1990) gelingt es zum ersten Mal, Antikörper gegen *M. suis* mittels eines indirekten ELISAs festzustellen. Die Aufreinigung des *M. suis*-Antigens erfolgt nach der Methode von SPLITTER (1958). Hierbei wird der Erreger nicht von der Erythrozytenmembran getrennt und die Präadsorption der zu untersuchenden Seren mit Schweineerythrozyten dient dazu, eine unspezifische Reaktion der im Serum enthaltenen IgM-Antikörper mit den in der Ag-(Antigen)-Präparationen vorhandenen Erythrozyten zu verhindern (SCHULLER et al., 1990).

Um den 13. Tag nach einem akuten Anfall kommt es bei splenektomierten Tieren zu einem Antikörper-Titeranstieg, der über sieben Wochen bestehen bleibt. Bei nicht splenektomierten

Schweinen zeigt sich zwischen der dritten und der fünften Woche ein positives Ergebnis mit einem geringeren Titeranstieg im Vergleich zu splenektomierten Tieren (SCHULLER et al., 1990). Aufgrund des sehr unterschiedlichen Titerverlaufs der einzelnen Tiere, vermutet SCHULLER et al. (1990), dass die Reaktion des körpereigenen Immunsystems und die davon abhängige Antikörperausbildung davon abhängig ist, inwieweit eine Erregervermehrung im Tier stattgefunden hat. Die Titerausprägung steht im direkten Zusammenhang mit der Virulenz der verwendeten Stämme (SCHULLER et al., 1990).

Diese serologischen Nachweisverfahren können für die Herdendiagnostik verwendet werden, das Aufspüren einzelner, infizierter Tiere ist aber aufgrund der immer wieder auftretenden falsch-negativen Titer, bedingt durch die wellenförmige Antikörperproduktion, nicht möglich (HEINRITZI, 1990a; SCHULLER et al., 1990). Ein weiteres Problem ist die für Infektionskrankheiten atypische kurzzeitige Antikörperpersistenz. Es kommt zu keiner Ausbildung von protektiven Antikörpern und dadurch häufig zu falsch-negativen Ergebnissen (BALJER et al., 1989; HEINRITZI, 1990a).

Ferner besitzen alle drei serologischen Tests den Nachteil, dass sie mit komplexen, nicht genau definierten *M. suis*-Antigenen, die aus dem Blut von experimentell infizierten Schweinen aufgereinigt werden, durchgeführt werden müssen. Mit allen drei Verfahren ist ausserdem nur der Nachweis der Kälteagglutinine der Klasse IgM möglich. Näher spezifizierte *M. suis*-spezifische Immunglobuline der Klasse G werden nicht gemessen.

HOELZLE et al. (2006) arbeiten an der Etablierung neuer serologischer Nachweisverfahren. Dazu wird zunächst eine detaillierte Analyse der humoralen Immunantwort gegen *M. suis* und der Antigenstruktur von *M. suis* durchgeführt. Das Testantigen wird aus dem Blut infizierter Schweine gewonnen. Als Zielproteine einer IgG-Immunantwort während einer *M. suis*-Infektion werden acht *M. suis*-spezifische Antigene (p33, p40, p45, p57, p61, p70, p83) nachgewiesen. Drei dieser Proteine (p40, p45, p70) zeigen sich als Hauptantigene, da sie im Verlauf einer Infektion ab dem 14. Tag p.i. bis zum Ende des Versuchszeitraumes vom Immunsystem beantwortet werden. Die Forschungsgruppe von HOELZLE et al. (2006) können nachweisen, dass mit den *M. suis*-Testantigenen auch porcine Immunglobuline mit aufgereinigt werden. Durch Depletion dieser Immunglobuline wird die Spezifität und Sensitivität eines auf Blutpräparationen basierten ELISAs signifikant verbessert. Zwei unterschiedliche Testsysteme stehen derzeit für eine Erreger-spezifische Serodiagnostik zur Verfügung:

(1) Ein ELISA mit Ig-depletiertem *M. suis*-Antigen

(2) Ein *M. suis*-spezifischer Western Blot

Zwei der Hauptantigene (p40=MSG1, p70=HspA1) werden rekombinant in *E. coli* exprimiert und als Testantigene im ELISA eingesetzt. Rekombinante Proteine ermöglichen eine *in vitro* Produktion von Testantigenen. Dadurch ist bei der Präparation der *M. suis* Antigene kein Tierversuch mehr nötig. Ein Vorteil, der zukünftig den Einsatz der *M. suis*-Serologie auch in Routinelabors möglich macht (HOELZLE et al., 2006).

Die Western Blot-Analyse hat den Vorteil, dass durch die Auftrennung des heterogenen Proteingemisches in der SDS-Page der Nachweis von *M. suis*-spezifischen Partialantigenen möglich ist. Ab einer bestimmten Nachweisgrenze ist der Western Blot unabhängig von der Erregerzahl und der daraus resultierenden Ag- Bildung. Der Western Blot ist somit ein qualitatives Nachweisverfahren im Gegensatz zum ELISA. Der Vorteil gegenüber der KBR, der IHA und dem ELISA besteht darin, dass spezifisch gegen *M. suis*-Partialantigene gerichtete Antikörper und keine Kälteagglutinine gemessen werden (FISCHER, 2003).

2.9.6 Molekularbiologischer Nachweis von *Mycoplasma suis* mittels PCR

Molekularbiologischer Nachweis von *M. suis*

Der erste molekularbiologische Nachweis wird von OBERST et al. (1990a) publiziert. Sie isolieren Gesamt-*M. suis*-DNA, mit deren Hybridisierung eine Detektion von *M. suis*-DNA im Vollblut experimentell infizierter Schweine möglich war. Radioaktiv markierte *M. suis*-DNA wird als Sonde eingesetzt. Anhand von Slot-Blot-Hybridisierungen und herkömmlichen Southern-Blot-Hybridisierungen wird die Spezifität der DNA bestimmt. Einzeltiere konnten in dieser Studie unter experimentellen Bedingungen als positiv identifiziert werden. Eine Standardisierung des gesamten Vorgangs ist nicht möglich, da infizierte, splenektomierte Schweine als Erregerreservoir dienen müssen und die DNA in der Quantität abhängig von der Schwere der Bakteriämie variiert.

Der gleichen Arbeitsgruppe (OBERST et al., 1990b) gelingt es mittels verdauter *M. suis*-DNA eine Gendatenbank zu erstellen. Ein *M. suis*-spezifischer rekombinanter Klon (KSU-2) konnte durch Hybridisierung mit radioaktiv markierter *M. suis*-DNA identifiziert werden.

Diese rekombinante DNA hybridisiert spezifisch mit der DNA von gereinigten *M. suis*-Organismen, als auch mit der DNA, die direkt aus dem Blut infizierter Schweine isoliert wird (OBERST et al., 1990b).

Die Etablierung einer *M. suis*-spezifischen PCR wird von GWALTNEY et al. (1993) erstmals publiziert. Diese PCR erlaubt die Detektion von klinisch inapparenten sowie akut infizierten Tieren. Die Primer werden aus der DNA-Sequenz des KSU-2-Klons nach Restriktionsenzymverdau mit *Bam*HI ausgewählt (GWALTNEY et al., 1993). Das Amplifikat, das eine Länge von 492 Basenpaaren hat, wird mit einer KSU-2-Sonde hybridisiert. Diese Methode ermöglicht es, *M. suis* 24 Stunden *post infectionem* im Blut infizierter Tiere nachzuweisen (OBERST et al., 1993). Die untere Nachweisgrenze der PCR liegt bei 450 pg *M. suis*-DNA, was etwa 5000 *M. suis*-Organismen entspricht (GWALTNEY et al., 1993). Das PCR-Protokoll kann sowohl für die Routinediagnostik als auch für Untersuchungen zur Pathogenese verwendet werden (GWALTNEY et al., 1993). Die Sensivität und Spezifität ist bei dieser Methode höher als bei den serologischen Testverfahren, so dass eine Identifizierung einzelner infizierter Tiere möglich ist (GWALTNEY et al., 1993).

Durch eine Verbesserung des PCR-Protokolls kann *M. suis*-DNA auch in latent infizierten, nicht splenektomierten Tieren detektiert werden (GWALTNEY und OBERST, 1994). GWALTNEY und OBERST (1994) gelingt es bei zwei der vier Schweine bereits vor der experimentellen Infektion *M. suis*-DNA zu amplifizieren. Dies lässt auf eine latente Infektion schliessen, welche in vorhergehenden Screening-Tests (Blutausstrich und/oder indirekte Hämagglutination) nicht erkannt worden war.

Ein weiterer PCR-Test basierend auf 16S rRNA-Gensequenzen wird von RIKIHISA et al. (1997) etabliert. Mit Hilfe von phylogenetischen Analysen, die auf diesem Gen basieren, kann eine engere Verwandtschaft von *M. suis* und *Haemobartonella* spp. zu *Mycoplasma* spp. als zu *Anaplasma marginale* nachgewiesen werden (RIKIHISA et al., 1997). MESSICK et al. (2000) klonieren und sequenzieren dieses Gen und verwenden schon bekannte hypervariable Regionen zur Herstellung von *M. suis*-spezifischen Primer.

Die Etablierung einer *M. suis*-spezifischen PCR auf der Basis von neuen definierten Erregersequenzen wird von HOELZLE et al. (2003) publiziert. Nach Isolierung der genomischen *M. suis*-DNA wird durch Unterschneidung der DNA ein Fragment isoliert, welches bei allen DNA-Präparationen aus Blut verschiedener Schweine im akuten Anfall gefunden wurde. Dieses 1,8 kb-grosses *Eco*RI-*M. suis*-Genomfragment wird sequenziert und analysiert. Basierend auf diesen Ergebnissen können Oligonukleotidprimer bestimmt werden, von denen ausgehend

ein PCR entwickelt wird (ADELT, 1999). Zur weiteren Spezifizierung der PCR erfolgt eine Southern-Blot- und Dot-Blot-Analyse. Dazu wird das klonierte und mit Digoxigenin markierte Amplifikat als Gensonde eingesetzt. Die Analysen zeigen, dass das Amplifikat nur mit den DNA-Präparationen der *M. suis*-DNA hybridisiert und somit die PCR spezifisch für *M. suis* ist. Mit Hilfe der *M. suis*-PCR wird eine untere Nachweisgrenze von $1,7 \times 10^{-7}$ ng DNA pro Mikroliter Probe festgelegt. Die analytische Sensitivität der PCR ist bei ca. 400 Genomäquivalente. Mittels dieser PCR ist es möglich, auch latente Infektionen mit geringen Infektionstern im Blut nachzuweisen (ADELT, 1999).

Quantitativer Nachweis von *M. suis*

Für den quantitativen Nachweis von *M. suis* etablieren HOELZLE et al. (2007b) eine LightCycler® (LC) real-time PCR. Dadurch kann *M. suis* nun trotz seiner Unkultivierbarkeit quantifiziert werden.

Durch ihre hohe Standardisierung, Reproduzierbarkeit, Automatisierung und dem geringen Kontaminationsrisiko lässt sich die PCR-Diagnostik nun auch in Routinelabors einsetzen. Als Basis dieser PCR dient das immunogene *M. suis*-Protein MSG1, welches glycolytisch aktiv ist und an der Bindung der Mykoplasmen an die Erythrozytenoberfläche beteiligt ist (HOELZLE et al., 2007c). Die analytische Spezifität der LightCycler® (LC) real-time PCR wird durch die Testung der DNA von *M. suis*-Isolaten, *M. suis*-negativen Schweineblut und Gewebeproben, sowie verschiedene Mykoplasmen-Spezies und andere Bakterien bestimmt.

Um latent verlaufende *M. suis*-Infektionen erkennen zu können, ist eine niedrige Nachweisgrenze von ausschlaggebender Bedeutung. Die DNA-Konzentration wird mit Hilfe der Spektralphotometrie gemessen und die Bakterienanzahl anhand des Genomgewichts berechnet. Die LC real-time PCR weist eine untere Nachweisgrenze von 10 bis 100 DNA-Kopien auf. Damit ist die Sensitivität im Vergleich zur herkömmlichen PCR um 4- bis 40-fach höher. Um die Spezifität und Sensitivität der LightCycler® (LC) real-time PCR zu ermitteln, werden Blutproben von 30 experimentell mit *M. suis*-infizierten Schweinen, die klinische Anzeichen einer akuten Eperythrozoonose aufweisen, und von 30 gesunden, nicht-*M. suis*-infizierten Schweinen untersucht. Alle der 30 *M. suis*-positiven Proben werden in der PCR als positiv erkannt. Daraus ergibt sich eine Sensitivität von 100%. In der Gruppe der nicht mit *M. suis*-infizierten Schweine werden 29 der 30 Tiere negativ getestet. Dies entspricht einer Spezifität von 96,7%.

Werden die Ergebnisse der LightCycler® (LC) real-time PCR mit denen der herkömmlichen PCR verglichen ergibt sich eine hohe Übereinstimmung in der Gruppe, die eine hohe Erreger-

zahl im Blut aufweist. Tiere mit geringen Erregermengen im Blut werden von der herkömmlichen PCR nur zu 90% erkannt.

Der quantitative Nachweis in den verschiedenen Phasen der Infektion (akut, klinisch inapparent) könnte wichtige Erkenntnisse über eine Korrelation zwischen Erregeranzahl und klinischen Parametern beziehungsweise dem Schweregrad der porcinen Eperythrozoonose liefern. Dadurch könnte der Therapiezeitpunkt optimiert und die Wirkung der antibiotischen Therapie überwacht werden. Außerdem ist der Erregernachweis in potentiellen Trägertieren besonders für die Pathogenese von *M. suis*-Infektionen von Bedeutung. Ebenso ermöglicht die Quantifizierung von *M. suis* auch eine Standardisierung von serologischen Testantigenen.

2.10 Therapie und Hygienemaßnahmen

Bei einer akuten Erkrankung führt die parenterale Behandlung mit Oxytetracyclin in einer Dosierung von 20 – 30 mg pro kg KGW oft schlagartig zur klinischen Besserung (BUGNOWSKI et al., 1986). BOLLWAHN (1982) beobachtet bereits nach einer einmaligen Injektion von 10 – 20 mg pro kg KGW i.m. innerhalb von 12 Stunden eine deutliche Besserung. Allerdings lässt sich weder mit parenteraler Gabe noch mit oraler Dauerapplikation eine Eliminierung der Mykoplasmen erreichen (HEINRITZI, 1984a; BUGNOWSKI et al., 1986). Bei Saugferkeln, bei einer chronisch verlaufenden Eperythrozoonose und bei einem hochgradig erniedrigten Blutzuckerspiegel sollte darüber hinaus auf eine ausreichende Eisen- und Glukoseversorgung geachtet werden (HENRY, 1979). Eine Prävention und Kontrolle der porcinen Eperythrozoonose ist nur über konsequente Hygiene- und Desinfektionsmassnahmen in den Betrieben besonders bei allen blutigen Eingriffen sowie durch die Verwendung von Einmalkanülen zu erreichen. Ebenso ist auch eine strikte Ekto- und Endoparasitenbekämpfung durchzuführen (HEINRITZI; 1984a). Ein Ausbruch der Erkrankung kann durch optimale und stressarme Haltungsbedingungen verhindert werden (HEINRITZI; 1989).

2.11 Impfung

Eine Impfung war bisher noch nicht möglich. *M. suis* ist *in vitro* nicht kultivierbar. Deshalb müssen potentielle Impfstoffe aus dem Blut von infizierten Schweinen mit einem akuten Anfall aufgereinigt werden. Dies bringt das Risiko mit sich, dass die Impfstoffe Komponenten des Schweineblutes enthalten, die Autoimmunprozesse im Impfling induzieren könnten. Die isolierten *M. suis*-Zellen sind voll virulent und es besteht zur Zeit keine Möglichkeit zur Atte-

nuierung. Die zwei *M. suis*- Proteine MSG1 und HspA1, die im Labor rekombinant hergestellt werden konnten, stellen mögliche Impfkandidaten dar (HOELZLE et al., 2007c; HOELZLE, 2007; HOELZLE et al., 2007a).

2.11.1 Immunologische Grundlagen der erworbenen Immunität

Das Immunsystem ermöglicht einem Organismus, auf verschiedene Pathogene wie Viren, Bakterien und Parasiten zu reagieren, und diese zu bekämpfen. Es lassen sich zwei Abwehrmechanismen unterscheiden: 1. die unspezifische, angeborene Resistenz (natürliche Immunität), hierzu gehören z.B. das Komplementsystem, natürliche Killerzellen und die zur Phagozytose befähigten Zellen. 2. die spezifische, erworbene (adaptive) Immunität, hierzu gehören das B- und T-Zellsystem, die Fähigkeit zur Unterscheidung von körperfremd und körpereigen und die Gedächtnisfunktion (MAYR, 2001).

Im Zusammenhang der Stimulation von Immunreaktionen durch Immunisierungen, wird hier auf die erworbene Immunität eingegangen.

2.11.1.1 Das T-Zellsystem

Die zellvermittelte Immunantwort wird durch die im Thymus gebildeten T-Zellen vermittelt, die entweder CD 4- oder CD 8-Moleküle auf ihrer Zelloberfläche exprimieren. Die CD 4+-T-Zellen, auch T-Helferzellen genannt, besitzen überwiegend immunregulatorische Funktionen und produzieren nach Kontakt mit dem Antigen hormonähnliche Botenstoffe, sogenannte Lymphokine. Die T-Helferzellen lassen sich in zwei Subtypen unterteilen: Th 1- und Th 2-Zellen.

Die Th 1-Zellen sind an Immunantworten der verzögerten Typ IV-Reaktion (Überempfindlichkeitsreaktion) beteiligt. Sie produzieren Interleukin 2 (IL-2) und Interferon- γ und spielen eine Rolle bei der Makrophagen-Aktivierung.

Die Th 2-Zellen sind von entscheidender Bedeutung für die Reifung von B-Zellen zu antikörperproduzierenden Plasmazellen. Sie werden vermehrt gebildet, wenn eine große Menge an IgG-Antikörpern benötigt wird.

Die CD 8+-Zellen, auch als zytotoxische Zellen bezeichnet, identifizieren und zerstören diejenigen Zellen im Körper, die fremde Genprodukte exprimieren. Sie spielen also bei viralen

Erkrankungen und auch bei gewissen bakteriellen Krankheiten, mit sich intrazellulär vermehrenden Bakterien, eine wichtige Rolle (SPIESS, 1999).

T-Zellen sind im Gegensatz zu B-Zellen erst fähig freie oder als Bestandteile von Antigenen umherschwimmende Epitope zu erkennen, wenn diese Epitope zusammen mit MHC-Antigenen auf der Oberfläche von Zellen präsentiert werden (T-Zell-Restriktion). Die MHC (major histocompatibility complex)-Moleküle zählen zur Immunglobuline-Superfamilie. Man unterscheidet zwei Klassen, MHC-Klasse-I und MHC-Klasse-II. Die MHC-I-Moleküle sind auf allen kernhaltigen Körperzellen vorhanden. Intrazelluläre Antigene werden in Oligopeptide zerlegt, in geeignete Abschnitte an die Zelloberfläche befördert und als MHC-I-Peptidkomplexe präsentiert. Die so präsentierten Antigene werden durch spezifische CD 8+-Zellen erkannt. MHC-II-Moleküle findet man nur auf spezifischen Antigenpräsentierenden Zellen (Dendritische Zellen, Makrophagen und B-Zellen). MHC-II-Moleküle sorgen bei extrazellulären Antigenen für eine entsprechende Antigenpräsentation an der Zelloberfläche. Die entstandenen MHC-II-Peptid-Komplexe dienen so als Liganden für die spezifischen CD 4+-T-Zellen (SPIESS, 1999).

2.11.1.2 Das B-Zellsystem

Die B-Zellen sind für die humorale Immunantwort verantwortlich. Sie stellen die Vorläuferzellen der Antikörper-produzierenden Plasmazellen dar und tragen nach erfolgtem „Rearrangement“ auf ihren Zelloberflächen als Rezeptoren Kopien der später in großen Mengen produzierten, spezifischen Immunglobuline. Durch Kontakt mit dem entsprechendem Antigen (Epitop) wird eine Differenzierung der B-Zelle zu Plasmazellen induziert, die dann Antikörper (Paratop) in grossen Mengen sezernieren (KAYSER et al., 2005). Den B-Zellen ist es im Gegensatz zu den T-Zellen nur möglich löslich Antigene, die nicht nur aus Proteinen, sondern auch aus Nukleinsäuren oder Polysacchariden bestehen können, zu erkennen. Diese Antigene können in T-Zell-abhängige und T-Zell-unabhängige eingeteilt werden. Die T-Zell-unabhängigen Antigene besitzen Epitope, die ein vielfaches, regelmäßiges Muster tragen, das bei bestimmten Polysacchariden auftritt. Diese Polysaccharide sind in den Kapselstrukturen vieler Bakterien vorhanden und ermöglichen den B-Zellen zu Antikörper-sezernierenden Plasmazellen zu reifen, ohne das die Anwesenheit von MHC-restringierten T-Helferzellen nötig ist. Bei dieser Immunantwort werden meist Antikörper vom IgM-Typ gebildet und es entsteht kein immunologisches Gedächtnis (SPIESS, 1999). Der Kontakt eines B-Zellrezeptors mit dem passenden Epitop genügt oft nicht um die Proliferation der B-Zellen auszulösen. Es sind weitere T-Zell-vermittelte Signale nötig und man spricht von T-Zell-abhängigen Antigen-

nen. Bei der Immunisierung mit Protein-Antigenen erkennen T-Helfer-Zellen die auf B-Zellen gebildeten Antigen-MHC-Komplexe und setzen darauf Wachstums- und Differenzierungsfaktoren für B-Zellen (IL-2, IL-4, IL-5...) frei. Erst dadurch wird ein Klassensprung von IgM nach IgG und IgA ausgelöst. Folge ist die Bildung von Memory-Zellen und eine wesentliche Steigerung der Antikörperaffinität (KAYSER et al., 2005).

2.11.1.3 Das immunologische Gedächtnis

Nach Auseinandersetzung mit einem Infektionserreger kommt es im Idealfall zu einer langdauernden, mitunter lebenslangen Immunität. Dies ist der Fall, wenn es zuvor zur Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses gekommen ist. Bei einer akuten Infektion (Primärantwort) werden die aktivierten Lymphozyten überwiegend zu Plasmazellen differenziert. Ein kleiner Teil entwickelt sich zu langlebigen Gedächtniszellen, sogenannten „*memory cells*“, die das relevante Paratop tragen. Die Gedächtniszellen haben eine Lebensdauer von mindestens 5-6 Jahren, so dass sie meist noch im Körper vorhanden sind, auch wenn sich keine spezifischen Antikörper nachweisen lassen. Bei einem erneuten Kontakt mit dem gleichen Antigen mobilisieren die schneller aktivierten Memory-Zellen die notwendigen Immunprodukte einfacher und schneller. Die gesamte Immunantwort verläuft stark beschleunigt (sekundäre Immunantwort) ab und der Organismus ist von einem erneuten Ausbruch der Krankheit geschützt (SPIESS, 1999).

2.11.2 Impfstoffarten im Überblick

Die häufigsten verwendeten Impfstoffe in der heutigen Zeit sind Lebend- oder Totimpfstoffe. Lebendimpfstoffe bestehen aus lebenden, attenuierten Mikroorganismen (Bakterien oder Viren), die noch in der Lage sind sich im Wirtsorganismus zu replizieren. Die Lebendimpfstoffe zeigen eine signifikant höhere Immunogenität als inaktivierte Impfstoffe, da die natürliche Infektion nahezu perfekt imitiert wird und rufen sowohl eine humorale als auch eine zelluläre Immunantwort hervor. Der größte Nachteil dieser Impstoffklasse besteht in einem potentiellen Rückfall der attenuierten Vakzine in die natürliche Virulenz via Rückmutation und die Gefahr der Erkrankung bei Tieren mit geschwächtem Immunsystem (SHAMS, 2005).

Totimpfstoffe enthalten keine vermehrungsfähigen Viren oder Bakterien. Man unterscheidet Vollkeim-, Toxoid-, Spalt- oder Subunit-Vakzine. Diese Impfstoffe benötigen eine höhere Quantität an Antigenen als Lebendimpfstoffe um eine adäquate immunologische Immunantwort zu stimulieren. Diese wird im Allgemeinen durch B-Zellen und CD 4+-T-Zellen vermit-

telt. Bei der Herstellung der meisten Impfstoffe dieser Klasse ist die Zugabe von Adjuvantien (Immunmodulatoren) erforderlich. Um eine langanhaltende Immunität aufzubauen, ist bei einer Vielzahl dieser Impfstoffe eine aus mehreren Dosen bestehende Grundimmunisierung mit darauf folgenden Auffrischungsimpfungen nötig. Diese Tatsache und die Notwendigkeit einer hohen Antigenkonzentration innerhalb der einzelnen Dosen macht die Anwendung von Totimpfstoffen relativ kostenintensiv (SHAMS, 2005).

Eine zentrale Rolle bei der Entwicklung von neuen, modernen Impfstoffen spielt die Gentechnologie. Mehrere Arten dieser gentechnisch modifizierten Vakzinen werden derzeit experimentell getestet: 1. *subunit* oder Spaltimpfstoffe, 2. DNA/RNA- Vakzine, 3. Vector-Vakzinen, 4. *defective in second cycle* Impfstoffe sowie 5. rekombinante Lebendvakzine. Gentechnische Veränderungen der Erreger wie genetische Insertionen, Deletionen oder Modifikationen können auch als Marker für die Differenzierung geimpfter von infizierten Tieren genutzt werden. Dieses auch als DIVA (*differentiating infected from vaccinated animals*) bezeichnete Prinzip nimmt in der Tierseuchenbekämpfung eine wichtige Rolle ein (BEER und METTENLEITER, 2003).

Subunit- oder Spaltvakzine enthalten im Gegensatz zu den vollständigen Mikroorganismen nur diejenigen Antigene des Originalorganismus, die an der schützenden Immunreaktion beteiligt sind. Voraussetzung für die Herstellung ist deshalb, dass eine eindeutige Identifizierung der verantwortlichen Antigene vorgenommen werden kann (SHAMS, 2005).

Proteine werden meist als Impfstoffkandidaten der ersten Wahl angesehen. Grund dafür ist ihre relativ einfache Identifizierung, Modifizierung und Produktion im grösseren Maßstab. Dies ist die Basis für eine kommerziell erhältliche Vakzine (HEIN und HARRISON, 2005).

2.11.2.1 Protein-Immunisierung

Protein-Impfstoffe induzieren vornehmlich eine Th 2-Immunantwort (SHEDLOCK und WEINER, 2000). Eine entscheidende Rolle spielt dabei die Präsentation des exogenen Antigens für die Induktion der hauptsächlich humoralen Immunantwort. Während Peptide endogener Proteine meist im Zusammenhang mit MCH-I-Molekülen präsentiert werden, werden MHC-II-Moleküle vornehmlich mit Peptiden exogener Proteine beladen. Die exogenen Proteine werden endozytiert und in Lysosomen gespalten. Die unbeladenen MHC-II-Moleküle werden im Endoplasmatischen Reticulum von der sog. Invarianten Kette vor Beladung mit zellulären Peptiden geschützt und über den Golgi-Apparat in die Endosomen transportiert. Lysosomen und Endosomen verschmelzen und es entstehen Endolysosomen. In ihnen wird die invariante

Kette abgebaut und die prozessierten Peptide auf die MHC-II-Moleküle geladen. Diese gelangen an die Zelloberfläche (CRESSWELL, 1994).

Der Peptid-MHC-Komplex kann von T-Zellen erkannt werden und es kommt somit zur Auslösung einer Immunantwort. Durch die Immunisierung mit rekombinanten Proteinen kann keine MHC-Klasse-I Immunantwort ausgelöst werden und somit erfolgt keine Induktion der zytotoxischen T-Zellen.

Der Schutz vor Infektionskrankheiten wird meistens nur durch eine Kombination zellulärer und humoraler Immunantwort erlangt. Aufgrund dessen ist das Ziel neuer Immunisierungsstrategien auf der Basis von Proteinen und Peptiden auch eine Th 1-Immunantwort zu stimulieren (BEDROSIAN et al., 2003; GODELAINE et al., 2003).

Impfstoffe auf der Basis von rekombinanten Proteinen und Peptiden müssen zur Steigerung der Immunogenität und zur Immunmodulation zusätzlich mit Adjuvantien versehen werden, da eine alleinige Verabreichung von Proteinen oder Peptiden nur eine schwache zelluläre Immunantwort auslöst (SINGH und O'HAGAN, 2003). Die immunologische Antwort auf eine Immunisierung kann auch durch die Dosis des Antigens, die Anzahl der Immunisierungen, die Auswahl des Adjuvans und die Applikationsart beeinflusst werden (DALTON und MULCAHY, 2001).

2.11.2.2 Adjuvantien

Adjuvantien sind definiert als eine Gruppe strukturell heterogener Bestandteile, die verwendet werden, um die Immunantwort auf ein Antigen zu erreichen oder zu verstärken (GUPTA et al., 1993; SCHIJNS, 2000). Nach COX und COULTER (1997) lassen sich die Adjuvantien in zwei Gruppen unterteilen: partikuläre- und nicht-partikuläre Adjuvantien. Im Folgenden werden die wichtigsten Adjuvantien jeder Gruppe beschrieben.

Partikuläre Adjuvantien:

Die wichtigsten Vertreter dieser Gruppe als meistgenutzte Adjuvantien sind Aluminiumhydroxid, Aluminiumphosphat oder Kalium-Aluminiumsulfat. Das Antigen bindet an die 100-1000 nm großen Partikel. Anschließend werden die Komplexe von antigenpräsentierenden Zellen aufgenommen, in kleine Peptide gespalten und MHC-II präsentiert. Durch eine vermehrte Produktion von Interleukin 4 (IL-4) erfolgt die Aktivierung der humoralen Immunantwort. Folge ist die Modulation in eine starke Th 2-Antwort, da die IL-4 die Differenzierung von Vorläuferzellen zu Th 1-Zellen hemmen (LINDBLAD, 2004).

Wasser-in-Öl-Emulsionen, wie das Freund'sche komplette und inkomplette Adjuvans, sind ebenfalls dieser Adjuvantienklasse zuzuordnen. Bei Adjuvantien vom Freund'schen Typ spielt vor allem die Balance zwischen hydrophilen und hydrophoben Anteilen eine wichtige Rolle in der Aktivität. Das Antigen wird dadurch an der Applikationsstelle gehalten und somit der Antigenkatabolismus verlangsamt. Durch das Eindringen in Immunzellen wird auch die Verteilung des Antigens im Körper verändert. Eine extensive Zellmultiplikation von Histozyten, Makrophagen, Lymphozyten und Plasmazellen ist die Folge (JOLLES und PARAF, 1973). Das in diesen Adjuvantien enthaltene Mineralöl induziert eine lokale, inflammatorische Antwort, die zur Bildung eines Granuloms an der Applikationsstelle führt. Das Antigen wird nur langsam freigesetzt. Die verzögerte Resorption erhöht die Dauer des antigenen Stimulus. Freund'sches inkomplettes Adjuvans induziert vor allem die humorale Immunantwort. Im kompletten Freund'schen Adjuvans sind zusätzlich abgetötete Mykobakterien (*Mycobacterium tuberculosis*) enthalten, die über ihren Inhaltsstoff Muramyl-dipeptid (MDP) zusätzlich Makrophagen zu Produktion von Cytokinen stimulieren. Auf diese Weise werden Th 1- und Th 2-Zellen stimuliert (TIZARD, 2000).

Andere Vertreter dieser Adjuvantien sind die immunstimulatorischen Komplexe (ISCOMs). ISCOMs sind Lipidpartikel, welche aus Cholesterol, Phospholipiden und Zellmembranantigenen, in die Saponine eingelagert sind, bestehen. Sie stimulieren eine starke Th 1- und Th 2-Antwort, wobei die zelluläre Immunantwort durch die Bildung von Interleukin 12 und Interferon- γ hervorgerufen wird (SINGH und O'HAGAN, 2003; COX und COULTER, 1997).

Nicht-partikuläre Adjuvantien:

Nicht-partikuläre Adjuvantien haben immunmodulatorische Eigenschaften und werden deshalb auch als immunstimulatorische Adjuvantien bezeichnet (SINGH und O'HAGAN, 2003). Ihre Aktivität ist im Gegensatz zu den partikulären Adjuvantien strukturunabhängig (COX und COULTER, 1997). Saponine werden aus der Rinde des *Quillaja saponaria*-Baumes gewonnen und rufen als Rohextrakt (Saponin) oder als aufgereinigte Komponenten wie Quil A eine humorale, vor allem aber auch eine zelluläre Immunantwort hervor. Der Wirkungsmechanismus, der zu dieser Immunantwort führt, ist bis jetzt noch nicht genau geklärt. Nur eine Einlagerung der Saponine in die Zellmembran mit daraus resultierender Porenbildung ist nachgewiesen. Das Antigen könnte durch diese Poren in das Zytosol vordringen und nach Präsentation über MHC-I-Moleküle eine zelluläre Immunreaktion hervorrufen (SJOLANDER et al., 2001). SINGH und O'HAGAN (2003) entdecken die bakteriellen Desoxycytidin-desoxyguanosin-Dinukleotiden (CpG-Dinukleotiden), die eine verstärkte Immunität hervorru-

fen. Die Effekte von CpG-Dinukleotiden als Adjuvantien umfassen die Steigerung der zytotoxischen Aktivität natürlicher Killerzellen und Makrophagen, Sekretion von Zytokinen, eine Steigerung der Antikörperproduktion, sowie die Induktion einer Antigen-spezifischen Th 1-Immunantwort (CHAUNG, 2006). Nicht-ionische Polymere, die auch zu dieser Adjuvantienklasse zählen, sind oberflächenaktive Substanzen, die eine besonders starke immunmodulatorische Aktivität besitzen, wenn ihre hydrophil-lipophil-Balance kleiner als zwei ist (HUNTER et al., 1981). Lipid A und Monophosphoryl-Lipid A (MPL), die Bestandteile der Lipopolysaccharide von *Salmonella minnesota* sind, rufen eine starke Th 1-Antwort hervor. Als Ursache für die Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen wird in der Bindung an Rezeptoren von antigenpräsentierenden Zellen vermutet. In verschiedenen Untersuchungen konnte dargelegt werden, dass MPL die Bildung und Freisetzung von Interleukin-2 und Interferon- γ anregen und damit eine zelluläre Immunantwort induzieren. Auch durch die Verwendung von Interleukin-12 oder Interferon- γ als Adjuvans kann die Ausbildung einer zellulären Immunabwehr stimuliert werden. Durch Interleukin-4 wird die Ausbildung einer humoralen Immunabwehr hervorgerufen. Aufgrund von Bedenken bezüglich ihrer Stabilität und Toxizität sowie ihrer kostspieligen und spezies-spezifischen Eigenschaften, werden sie in der Veterinärmedizin nicht verwendet (SINGH und O'HAGAN, 2003; COX und COULTER, 1997).

3 Material und Methoden

Der im Folgenden beschriebene Versuch wurde in der Klinik für Schweine der LMU München in Oberschleißheim durchgeführt. Die Auswertung der Blutproben erfolgte ebenfalls in der Klinik für Schweine der LMU. Die Polymerasekettenreaktion und der ELISA wurden am Institut für Veterinärbakteriologie der Vetsuisse Fakultät der Universität Zürich durchgeführt. Die Untersuchungen und Probenentnahmen erstreckten sich über den Zeitraum von Dezember 2006 bis Juni 2007.

3.1 Durchführung des Tierversuchs

3.1.1 Versuchstiere

Die Studie wurde von der zuständigen Behörde genehmigt.

Die Untersuchungen wurden in der Klinik für Schweine der Ludwig-Maximilians-Universität München an 25 Schweinen durchgeführt. Die Ferkel stammten von 4 klinikeigenen Sauen. Nach dem Absetzen wurden sie in Gruppenboxen auf planbefestigtem Boden mit Stroh-einstreu gehalten, ab dem Zeitpunkt der Splenektomie in Einzel- bzw. Zweierboxen. Die Fütterung erfolgte zweimal täglich mit einem pelletierten Ferkel- bzw. Vormastfutter (Fa. Zimmererwerke, Landshut). Sie erhielten das Trinkwasser über Nippeltränken ad libitum. Die Erfassung der rektalen Temperatur erfolgte morgens und abends nach der Fütterung. Die Luftfeuchtigkeit im Stall betrug zwischen 60-70% bei einer Temperatur von 16-18°C.

Allen Ferkeln wurde am 3. Lebenstag Ceftiofur (Naxcel[®] 100 mg/ml, 5,0 mg/kg KGW, Pfizer GmbH) i.m. appliziert und Toltrazuril (Baycox[®] 5% orale Suspension, 20 mg/kg KGW, Bayer Vital GmbH) und Eisen (BioWeyxin[®], FeVit, Fa. Veyx) 2 ml oral verabreicht. Am 14. Lebenstag erfolgte eine Eisenapplikation (Myofer[®] 100, Intervet) 2 ml pro Ferkel i.m..

Der Versuch wurde in zwei Durchgängen à drei Monaten durchgeführt. Die Gruppeneinteilung erfolgte in 4 Versuchsgruppen mit Gruppennummer 1-4 und Kontrollgruppen mit Gruppennummern 5-7. Die Tiere wurden wie in Tabelle 1 dargestellt in die Gruppen verteilt.

Tabelle 1: Gruppeneinteilung

Gruppennummer	Impfantigen	Menge	Anzahl der Immunisierungen	Tiernummer
1	Rekombinantes MSG1 Protein	10 mg Protein in 1 ml PBS	2	1-6
2	<i>E. coli</i> pBAD_MSG1	2 x 10 ⁷ KBE in 1 ml PBS	2	7-11
3	Rekombinantes MSG1 Protein	20 mg Protein in 1 ml PBS	2	12-15
4	<i>E. coli</i> pBAD_MSG1	2 x 10 ⁸ KBE in 1 ml PBS	2	16-19
5	pBAD_ohne Insert, aufgereinigt	10 mg Protein in 1 ml PBS	2	20-21
6	<i>E. coli</i> pBAD_ohne Insert	2 x 10 ⁷ KBE in 1 ml PBS	2	22-23
7	PBS	1 ml	2	24-25

3.1.2 Versuchsablauf

Vor Beginn des Versuchs wurden die Blutproben der Schweine in der ersten Lebenswoche mittels PCR und Antikörper-Nachweis auf eine Infektion mit *M. suis* untersucht. Es wurden nur *M. suis*-negative Tiere in den Versuch eingeschlossen. Für das Screening wurden ca. 4 ml Blut für die Serumgewinnung und ca. 2 ml EDTA-Blut für die DNA-Extraktion entnommen. Diese Angaben gelten auch für die folgenden Blutentnahmen. Die Blutentnahmen erfolgten aus der *V. cava cranialis*. Es wurden Serummonovetten und EDTA-Monovetten (Primavette[®] V Fa. KABE Labortechnik, Nümbrecht-Elsenroth) mit aufgesetzten Einmalkanülen von 50-80 mm Länge (Sterican[®], Braun, Melsungen) verwendet. Um eine Gerinnung des Blutes zu verhindern, wurden die EDTA-Monovetten anschließend ausreichend geschwenkt.

ad 880 ml mit A. bidest,
autoklavieren,
Zugabe von 1,0 ml 1 M MgSO₄ ,
10,0 ml 20% Glucose,
100,0 ml M9 Salzlösung,
1,0 ml Ampicillin (100 mg/ml)
Arabinose, 20 %

100 ml RM-Medium wurden mit 1 ml einer frischen Übernachtskultur LMG_pBad_msg1 angeimpft und bei 37°C bis zu einer optische Dichte OD₆₀₀ von 0,6 inkubiert. Durch Zugabe von Arabinose bis zu einer Endkonzentration von 0,02 % wurde die Proteinexpression induziert und die Kulturen für eine weitere Stunde geschüttelt. Anschliessend wurden die Bakterien 10 min mit 1000 x g zentrifugiert (Heraeus Suprafuge 22, Rotor: HFA 12.500), mit PBS drei Mal gewaschen und auf eine OD₆₀₀ von 0,6 (= 1x10⁷ KBE/ml) eingestellt. Eine nicht-induzierte Kontroll-Suspension LMG_pBad (ohne Insert) wurde analog hergestellt.

3.1.3.1.2 Herstellung und Aufreinigung von rekombinantem MSG1

Material:

Resuspendierpuffer : PBS pH 7,4 (Sigma) 10,0 mM Imidazol

Elutionspuffer: PBS pH 7,4; 400,0 mM Imidazol

Ni²⁺-NTA Agarose (Qiagen)

Bradford Protein Quantifizierungskit (BioRad)

Die Aufreinigung der rekombinanten Proteine erfolgte durch Metall-Affinitätschromatographie unter Verwendung von Ni²⁺-NTA Agarose. Ni²⁺-Ionen binden mit hoher Affinität an die dem rekombinanten Protein angefügten sechs Histidin-Reste (6xHis). Die Elution erfolgt mit Imidazol, da Imidazol aufgrund seiner homologen Struktur die Histidin-Reste kompetitiv aus der Bindung verdrängt.

Die Proteinexpression einer *E. coli* Kultur LMG_pBad_msg1 (500 ml) wurde mit Arabinose induziert (siehe oben). Anschliessend wurde das Bakterienpellet mit 30 ml Resuspendierpuffer resuspendiert und dann auf Eis beschallt (Ultrasonic Processor; Vibra cell, Merck). Die Suspension wurde dann zentrifugiert (30 min, 4°C, 26.000xg; Heraeus Suprafuge 22, Rotor: HFA 21.94). Der Überstand wurde mit 2 ml Ni²⁺-NTA Agarose vermischt und 10 min auf Eis unter Schütteln inkubiert. Danach wurden die Proben bei 4°C 3 min mit 1000 x g zentrifu-

giert, die Agarose drei Mal mit 20 ml Resuspendierpuffer gewaschen und die Proteine in 3 x 2 ml Fraktionen mit Elutionspuffer eluiert. Als Kontrolle wurden rekombinante *E. coli* LMG_pBad (ohne Insert) in gleicher Weise mitgeführt. Die Konzentration der rekombinanten Proteine wurde mit einem Bradford Protein-Quantifizierungskit nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Reinheit der rekombinanten Proteinaufreinigungen wurde im SDS-Polyacrylamid-Gel nach Coomassieblau-Färbung kontrolliert. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Proteine bei -80°C gelagert.

3.1.4 Adjuvans

Freund'sches komplettes (1. Immunisierung) und inkomplettes Adjuvans (2. Immunisierung) wurden von der Firma Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, bezogen (Produkt-Code:F5506).

3.1.5 Impfstoffapplikation und klinische Untersuchung

Die Impfung wurde durch intramuskuläre Injektion vorgenommen. Die Einstichstelle ist seitlich am Hals in Höhe des oberen Ohrgrundes am Übergang von behaarter zu unbehaarter Haut. Die Immunisierungen erfolgten auf der rechten Halsseite.

Die Impfdosis setzt sich zusammen aus jeweils 1,0 ml Impfstoffpräparation (Tabelle 1) und 1,0 ml komplettes bzw. inkomplettes Freund'sches Adjuvans.

Die Applikationsstelle wurde sofort nach der Impfung mit einem wasserfesten Stift markiert, um eine spätere Identifizierung für die Messungen der Hautschwellungen und die Begutachtung der Applikationsstelle sicherzustellen.

Die Impfstoff-Verträglichkeit wurde bis einschliesslich vierten Tag nach der Impfung klinisch untersucht. Der Injektionsbereich wurde einen Tag vor der Impfstoffapplikation, am Tag der Applikation 2 h, 4 h und 8 h nach der Applikation und weitere 3 Tage täglich einmal kontrolliert. Es wurde das Allgemeinbefinden beurteilt und speziell auf Umfangsvermehrung, Wärme, Konsistenz, Verfärbung der Haut und Körpertemperatur geachtet.

Beurteilung des Allgemeinbefindens:

0 = normal

1 = geringe Veränderungen

2 = ausgeprägte Veränderungen

3 = schwere Veränderungen

Beurteilung der Injektionsstelle hinsichtlich Umfangsvermehrung, Wärme, Konsistenz, Verfärbung der Haut:

0 = keine Veränderungen

1 = andeutungsweise

2 = geringgradig

3 = mittelgradig

4 = hochgradig

3.1.6 Splenektomie

Die Tiere wurden zwischen dem 29. und 32. Versuchstag nach der Methode nach HEINRITZI (1984b) splenektomiert.

Die Narkoseeinleitung erfolgte intramuskulär mit Azaperon (Stresnil[®], 2 mg/kg KGW, Fa. Janssen-Cilag GmbH) und Ketamin (Ursotamin[®], 10 mg/kg KGW, Fa. Serum-Werk-Bernburg AG). Zur Aufrechterhaltung der Narkose wurden die Tiere mit Isofluran (Isoba[®], MAC ca. 1,5 Vol%, Fa. Essex Tierarznei) *per inhalationem* anästhesiert und um den operativen und postoperativen Schmerz zu reduzieren wurden sie mit Meloxicam (Metacam[®], 2 ml/100 kg KGW, Fa. Boehringer Ingelheim) und Metamizol (Vetalgin[®], 1 ml/10 kg KGW, Intervet Deutschland GmbH) behandelt. Zur Vorbeugung einer Wundinfektion erfolgte eine Gabe von Penicillin (Vetri-Proc[®] 30%, 1 ml/10 kg KGW, CEVA Tiergesundheit GmbH) i.m. drei Tage lang.

Nach der Fixation der Tiere in rechter Seitenlage, wurde die linke Flankengegend rasiert, gesäubert und desinfiziert. Das Operationsfeld wurde mit einer sterilen Folie (BUSTER[®], Opcover 60 x 90 cm, Kruuse) abgedeckt. Der Hautschnitt erfolgte 1-2 fingerbreit hinter und parallel mit dem Rippenbogen in einer Länge von 10 cm. In gleicher Schnittrichtung wurden die Faszien, Bauchmuskeln und Peritoneum durchtrennt. Bei leerem Magen liegt die Milz in ihrer Gesamtheit unter dem Rippenbogen. Der ventrale Milzpol wurde durch die Laparotomiewunde so weit vorverlagert, dass die im ventralen Teil des *Ligamentum gastrolienale* verlaufenden Gefäße (*A.- u. V. gastroepiploica*) sichtbar werden. Das Band wurde oberhalb des Gefäß-

verlaufes stumpf durchtrennt und im Abstand von 5 cm ligiert. Zwischen den Ligaturen wurden die Gefäße durchtrennt und die Stümpfe auf eventuell vorkommende Blutungen hin untersucht. Nach Vorverlagerung der Milz aus der Wunde wurden die im dorsalen Teil des grossen Netzes verlaufenden *Aa.- und Vv. lienalis und gastricae breves* mit dem Schlingenführer nach HEINRITZI (1984a) über den dorsalen Rand der Milz geschoben.

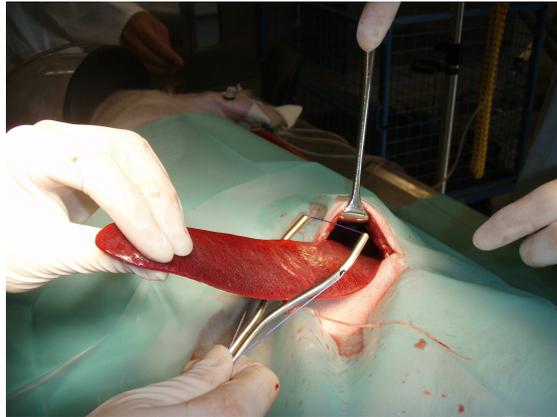


Abbildung 2: Splenektomie mithilfe des Schlingenführers nach HEINRITZI (1984a)

Der Schlingenführer wurde mit straff gespanntem Faden von ventral über den dorsalen Milzpol geführt und auf der Viszeralseite bis zum Ansatz des großen Netzes geführt. Anschließend wurde er unter anhaltend leichter Spannung des Ligaturmaterials zurückgezogen. Der Faden wurde von aussen verknotet. Vor dem Absetzen der Milz wurde der Sitz der Ligatur überprüft. Die Ligatur wurde mit dem Mittel- und Zeigefinger der linken Hand bedeckt und die Milz mit einer gebogenen Schere abgesetzt. Nach Entfernen der Milz aus der Bauchhöhle und Kontrolle des Stumpfes auf Blutungen wurde die Bauchhöhle durch eine fortlaufende Peritonealnaht verschlossen. Haut- und Muskelwunde wurden in Form einer modifizierten Donatonaht verschlossen und die Fäden nach 10 Tagen gezogen.

3.1.7 Belastungsinfektion

Am 35. Versuchstag wurde eine Belastungsinfektion mit *M. suis* an allen Tieren vorgenommen. Diese erfolgte durch eine subkutane Injektion von 0,5 ml EDTA-Blut (10^8 *M. suis* / ml Blut) eines natürlich infizierten Schweines, das sich zum Zeitpunkt der Blutentnahme im akuten Anfall befand. Anschliessend erfolgte eine prophylaktische Gabe von Penicillin (Vetri-Proc® 30%, 1 ml/ 10 kg KGW, CEVA Tiergesundheit GmbH) i.m. drei Tage lang.

3.1.8 Therapie

Bei einer akuten Erkrankung wurden die Tiere nach vorheriger Blutentnahme parenteral mit Oxytetracyclin (Terramycin/LA[®], 1,0 ml Terramycin/LA je 5 kg/KGW) in einer Dosierung von 40 mg pro kg KGW behandelt. Zur Fiebersenkung wurde Metamizol eingesetzt (Vetalgin[®], 1 ml/ 10 kg KGW, Intervet Deutschland GmbH). Bei einem hochgradig erniedrigten Glukosespiegel wurden die Tiere oral mit Glukose versorgt (Ursolyt G oral[®], 35 g Ursolyt G oral werden in 1 Liter Trinkwasser gelöst, Serum-Werk-Bernburg AG). Eisenapplikationen erfolgten am 52. und 56. Versuchstag i.m. (Myofer[®] 100, Intervet).

3.2 Hämatologische und klinisch-chemische Blutuntersuchungen

Die Bestimmung der Erythrozytenzahl, des Hämoglobingehaltes, des Hämatokritwertes und der Leukozytenzahl wurde an EDTA-Blut mit einem automatischen Blutkörperchenzählgerät durchgeführt (Celltek, Bayer Diagnostics, München). Das Gerät wurde täglich bei Inbetriebnahme kalibriert. Das restliche EDTA-Blut wurde bei -70°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Das Serum wurde durch Zentrifugieren der Serummonovetten[®] (10 min bei 3000 U/min, Hettich Rotixa/AP, Hettich, Tuttlingen) gewonnen. Die Bestimmung der Parameter Glukose, Eisen und Bilirubin wurde im Labor der Nutztierklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München mit einem vollselektiven, diskreten Mehrfachanalysensystem (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 Mikroskopischer Erregernachweis

Material:

Acridinorange-Stammlösung: 1,5% 3,6-Bis(dimethylamino)-acridin-hydrochlorid Zinkchlorid Doppelsalz (Certistain[®], Merck, Darmstadt) in 10000 ml Aqua dest.

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

Von den EDTA-Blutproben wurde nach Erwärmen des Objektträgers und des Blutes auf 38°C ein Ausstrich angefertigt. Nach der Trocknung an der Luft wurden sie 1 Minute in 96% Ethanol fixiert und nach erneuter Trocknung 20 - 60 Minuten in Acridinorange-Gebrauchslösung gefärbt. Der Ausstrich wurde mit Aqua bidest. gespült und luftgetrocknet. Anschließend wurden die Ausstriche im Fluoreszenzmikroskop bei 600facher Vergrößerung unter Ölimmersion untersucht. *M. suis* konnten als hell- bis dunkelorange Punkte von ca. 0,5-0,8 µm Durchmesser auf den Erythrozyten nachgewiesen werden (HEINRITZI, 1990b).

3.4 Erregernachweis mittels quantitativer Polymerase-Ketten-Reaktion

3.4.1 DNA Extraktion

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

Zuerst wurden 200 µl des mit EDTA ungerinnbar gemachten Blutes mit 200 µl BEL-Puffer versetzt und 1 min bei 10.000 U/min und Raumtemperatur zentrifugiert (Biofuge pico, He-

raeus). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet anschließend in 500 µl BEL-Puffer resuspendiert und nochmal zentrifugiert. Dieser Schritt wird wiederholt, bis das Pellet weiß war. Aus dem resultierenden Pellet wurde mittels GenElute Bacterial Genomic Kit entsprechend den Angaben des Herstellers DNA extrahiert. Zunächst wurde eine Lyse mit Proteinase K durchgeführt. Im nächsten Schritt wurde die DNA über ein Filtersäulchen extrahiert.

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

3.4.2 Quantitative LightCycler PCR

Material:

LightCycler® Fast Start DNA Master^{PLUS} Kit (Roche Diagnostics)

LightCycler Glaskapillaren (Roche Diagnostics)

PCR Primer: PCR-Hybridisierungssonden

Die quantitative PCR wurde auf Grundlage des von HOELZLE et al. (2007b) etablierten Protokolls (LightCycler® MSG1 PCR Protokoll) durchgeführt. Zuerst wurde ein PCR Master Mix angesetzt: 4 µl LightCycler® Fast Start Master Mix (TaqPolymerase, dNTPs, MgCl₂), Primer [Endkonzentration je 0,5 µM], PCR Hybridisierungssonden [Endkonzentration je 0,2 µM] und Aqua bidest. [ad Endvolumen 15 µl]. Der Master Mix wurde zusammen mit 5 µl extrahierter DNA in eine LightCycler Glaskapillare pipettiert. Bei jedem PCR-Lauf wurden definierte Positivkontrollen für eine Quantifizierung und eine Negativkontrolle (Aqua bidest.) mitgeführt.

3.5 Nachweis der humoralen Immunantwort

3.5.1 rMSG1/rHspA1 ELISA

Material:

96-Loch-Mikrotiterplatten (Microton, Greiner)

Coating-Puffer: 15 mM Na₂CO₃,
34,8 mM NaHCO₃,
3 mM NaN₃, pH 9.6

Blockingpuffer: PBS pH 7,4
1 % Proteose-Pepton (Brunschwig)

Verdünnungspuffer:	PBS 0,5% Proteose-Pepton, 0,05% Tween 20
Waschpuffer:	PBS 0,05% Tween 20
Horseradish-Peroxidase-konjugiertes anti-Schwein Konjugat (H+L chain, Sigma)	
Substrat:	0,73 mM ABTS (2,2-Azino-di [3-ethyl-Benzthiazolin sulfat]; Roche), 100 mM Citrat-Phosphat-Puffer, pH 4,2 2 mM H ₂ O ₂

Rekombinantes rMSG1 und Kontroll-Antigen (Aufreinigung aus *E. coli* LMG_pBad, ohne Insert) wurden in Coating-Puffer auf eine Konzentration von 6 µg/ml eingestellt (HOELZLE et al., 2007b). Mikrotiterplatten wurden mit 100 µl Antigen pro Vertiefung beschickt, 1 h bei Raumtemperatur (RT) auf einem Plattenschüttler geschüttelt und anschliessend über Nacht bei 4°C inkubiert. Danach wurden die Platten mit einem automatischen Waschgerät (Tecan) gewaschen. Alle weiteren Inkubationsschritte wurden bei RT 1 h auf einem Plattenschüttler durchgeführt und zwischen den Inkubationsschritten wurden die Platten gewaschen. Zur Verhinderung von unspezifischen Reaktionen wurde mit 200 µl Blockingpuffer inkubiert. Die Testseren wurden vor Gebrauch mit *E. coli* präadsorbiert. Dazu wurden die Seren in einer *E. coli*-Suspension 1:25 verdünnt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Dann wurde die Serum-*E. coli*-Suspension zentrifugiert (10.000 x g, 2 min) und der Überstand in Verdünnungspuffer verdünnt (Endverdünnung 1:100). Alle Seren wurden sowohl mit rMSG1 als auch mit *E. coli*-Kontroll-Antigen im Doppel untersucht. Das Konjugat wurde 1:10.000 in Verdünnungspuffer verdünnt und 100 µl/Vertiefung eingesetzt. Nach 1 h Inkubation wurden nach dem Waschen 100 µl Substrat zugegeben und 30 min inkubiert. Ein computergesteuerter Mikroplattenleser (Tecan) lieferte die OD-Werte bei 405 nm.

3.5.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot

3.5.2.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Material:

Mini-Protean 3 Elektrophorese-System (Biorad)

Acrylamid-/Bisacrylamid-Lösung 30 %, 37,5:1 (Roth)

Trenngel-Puffer: 1,88 M Tris, pH 8,8

Sammelgel-Puffer:	0,5 M Tris, pH 6,8
Probenpuffer (5x):	18,4 ml Aqua bidest., 4 ml Sammelgel-Puffer, 3,2 ml Glycerol, 3,2 ml SDS, 10%, 1,6 ml Bromphenolblau, 1 % 500 µl β-Mercaptoethanol
Laufpuffer:	0,03 M Tris, 0,23 M Glycin, 0,08% SDS
Prestained Protein Standard (New England BioLab)	
TEMED (BioRad)	
Ammoniumpersulfat 10%	
Trenngel-Zusammensetzung:	1,7 ml Acrylamid/Bisacrylamidlösung, 1 ml Trenngel-Puffer, 1 ml SDS, 0,5%, 1,3 ml A. bidest., 10 µl TEMED, 40 µl Ammoniumpersulfat
Sammelgel-Zusammensetzung:	0,33 ml Acrylamid/Bisacrylamidlösung, 0,4 ml Sammel-gel-Puffer, 0,4 ml SDS, 0,5%, 0,87 ml Aqua bidest., 10 µl TEMED, 10 µl Ammoniumpersulfat

Die Trenngel-Lösung wurde gemischt, mit einer Glaspipette bis zu einer Höhe von 5 cm zwischen zwei Glasplatten gefüllt und mit 96% Ethanol überschichtet. Die Polymerisation des Gels war nach 1 h abgeschlossen. Das Ethanol wurde vom Trenngel abgegossen, das Sammelgel eingefüllt und der Kamm zur Bildung der Probenaschen eingesetzt. Die Polymerisationszeit des Sammelgels betrug 30 min. Die Proteinproben wurden mit Probenpuffer (5x) vermischt und 10 min gekocht. Für die Elektrophorese wurde das Lämmli-Puffersystem (LÄMMLI, 1970) verwendet. Pro Geltasche wurden 1 µg Protein bzw. Kontrollpräparation aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 200 V für ca. 35 min. In jedem Lauf wurde der Molekulargewichtsstandard mitgeführt.

3.5.2.2 Western Blot

Material:

Mini Trans-Blot Cell-System (Biorad)

Protran Nitrocellulose-Membran (0,45 µm; Schleicher und Schüll)

Filterpapier: Gel-Blotting-Papier (Schleicher und Schüll)

Transfer-Puffer: 25 mM Tris
 192 mM Glycin
 20 % Methanol

TBS: 10 mM Tris
 150 mM NaCl
 pH 8,5

TBS-Tween: TBS mit 0,05 % Tween 20

Blocking-Puffer: TBS mit 2 % Magermilchpulver

Entwickler-Lösung A: 60 mg 4-ChlorNaphthol (Sigma)
 20 ml Methanol (eiskalt)

Entwickler-Lösung B: 100 ml TBS, eiskalt
 60 µl H₂O₂ (30 %ig)

Filterpapiere und Schwammkissen wurden im Western Blot-Puffer eingeweicht und die Gele und Nitrocellulose-Membran 10 min in Transfer-Puffer äquilibriert. Das Blot-Sandwich, bestehend aus Schwammkissen, 2 Filterpapieren, Nitrocellulose-Membran, Gel, 2 Filterpapieren und Schwammkissen wurde entsprechend den Herstellerangaben in die Transferkammer eingelegt. Die Transferkammer wurde mit Transfer-Puffer befüllt. Der Transfer der Proteine erfolgte für 1 h bei 100 V. Die Transferkammer wurde dabei auf Eis gekühlt. Nach dem Transfer wurde von den Membranen das Methanol durch Waschen in TBS entfernt.

Zur Durchführung der immunologischen Detektion wurden die Membranen zuerst 1 h in Blockingpuffer bei Raumtemperatur abgesättigt und anschliessend zweimal 10 min in TBS gewaschen. Die Membranen wurden für 2 h in Serumverdünnungen (1:100 in Blocking-Puffer) auf dem Schüttler inkubiert. Nach zweimaligem Waschen in TBS (10 min, RT) wurden die Membranen in Konjugat (1:2000 in Blockingpuffer) 2 h bei RT auf dem Schüttler inkubiert. Anschliessend wurden die Membranen je zweimal für 10 min bei RT in TBS-Tween und TBS gewaschen. Die immunologische Färbung erfolgte in dem Gemisch aus den Entwickler-Lösungen A und B für 20-30 min. Danach wurden die Membranen mehrmals in A. bidest. gewaschen und zwischen zwei Filterpapieren getrocknet. Die Auswertung der Grösse der detektierten Bande wurde mit Hilfe des Computerprogramms BioProfil 3.1 (LTF, Wasserburg)

durchgeführt.

3.6 Nachweis der T-Zell vermittelten Immunantwort

3.6.1 Lymphozyten-Isolierung aus der Milz

Material:

Zellkulturmedium RPMI 1640 (Sigma)

Fötale Kälberserum (FKS) (Biochrom Seromed)

Lysispuffer für die Erythrozyten-Lyse (Becton Dickinson)

Zählkammer nach Neubauer

Lymphozyten wurden aus der Milz gewonnen. Dazu wurde ein ca. 2 x 2 cm grosses Stück in einer Petrischale mit RPMI 1640 Medium mit Hilfe durch ein Zellkultursieb zerdrückt. Die so gewonnene Zellsuspension wurde einmal mit RPMI 1640 gewaschen und dann zur Lyse der Erythrozyten in 1x Lysispuffer resuspendiert und für ca. 10 min. inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Zellsuspension dreimal gewaschen, in RPMI 1640 mit 10% FKS resuspendiert und in der Zählkammer nach Neubauer gezählt.

3.6.2 Isolierung peripherer Blutlymphozyten

Material:

Percoll Trennlösung, 1,077 g/ml Dichte (Biochrom)

Fötale Kälberserum (FKS)

Zählkammer nach Neubauer

Periphere Blutlymphozyten wurden aus Vollblut (EDTA) mittels Dichtegradientenzentrifugation mit Percoll isoliert. In 15 ml Röhrchen wurden jeweils 7 ml Percoll mit 3 ml der Blut überschichtet und bei Raumtemperatur für 30 min. bei 900 g zentrifugiert. Die als Lymphozyten identifizierbare Phase wurde gewonnen, mit RPMI 1640 gewaschen, in RPMI 1640 mit 10%FKS resuspendiert und quantifiziert in der Zählkammer nach Neubauer.

3.6.3 Lymphozyten-Proliferationstest

Material:

Cell Proliferation ELISA Kit, BrdU (Roche Diagnostics)

PBS, pH 7,4 (Sigma)

1 M H₂SO₄

Dieser Test beruht auf der colorimetrischen Messung der BrdU-Inkorporation während der DNA-Synthese nach Zugabe von Antigen-spezifischen Stimulanzen. Die Durchführung des Test-ELISAs erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Lymphozyten (Milzlymphozyten oder periphere Lymphozyten) wurden in 96-Loch-Platten (5×10^5 Lymphozyten/Loch) bei 37°C kultiviert. Nach 24 h wurden als Proliferationsstimulanzen jeweils 10 µg und 1 µg rekombinantes MSG1, *Escherichia coli* Kontrollpräparation, aufgereinigte *M. suis* Präparationen, Kontrollpräparationen aus Schweineblut, sowie als Proliferationskontrolle Concanavalin A (5 µg/ml) dazugegeben und weitere 48 h bei 37°C inkubiert. Danach wurde BrdU-Lösung (Endkonzentration 10 µM) zu den Zellen pipettiert und weitere 24 h bei 37 °C bebrütet. Anschliessend wurden 30 min die Zellen fixiert und 90 min bei RT mit anti-BrdU-POD-Lösung inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurde 100 µl/Loch Substrat dazugegeben. Nach 15 bis 30 min wurde als Stopplösung 25 µl/Loch 1 M H₂SO₄ dazugegeben und die optische Dichte bei 450 nm mit einem Photometer (Tecan, Männedorf, Schweiz) gemessen.

3.7 Patho-morphologische Untersuchungen

Die Tiere wurden am 84. Versuchstag mit Eutha[®]77 (1 ml /5 kg KGW) euthanasiert. Tiere, die im Verlauf des Versuchs bei der klinischen Untersuchung ein hochgradig gestörtes Allgemeinbefinden zeigten, wurden aus Tierschutzgründen sofort euthanasiert. Eine pathomorphologische Untersuchung wurde an allen getöteten und verendeten Tieren vom Institut der Tierpathologie der LMU München vorgenommen.

4 Ergebnisse

4.1 Klinische Parameter nach der Impfung

Die Verträglichkeit der Immunisierung wurde anhand lokaler und systemischer Reaktionen auf die Impfung geprüft. Alle Ergebnisse der klinischen Untersuchung der Injektionsstelle für die einzelnen Parameter sind in den Tabellen 5 bis 14 im Anhang dargestellt.

4.1.1 Lokale Reaktionen

4.1.1.1 Immunisierungsgruppe MSG1Prot1 (Gruppe1)

1. Immunisierung

Fünf Tiere der MSG1Prot1-Gruppe zeigten acht Stunden nach der ersten Immunisierung eine leichte bis geringgradige Veränderung der Konsistenz an der Injektionsstelle und eine Umfangsvermehrung mit einem maximalen Ausmaß von 0,5 cm. Bei drei Tieren war eine leichte Rötung zu erkennen. Befunde bezüglich des Parameters Wärme waren negativ. Ab dem ersten Tag post vaccinationem (p.vacc.) konnten keine pathologischen Befunde hinsichtlich der Konsistenz und Rötung erhoben werden. Die Umfangsveränderung konnte bis zum dritten Tag nach der Behandlung nachgewiesen werden.

2. Immunisierung

Nach der zweiten Impfung zeigte die MSG1Prot1-Gruppe zwei Stunden p.vacc. überwiegend geringgradige bis mittelgradige Veränderungen der Konsistenz und drei Tiere eine leichte bis geringgradige Rötung sowie eine geringgradige bis mittelgradige Erwärmung der Haut acht Stunden p.vacc.. Zwei Stunden p.vacc. wiesen alle Tiere eine Umfangsvermehrung mit einem Ausmaß von bis zu 0,5 cm auf. Diese erreichte bei drei Tieren bis zum dritten Untersuchungstag ein Ausmaß von bis zu 1 cm. Die Abweichungen der Wärme und der Farbe waren bis zum 2. Tag p.vacc. nachweisbar, die Veränderungen der Konsistenz bis zum 3. Tag.

4.1.1.2 Immunisierungsgruppe MSG1Coli1 (Gruppe2)

1. Immunisierung

Nach der ersten Immunisierung waren bei der MSG1Coli1-Gruppe vier Stunden p.vacc. eine Umfangsvermehrung von bis zu 1 cm mit teilweiser leichter Verfärbung der Haut und leichter

bis mittelgradiger Konsistenzänderung zu beobachten. Die Abweichungen hinsichtlich der Konsistenz und der Umfangsvermehrung waren bei zwei Tieren bis zum 3. Tag p.vacc. nachweisbar. Die Rötung der Haut war nur am Impftag festzustellen. Ein Tier wies am ersten Tag p.vacc. eine mittelgradige Erwärmung der Haut an der Injektionsstelle auf, welche bis zum 2. Tag nachweisbar war.

2. Immunisierung

Die Impfgruppe MSG1Coli1 zeigte bereits vier Stunden nach der zweiten Immunisierung geringgradige bis hochgradige Konsistenzänderungen und eine Umfangsvermehrung mit einem Ausmaß von bis zu 1,5 cm. Bei vier Tieren war acht Stunden p.vacc. eine geringgradige Veränderung bezüglich der Parameter „Wärme“ und „Verfärbung der Haut“ festzustellen.

Die pathologischen Befunde hinsichtlich der Veränderung der Konsistenz waren bis zum 3. Tag p.vacc. zu beobachten. Bei einem Tier zeigte sich eine Umfangsvermehrung mit einer maximalen Ausdehnung von bis zu 4 cm. Eine leichte Rötung der Haut war bis zum 3. Tag p.vacc. nachzuweisen und die leichte bis geringgradige Erwärmung der Haut an der Injektionsstelle konnte bei drei Tieren noch am 1. Tag p.vacc. beobachtet werden.

4.1.1.3 Immunisierungsgruppe MSG1Prot2 (Gruppe3)

1. Immunisierung

Bei der ersten Impfung zeigten alle Tiere der Immunisierungsgruppe MSG1Prot2 acht Stunden p.vacc. geringgradige Veränderungen der Konsistenz. Das Ausmaß der Umfangsvermehrung betrug bis zu 0,5 cm. Am 3. Tag p.vacc. konnten keine pathologischen Befunde mehr erhoben werden. Bezüglich der Parameter „Wärme“ und „Verfärbung der Haut“ waren keine Veränderungen zu erkennen.

2. Immunisierung

Bei allen Tieren der MSG1Prot2-Impfgruppe war vier Stunden p.vacc. eine geringgradige bis mittelgradige Konsistenzänderung und Erwärmung sowie eine Umfangsvermehrung von 0,5 cm zu beobachten. Die Abweichungen der Konsistenz und die Umfangsvermehrung waren bis zum 3. Tag p.vacc. nachweisbar. Sie erreichten bei einem Tier ein Ausmaß von 2 cm, bei den restlichen Tieren bis zu 1 cm. Eine geringgradige Rötung an der Injektionsstelle war bei drei Tieren nur am 1. Tag p.vacc. nachzuweisen. Ein Tier wies ab dem 2. Tag p.vacc. eine mittelgradige Verfärbung der Haut auf, die bis zum 3. Tag p.vacc. anhielt.

4.1.1.4 Immunisierungsgruppe MSG1Coli2 (Gruppe 4)

1. Immunisierung

Die Tiere der Immunisierungsgruppe MSG1Coli2 hatten acht Stunden p.vacc. überwiegend eine geringgradige bis mittelgradige Konsistenzänderung mit einer Umfangsvermehrung von bis zu 2 cm, die am 3. Tag p.vacc. noch registriert werden konnte. Bei zwei Tieren war am 2. Tag eine hochgradige Veränderung der Konsistenz zu beobachten. Ein Teil der Tiere zeigte acht Stunden p.vacc. mittelgradige bis hochgradige Wärme sowie eine mittelgradige Verfärbung der Haut. Am 3. Tag p.vacc. konnten keine pathologischen Befunde bezüglich der Parameter „Wärme“ und „Verfärbung der Haut“ mehr erhoben werden.

2. Immunisierung

Eine geringgradige bis mittelgradige Veränderung der Konsistenz und eine Umfangsvermehrung von bis zu 1 cm war vier Stunden p.vacc. zu beobachten und konnten bis zum 3. Tag p.vacc. nachgewiesen werden. Ein Tier zeigte bis vier Stunden p.vacc. eine mittelgradige Erwärmung an der Injektionsstelle. Eine geringgradige Verfärbung der Haut war bei einem Teil der Tiere am 1. und 2. Tag p.vacc. zu erkennen.



Abbildung 3: Deutliche Umfangsvermehrung an der rechten Nackenseite nach Injektion von MSG1Coli2

4.1.1.5 Protein-Kontrollgruppe (BAD_ohne Insert, aufgereinigt; Gruppe 5)

1. Immunisierung

Es zeigte sich bei den Tieren der Protein-Kontrollgruppe bereits zwei Stunden nach intramuskulärer Injektion eine geringgradig derbe Konsistenz sowie Verfärbung der Haut an der Injektionsstelle. Die Umfangsvermehrung hatte ein Ausmaß von 0,5 cm und konnte überwiegend

bis zum 2. Tag p.vacc. beobachtet werden. Eine vermehrte Wärme an der Injektionsstelle konnte nicht nachgewiesen werden.

2. Immunisierung

Eine mittelgradige Konsistenzänderung und Rötung an der Injektionsstelle wurde acht Stunden p.vacc. festgestellt. Der Parameter „Wärme“ war vier Stunden p.vacc. mittelgradig verändert. Das Ausmaß der Umfangsvermehrung betrug 1 cm und war bis zum 3. Tag p.vacc. nachweisbar.

4.1.1.6 *E. coli*-Kontrollgruppe (*E. coli* pBAD_ohne Insert; Gruppe 6)

1. Immunisierung

Die Tiere der *E. coli*-Kontrollgruppe zeigten nach zwei Stunden p.vacc. geringgradige Konsistenzänderungen und eine Umfangsvermehrung mit einer maximalen Ausdehnung von bis zu 0,5 cm sowie eine leichte bis geringgradige Verfärbung der Haut. Eine Erwärmung an der Injektionsstelle konnte nicht festgestellt werden. Die Abweichungen der Konsistenz und der Umfangsvermehrung waren bei einem Tier bis zum 2. Tag p.vacc., bei dem zweiten Tier bis zum 3. Tag p.vacc. zu beobachten.

2. Immunisierung

Bei der *E. coli*-Kontrollgruppe traten vier Stunden p.vacc. eine Umfangsvermehrung bis zu einem maximalen Ausmaß von bis zu 1,5 cm auf. Es konnte eine geringgradige bis mittelgradige derbere Konsistenz sowie eine mittelgradige Erwärmung und eine geringgradige Rötung festgestellt werden. Die Erwärmung und die Verfärbung der Haut waren bis zum 2. Tag p.vacc. fühlbar, die Veränderungen der Konsistenz und die Umfangsvermehrung waren bis zum 3. Tag p.vacc. wahrzunehmen.

4.1.1.7 Kontrollgruppe mit PBS (Gruppe 7)

1. Immunisierung

Die Tiere der PBS-Kontrolle zeigten acht Stunden p.vacc. eine geringgradig derbere Konsistenz und eine Umfangsvermehrung von bis zu 0,5 cm. Eine geringgradige Verfärbung der Haut wurde nach vier Stunden p.vacc. beobachtet. Die pathologischen Befunde konnten bis zum 2. Tag p.vacc. erhoben werden, bei einem Tier waren sie bis zum 3. Tag p.vacc. nachweisbar. Für den Parameter „Wärme“ konnten keine Veränderungen festgestellt werden.

2. Immunisierung

Acht Stunden p.vacc. zeigten die Tiere eine Umfangsvermehrung bis zu einem maximalen Ausmaß von bis zu 2 cm. An der Injektionsstelle konnte eine geringgradig bis mittelgradig derbere Konsistenz sowie Verfärbung der Haut beobachtet werden. Eine geringgradige Erwärmung trat überwiegend ab 1. Tag p.vacc. auf und war bei einem Tier bis zum 3. Tag p.vacc. nachweisbar. Der Parameter „Konsistenz“ war bis zum 3. Tag p.vacc. verändert. Bei einem Tier konnte ab dem 2. Tag eine hochgradig derbere Konsistenz festgestellt werden sowie eine mittelgradige Rötung an der Injektionsstelle.

4.1.2 Systemische Reaktionen

4.1.2.1 Allgemeiner Gesundheitszustand nach der Impfung

Das Allgemeinbefinden (Aufmerksamkeit, Futteraufnahme, Ruheverhalten) wurde vor der ersten und der zweiten Immunisierung bei allen Tieren als unauffällig bewertet.

Zwei Tiere der MSG1Coli1-Impfgruppe wiesen nach der ersten Impfung geringgradige Auffälligkeiten im Allgemeinbefinden auf. Die Tiere der MSG1Coli2-Immunisierungsgruppe zeigten acht Stunden p.vacc. geringgradige bis mittelgradige Störungen des Allgemeinbefindens, welche bei einem Tier bis einen Tag p.vacc. anhielten. Die restlichen Tiere zeigten nach der Immunisierung keine Auffälligkeiten in ihrem Verhalten.

Nach der zweiten Impfung stieg die Anzahl der Tiere mit Auffälligkeiten. In den Gruppen MSG1Prot1, MSG1Coli1 und den drei Kontrollgruppen zeigten alle Tiere ein geringgradig bis mittelgradig gestörtes Allgemeinbefinden im Zeitraum zwei bis vier Stunden p.vacc.. Die Tiere der Gruppen MSG1Prot2 und MSG1Coli2 wiesen geringgradige Störungen im Allgemeinbefinden auf. Bei einem Tier der MSG1Coli2-Impfgruppe wurde das Allgemeinbefinden zwei Stunden p.vacc. als hochgradig gestört bewertet. Geringgradige Störungen zeigten sich bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes bei zwei Tieren der MSG1Prot1-Gruppe, bei jeweils einem Tier der Protein-Kontrollgruppe und der PBS-Kontrolle und bei beiden Tieren der *E. coli*-Kontrollgruppe.

4.1.2.2 Rektaltemperatur

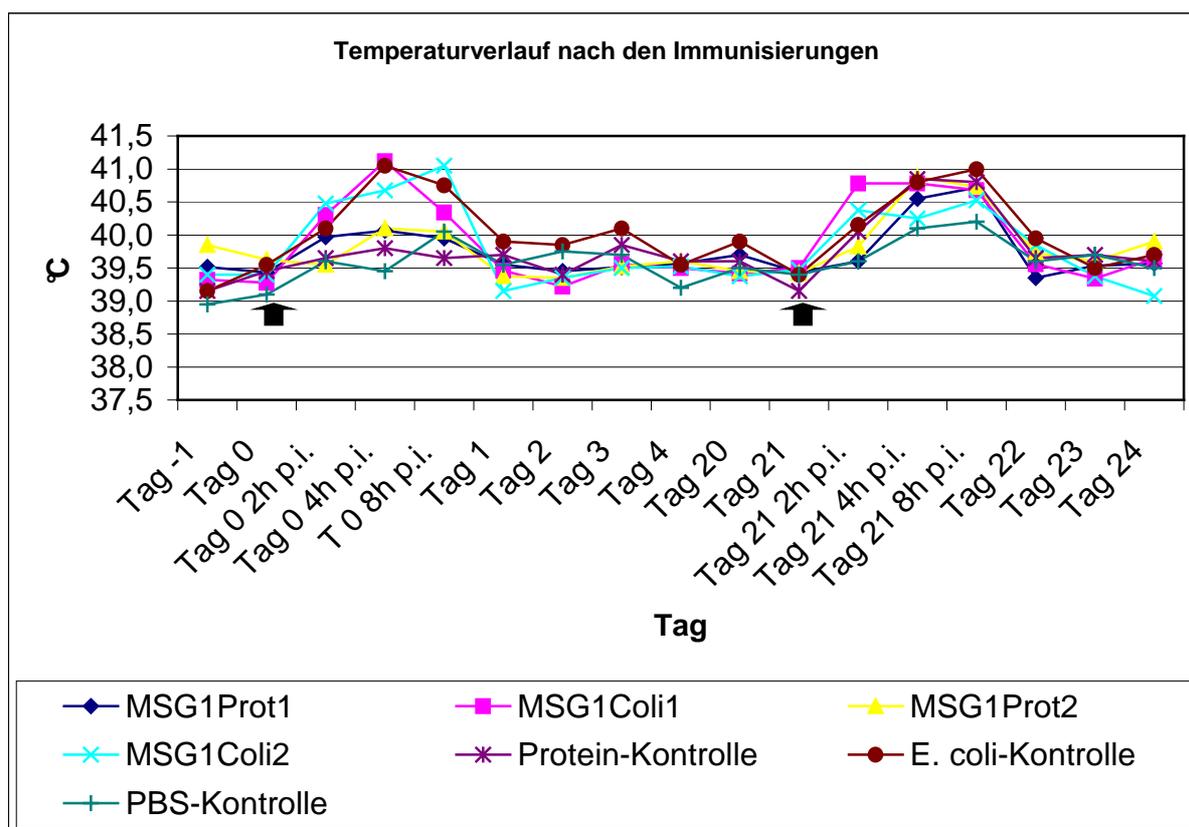


Abbildung 4: Temperaturverlauf nach den Immunisierungen gegliedert nach Versuchsgruppen. Der Pfeil kennzeichnet den Zeitpunkt der Impfungen.

Bei der ersten Immunisierung kam es zwei Stunden p.vacc. zu einem Anstieg der Körpertemperatur in allen Gruppen, wie in Abbildung 4 zu sehen ist. Der mittlere Anstieg der Temperatur in den Impfgruppen MSG1Coli1 und MSG1Coli2 und der *E. coli*-Kontrollgruppe ergab vier und acht Stunden nach der ersten Injektion einen Temperaturunterschied von mehr als 1°C zu den anderen Gruppen. Bei drei von vier Tieren der Gruppen MSG1Coli1 und MSG1Coli2 wurde ein Anstieg der Körpertemperatur auf über 41°C gemessen. Die durchschnittliche Rektaltemperatur der anderen Gruppen befand sich zwischen 39,5°C und 40°C in dem Zeitraum zwei bis acht Stunden p.vacc.. Am Tag 1 p.vacc. war die Körpertemperatur bei allen Tieren unter 40°C gesunken. Nur 1 Tier der Gruppe MSG1Coli1 hatte eine Rektaltemperatur von 40,2°C.

Nach der zweiten Immunisierung stieg die Körpertemperatur vier Stunden p.vacc. bei allen Gruppen auf über 40°C. Bei allen Gruppen außer der PBS-Kontrollgruppe konnte acht Stunden p.vacc. eine durchschnittliche Rektaltemperatur von 40,5°C bis 41°C gemessen werden.

Einen Tag nach der zweiten Immunisierung ergaben die Messungen größtenteils eine Temperatur $< 40^{\circ}\text{C}$.

4.2 Ergebnisse der klinischen Untersuchung und allgemeinen Labordiagnostik nach der Belastungsinfektion

Die 25 in die Untersuchungen eingehenden Schweine waren zum Aufstellungszeitpunkt klinisch gesund. Alle Parameter, die hämatologisch und klinisch-chemisch bestimmt wurden, lagen im Normbereich. In der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung der mit Akridinorange gefärbten Blutaussstriche war in keinem Fall *M. suis* nachweisbar. Die Versuchsgruppen 5, 6 und 7 werden für die weiteren Auswertungen der Meßparameter zu einer Kontrollgruppe zusammengefasst.

Ein Tier der Gruppe 1 (Tiernummer 1) zeigte nach der Splenektomie Erbrechen und Apathie. Es wurde aufgrund seines hochgradig gestörten Allgemeinbefindens nicht mit *M. suis* infiziert und am Tag 37 euthanasiert. Bei der patho-morphologischen Untersuchung konnte eine Inagination des Dünndarms über eine Strecke von 20 cm festgestellt werden.

Tabelle 3 zeigt die klinischen Ergebnisse der in die Untersuchung eingehenden Schweine. Sechs bis acht Tage nach experimenteller Infektion der 25 Schweine war ein Anstieg der Körpertemperatur von durchschnittlich $39,2^{\circ}\text{C}$ auf maximal $41,7^{\circ}\text{C}$ zu beobachten. Die Tiere zeigten das klinische Bild einer akuten Eperythrozoonose. Die Diagnose wurde bei der Beurteilung des mit Akridinorange gefärbten Blutaussstrichs und anhand charakteristischer Veränderungen von Erythrozytenzahl, Hämoglobingehalt, Hämatokritwert, Leukozytenzahl, Bilirubin, Eisen und Glukose bestätigt. Die Tiere zeigten zudem ausgeprägte Anorexie sowie Apathie. Im anschließenden Untersuchungszeitraum traten bei allen Tieren die gleichen Symptome wiederholt im Abstand von 5 bis 10 Tagen auf. Nur bei einem Tier wurde nach dem zweiten akuten eperythrozoonotischen Anfall keine erneute klinische Symptomatik beobachtet. Bis zum Versuchsende zeigten die Tiere durchschnittlich 4,8 akute Anfälle. Die klinischen Symptome bildeten sich bei einem Grossteil der Tiere nach einer fünftägigen Behandlung mit Oxytetracyclin (Terramycin LA®, 40 mg/ kg KGW) vollständig zurück. Sieben Tiere mussten vor Versuchsende aufgrund ihres hochgradig veränderten Allgemeinbefindens euthanasiert werden und vier Tiere sind verendet.

Tabelle 3: Klinische Ergebnisse der in die Untersuchung eingehenden Schweine

Gruppe	Tiernummer	Akute Eperythrozoonose Tag nach 1.Immunisierung	Euthanasie/verendet
1	2	42./ 47./ 52./ 59./ 69./ 78.	Euthanasie Tag 84
1	3	42./ 47./ 52./ 58./ 66./ 74.	Euthanasie Tag 84
1	4	41.	Euthanasie Tag 44
1	5	41./ 46./ 53./ 61./ 70.	Euthanasie Tag 84
1	6	41.	Euthanasie Tag 46
2	7	43./ 51.	Euthanasie Tag 84
2	8	41./ 51./ 61./ 72./ 83.	Euthanasie Tag 84
2	9	42./ 51./ 61./ 77.	Euthanasie Tag 84
2	10	41.	Euthanasie Tag 44
2	11	41./ 49./ 57./ 64./ 70./ 79.	Euthanasie Tag 84
3	12	41.	verendet Tag 42
3	13	41./ 48./ 55./ 66./ 82.	Euthanasie Tag 84
3	14	41.	verendet Tag 44
3	15	41./ 48./ 55./ 61./ 70.	Euthanasie Tag 71
4	16	41.	verendet Tag 42
4	17	41./ 49./ 56./ 66./ 76.	Euthanasie Tag 84
4	18	41./ 51./ 57./ 64.	Euthanasie Tag 84
4	19	42.	Euthanasie Tag 44
5	20	42./ 51./ 59./ 69.	Euthanasie Tag 84
5	21	42./ 49.	verendet Tag 49
6	22	43./ 51./ 57./ 65./ 74./ 81.	Euthanasie Tag 84
6	23	42./ 51./ 59.	Euthanasie Tag 59
7	24	41./ 49./ 59./ 68./78.	Euthanasie Tag 84
7	25	42./ 49.	Euthanasie Tag 50

4.2.1 Ergebnisse der Blutparameter

4.2.1.1 Erythrozytenzahl, Hämoglobingehalt und Hämatokritwert

Die Erythrozytenzahl, der Hämoglobingehalt und der Hämatokritwert sind in ihrer Höhe sowie im Verlauf über den Untersuchungszeitraum getrennt für die einzelnen Versuchsgruppen und die Kontrollgruppe in den Abbildungen 5, 6 und 7 dargestellt. Die Referenzbereiche werden in Tabelle 4 dargestellt. Ab Tag 42 konnte ein deutlicher Abfall der drei Parameter beobachtet werden, der an Tag 49 für die Hämoglobin- und Hämatokritkonzentration bzw. an Tag 52 für die Erythrozytenzahl sein Minimum erreichte. Die MSG1Prot1-Gruppe wies an Tag 49 die niedrigste Erythrozytenzahl (1,76 T/l), den niedrigsten Hämoglobingehalt (48 g/l) und den niedrigsten Hämatokritwert (0,118 l/l) auf. Mit einer Erythrozytenzahl von 2,76 T/l, einem Hämoglobingehalt von 77 g/l und einer Hämatokritkonzentration von 0,230 l/l waren bei der Gruppe MSG1Coli2 die höchsten Werte an Tag 49 messbar. Bis zum Ende des Untersuchungszeitraums wurde wieder ein Anstieg der drei Parameter in allen Gruppen festgestellt. Die Werte blieben aber deutlich unter dem Normbereich.

Tabelle 4: Referenzbereiche (KRAFT et al., 2005)

	Schwein	
Erythrozytenzahl	5,8 – 8,1 x 10 ⁶ /μl	5,8 – 8,1 T/l
Hämoglobinkonzentration	6,7 – 9,2 mmol/l	108 – 148 g/l
Hämatokritwerte	33 – 45 %	0,33 – 0,45 l/l

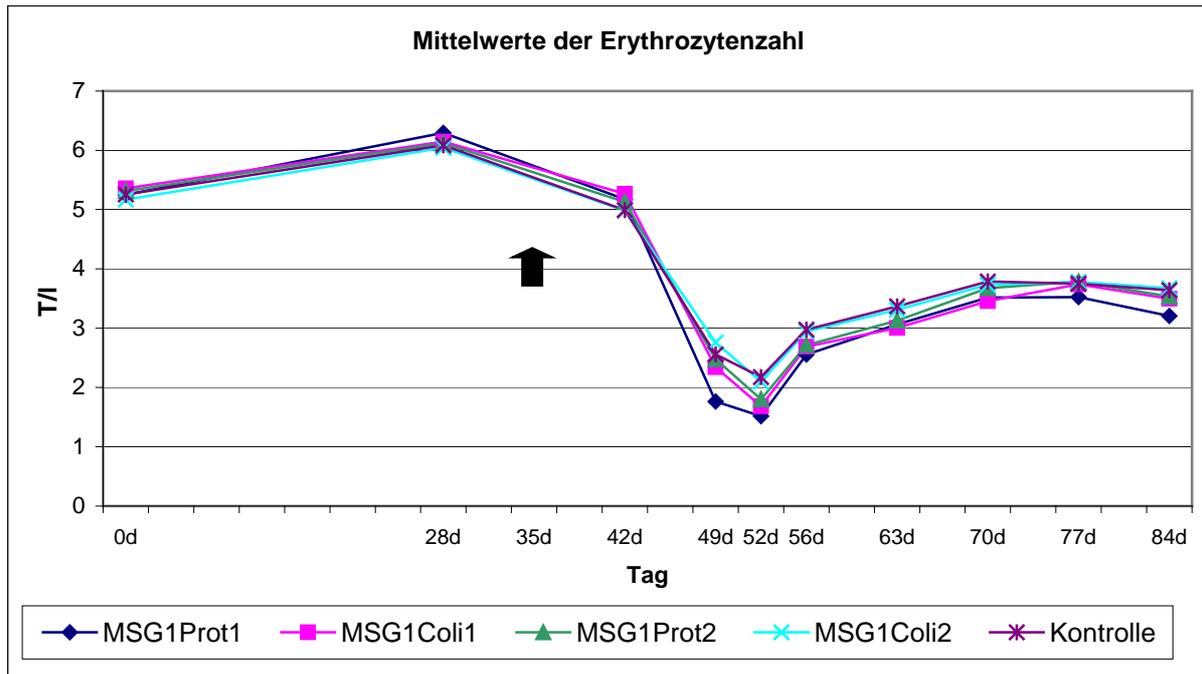


Abbildung 5: Mittlere Erythrozytenkonzentration gegliedert nach Versuchsgruppen. Der Pfeil kennzeichnet den Zeitpunkt der Belastungsinfektion

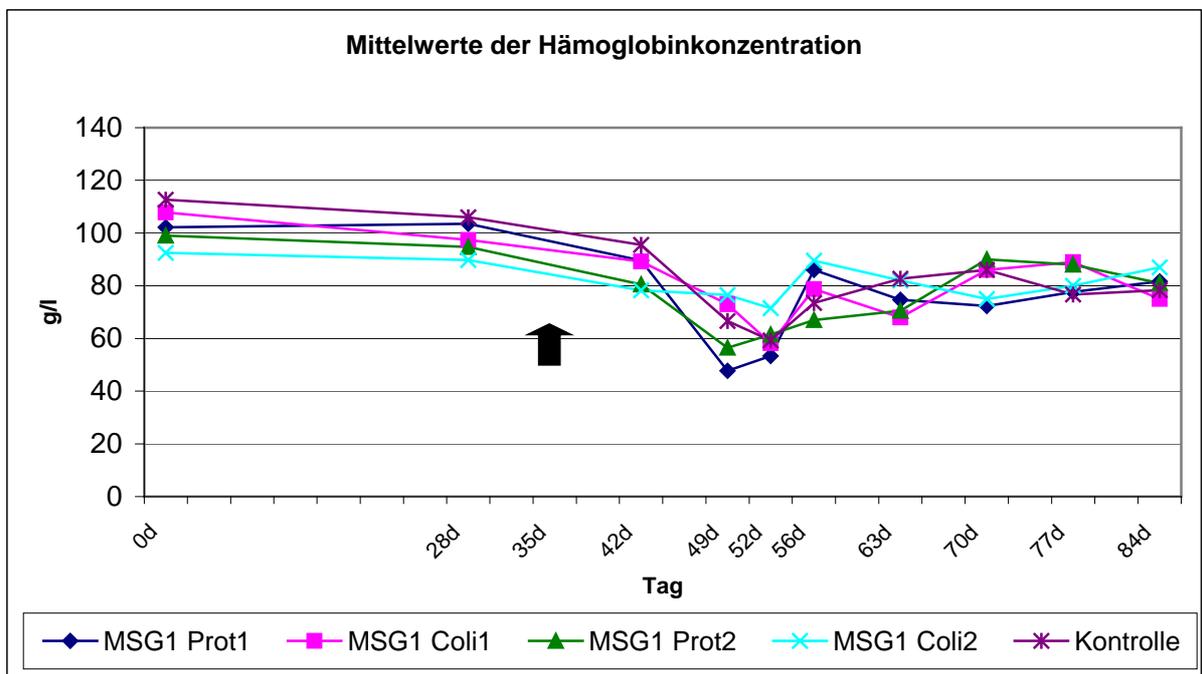


Abbildung 6: Mittlere Hämoglobinkonzentration gegliedert nach Versuchsgruppen. Der Pfeil kennzeichnet den Zeitpunkt der Belastungsinfektion.

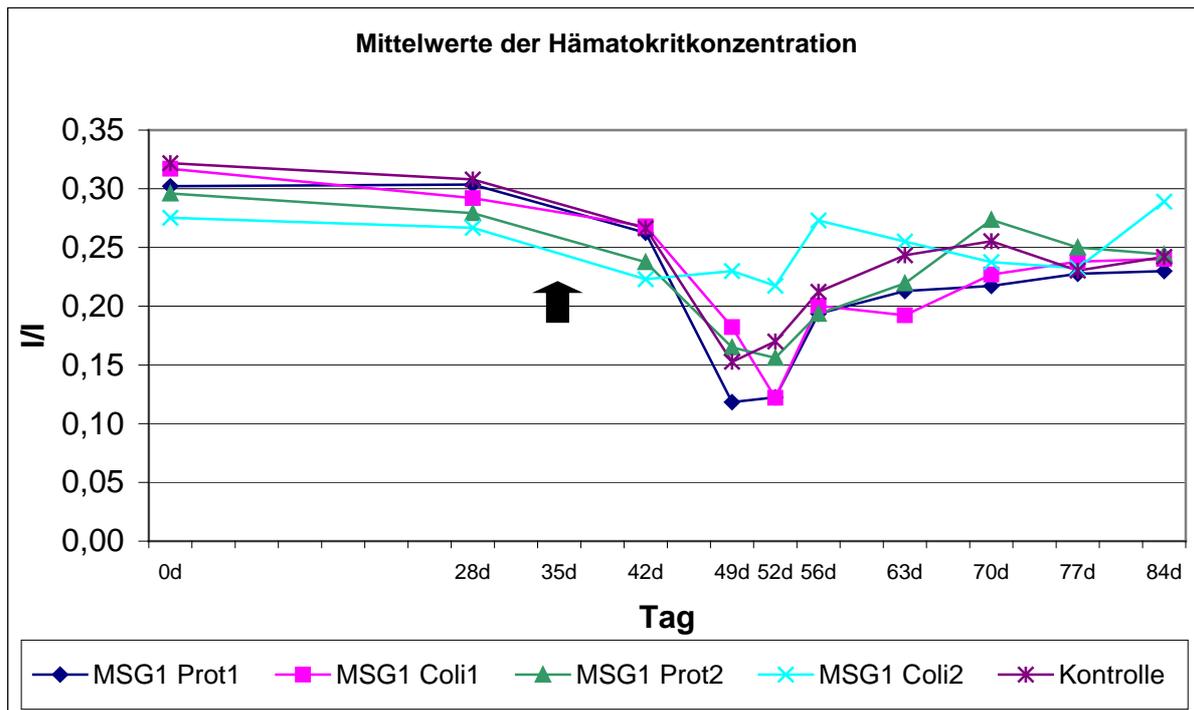


Abbildung 7: Mittlere Hämatokritkonzentration gegliedert nach Versuchsgruppen. Der Pfeil kennzeichnet den Zeitpunkt der Belastungsinfektion.

4.2.1.2 Leukozytenzahl

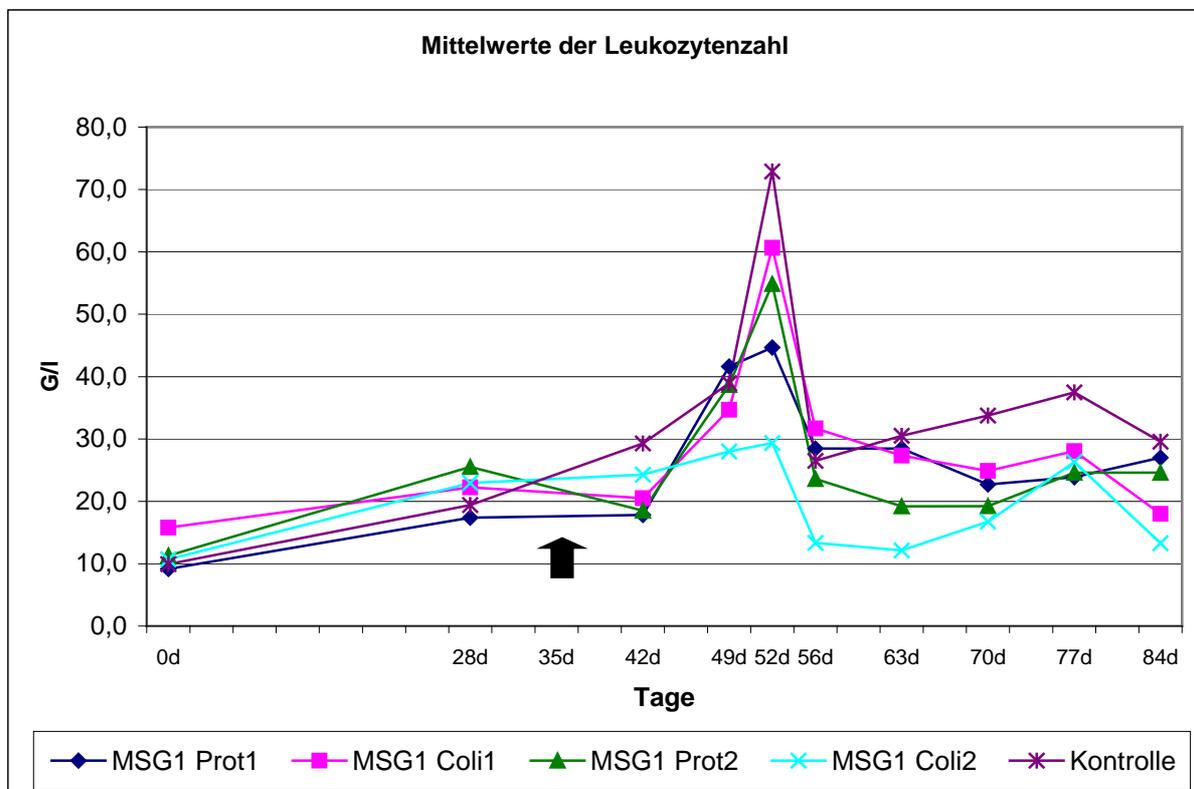


Abbildung 8: Mittlere Leukozytenzahl gegliedert nach Versuchsgruppen. Der Pfeil kennzeichnet den Zeitpunkt der Belastungsinfektion.

Für die Gesamtleukozytenzahl werden beim Schwein Werte von 10 bis 22 G/l als Referenzbereich angegeben. Die mittlere Leukozytenzahl stieg ab Tag 42 in allen Gruppen an und erreichte an Tag 52 ihren Höchstwert (Abb. 8). Dieser lag bei der Kontrollgruppe bei 72,9 G/l, bei den Gruppen MSG1Prot1, MSG1Coli1 und MSG1Prot2 zwischen 44,7 und 60,7 G/l. Die MSG1Coli2-Impfgruppe wies den niedrigsten Maximalwert von 29,4 G/l auf. Bis zum Versuchsende fiel die mittlere Leukozytenzahl in allen Gruppen wieder ab, wobei nur die Werte der Gruppen MSG1Prot2 und MSG1Coli2 grösstenteils wieder im Normbereich lagen.

4.2.1.3 Glukose

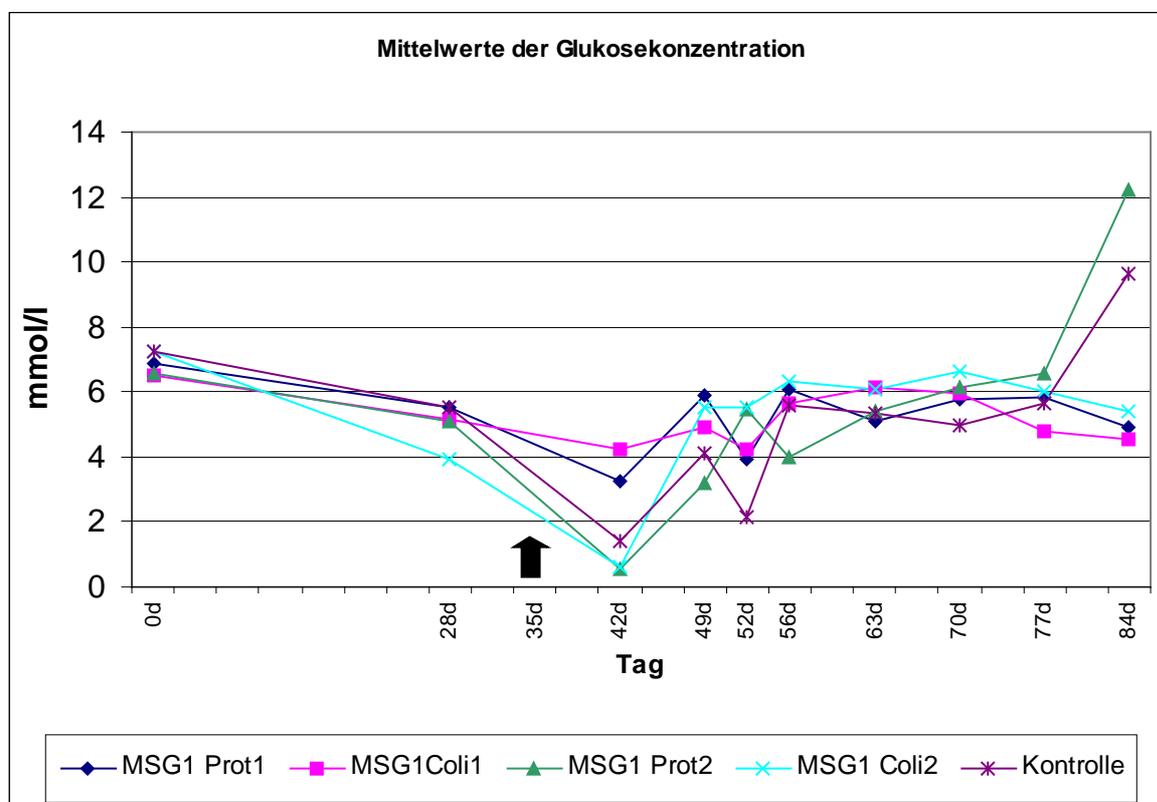


Abbildung 9: Mittlere Glukosekonzentration gegliedert nach Versuchsgruppen. Der Pfeil kennzeichnet den Zeitpunkt der Belastungsinfektion.

Die mittlere Glukosekonzentration lag vor der Belastungsinfektion in allen Gruppen im Normbereich von 4,0 bis 6,4 mmol/l. An Tag 42 konnte ein deutlicher Blutzuckerabfall im Serum in den Gruppen MSG1Prot2 und MSG1Coli2 und der Kontrollgruppe festgestellt werden, wobei bei der MSG1Prot2- und der MSG1Coli2-Gruppe sogar nur Werte von 0,6 mmol/l gemessen wurden (Abb. 9). Der Blutzuckergehalt blieb bei Gruppe MSG1Prot1 > 4 mmol/l, ebenso bei Gruppe MSG1Coli1, bei der an Tag 42 ein Wert < 4 mmol/l festgestellt wurde. Ab

Tag 49 lagen die Mittelwerte der Glukosekonzentration in allen Gruppen überwiegend wieder im Normbereich.

4.2.1.4 Bilirubin

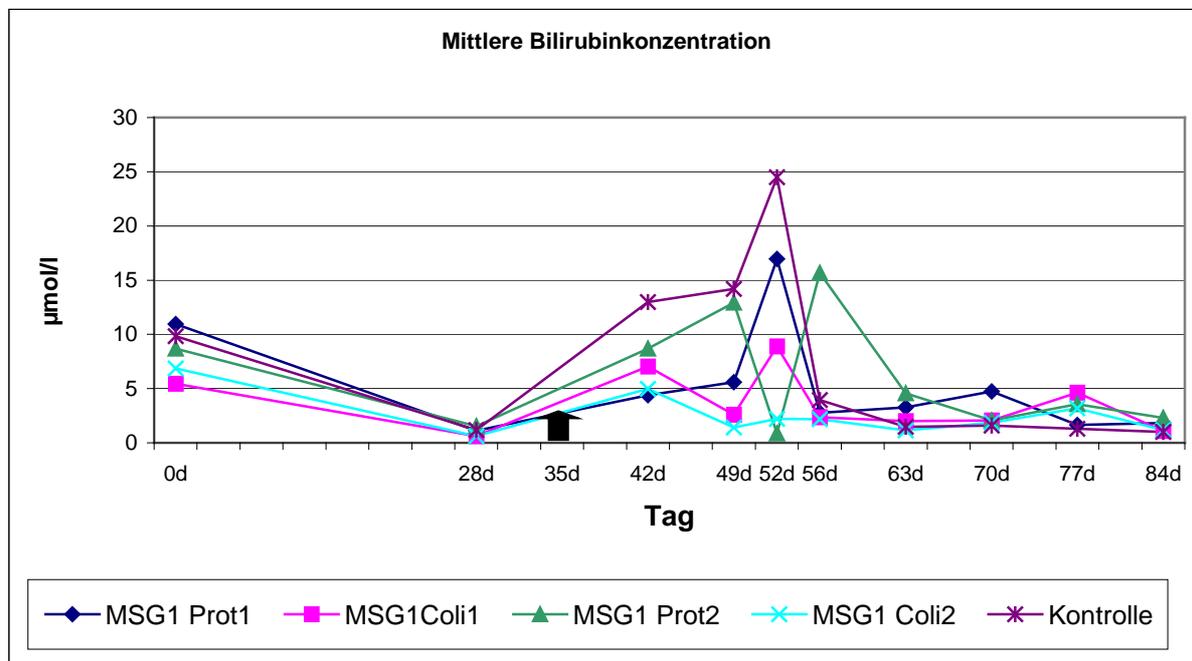


Abbildung 10: Mittlere Bilirubinkonzentration gegliedert nach Versuchsgruppen. Der Pfeil kennzeichnet den Zeitpunkt der Belastungsinfektion.

Für die Gesamtbilirubinkonzentration werden beim Schwein Werte von 0,0 bis 4,00 µmol/l als Referenzbereich angegeben. Die MSG1Coli2-Gruppe blieb nach der Belastungsinfektion bis zum Versuchsende im Normbereich, nur an Tag 42 konnte eine minimale Erhöhung festgestellt werden (Abb. 10). In den anderen Gruppen wurde eine deutliche Erhöhung der mittleren Bilirubinkonzentration beobachtet. Die MSG1Prot1-Gruppe erreichte an Tag 52 ihren Höchstwert mit 16,97 µmol/l, ebenso die Gruppe MSG1Coli1 (8,9 µmol/l) und die Kontrollgruppen (24,49 µmol/l). Bei der MSG1Prot2-Gruppe kam es bis zu Tag 49 zu einem signifikanten Anstieg des Bilirubingehaltes auf 12,92 µmol/l. Danach sank der Wert auf 0,86 µmol/l und stieg an Tag 56 auf seinen Höchstwert in dieser Gruppe (15,66 µmol/l) an. Ab Tag 63 bis zum Ende des Versuchs blieben die Werte < 5 µmol/l.

4.2.1.5 Eisen

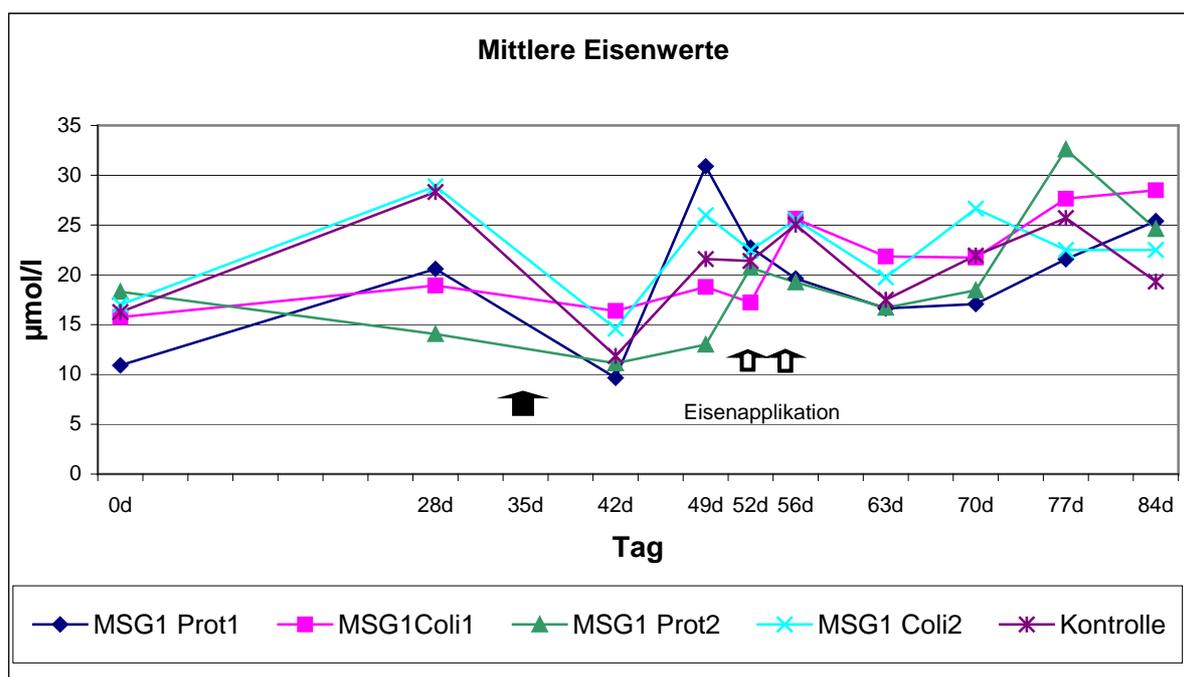


Abbildung 11: Mittlere Eisenkonzentration gegliedert nach Versuchsgruppen. Der schwarze Pfeil kennzeichnet den Zeitpunkt der Belastungsinfektion, die schwarz-weißen Pfeile kennzeichnen die Zeitpunkte der Eisengabe

Die Eisenkonzentration ist in ihrer Höhe sowie Verlauf über den Untersuchungszeitraum getrennt für die einzelnen Behandlungsgruppen und die Kontrollgruppe in Abbildung 11 dargestellt. Als Normalbereich werden beim Schwein Werte $>17,9 \mu\text{mol/l}$ angegeben. Trotz Eisenapplikation am 3. und 14. Lebenstag der Ferkel vor Beginn des Versuches liegt die mittlere Eisenkonzentration an Tag 0 bei allen Gruppen außer der Gruppe MSG1Prot2 unter dem Normbereich. Bis Tag 28 stieg der Eisengehalt im Serum in den Gruppen MSG1Prot1, MSG1Coli1 und MSG1Coli2 und den Kontrollgruppen in den Normbereich. In der MSG1Prot2-Gruppe hingegen konnte ein Abfall auf $14,1 \mu\text{mol/l}$ beobachtet werden. An Tag 42 wurde ein signifikanter Abfall der mittleren Eisenwerte in allen Gruppen nachgewiesen. Danach stieg die Eisenkonzentration wieder an und lag ab Tag 56 bis zum Versuchsende bei allen Tieren überwiegend im Normbereich.

4.2.2 Ergebnisse der patho-morphologischen Untersuchungen

Eine patho-morphologische Untersuchung wurde an allen euthanasierten und verendeten Tieren durchgeführt.

4.2.2.1 MSG1Prot1-Gruppe

Die Sektion der an Tag 44 und 46 euthanasierten Tiere ergab Befunde einer gering- und mittelgradigen interstitiellen Pneumonie und mittelgradigen und hochgradigen interstitiellen nichteitrigen Herdnephritis. Bei einem Tier konnte eine lokale Peritonitis an der 5 cm langen Nahtstelle festgestellt werden und das zweite Tier wies eine nichteitriges Epi- und Myokarditis und eine Enteritis auf. Die drei Tiere, die am Versuchsende euthanasiert wurden, zeigten bei der patho-morphologischen Untersuchung eine gering- bis mittelgradige interstitielle Pneumonie, eine gering- bis mittelgradige interstitielle gemischtzellige Hepatitis und eine gering- bis mittelgradige chronische interstitielle follikuläre Nephritis.

4.2.2.2 MSG1Coli1-Gruppe

Bei der Sektion des am Tag 44 euthanasierten Tieres konnte eine geringgradige interstitielle Pneumonie festgestellt werden. Die restlichen Tiere (n = 4) wurden am Tag 84 euthanasiert und wiesen eine gering- bis mittelgradige interstitielle Pneumonie, eine gering- bis mittelgradige interstitielle gemischtzellige Hepatitis und eine gering- bis mittelgradige chronische interstitielle follikuläre Nephritis auf.

4.2.2.3 MSG1Prot2-Gruppe

Die am Tag 42 und 44 verendeten Tiere zeigten bei der Sektion multifokale Petechien und Ekchymosen v.a. an den Akren. Bei einem Tier konnte eine mittelgradige interstitielle Pneumonie, bei dem anderen Tier ein interstitielles Ödem und eine fibrinöse Pleuritis festgestellt werden. Die Sektion des am Tag 71 euthanasierten Tieres ergab einen chronischen Abszess im Nacken, eine mittelgradige interstitielle Pneumonie mit einer fokalen geringgradigen Pleuritis, eine gering- bis mittelgradige Nephritis sowie eine gemischtzellige Hepatitis. Das am Versuchsende euthanasierte Tier wies eine Pneumonie, Hepatitis und Nephritis auf.

4.2.2.4 MSG1Coli2-Gruppe

Die patho-morphologische Untersuchungen der am Tag 42 verendeten und am Tag 44 euthanasierten Tiere ergaben eine mittel- bis hochgradige Anämie und einen gering- bis mittelgradigen Ikterus. Neben einer gering- bis mittelgradigen interstitiellen gemischtzelligen Hepatitis

und nichteitrigen Nephritis konnte bei einem Tier eine hochgradige und tiefreichende eitrig-einschmelzende und abszedierende Myositis in der Nackenregion mit einem Ausmaß von 5 cm sowie ca. 400 ml geronnenes Blut in der Brusthöhle nachgewiesen werden. Die beiden am Versuchsende euthanasierten Tiere wiesen neben einer interstitiellen Pneumonie eine Hepatitis und Nephritis auf.

4.2.2.5 Kontroll-Gruppe

Die Sektionen der am Tag 49 verendeten und an Tag 50 euthanasierten Tiere ergaben neben Anämie, Ikterus, Zyanosen an den Ohrmuscheln und einer geringgradigen interstitiellen Pneumonie ausserdem eine geringgradige interstitielle nichteitrig Herdnephritis. Bei einem Tier konnte zusätzlich eine geringgradige Enteritis und ein mittelgradig interstitielles, betont perivaskuläres Ödem am Herz festgestellt werden. Das am Tag 59 euthanasierte Tier zeigte bei der patho-morphologischen Untersuchung eine mittelgradige Anämie, eine geringgradige interstitielle Pneumonie sowie eine geringgradige interstitielle nichteitrig Herdnephritis. Bei der Sektion der am Versuchsende euthanasierten Tiere wurde eine gering- bis mittelgradige interstitielle Pneumonie, eine gering- bis mittelgradige interstitielle gemischtzellige Hepatitis und eine gering- bis mittelgradige chronische interstitielle folliculäre Nephritis nachgewiesen.

Alle Ergebnisse der patho-morphologischen Untersuchung für die einzelnen Tiere sind in der Tabelle 15 im Anhang dargestellt.

4.2.3 Zelluläre Immunantwort nach Immunisierung

Die zelluläre Immunreaktion auf die Vakzination wurde mittels T-Zell-Proliferationstest bestimmt. Dazu wurden Milz-Lymphozyten präpariert, kultiviert und anschliessend spezifisch mit einer gereinigten *M. suis*-Präparation und rekombinantem MSG1 stimuliert. Als Negativ-Kontrolle dienten Präparationen aus dem Blut von *M. suis*-negativen Schweinen sowie *E. coli*-Kontrollpräparationen. Die Proliferationsrate nach Stimulierung mit dem Mitogen Concavalin A wurde als 100% Wert festgelegt und so die Proliferationsrate (%) nach Stimulierung mit spezifischen Antigenen und Kontrollantigenen berechnet.

Die Versuchsgruppen MSG1Prot1 und MSG1Prot2 sowie MSG1Coli1 und MSG1Coli2 wurden jeweils zu einer Gruppe (MSG1Prot bzw. MSG1Coli) in den Auswertungen zusammengefasst.

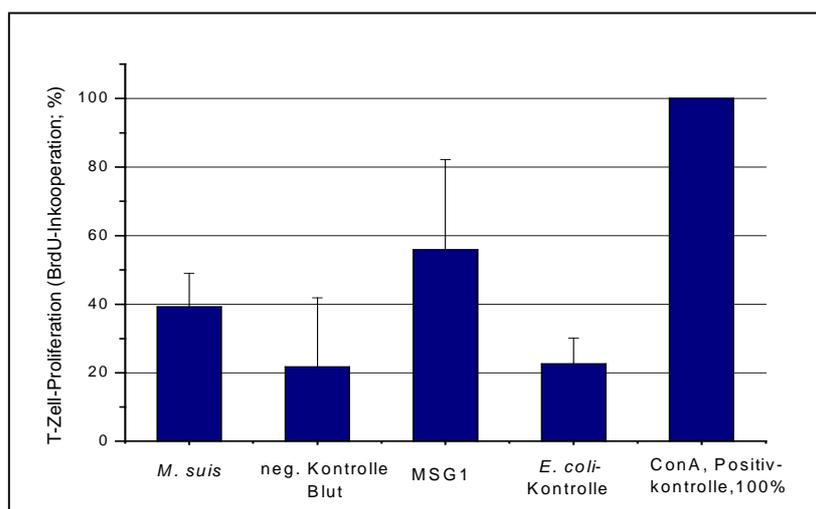


Abbildung 12: Lymphozytenproliferation Impfgruppe rMSG1 Protein

In der rMSG1 Protein-Impfgruppe konnte nach Stimulierung mit rMSG1 eine Proliferationsrate von 55,89% und mit *M. suis* eine Rate von 39,13% nachgewiesen werden. Nach Stimulierung mit den Kontrollpräparationen betrug die Proliferationsrate 21,7% bzw. 22,59%.

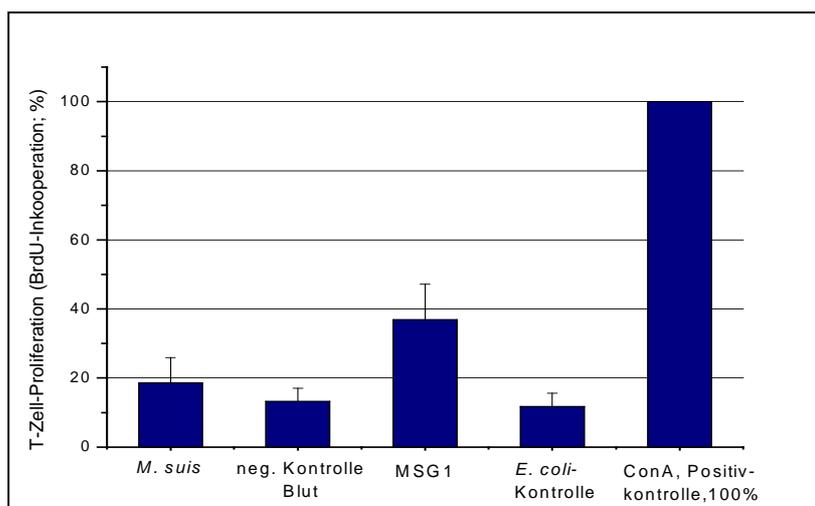


Abbildung 13: Lymphozytenproliferation Impfgruppe rMSG1 Coli

In der Gruppe der MSG1 Coli-immunisierten Tiere konnten die Milzlymphozyten ebenfalls spezifisch stimuliert werden: nach Stimulation mit rMSG1 mit einer Rate von 36,83% und nach Stimulation mit *M. suis* mit einer Rate von 18,55%. Die Kontrollwerte nach unspezifischer Stimulation mit den Negativpräparationen betragen 11,76% (*E. coli*-Kontrollpräparationen) bzw. 13,2% (negative Blutpräparationen).

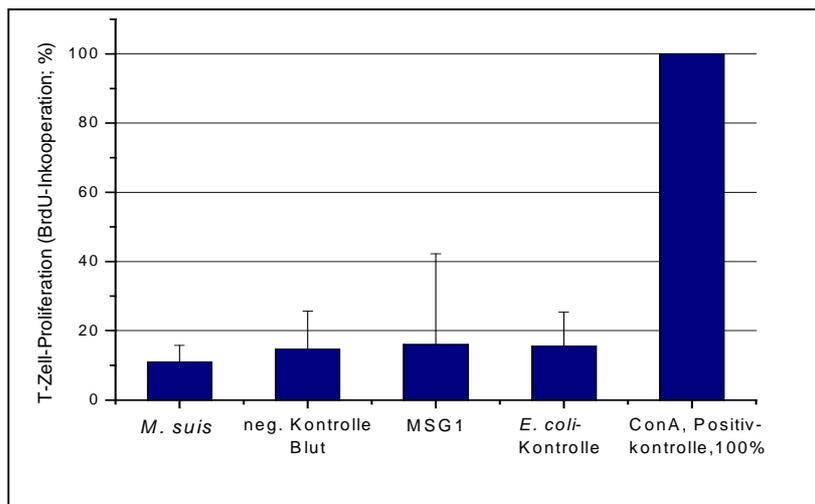


Abbildung 14: Lymphozytenproliferation Kontrollgruppe

In der Kontrollgruppe blieben die Proliferationsraten, unabhängig davon ob eine spezifische (*M. suis*; rMSG1) oder unspezifische (*E. coli*, negative Blutpräparation) Stimulation vorgenommen wurde, ungefähr auf gleichem Niveau. Nach der spezifischen Stimulierung wurden die Proliferationsraten von 10,95% und 16,03% nachgewiesen, nach der unspezifischen Stimulation betrug die Proliferation 14,68% bzw. 15,58%.

4.2.4 Humorale Immunantwort nach Immunisierung und Belastungsinfektion

Die humorale Immunantwort wurde mittels rekombinanter ELISA-Systeme ermittelt. Zwei der Hauptantigene (rMSG1=gleichzeitig Impfantigen, rHspA1) wurden rekombinant in *E. coli* exprimiert und als Testantigene im ELISA eingesetzt (HOELZLE et al., 2007a). MSG1-spezifische Antikörper wurden in allen Immunisierungsgruppen spätestens 21 Tage nach der Vakzination nachgewiesen. Durch die zweite Impfung erfolgte eine Verstärkung der Immunantwort (Boost-Effekt).

Eine MSG1-spezifische humorale Immunantwort konnte bis zum Versuchsende (Tag 84) festgestellt werden. Nach der Belastungsinfektion wurden keine signifikanten Unterschiede in der Höhe der ELISA-OD-Werte zwischen den geimpften Gruppen und der Kontrollgruppe beobachtet.

Eine HspA1-spezifische humorale Immunantwort konnte 7 Tage nach der Belastungsinfektion in allen Versuchsgruppen nachgewiesen werden. Es konnten keine signifikanten Unterschiede in der Höhe der ELISA-OD-Werte zwischen den Immunisierungsgruppen und den Kontrollgruppen festgestellt werden. In allen Gruppen war während des Infektionsverlaufs zu

unterschiedlichen Zeitpunkten ein kurzzeitiger Abfall der *M. suis*-spezifischen humoralen Immunantwort sowohl gegen MSG1 als auch gegen HspA1 zu beobachten. Zum nächsten Mess-Zeitpunkt stieg der Antikörper-Gehalt im Blutserum wieder an.

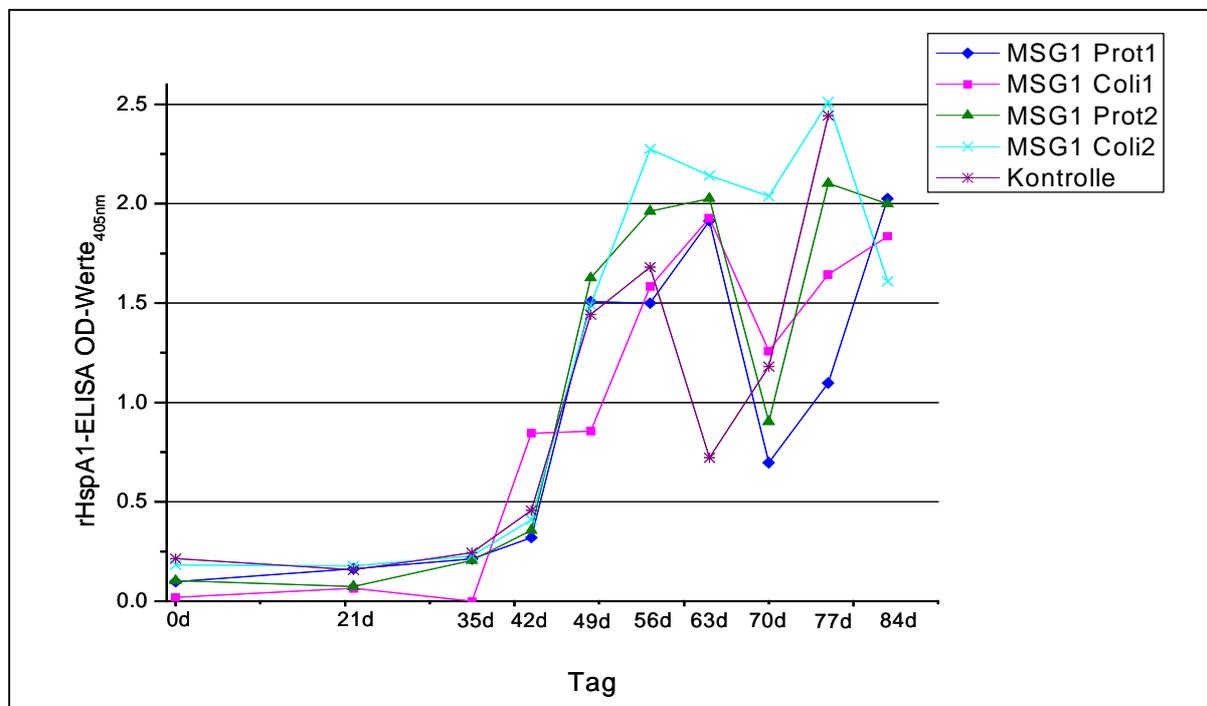


Abbildung 15: Humorale Immunantwort gegen rMSG1

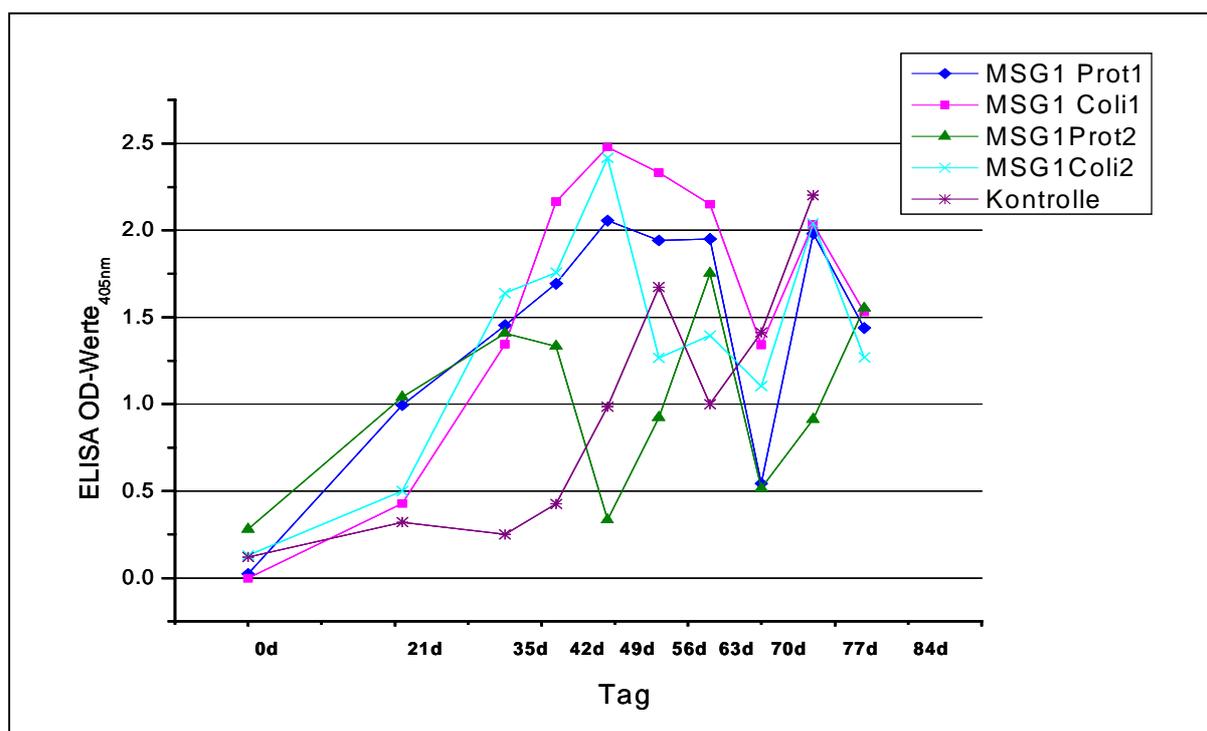


Abbildung 16: Humorale Immunantwort gegen rHspA1

4.2.5 *M. suis*-Konzentration im Blut während der Belastungsinfektion

Die *M. suis*-Konzentration im Verlauf der Infektion wurde mittels quantitativer PCR ermittelt. Das Blut der Schweine wurde im wöchentlichen Abstand untersucht. Abbildung 17 zeigt den Verlauf der *M. suis*-Konzentrationen in den verschiedenen Gruppen. Nach der Belastungsinfektion stieg der Gehalt an *M. suis* in allen Gruppen stark an und erreichte Werte zwischen 3.6×10^9 *M. suis* / ml Blut und 1.16×10^{11} *M. suis* / ml Blut. In allen Gruppen war während des gesamten Infektionsverlaufs *M. suis* nachweisbar.

In den Immunisierungsgruppen MSG1Prot2 und MSG1Coli2 fiel der *M. suis*-Gehalt im Blut 14 Tage nach der Infektion auf Werte von 1.2×10^8 *M. suis* / ml Blut bzw. 1.7×10^8 *M. suis* / ml Blut ab, während in allen anderen Gruppen die *M. suis*-Konzentration nicht abfiel und bei Werten zwischen 8.5×10^{10} *M. suis* / ml Blut und 1.8×10^{11} *M. suis* / ml Blut lag.

In der Impfgruppe MSG1Prot2 konnte 21 Tage nach Infektion wieder ein Anstieg des *M. suis*-Gehalts auf einen Wert von 9.6×10^9 *M. suis* /ml Blut beobachtet werden.

In der MSG1Coli2-Immunisierungsgruppe blieb die *M. suis*-Konzentration 28 und 35 Tage nach der Infektion bei Werten von 9.7×10^6 *M. suis* / ml Blut und 2.6×10^6 *M. suis* / ml Blut und stieg ab dem 42. Tag nach der Infektion wieder an (3.9×10^9 *M. suis* / ml Blut).

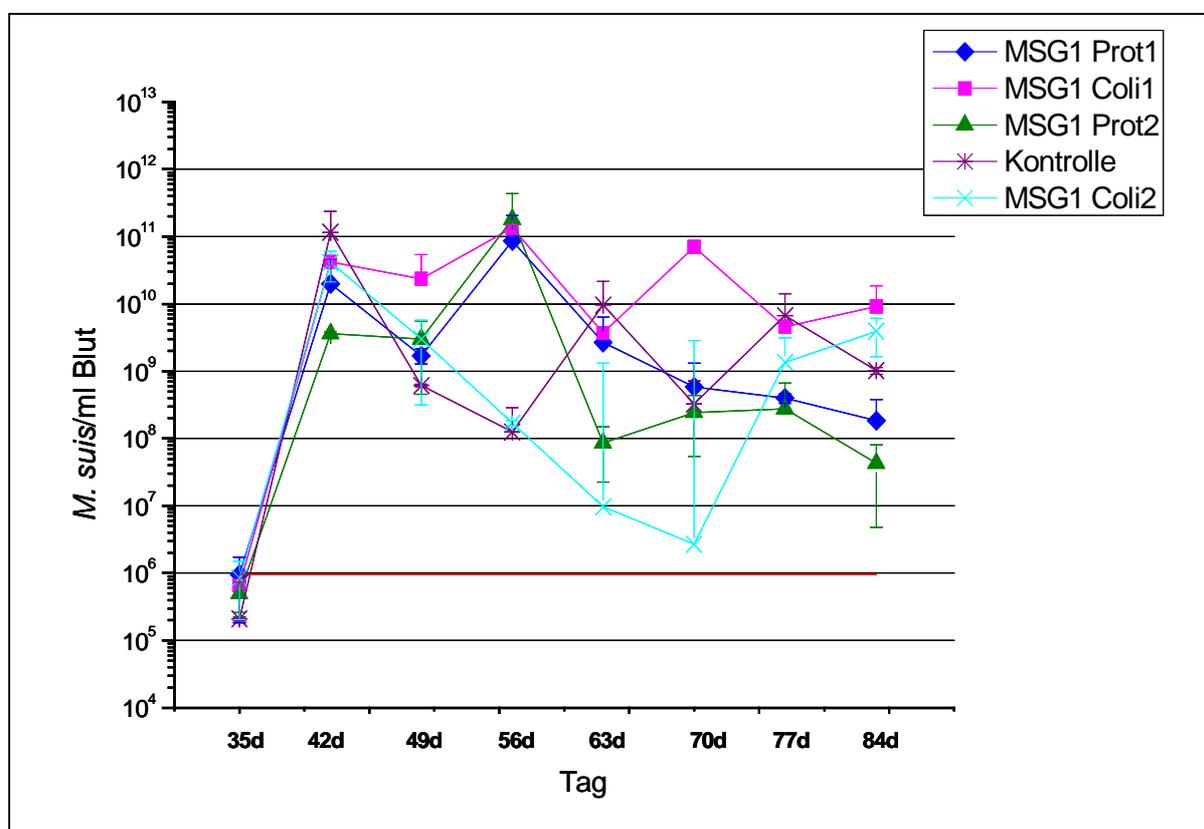


Abbildung 17: *M. suis*-Gehalt im Blut während des Infektionsverlaufs

5 Diskussion

Die Eperythrozoonose des Schweines, verursacht durch *M. suis*, ist eine weltweit verbreitete Infektionskrankheit mit wirtschaftlicher Bedeutung. Die akute Verlaufsform ist gekennzeichnet durch Fieber, immunhämolytische Anämie, Zyanosen an den Akren und massiver Hypoglykämie. Bei der chronischen Eperythrozoonose findet man Anämien, verzögertes Wachstum und eine signifikant erhöhte Anfälligkeit für virale und andere bakterielle Infektionskrankheiten in den Mastbetrieben, sowie eine verminderte Reproduktionsleistung in Zuchtbetrieben mit erhöhter embryonaler Sterblichkeit und Aborten (MESSICK, 2004).

Bei einer akuten Erkrankung führt die parenterale oder orale Applikation von potentiell wirksamen Antibiotika wie z.B. Tetrazyklin zu einer klinischen Besserung der Symptome, aber es wird keine Eliminierung der Mykoplasmen erreicht. Die betroffenen Tiere bleiben chronisch-persistent infizierte Trägartiere, und zeigen eine erhöhte Empfänglichkeit für multikausale Durchfall- und Respirationskrankheiten (MESSICK, 2004).

Der zunehmende Konsumentenwunsch nach Antibiotika-frei erzeugtem Fleisch erhöht die Bedeutung präventativer Maßnahmen.

Allerdings gestaltet sich die Entwicklung eines Impfstoffes gegen *M. suis* schwierig, da *M. suis* als Vertreter der hämotrophen Mykoplasmen bislang *in vitro* nicht kultivierbar ist (NEIMARK et al., 2001; HOELZLE, 2007). Daher stehen einerseits keine Reinkulturen für eine Ganzzell-Vakzine zur Verfügung, andererseits weiss man sehr wenig über die Erregerstrukturen, die an der Pathogenese der porcinen Eperythrozoonose beteiligt sind.

In Untersuchungen zur humoralen Immunantwort in experimentell infizierten Schweinen konnten drei Hauptimmunogene (p40, p45, p70) identifiziert werden, denen eine wichtige Rolle im Infektionsverlauf zugeschrieben wird (HOELZLE et al., 2006). Eines dieser drei Antigene stellt das *M. suis*-Protein MSG1 (p40) dar, das während der experimentellen *M. suis*-Infektion beantwortet wird (HOELZLE et al., 2007a). Die humorale Immunantwort gegen MSG1 beginnt spätestens zwei Wochen *post infectionem* und bleibt während des gesamten Infektionsverlaufs bestehen. Nur zum Zeitpunkt eines akuten eperythrozoonotischen Anfalls kann wie auch gegen andere immunogene Proteine, ein typischer Abfall spezifischer anti-*M. suis*-Antikörper und damit auch ein Abfall der anti-MSG1-Antikörper beobachtet werden (HOELZLE et al., 2006; HOELZLE et al., 2007a).

Das *M. suis*-Protein MSG1 wird von dem Gen *mgs1* mit einer Grösse von 1011 bp kodiert. Das Protein MSG1 ist aus 336 Aminosäuren aufgebaut und weist damit ein Molekulargewicht

von 36,7 kDa auf (HOELZLE et al., 2007c). Für das MSG1 wurden pathogenetisch wichtige Eigenschaften nachgewiesen: Einerseits konnte *in vitro* eine Glyceraldehyd-3-Phosphat-Aktivität (GAPDH-Aktivität) festgestellt werden. Desweiteren wurde nachgewiesen, dass MSG1 an der Bindung der Mykoplasmen an die Erythrozytenoberfläche beteiligt ist (HOELZLE et al., 2007c). Beide Eigenschaften sind für den Lebenszyklus von *M. suis* von Bedeutung und stehen in engem Zusammenhang mit zwei wichtigen pathogenetischen Phänomenen der porcinen Eperythrozoonose.

(1.) *M. suis*-infizierte Schweine zeigen während des akuten Anfalls einen lebensbedrohlichen Abfall der Blutglukosewerte, der eindeutig mit dem Stoffwechsel von *M. suis* in Verbindung steht (HEINRITZI et al., 1990; SMITH et al., 1990). Als Ursache des stark erhöhten Glukoseverbrauchs kommt einerseits eine Verstoffwechslung durch den Erreger selbst, andererseits eine erregerinduzierte Steigerung des erythrozytären Glukoseabbaus in Betracht (HEINRITZI et al., 1990). Die während der Fieberanfälle reduzierte Futteraufnahme kann nicht als Ursache der Hypoglykämie angesehen werden (MÜLLER et al., 1983). Inwieweit *M. suis* zu einem eigenständigen Glukoseabbau in der Lage ist, kann momentan nicht vollständig aufgeklärt werden, da eine Methode zur *in vitro*-Kultivierung bisher nicht zur Verfügung steht. MSG1 ist das erste *M. suis*-Protein, das nachweislich eine Funktion im Glukose-Abbau hat (GAPDH-Aktivität; HOELZLE et al., 2007b). MSG1 weist auch auf genetischer Ebene Homologien zu bakteriellen GAPDHs auf (52,6 – 54,5% zu GAPDH-Genen anderer Mykoplasmen; HOELZLE et al., 2007b).

(2.) Die Adhäsion an die Erythrozyten ist für hämotrophe Mykoplasmen essentiell für den Lebenszyklus. Man geht davon aus, dass sich hämotrophe Mykoplasmen auf der Oberfläche der Erythrozyten vermehren: ZACHARY und BASGALL (1985) konnten in elektronenmikroskopischen Untersuchungen auf infizierten Erythrozyten verschiedene Replikationsformen nachweisen. Aus diesen elektronenmikroskopischen Untersuchungen ist ausserdem bekannt, dass *M. suis* über fibrilläre Strukturen mit der Oberfläche der Wirtserythrozyten verbunden ist und Einbuchtungen und Vertiefungen der Erythrozytenoberfläche entstehen (MESSICK, 2004; ZACHARY und BASGALL, 1985). Dieser enge Kontakt zwischen Bakterium und Wirtszelle führt zu massiven Veränderungen und Schädigung der Wirtserythrozyten. Bislang ist allerdings noch unklar, aus welchen Proteinen diese Adhärenz-Strukturen aufgebaut sind. MSG1 wurde bisher als erstes *M. suis* Protein beschrieben, das an der Adhäsion beteiligt ist.

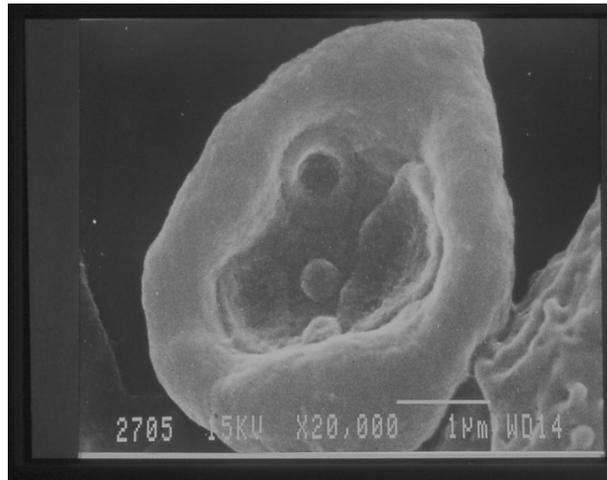
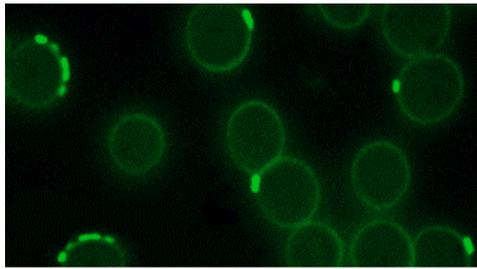
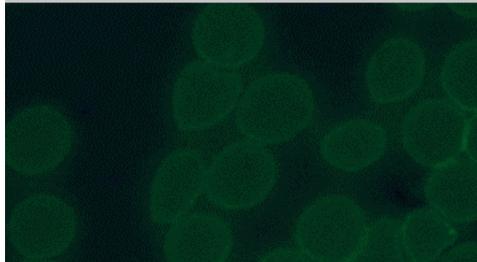


Abbildung 18: Elektronenmikroskopische Aufnahme (20.000fache Vergrößerung) zeigt den engen Kontakt von *M. suis* mit der Wirtszelle Erythrozyt

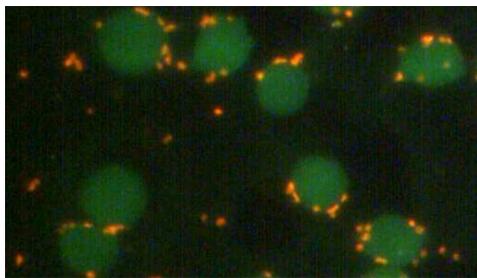
HOELZLE und Mitarbeiter (2007c) konnten nachweisen, dass nicht-adhärenente *E. coli* durch die rekombinante Expression von MSG1 auf ihrer Oberfläche die Eigenschaft zur Adhäsion an Schweineerythrozyten erlangen. Diese Adhäsion konnte durch anti-MSG1-Antikörper gehemmt werden. Das gibt einen Hinweis darauf, dass es sich bei MSG1 um ein Virulenz-assoziiertes Protein handelt und Antikörper gegen dieses Protein einen protektiven Schutz induzieren könnten. Solche virulenzassoziierten Proteine sind aussichtsreiche Impfstoffkandidaten. Eine rekombinante Expression von *M. suis*-Proteinen in *Escherichia coli* ermöglicht die Herstellung von relativ reinem Protein in grösseren Mengen. Rekombinantes MSG1 zeigt glykolytische Aktivität (HOELZLE et al., 2007c). Dadurch konnte nachgewiesen werden, dass in *E. coli* funktionell aktives Protein exprimiert wird. Die Expression von MSG1 in *M. suis* erfolgt sowohl im Zytoplasma als auch als oberflächenständiges Membranprotein (HOELZLE et al., 2007c). Für rekombinantes MSG1-*E. coli* konnte eine gleiche Kompartimentierung nachgewiesen werden. In *E. coli* wird rMSG1 im Zytoplasma, in der Membran und auf der Oberfläche exprimiert.



MSG1-exprimierende *E. coli* (grüne Fluoreszenz) adhäreren an der Oberfläche von Schweineerythrozyten



Negative *E. coli* (keine MSG1 Expression) → keine Adhärenz an der Oberfläche von Schweineerythrozyten



Acridinorange gefärbter Blutausstrich

Abbildung 19: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von *M. suis* (1000fache Vergrößerung)

Mittels des im Rahmen dieser Pilotstudie durchgeführten Protein-Immunisierungsversuchs sollte die Immunogenität von MSG1 näher charakterisiert, sowie der Einfluss auf die Modulation einer Immunantwort überprüft werden. Da, wie oben erwähnt, nicht-adhärerende *E. coli* durch die MSG1-Expression adhäsive Fähigkeiten erwerben, wurden ausserdem rekombinante *E. coli* als Impfantigen verwendet. Für diesen Versuch stand ein von HEINRITZI (1984b) etabliertes und häufig angewendetes Tiermodell zur Verfügung: In diesem Modell werden splenektomierte Schweine verwendet, die sieben bis zehn Tage nach der Splenektomie akute eperythrozoonotische Anfälle mit hohem Fieber entwickeln. Der Vorteil dieses Tiermodells liegt in seiner eindeutigen Messbarkeit der klinischen Parameter wie Fieber, gestörtes Allgemeinbefinden sowie der hämatologischen Parameter.

Zur Unterstützung der immunogenen Wirkung des Antigens MSG1 erfolgten die Immunisierungen als Emulsion, bei der das Antigen mit Freund'schem Adjuvans emulgiert wurde. Man unterscheidet zwischen komplettem Freund'schem Adjuvans und inkomplettem Freund'schem Adjuvans. Das komplette Freund'sche Adjuvans besteht aus abgetöteten Bakterien (*Mycobacterium tuberculosis*), Mineralöl und einem Emulgator, beim inkompletten Freund'schen Adju-

vans fehlen die Bakterien. Die Emulsion zwischen MSG1 und Mineralöl erzeugt nach einer Injektion ein Depot, aus dem das MSG1 langsam in den Tierkörper freigesetzt wird. Durch die Bakterien kommt es zu einer allgemeinen Verstärkung der Immunantwort. Freund'sches Adjuvans kann allerdings bei Versuchstieren Entzündungen an der Injektionsstelle, Fieber und Granulombildung verursachen (TIZARD, 2000). Ein Vorteil des Freund'schen Adjuvans liegt in der Stimulierung sowohl der zellulären als auch der humoralen Immunantwort. Aufgrund dessen war das Freund'sche Adjuvans in dieser Pilotstudie das Mittel der Wahl.

In den Untersuchungen konnten Gewebeirritationen sowohl in den Immunisierungsgruppen als auch in den Kontrollgruppen festgestellt werden. Nach der 1. Immunisierung mit komplettem Freund'schen Adjuvans war kein deutlicher Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen erkennbar. Es konnte überwiegend eine geringgradige Konsistenzänderung mit einem Ausmaß von ca. 0,5 bis 1 cm und eine geringgradige Rötung beobachtet werden. In den Immunisierungsgruppen MSG1Coli1, MSG1Prot2 und MSG1Coli2 wurde geringgradige bis hochgradige Wärme an der Injektionsstelle nachgewiesen. Die Tiere der Immunisierungsgruppe MSG1Coli2 wiesen nach der 1. Impfung grösstenteils geringgradige bis mittelgradige Konsistenzänderungen mit einer maximalen Ausdehnung von bis zu 2 cm sowie eine mittelgradige Rötung auf. Die meisten Schweine zeigten nach der 1. Immunisierung keine Auffälligkeiten in ihrem Verhalten. Die Ergebnisse der Temperaturmessung am Tag der Impfung ergaben keine deutlichen Unterschiede zwischen den verschiedenen Versuchsgruppen.

Bei der 2. Immunisierung wurde als Adjuvans inkomplettes Freund'sches Adjuvans verwendet. In allen Versuchsgruppen wurden stärkere lokale Reaktionen festgestellt. Es konnte grösstenteils eine geringgradige bis mittelgradige derbe Konsistenz und eine Umfangsvermehrung von 0,5 bis 1,5 cm beobachtet werden, sowie eine geringgradige Verfärbung der Haut und eine geringgradige bis mittelgradige Erwärmung an der Injektionsstelle. Die Tiere zeigten am Tag der 2. Impfung ein geringgradig bis mittelgradig gestörtes Allgemeinbefinden. Bei allen Gruppen außer der PBS-Kontrollgruppe konnte am Tag der 2. Impfung eine durchschnittliche Rektaltemperatur von 40,5°C bis 41°C gemessen werden.

In der Literatur werden sehr intensive Gewebeirritationen, Entzündungsreaktionen und Fieber bei komplettem Freund'schem Adjuvans beschrieben (BENNET et al., 1992), die im direkten Vergleich mit inkomplettem Freund'schen Adjuvans immer stärker ausfallen (YAMANAKA et al., 1993). Im Gegensatz dazu berichtete VAN DER VEN (2002) von stärkeren Reaktionen vom inkompletten Freund'schen Adjuvans, wie auch die Ergebnisse in dieser Studie zeigten.

Aufgrund der durch die Immunisierung induzierten Immunantwort war ein zumindest teilweiser protektiver Effekt zu erwarten. Die Vakzinierungen sowohl mit rekombinantem Protein als auch mit MSG1 exprimierenden *E. coli* hatten eine ausgeprägte Immunantwort zur Folge. Nicht nur ein Nachweis der anti-*M. suis*-Antikörper war möglich, sondern auch ein deutlicher Anstieg der anti-*M. suis*-Antikörper in Form eines Boosteffekts war messbar nach jeweils der zweiten Immunisierung. Ebenfalls nachweisbar war eine Induktion einer zellulären Immunantwort: Nach jeweils zwei Vakzinierungen konnten Milzlymphozyten sowohl mit rekombinantem MSG1 als auch *M. suis*-Präparationen spezifisch stimuliert werden. Ein solcher Stimulationseffekt war in den Kontrollgruppen nicht vorhanden.

Nach der Belastungsinfektion zeigten jedoch alle Versuchsgruppen (unabhängig vom Vakzinierungsstatus) das klinische Bild einer akuten Eperythrozoonose. Die akute Eperythrozoonose ist geprägt durch einen parallelen Abfall der Erythrozytenzahl, des Hämatokritwertes und des Hämoglobingehaltes. Das weiße Blutbild zeigt eine neutrophile Leukozytose (BOLLWAHN, 1982). Der Blutglukosespiegel sinkt stark ab (ZACHARY und SMITH, 1985) und der Bilirubingehalt ist leicht erhöht (HEINRITZI et al., 1990; HEINRITZI, 1990b). Alle Schweine dieser Studie zeigten das typische Krankheitsbild einer ausgeprägten Anämie (erniedrigte Erythrozytenzahl, niedriger Hämatokrit, reduzierter Hämoglobingehalt), Leukozytose, Bilirubinämie und Hypoglykämie.

Zwischen den Versuchsgruppen konnten bei den hämatologischen Parametern keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. So kam es ab Tag 42 (7 Tage nach der Belastungsinfektion) zu einem deutlichen Abfall von Erythrozytenzahl, Hämatokrit und Hämoglobingehalt mit den niedrigsten Werten an den Tagen 49 und 52. Bis zum Ende des Untersuchungszeitraums stiegen die drei Parameter wieder an, die Werte blieben aber deutlich unter dem Normbereich für Schweine dieser Altersgruppe. Eine Ausnahme stellte die MSG1Coli2-Impfgruppe dar: In den Infektionsparametern Hämatokrit, Hämoglobinkonzentration und Leukozytenzahl zeigte sich ein deutlicher Unterschied sowohl zur Kontroll- als auch zu den anderen Impfgruppen.

Der Infektionsverlauf bzw. die fehlende protektive Wirkung konnte durch regelmäßige Messung der *M. suis*-Konzentration im Blut bestätigt werden. Diese Konzentration wurde mittels quantitativer PCR überwacht. Nach der Belastungsinfektion kam es zu einem starken Anstieg des *M. suis*-Gehalts in allen Gruppen. Es wurden Werte zwischen 3.6×10^9 *M. suis* /ml Blut und 1.16×10^{11} *M. suis* / ml Blut gemessen. Nur die Immunisierungsgruppen MSG1Prot2 und MSG1Coli2 stellten eine Ausnahme dar. In diesen beiden Gruppen fiel der *M. suis*-Gehalt im Blut 14 Tage nach der Infektion ab, während in allen anderen Gruppen die *M. suis*-

Konzentration relativ konstant blieb. In der MSG1Coli2-Immunisierungsgruppe wurden 28 und 35 Tage nach der Infektion die niedrigsten *M. suis*-Konzentrationen gemessen und sie stiegen ab erst dem 42. Tag nach der Infektion wieder an.

Wie bei GRIMM et al. (2007) konnte eine Korrelation zwischen der Erregermenge und dem Schweregrad der Anämie festgestellt werden, d.h. bei steigender Erregermenge war eine Abnahme der Erythrozytenzahl, der Hämoglobinkonzentration sowie des Hämatokritwertes zu beobachten. Dagegen konnte kein Zusammenhang zwischen Erregermenge und den klinischen Symptomen festgestellt werden. Zusätzlich mussten in allen Versuchsgruppen Tiere aufgrund ihres hochgradig gestörten Allgemeinbefindens vor Versuchsende euthanasiert werden.

6 Schlussfolgerung

Die hämatologischen Ergebnisse und der gemessene „Bacterial load“ lassen zwischen den einzelnen Versuchsgruppen und der Kontrollgruppe keine signifikanten Unterschiede erkennen. Nur in der MSG1Coli2-Impfgruppe ist eine Tendenz für die Wirksamkeit des verwendeten Antigens zu beobachten. Rekombinantes MSG1-*E. coli* präsentiert im Tier vermutlich ähnliche Konformationseigenschaften wie *M. suis*.

MSG1 wurde bisher als erstes *M. suis*-Protein beschrieben, das an der Adhäsion an die Erythrozyten beteiligt ist. Höchstwahrscheinlich weist *M. suis*, wie die meisten Mykoplasmen, einen Adhäsionskomplex auf, der aus mehreren Proteinen bzw. Zellstrukturen besteht. Daher ist eine Immunisierung mit MSG1 und somit die spezifische Antikörperproduktion gegen das Antigen nicht ausreichend um klinische Symptome zu verhindern. Die Impfung konnte trotz der Induktion von anti-MSG1-Antikörpern nicht verhindern, dass *M. suis* an die Erythrozyten bindet. Im Gegensatz zu den in vitro-Vorversuchen, bei denen es durch experimentelle anti-MSG1-Seren (hergestellt in Kaninchen und Schweinen) möglich war, die Bindung von rekombinanten MSG1-exprimierenden *E. colis* an Schweineerythrozyten zu inhibieren.

Insgesamt sprechen die publizierten Daten und die Resultate der vorliegenden Arbeit dafür, dass die eingesetzten Immunisierungsstrategien in Kombination mit dem verwendeten Protein zu ineffizient sind, um den gewünschten protektiven Effekt zu generieren. Aus diesem Grunde sind vermutlich, neben der weiteren Identifizierung neuer Kandidatenantigene, neue Immunisierungsstrategien notwendig.

Ebenso muss berücksichtigt werden, dass *M. suis*, wie andere Mykoplasmen auch, in der Lage ist, eine Art Immunmodulation zu induzieren. Die Kälteagglutinine bewirken eine Unterdrückung der T-Zell-Blastogenese, insbesondere der T-Helfer-Zellen und somit eine Suppression der T-Zell-Immunität (ZACHARY und SMITH, 1985). In den Untersuchungen von HOELZLE et al. (2006) konnte eine Unterdrückung der Erreger-spezifischen Antikörperantwort während eines akuten Anfalls nachgewiesen werden. Dies ist womöglich die Ursache, warum bei der porcinen Eperythrozoonose keine Aktivierung spezifischer Gedächtniszellen stattfindet.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Unverträglichkeitsreaktionen nach den Immunisierungen auf das Freund'sche Adjuvans zurückzuführen sind. Durch die Applikation von rMSG1 und auch rekombinanten MSG1-exprimierenden *E. coli* lässt sich sowohl eine humorale als auch eine zelluläre Immunantwort induzieren. In der MSG1Coli2-Impfgruppe ist eine Tendenz für die Wirksamkeit des verwendeten Antigens erkennbar.

Das Ziel weiterer Untersuchungen liegt in der Überprüfung von neuen Impfstrategien. Zukünftig sollten in Studien neue Immunisierungsansätze (genetische Vakzine, DNA-Vakzine, virale Vektoren) und die Kombination mit anderen Immunisierungsmethoden im Vordergrund stehen. Um einen erfolgreichen Impfstoff gegen *M. suis*-Infektionen zu entwickeln, sollte neben der Suche nach möglicherweise effizienteren Impfstoffapplikationen auch die weitere Identifizierung von neuen protektiven *M. suis*-Antigenen im Vordergrund stehen.

Zur Zeit lässt sich keine Aussage darüber machen, welche Immunisierungsstrategie in Zukunft am schnellsten zum Erfolg führen könnte. Ein Grund hierfür ist, dass die dem Immunschutz gegen die porcine Eperythrozoonose zugrunde liegenden Mechanismen noch ungeklärt sind. Zukünftige Studien mit dem Ziel einen *M. suis*-Impfstoff zu entwickeln, sollten deshalb auch verstärkt die Aufklärung dieser immunologischen Reaktionen weiter im Blickfeld haben.

7 Zusammenfassung

Untersuchung zur Möglichkeit einer Vakzination gegen *Mycoplasma suis*

Die porcine Eperythrozoonose, verursacht durch *Mycoplasma suis*, ist eine weltweit verbreitete Infektionskrankheit mit wirtschaftlicher Bedeutung. *M. suis* ist in vitro nicht kultivierbar. Deshalb gestaltet sich die Entwicklung eines Impfstoffes schwierig.

Das *M. suis*-Protein MSG1 stellt eines von drei identifizierten Hauptimmunogenen dar. Da nicht-adhärierende *E. coli* durch die MSG1-Expression adhäsive Fähigkeiten erlangen, wurden ausserdem rekombinante *E. coli* als Impfantigen verwendet. Für die Immunisierung wurden zwei Versuchsgruppen mit rekombinantem MSG1-Protein mit einfacher (MSG1Prot1) und doppelter Proteinmenge (MSG1Prot2) und zwei Versuchsgruppen mit rekombinantem *E. coli* als Impfantigen in einfacher (MSG1Coli1) und doppelter Dosierung (MSG1Coli2) eingesetzt. Als Kontrolle fungierte eine Protein-Kontrollgruppe (BAD_ohne Insert, aufgereinigt) und eine *E. coli*-Kontrollgruppe (pBAD_ohne Insert, aufgereinigt). Einer Kontrollgruppe wurde nur Adjuvans verabreicht. Die 25 Tiere wurden im Alter von drei (Versuchstag 0) und sechs Wochen (21. Versuchstag) geimpft. Bei der 1. Immunisierung wurde komplettes Freund'sches Adjuvans und bei der 2. Immunisierung wurde inkomplettes Freund'sches Adjuvans verwendet. Zwischen dem 29. und 32. Versuchstag erfolgte die Splenektomie aller Tiere. Am 35. Versuchstag wurden die Schweine einer Belastungsinfektion unterzogen. Zur Beurteilung des Gesundheitsstatus wurde neben der klinischen Beobachtung, zweimal täglich die Körpertemperatur gemessen. Während des gesamten Versuchszeitraumes, bis zum 84. Versuchstag, wurde das Blut der Tiere wöchentlich serologisch und mikrobiologisch untersucht.

Zusätzlich wurde der durch die Vakzination verursachte Schaden an der Applikationsstelle adspektorisch und palpatorisch beurteilt. Die Gewebeveränderungen verliefen in den verschiedenen Tiergruppen einheitlich. Sie waren nach der 2. Impfung deutlich stärker ausgeprägt als nach der 1. Impfung.

Die humorale Immunantwort wurde mittels rekombinanter ELISA-Systeme ermittelt. MSG1-spezifische Antikörper wurden in allen Immunisierungsgruppen spätestens 21 Tage nach der 1. Vakzination nachgewiesen. Durch die zweite Impfung erfolgte eine Boosterung der Immunantwort. Auch eine zelluläre Immunantwort konnte mittels T-Zell-Proliferationstest festgestellt werden.

Die Belastungsinfektion löste sowohl bei den geimpften als auch bei den nichtgeimpften Schweinen das Krankheitsbild einer akuten Eperythrozoonose aus. Die hämatologischen Ergebnisse und der gemessene *M. suis*-Gehalt/ ml Blut lassen zwischen den einzelnen Versuchsgruppen und den Kontrollgruppen keine signifikanten Unterschiede erkennen. Nur in der MSG1Coli2-Impfgruppe ist eine Tendenz für die Wirksamkeit des verwendeten Antigens zu beobachten.

Diese Studie stellt die Grundlage weiterer Arbeiten zur Entwicklung eines Impfstoffes gegen *M. suis* dar. Dabei sollte zunächst die Suche nach weiteren Impfstoff-Kandidaten und neuen Impfstrategien im Vordergrund stehen.

8 Summary

Investigation for the possibility of a vaccination against *Mycoplasma suis*

Porcine eperythrozoonosis caused by *Mycoplasma suis* is a globally distributed disease of economic impact. Since *M. suis* cannot be cultivated in vitro the development of suitable vaccines is difficult.

In this work, an *M. suis* vaccination study was performed using recombinant MSG1 (rMSG1), one of three major *M. suis* immunogens. Since non-adhesive *E. coli* gain adhesive properties through MSG1 expression, recombinant *E. coli* were used as vaccine antigens too. Two test groups with rMSG1, one with singular (MSG1Prot1) and one with double the amount of proteins (MSG1Prot2), as well as two test groups with recombinant *E. coli* serving as a vaccine antigen in singular (MSG1Coli1) and double dosis (MSG1Coli2) were applied. Control vaccination groups received purified control protein (pBAD_without insert, purified), an *E. coli* control (*E. coli*_pBAD_without insert) and adjuvans alone.

Twenty five experimental pigs were vaccinated at an age of three weeks (day 0) and at an age of six weeks (day 21). For the first vaccination complete Freund adjuvant and for the second vaccination incomplete Freund adjuvant was used. All animals were splenectomised between day 29 and 32. To check protection potential of the vaccination the pigs were given a challenge infection on day 35. During said test phase the pigs were tested weekly up to the 84th test day. Besides clinical examinations temperature was measured twice daily in order to determine their health status. Furthermore, local irritation and damage due to vaccination were measured by adspection and palpation. Tissue irritations and damage were the same for all animal groups. These changes were obviously stronger after the second vaccination than after the first vaccination.

The humoral immune response was determined by recombinant ELISA systems. MSG1 specific antibodies were determined for all immunisation groups 21 days after the first vaccination at latest. After the second vaccination the immune response was boosted. In addition, a cellular immune response was determined by applying a T-cell proliferation test.

The test infection caused an acute eperythrozoonosis with the vaccinated as well as with the non-vaccinated pigs. Haematologic results and the *M. suis*-load/ ml blood do not show significant differences amongst the individual test groups and control groups. Merely the MSG1Coli2 vaccination group tends to show protection potency due to the vaccination and antigen used.

This work represents the foundation for further studies towards developing a vaccine against *M. suis*. Now the initial aim must focus on searching for further vaccine candidates and state-of-the-art strategies.

9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Akridinorange-Ausstrich während eines akuten Anfalls	12
Abbildung 2: Splenektomie mithilfe des Schlingenführers nach HEINRITZI (1984a).....	33
Abbildung 3: Deutliche Umfangsvermehrung an der rechten Nackenseite nach Injektion von MSG1Coli2.....	44
Abbildung 4: Temperaturverlauf nach den Immunisierungen gegliedert nach Versuchsgruppen. Der Pfeil kennzeichnet den Zeitpunkt der Impfungen.....	47
Abbildung 5: Mittlere Erythrozytenkonzentration gegliedert nach Versuchsgruppen. Der Pfeil kennzeichnet den Zeitpunkt der Belastungsinfektion.....	51
Abbildung 6: Mittlere Hämoglobinkonzentration gegliedert nach Versuchsgruppen. Der Pfeil kennzeichnet den Zeitpunkt der Belastungsinfektion.....	51
Abbildung 7: Mittlere Hämatokritkonzentration gegliedert nach Versuchsgruppen. Der Pfeil kennzeichnet den Zeitpunkt der Belastungsinfektion.....	52
Abbildung 8: Mittlere Leukozytenzahl gegliedert nach Versuchsgruppen. Der Pfeil kennzeichnet den Zeitpunkt der Belastungsinfektion.....	52
Abbildung 9: Mittlere Glukosekonzentration gegliedert nach Versuchsgruppen. Der Pfeil kennzeichnet den Zeitpunkt der Belastungsinfektion.....	53
Abbildung 10: Mittelere Bilirubinkonzentration gegliedert nach Versuchsgruppen. Der Pfeil kennzeichnet den Zeitpunkt der Belastungsinfektion.....	54
Abbildung 11: Mittlere Eisenkonzentration gegliedert nach Versuchsgruppen. Der schwarze Pfeil kennzeichnet den Zeitpunkt der Belastungsinfektion, die schwarz-weißen Pfeile kennzeichnen die Zeitpunkte der Eisengabe	55
Abbildung 12: Lymphozytenproliferation Impfgruppe rMSG1 Protein	58
Abbildung 13: Lymphozytenproliferation Impfgruppe rMSG1 Coli.....	58
Abbildung 14: Lymphozytenproliferation Kontrollgruppe.....	59
Abbildung 15: Humorale Immunantwort gegen rMSG1	60
Abbildung 16: Humorale Immunantwort gegen rHspA1	60
Abbildung 17: <i>M. suis</i> -Gehalt im Blut während des Infektionsverlaufs.....	61
Abbildung 18: Elektronenmikroskopische Aufnahme (20.000fache Vergrößerung) zeigt den engen Kontakt von <i>M. suis</i> mit der Wirtszelle Erythrozyt	64
Abbildung 19: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von <i>M. suis</i> (1000fache Vergrößerung)	65

10 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Gruppeneinteilung	28
Tabelle 2: Versuchsablauf	29
Tabelle 3: Klinische Ergebnisse der in die Untersuchung eingehenden Schweine.....	48
Tabelle 4: Referenzbereiche (KRAFT et al., 2005)	50
Tabelle 5: Zeitlicher Verlauf der klinischen Untersuchung der Injektionsstelle bezüglich des Parameters „Allgemeinbefinden“ getrennt nach Gruppen nach der 1. Immunisierung.....	87
Tabelle 6: Zeitlicher Verlauf der klinischen Untersuchung der Injektionsstelle bezüglich des Parameters „Allgemeinbefinden“ getrennt nach Gruppen nach der 2. Immunisierung.....	88
Tabelle 7: Zeitlicher Verlauf der klinischen Untersuchung der Injektionsstelle bezüglich des Parameters „Konsistenz“ getrennt nach Gruppen nach der 1. Immunisierung	90
Tabelle 8: Zeitlicher Verlauf der klinischen Untersuchung der Injektionsstelle bezüglich des Parameters „Konsistenz“ getrennt nach Gruppen nach der 2. Immunisierung	91
Tabelle 9: Zeitlicher Verlauf der klinischen Untersuchung der Injektionsstelle bezüglich des Parameters „Wärme“ getrennt nach Gruppen nach der 1. Immunisierung	92
Tabelle 10: Zeitlicher Verlauf der klinischen Untersuchung der Injektionsstelle bezüglich des Parameters „Wärme“ getrennt nach Gruppen nach der 2. Immunisierung	94
Tabelle 11: Zeitlicher Verlauf der klinischen Untersuchung der Injektionsstelle bezüglich des Parameters „Verfärbung der Haut“ getrennt nach Gruppen nach der 1. Immunisierung.....	95
Tabelle 12: Zeitlicher Verlauf der klinischen Untersuchung der Injektionsstelle bezüglich des Parameters „Verfärbung der Haut“ getrennt nach Gruppen nach der 2. Immunisierung.....	97
Tabelle 13: Zeitlicher Verlauf der klinischen Untersuchung der Injektionsstelle bezüglich des Parameters „Veränderung in cm“ getrennt nach Gruppen nach der 1. Immunisierung.....	98
Tabelle 14: Zeitlicher Verlauf der klinischen Untersuchung der Injektionsstelle bezüglich des Parameters „Veränderung in cm“ getrennt nach Gruppen nach der 2. Immunisierung.....	100
Tabelle 15: Ergebnisse der patho-morphologischen Untersuchung.....	101

11 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

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

Bedrosian, I., R. Mick, S. Xu, H. Nisenbaum, M. Faries, P. Zhang, P.A. Cohen, G. Koski, B.J. Czerniecki (2003):

Intranodal administration of peptid-pulsed mature dendritic cell vaccines results in superior CD8+ T-cell function in melanoma patients
J. Clin. Oncol. **21**, 3826-3835

Beer, M., C. Mettenleiter (2003):

Moderne Methoden der Impfstoffentwicklung: Möglichkeiten und Grenzen
AfT-Herbstsymposium, 9. Oktober 2003

Bennett, B., I.J. Check, M.R. Olsen, R.L. Hunter (1992):

A comparison of commercially available adjuvants for use in research
J. Immunol. Methods **153**, 31-40

Berrier H.H., R.E. Gouge (1954):

Eperythrozoonosis transmitted in utero from carrier sows to their pigs
J. Am. Vet. Med. Ass. **124**, 98-100

Bollwahn, W. (1982):

Die Eperythrozoonose (Iktereanämie) 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

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

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

Bugnowski, H. (1987):

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

Chaung, H.C. (2006):

CpG oligodeoxynucleotids as DNA adjuvants in vertebrates and their application in immunotherapy
Int. Immunopharmacol. **6**, 1586-1596

Cox, J.C., A.R. Coulter (1997):

Adjuvant- a classification and review of their modes of action
Vaccine **15**, 248-256

Cresswell, P. (1994):

Assembly, transport, and function of MHC class 2 molecules
Annu. Rev. Immunol. **12**, 259-293

Dalton, J.P., G. Mulcahy (2001):

Parasite vaccines- a reality?
Vet. Parasitol. **98**, 149-167

Doyle, L.P. (1932):

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

Duarte, M.I.S., M.S. Oliveira, M.A. Shikanai-Yasuda, O.N. Mariano, C.F.H. Takakura, C. Pagliari, C.E.P. Corbett (1992):

Haemobartonella-like microorganism infection in AIDS patients: ultrastructural pathology
J. Infect. Dis. **165**, 976-977

Fischer, P. (2003):

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

Godelaine, D., J Carrasco, S. Lucas, V. Karanikas, B. Schuler-Thurner, P.G. Coulie, G. Schuler, T. Boon, A. Van Pel (2003):

Polyclonal CTL responses observed in melanoma patients vaccinated with dendritic cells pulsed with a MAGE-3,A1 peptide
J. Immunol. **171**, 4893-4897

Gresham, A.C.J., J.P. Rogers (1994):

Eperythrozoon suis in weaned pigs
Vet. Rec. **134**, 71-72

Grimm, J., M. Ritzmann, K. Heinritzi, M.M. Wittenbrink, K. Hoelzle, L.E. Hoelzle (2007):

Untersuchungen zur Prävalenz von Mycoplasma suis in Deutschland mittels real-time Polymerasekettenreaktion
bpt-Kongress, Bremen, 2007

- Gupta, R.K., E.D. Relyveld, E.B. Lindblad, B. Bizzini, S. Ben.Efrain, C.K. Gupta (1993):**
Adjuvants- a Balance between toxicity and adjuvancity
Vaccine **11**, 293-306
- Gwaltney, S.M., M.P. Hays, R.D. Oberst (1993):**
Detection of Eperythrozoon suis using the polymerase chain reaction
J. Vet. Diagn. Invest. **5**, 40-46
- 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
- Hein, W.R., G.B.L. Harrison (2005):**
Vaccines against veterinary helminths
Vet. Parasitol. **132**, 217-222
- Heinritzi, K. (1984a):**
Klinik, Hämatologie und Metabolismus des eperythrozoonotischen Anfalls
Prakt. Tierarzt **65** „Collegium Veterinarium XIV“, 44-44
- 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., G. Plank, W. Peteranderl, N. Sandner (1990):**
Untersuchungen zum Säure-Basen-Haushalt und Kohlenhydratstoffwechsel bei der Infektion mit Eperythrozoon suis
J. Vet. Med. B. **37**, 412-417
- 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
- Henry, S.C. (1979):**
Clinical observation on Eperythrozoonosis
J. Am. Vet. Med. Ass. **174**, 601-603
- 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 detec-

- tion 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. (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., 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):**
First LightCycler Real-Time PCR assay for the quantitative detection of *Mycoplasma suis* in clinical samples
J. Microbiol. Methods **70**, 346-354
- 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, 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
- Hunter, R., F. Strickland, F. Kezdy (1981):**
The adjuvant activity of nonionic block polymer surfactants: I. The role of hydrophile-lipophile balance
J. Immunol. **127**, 1244-1250
- Jolles, P., A. Paraf (1973):**
Chemical and biological basis of adjuvants
Mol. Biol. Biochem. Biophys. **13**, 1-152
- 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

Kallick, C.A., K.C. Thadhani, T.W. Rice (1980):

Identification of Anaplasmatataceae (Haemobartonella) antigen and antibodies in systemic lupus erythematosus
Arthritis Rheum. **23**, 197-205

Kayser, F.H., E.C. Böttger, R.M. Zinkernagel, O. Haller, J. Eckert, P. Deplazes (2005):

Medizinische Mikrobiologie
Thieme Verlag, Stuttgart, 11. Auflage, 34-54

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

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. Fürll, H. Bostedt, K. Heinritzi (2005):

Hämatologie
In: Kraft, W., U.M. Dürr (Hrsg.): Klinische Labordiagnostik
6. Auflage, Schattauer-Verlag, Stuttgart, 49-92

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

Aegyptianellosis, Eperythrozoonosis, Grahamellosis and Haemobartonellosis
Vet. Parasitol. **2**, 83-95

Laemmli (1970):

Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4
Nature **227**, 680-685

Liebich, H.G., K. Heinritzi (1992):

Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen an Eperythrozoon suis
Tierärztl. Prax. **20**, 270-274

Lindblad, E.B. (2004):

Aluminium compounds for use in vaccines
Immunol. Cell Biol. **82**, 497-505

Mayr, A. (2001):

Grundlagen der Allgemeinen Medizinischen Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre
In: Rolle, M., Mayr, A. (Hrsg.):
Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre, 7. Auflage, 28-41
Enke Verlag Stuttgart

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 mycoplasmas
Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **52**, 693-698

Messick, J.B. (2004):

Hemotrophic mycoplasmas (hemoplasmas). a review and new insights into pathogenic potential
Vet. Clin. Pathol. **33**, 2-13

Müller, E., G. Neddenriep (1979):

Eperythrozoonose in einem Ferkelerzeugerbetrieb in Norddeutschland
Prakt. Tierarzt **8**, 662-665

Müller, M.J., U. Paschen, H.J. Seitz (1983):

Glucose production measured by tracer and balance data in conscious miniature pig
Am. J. Physiol. **224**, 236-244

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

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

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

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

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

Preston, K., J. Greve (1965):

Eperythrozoonosis in 4-week-old pigs
Veterinaria **27**, 119

Quin, A.H. (1938):

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

Rikihisa, Y., M. 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

Rommel, M. (1992):

Parasitosen des Schweines: Protozoen
In: Boch, J., Supperer, R. (Hrsg.):
Veterinärmedizinische Parasitologie, 4. Auflage, 444-458
Verlag Paul Parey Berlin-Hamburg

Schijns, V.E.J.C. (2000):

Immunological Concepts of Vaccine Adjuvant
Curr. Op. Immunol. **12**, 456-463

Schilling, V. (1928):

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

Schmidt, U., H.H. Fiedler, B. Hertrampf (1977):

Thrombozytopenische Purpura beim Saugferkel (Pathologisch-anatomische Befunde)
Dtsch. Tierärztl. Wschr. **81**, 530-532

- 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. Lauermann (1986):**
Eperythrozoonose beim Schwein-ein Fallbericht
Wien. Tierärztl. Mschr. **73**, 250-253
- Shams, H. (2005):**
Recent developments in veterinary vaccinology
Vet. J. **170**, 289-99
- Shedlock, D.J., D.B. Weiner (2000):**
DNA vaccination: antigen presentation and the induction of immunity
J. Leukoc. Biol. **68**, 793-806
- Singh M., D.T. O'Hagan (2003):**
Recent advances in veterinary vaccine adjuvants
Int. J. Parasitol. **33**, 469-478
- 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
- Sjolander, A., D. Drane, E. Maraskovsky, J.P. Scheerlinck, A. Suhrbier, J. Tennent, M. Pearse (2001):**
Immune responses to ISCOM formulations in animal and primate models
Vaccine **19**, 2661-2665
- 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, 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
- Spiess, H. (1999):**
Impfkompendium,
Thieme Verlag, 5. Auflage, 8-23, 77-79
- Splitter, E.J., R.L. Williamson (1950):**
Eperythrozoonosis in swine. A preliminary report.
J. Am.Vet.Med. Ass. **116**, 360-364
- 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

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

Tasker, S., C. R. Helps, M. J. Day, D. A. Harbour, S. E. Shaw, S. Harrus, G. Baneth, R. G. Lobetti, R. Malik, J. P. Beaufils, C. R. Belford, T. J. Gruffydd-Jones (2003):

Phylogenetic analysis of hemoplasma species: an international study.
J. Clin. Microbiol. **41**, 3877-3880

Thacker, E.L. (2006):

Mycoplasmal Diseases
In: Straw B.E., J.J. Zimmermann, S. D'Allaire, D.J. Taylor (Hrsg.):
Diseases of Swine
9. Auflage, Blackwell Publishing Professional, Iowa, 701-717

Thiel, W. (1983):

Zur Pathologie und Diagnostik der Eperythrozooninfektion der Schweine
Prakt. Tierarzt **64**, 692-697

Tizard, I.R. (2000):

Vaccination and vaccines in: Veterinary Immunology An Introduction
W.B. Saunders Company, (6) 244-246

Van der Ven, H. (2002):

Zur Wirksamkeit verschiedener Adjuvantien in bakteriellen bestandsspezifischen
Vakzinen für Puten
Vet. med. Diss., Hannover

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

Yamanaka, M., T. Okabe, M. Nakai, N. Goto (1993):

Local pathological reactions and immune response of chickens to ISA-70 and other adjuvants containing newcastle disease virus antigen
Avian Dis. **37**, 459-466

Yang D., X. Tai, Y. Qiu, S. Yun (2000):

Prevalence of Eperythrozoon spp. infection and congenital eperythrozoonosis in humans in Inner Mongolia, China
Epidemiol. Infect. **125**, 421-426

Zachary, J.F., E.J. Basgall (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**, 369-37

12 Anhang

Tabelle 5: Zeitlicher Verlauf der klinischen Untersuchung der Injektionsstelle bezüglich des Parameters „Allgemeinbefinden“ getrennt nach Gruppen nach der 1. Immunisierung

	Gruppe	n	Allgemeinbefinden			
			0	1	2	3
2 h p.i.	1	n	6	0	0	0
	2	n	5	0	0	0
	3	n	4	0	0	0
	4	n	3	1	0	0
	5	n	2	0	0	0
	6	n	2	0	0	0
	7	n	2	0	0	0
4 h p.i.	1	n	6	0	0	0
	2	n	4	1	0	0
	3	n	4	0	0	0
	4	n	3	1	0	0
	5	n	2	0	0	0
	6	n	2	0	0	0
	7	n	2	0	0	0
8 h p.i.	1	n	6	0	0	0
	2	n	4	1	0	0
	3	n	4	0	0	0
	4	n	0	2	2	0
	5	n	2	0	0	0
	6	n	2	0	0	0
	7	n	2	0	0	0
1 d p.i.	1	n	6	0	0	0
	2	n	5	0	0	0
	3	n	4	0	0	0
	4	n	3	1	0	0
	5	n	2	0	0	0

	6	n	2	0	0	0
	7	n	2	0	0	0
2 d p.i.	1	n	6	0	0	0
	2	n	5	0	0	0
	3	n	4	0	0	0
	4	n	4	0	0	0
	5	n	2	0	0	0
	6	n	2	0	0	0
	7	n	2	0	0	0
3 d p.i.	1	n	6	0	0	0
	2	n	5	0	0	0
	3	n	4	0	0	0
	4	n	4	0	0	0
	5	n	2	0	0	0
	6	n	2	0	0	0
	7	n	2	0	0	0

Tabelle 6: Zeitlicher Verlauf der klinischen Untersuchung der Injektionsstelle bezüglich des Parameters „Allgemeinbefinden“ getrennt nach Gruppen nach der 2. Immunisierung

	Gruppe		Allgemeinbefinden			
			0	1	2	3
2 h p.i.	1	n	2	3	1	0
	2	n	0	5	0	0
	3	n	0	4	0	0
	4	n	0	4	0	0
	5	n	2	0	0	0
	6	n	1	1	0	0
	7	n	2	0	0	0
4 h p.i.	1	n	1	3	2	0
	2	n	0	4	1	0
	3	n	0	4	0	0

	4	n	1	2	0	1
	5	n	1	1	0	0
	6	n	0	1	1	0
	7	n	1	1	0	0
8 h p.i.	1	n	0	5	1	0
	2	n	0	3	2	0
	3	n	0	4	0	0
	4	n	1	3	0	0
	5	n	1	1	0	0
	6	n	0	0	2	0
	7	n	1	1	0	0
1 d p.i.	1	n	5	1	0	0
	2	n	4	1	0	0
	3	n	4	0	0	0
	4	n	4	0	0	0
	5	n	2	0	0	0
	6	n	0	2	0	0
	7	n	2	0	0	0
2 d p.i.	1	n	6	0	0	0
	2	n	5	0	0	0
	3	n	4	0	0	0
	4	n	4	0	0	0
	5	n	2	0	0	0
	6	n	2	0	0	0
	7	n	2	0	0	0
3 d p.i.	1	n	4	2	0	0
	2	n	5	0	0	0
	3	n	4	0	0	0
	4	n	4	0	0	0
	5	n	1	1	0	0
	6	n	0	2	0	0
	7	n	1	1	0	0

Tabelle 7: Zeitlicher Verlauf der klinischen Untersuchung der Injektionsstelle bezüglich des Parameters „Konsistenz“ getrennt nach Gruppen nach der 1. Immunisierung

	Gruppe	n	Konsistenz				
			0	1	2	3	4
2 h p.i.	1	n	4	2	0	0	0
	2	n	2	0	2	1	0
	3	n	4	0	0	0	0
	4	n	2	0	0	2	0
	5	n	0	0	2	0	0
	6	n	0	0	2	0	0
	7	n	1	0	1	0	0
4 h p.i.	1	n	3	3	0	0	0
	2	n	0	3	0	2	0
	3	n	0	3	1	0	0
	4	n	0	1	1	2	0
	5	n	0	1	1	0	0
	6	n	0	1	1	0	0
	7	n	0	1	1	0	0
8 h p.i.	1	n	1	3	2	0	0
	2	n	2	1	1	1	0
	3	n	0	0	4	0	0
	4	n	0	1	1	2	0
	5	n	0	1	1	0	0
	6	n	0	1	1	0	0
	7	n	0	0	2	0	0
1 d p.i.	1	n	3	2	1	0	0
	2	n	2	1	0	2	0
	3	n	2	0	2	0	0
	4	n	0	1	1	2	0
	5	n	0	2	0	0	0
	6	n	0	1	1	0	0
	7	n	0	1	1	0	0
	1	n	3	2	1	0	0

2 d p.i.	1	n	3	2	1	0	0
	3	n	3	2	0	0	0
	4	n	0	1	0	1	2
	5	n	1	1	0	0	0
	6	n	0	0	1	1	0
	7	n	0	1	1	0	0
	3 d p.i.	1	n	4	2	0	0
2		n	1	2	0	2	0
3		n	4	0	0	0	0
4		n	0	1	1	1	1
5		n	1	1	0	0	0
6		n	1	1	0	0	0
7		n	1	1	0	0	0

Tabelle 8: Zeitlicher Verlauf der klinischen Untersuchung der Injektionsstelle bezüglich des Parameters „Konsistenz“ getrennt nach Gruppen nach der 2. Immunisierung

	Gruppe		Konsistenz				
			0	1	2	3	4
2 h p.i.	1	n	0	1	3	2	0
	2	n	0	0	4	1	0
	3	n	0	0	3	1	0
	4	n	1	0	3	0	0
	5	n	0	0	1	1	0
	6	n	0	0	1	1	0
	7	n	0	1	0	1	0
	1	n	1	1	3	1	0
	2	n	0	0	1	3	1
	3	n	0	0	1	3	0
	4	n	0	0	2	1	1
	5	n	0	0	1	1	0
	6	n	0	0	1	1	0
	7	n	0	0	1	1	0

8 h p.i.	1	n	1	1	2	2	0
	2	n	0	0	1	3	1
	3	n	0	0	2	2	0
	4	n	0	0	0	4	0
	5	n	0	0	0	2	0
	6	n	0	0	1	1	0
	7	n	0	0	0	3	0
1 d p.i.	1	n	0	0	3	3	0
	2	n	0	0	2	3	0
	3	n	0	0	3	1	0
	4	n	0	0	2	2	0
	5	n	0	0	0	2	0
	6	n	0	0	1	1	0
	7	n	0	0	0	2	0
2 d p.i.	1	n	0	1	2	3	0
	2	n	0	0	1	4	0
	3	n	0	0	2	2	0
	4	n	0	0	3	1	0
	5	n	0	0	0	2	0
	6	n	0	0	1	1	0
	7	n	0	0	0	1	1
3 d p.i.	1	n	0	2	2	2	0
	2	n	0	0	1	4	0
	3	n	0	0	2	2	0
	4	n	0	0	2	2	0
	5	n	0	0	0	2	0
	6	n	0	0	1	1	0
	7	n	0	0	0	1	1

Tabelle 9: Zeitlicher Verlauf der klinischen Untersuchung der Injektionsstelle bezüglich des Parameters „Wärme“ getrennt nach Gruppen nach der 1. Immunisierung

	Gruppe	Wärme				
		0	1	2	3	4

2 h p.i.	1	n	6	0	0	0	0
	2	n	5	0	0	0	0
	3	n	4	0	0	0	0
	4	n	4	0	0	0	0
	5	n	2	0	0	0	0
	6	n	2	0	0	0	0
	7	n	2	0	0	0	0
4 h p.i.	1	n	6	0	0	0	0
	2	n	5	0	0	0	0
	3	n	4	0	0	0	0
	4	n	3	0	0	1	0
	5	n	2	0	0	0	0
	6	n	2	0	0	0	0
	7	n	2	0	0	0	0
8 h p.i.	1	n	6	0	0	0	0
	2	n	5	0	0	0	0
	3	n	4	0	0	0	0
	4	n	2	0	0	1	1
	5	n	2	0	0	0	0
	6	n	2	0	0	0	0
	7	n	2	0	0	0	0
1 d p.i.	1	n	6	0	0	0	0
	2	n	4	0	0	1	0
	3	n	4	0	0	0	0
	4	n	1	0	1	2	0
	5	n	2	0	0	0	0
	6	n	2	0	0	0	0
	7	n	2	0	0	0	0
2 d p.i.	1	n	6	0	0	0	0
	2	n	4	0	1	0	0
	3	n	4	0	0	0	0
	4	n	2	0	0	2	0

	5	n	2	0	0	0	0
	6	n	2	0	0	0	0
	7	n	2	0	0	0	0
3 d p.i.	1	n	6	0	0	0	0
	2	n	5	0	0	0	0
	3	n	4	0	0	0	0
	4	n	4	0	0	0	0
	5	n	2	0	0	0	0
	6	n	2	0	0	0	0
	7	n	2	0	0	0	0

Tabelle 10: Zeitlicher Verlauf der klinischen Untersuchung der Injektionsstelle bezüglich des Parameters „Wärme“ getrennt nach Gruppen nach der 2. Immunisierung

	Gruppe		Wärme				
			0	1	2	3	4
2 h p.i.	1	n	6	0	0	0	0
	2	n	3	0	1	1	0
	3	n	4	0	0	0	0
	4	n	4	0	0	0	0
	5	n	2	0	0	0	0
	6	n	0	0	2	0	0
	7	n	2	0	0	0	0
4 h p.i.	1	n	5	1	0	0	0
	2	n	3	0	2	0	0
	3	n	1	0	1	2	0
	4	n	3	0	0	0	1
	5	n	2	0	0	0	0
	6	n	0	0	0	2	0
	7	n	2	0	0	0	0
8 h p.i.	1	n	3	0	2	1	0
	2	n	1	0	4	0	0
	3	n	4	0	0	0	0

	4	n	4	0	0	0	0
	5	n	0	0	2	0	0
	6	n	0	0	2	0	0
	7	n	1	0	1	0	0
1 d p.i.	1	n	5	1	0	0	0
	2	n	2	1	2	0	0
	3	n	4	0	0	0	0
	4	n	4	0	0	0	0
	5	n	0	0	2	0	0
	6	n	0	1	1	0	0
	7	n	0	0	2	0	0
2 d p.i.	1	n	5	0	1	0	0
	2	n	5	0	0	0	0
	3	n	3	1	0	0	0
	4	n	4	0	0	0	0
	5	n	1	0	1	0	0
	6	n	2	0	0	0	0
	7	n	0	0	2	0	0
3 d p.i.	1	n	6	0	0	0	0
	2	n	5	0	0	0	0
	3	n	4	0	0	0	0
	4	n	4	0	0	0	0
	5	n	1	1	0	0	0
	6	n	2	0	0	0	0
	7	n	1	0	1	0	0

Tabelle 11: Zeitlicher Verlauf der klinischen Untersuchung der Injektionsstelle bezüglich des Parameters „Verfärbung der Haut“ getrennt nach Gruppen nach der 1. Immunisierung

	Gruppe		Verfärbung der Haut				
			0	1	2	3	4
2 h p.i.	1	n	4	2	0	0	0
	2	n	3	1	1	0	0

	3	n	4	0	0	0	0
	4	n	4	0	0	0	0
	5	n	0	0	2	0	0
	6	n	0	1	1	0	0
	7	n	2	0	0	0	0
4 h p.i.	1	n	4	2	0	0	0
	2	n	3	1	1	0	0
	3	n	4	0	0	0	0
	4	n	3	0	0	1	0
	5	n	0	2	0	0	0
	6	n	1	1	0	0	0
	7	n	0	0	2	0	0
8 h p.i.	1	n	5	1	0	0	0
	2	n	3	2	0	0	0
	3	n	4	0	0	0	0
	4	n	3	0	0	1	0
	5	n	0	2	0	0	0
	6	n	1	1	0	0	0
	7	n	0	2	0	0	0
1 d p.i.	1	n	6	0	0	0	0
	2	n	5	0	0	0	0
	3	n	4	0	0	0	0
	4	n	4	0	0	0	0
	5	n	0	2	0	0	0
	6	n	1	1	0	0	0
	7	n	1	1	0	0	0
2 d p.i.	1	n	6	0	0	0	0
	2	n	5	0	0	0	0
	3	n	4	0	0	0	0
	4	n	2	0	0	1	1
	5	n	1	0	1	0	0
	6	n	1	0	1	0	0

	7	n	2	0	0	0	0
3 d p.i.	1	n	6	0	0	0	0
	2	n	5	0	0	0	0
	3	n	4	0	0	0	0
	4	n	4	0	0	0	0
	5	n	2	0	0	0	0
	6	n	2	0	0	0	0
	7	n	2	0	0	0	0

Tabelle 12: Zeitlicher Verlauf der klinischen Untersuchung der Injektionsstelle bezüglich des Parameters „Verfärbung der Haut“ getrennt nach Gruppen nach der 2. Immunisierung

	Gruppe		Verfärbung der Haut				
			0	1	2	3	4
2 h p.i.	1	n	3	2	1	0	0
	2	n	2	0	3	0	0
	3	n	4	0	0	0	0
	4	n	4	0	0	0	0
	5	n	0	0	2	0	0
	6	n	0	0	2	0	0
	7	n	1	0	1	0	0
4 h p.i.	1	n	2	2	2	0	0
	2	n	1	0	4	0	0
	3	n	4	0	0	0	0
	4	n	4	0	0	0	0
	5	n	0	0	2	0	0
	6	n	0	0	2	0	0
	7	n	1	0	1	0	0
8 h p.i.	1	n	4	0	2	0	0
	2	n	1	0	4	0	0
	3	n	4	0	0	0	0
	4	n	4	0	0	0	0

	5	n	0	0	0	2	0
	6	n	0	0	2	0	0
	7	n	0	0	1	1	0
1 d p.i.	1	n	2	1	3	0	0
	2	n	1	0	2	2	0
	3	n	1	0	3	0	0
	4	n	1	0	3	0	0
	5	n	0	1	0	1	0
	6	n	0	1	1	0	0
	7	n	0	0	2	0	0
2 d p.i.	1	n	6	0	0	0	0
	2	n	2	3	0	0	0
	3	n	3	0	0	1	0
	4	n	4	0	0	0	0
	5	n	1	1	0	0	0
	6	n	1	0	0	1	0
	7	n	1	0	0	1	0
3 d p.i.	1	n	6	0	0	0	0
	2	n	2	3	0	0	0
	3	n	3	0	0	1	0
	4	n	4	0	0	0	0
	5	n	1	1	0	0	0
	6	n	1	0	0	1	0
	7	n	1	0	0	1	0

Tabelle 13: Zeitlicher Verlauf der klinischen Untersuchung der Injektionsstelle bezüglich des Parameters „Veränderung in cm“ getrennt nach Gruppen nach der 1. Immunisierung

	Gruppe		Veränderung in cm						
			0	0.5	1	1,5	2	3	4
2 h p.i.	1	n	4	2	0	0	0	0	0
	2	n	2	2	1	0	0	0	0
	3	n	4	0	0	0	0	0	0

	4	n	2	0	2	0	0	0	0
	5	n	0	2	0	0	0	0	0
	6	n	0	2	0	0	0	0	0
	7	n	1	1	0	0	0	0	0
4 h p.i.	1	n	4	2	0	0	0	0	0
	2	n	1	3	1	0	0	0	0
	3	n	0	4	0	0	0	0	0
	4	n	0	1	2	0	1	0	0
	5	n	0	2	0	0	0	0	0
	6	n	0	2	0	0	0	0	0
	7	n	1	1	0	0	0	0	0
8 h p.i.	1	n	2	4	0	0	0	0	0
	2	n	2	2	1	0	0	0	0
	3	n	0	4	0	0	0	0	0
	4	n	0	2	1	0	1	0	0
	5	n	0	2	0	0	0	0	0
	6	n	0	2	0	0	0	0	0
	7	n	0	2	0	0	0	0	0
1 d p.i.	1	n	3	3	0	0	0	0	0
	2	n	2	1	1	1	0	0	0
	3	n	2	2	0	0	0	0	0
	4	n	0	2	1	0	1	0	0
	5	n	1	1	0	0	0	0	0
	6	n	0	2	0	0	0	0	0
	7	n	0	2	0	0	0	0	0
2 d p.i.	1	n	4	2	0	0	0	0	0
	2	n	2	1	2	0	0	0	0
	3	n	3	1	0	0	0	0	0
	4	n	0	2	1	0	1	0	0
	5	n	1	1	0	0	0	0	0
	6	n	0	2	0	0	0	0	0
	7	n	0	2	0	0	0	0	0

3 d p.i.	1	n	4	2	0	0	0	0	0
	2	n	1	2	1	1	0	0	0
	3	n	4	0	0	0	0	0	0
	4	n	0	3	0	1	0	0	0
	5	n	1	1	0	0	0	0	0
	6	n	1	1	0	0	0	0	0
	7	n	1	1	0	0	0	0	0

Tabelle 14: Zeitlicher Verlauf der klinischen Untersuchung der Injektionsstelle bezüglich des Parameters „Veränderung in cm“ getrennt nach Gruppen nach der 2. Immunisierung

	Gruppe		Veränderung in cm						
			0	0,5	1	1,5	2	3	4
2 h p.i.	1	n	0	6	0	0	0	0	0
	2	n	0	2	0	3	0	0	0
	3	n	0	4	0	0	0	0	0
	4	n	1	3	0	0	0	0	0
	5	n	0	2	0	0	0	0	0
	6	n	0	0	1	1	0	0	0
	7	n	0	2	0	0	0	0	0
4 h p.i.	1	n	1	5	2	0	0	0	0
	2	n	0	1	1	3	0	0	0
	3	n	0	4	0	0	0	0	0
	4	n	0	3	1	1	0	0	0
	5	n	0	1	1	0	0	0	0
	6	n	0	0	1	1	0	0	0
	7	n	0	2	0	0	0	0	0
8 h p.i.	1	n	1	5	0	0	0	0	0
	2	n	0	1	2	2	0	0	0
	3	n	0	4	0	0	0	0	0
	4	n	0	4	0	0	0	0	0

	5	n	0	0	2	0	0	0	0
	6	n	0	0	2	0	0	0	0
	7	n	0	0	1	0	1	0	0
1 d p.i.	1	n	0	4	2	0	0	0	0
	2	n	0	0	2	1	2	0	0
	3	n	0	4	0	0	0	0	0
	4	n	0	3	1	0	0	0	0
	5	n	0	0	2	0	0	0	0
	6	n	0	0	2	0	0	0	0
	7	n	0	0	1	0	1	0	0
2 d p.i.	1	n	0	4	2	0	0	0	0
	2	n	0	0	4	1	0	0	0
	3	n	0	3	0	0	1	0	0
	4	n	0	4	0	0	0	0	0
	5	n	0	0	2	0	0	0	0
	6	n	0	0	2	0	0	0	0
	7	n	0	1	0	0	1	0	0
3 d p.i.	1	n	0	5	1	0	0	0	0
	2	n	0	0	4	0	0	0	1
	3	n	0	1	2	0	1	0	0
	4	n	0	3	1	0	0	0	0
	5	n	0	0	2	0	0	0	0
	6	n	0	0	2	0	0	0	0
	7	n	0	1	0	0	1	0	0

Tabelle 15: Ergebnisse der patho-morphologischen Untersuchung

Gruppe	Tier-Nr	Lunge	Niere	Leber	Haut/ Unterhaut	Sonstige Ver- änderungen
1	2	ggrd. BALT- Hyperplasie	o.b.B.	teils interstitielle chron. follikuläre, teils gemischte zellige Hepatitis	o.b.B.	

1	3	ggrd. bis mgrd. BALT-Hyperplasie	o.b.B.	mgrd. interstitielle gemischtzellige Hepatiitis	o.b.B.	
1	4	mgrd. Interstitielle Pneumonie	mgrd. nichteitrige interstitielle Herdnephritis	o.b.B.	mgrd. Anämie, ggrd. Ikterus	nichteitrige Epi- und Myokarditis, Enteritis
1	5	interstitielle Pneumonie	nichteitrige interstitielle Herdnephritis	ggrd. interstitielle gemischtzellige Hepatiitis	o.b.B.	
1	6	ggrd. interstitielle Pneumonie	hgrd. nichteitrige interstitielle Herdnephritis	o.b.B.	o.b.B.	lokale Peritonitis an der 5 cm langen Naht
2	7	ggrd. BALT-Hyperplasie	mgrd. chron. interstitielle follikuläre Nephritis	ggrd. interstitielle gemischtzellige Hepatiitis	o.b.B.	
2	8	mgrd. BALT-Hyperplasie	ggrd. chron. interstitielle follikuläre Nephritis	ggrd. interstitielle gemischtzellige Hepatiitis	o.b.B.	
2	9	mgrd. BALT-Hyperplasie	mgrd. chron. interstitielle follikuläre Nephritis	mgrd. interstitielle gemischtzellige Hepatiitis	o.b.B.	
2	10	ggrd. interstitielle Pneumonie	o.b.B.	o.b.B.	o.b.B.	
2	11	interstitielle Pneumonie	nichteitrige interstitielle Herdnephritis	ggrd. interstitielle gemischtzellige Hepatiitis		
3	12	fibrinöse Pleuritis, interstitielles Ödem	mgrd. nichteitrige interstitielle Herdnephritis	mgrd. interstitielle gemischtzellige Hepatiitis	hgrd. Anämie, mgrd. Ikterus, Petechien und Ekchymosen an den Akren	Enteritis
3	13	ggrd. intersti-	nichteitrige	interstitielle		

		tielle Pneumonie	interstitielle Herdnephritis	gemischtzellige Hepatiitis		
3	14	mgrd. interstitielle Pneumonie	o.b.B.	o.b.B.	Petechien und Ekchymosen an den Akren	
3	15	mgrd. interstitielle Pneumonie, fokal ggrd. Pleuritis	ggrd. - mgrd. nichteitrig interstitielle Herdnephritis	ggrd. - mgrd. interstitielle gemischtzellige Hepatiitis	Anämie, Abszess im Nackenbereich mit ca. 1,5 cm Durchmesser	Enteritis
4	16	o.b.B.	ggrd. nichteitrig interstitielle Herdnephritis	ggrd. - mgrd. interstitielle gemischtzellige Hepatiitis	hgrd. Anämie, ggrd. Ikterus, hgrd. und tiefreichende eitrig-einschmelzende und abszedierende Myositis in der Nackenregion mit ca. 5 cm Ausdehnung	ca. 400 ml geronnenes Blut in der Brusthöhle
4	17	interstitielle Pneumonie	nichteitrig interstitielle Herdnephritis	interstitielle gemischtzellige Hepatiitis	o.b.B.	
4	18	interstitielle Pneumonie	nichteitrig interstitielle Herdnephritis	interstitielle gemischtzellige Hepatiitis	o.b.B.	
4	19	Ödem	ggrd. nichteitrig interstitielle und vernarbende Herdnephritis	ggrd.interstitielle gemischtzellige Hepatiitis	mgrd. Anämie, ggrd. Ikterus	Enteritis
5	20	ggrd. BALT-Hyperplasie	ggrd. chron. interstitielle follikuläre Nephritis	mgrd. bis hgrd. chron. interstitielle follikuläre Hepatitis	o.b.B.	
5	21	ggrd. interstitielle Pneumonie	ggrd. interstitielle nichteitrig	mgrd. interstitielle periportale	hgrd. Anämie, mgrd. Ikterus,	ggrd. Enteritis, ggrd. Arthritis

		nie	ge Herdnephritis	gemischtzellige Infiltrate	Zyanose der Ohrmuscheln	im linken Ellbogengelenk, mgrd. interstitielles, betont perivaskuläres Ödem am Herz
6	22	ggrd. bis mgrd. BALT-Hyperplasie	ggrd. chron. interstitielle follikuläre Nephritis	mgrd. interstitielle gemischtzellige Hepatiitis	o.b.B.	
6	23	ggrd. interstitielle Pneumonie	ggrd. interstitielle nichteitrige Herdnephritis	o.b.B.	o.b.B.	
7	24	ggrd. bis mgrd. BALT-Hyperplasie	ggrd. bis mgrd. chron. interstitielle follikuläre Nephritis	ggrd. interstitielle gemischtzellige Hepatiitis	o.b.B.	
7	25	ggrd. interstitielle Pneumonie	ggrd. interstitielle nichteitrige Herdnephritis	ggrd. interstitielle gemischtzellige Hepatiitis	mgrd. Anämie, mgrd. Ikterus, Zyanose der Ohrmuscheln	

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bedanken....

bei Herrn Prof. Dr. K. Heinritzi für die Überlassung des Themas, die stets gewährte und sehr freundliche Unterstützung sowie konstruktive Kritik bei der Anfertigung der Arbeit und ebenso für die lehrreiche und interessante Zeit an der Klinik für Schweine.

bei Herrn Dr. M. Ritzmann für die sehr gute Betreuung und die Mithilfe bei der Textbearbeitung.

bei Frau Dr. Katharina Hölzle sowie Herrn Dr. Ludwig Hölzle für die wissenschaftliche Betreuung und jederzeit gewährte Unterstützung sowie für die geduldige und zügige Korrektur der Arbeit.

bei allen Mitarbeitern der Klinik für das gute Arbeitsklima, die freundliche Mithilfe und die interessante, lehrreiche und nette Zeit in der Klinik besonders bei Kristina Haedke, Simone Mettler, Julia Grimm, Astrid Mette, Andrea Barz und Iris Breitingen, ohne deren Hilfe die praktische Durchführung des Versuchs nicht möglich gewesen wäre.

bei Frau Dr. Sabine Elicker für die Unterstützung während der Versuchsdurchführung, bei Frau Dr. Susanne Zöls für die unermüdliche Hilfe bei allen Computerangelegenheiten und bei Herrn Dr. A. Palzer für die wissenschaftliche Betreuung der Studie.

bei den Tierpflegern Herrn G. Cafiero, Herrn S. Brockhaus und Frau J. Lange für die Betreuung der Versuchstiere.

bei Frau C. Bayer und Frau I. Hartmann aus dem Labor der Klinik für Wiederkäuer für die klinisch-chemische Auswertung der Blutproben.

vor allem bei meinen Eltern. Ich möchte mich bei ihnen für ihre uneingeschränkte Unterstützung und für alles, was sie mir ermöglicht haben, von ganzem Herzen bedanken. Ganz herzlich danke ich meinem Freund Andy für seine immer währende Geduld sowie seelische und moralische Unterstützung in dieser Zeit.

Lebenslauf

Name	Doser	
Vorname	Susanne	
Geburtsdatum	11.07.1981	
Geburtsort	Füssen	
Staatsangehörigkeit	deutsch	
Eltern	Leonhard Doser Margot Doser, geb. Weixler	
Geschwister:	Thomas Doser	
Ausbildung/Beruf	1987 - 1991	Grundschule Lechbruck
	1991 - 2000	Gymnasium Schongau
	10/2000 - 04/2006	Studium der Tiermedizin an der LMU München
	04/2006	Tierärztliche Approbation
	05/2006	Beginn der Dissertation
	seit 05/2006	Wissenschaftliche Hilfskraft an der Klinik für Schweine der LMU München
	seit 08/2006	Zusätzliche Tätigkeit in einer Gemischtpraxis