

## 6 Zusammenfassung

*M. hyopneumoniae* ist der primäre Erreger der weltweit verbreiteten Enzootischen Pneumonie der Schweine. Er ist wegen seiner anspruchsvollen Kulturbedürfnisse, des sehr langsamen Wachstums und der serologischen Kreuzreaktionen mit anderen den Respirationstrakt des Schweines besiedelnden Mykoplasmen mit den klassischen mikrobiologischen Methoden nur schwer nachzuweisen. In der vorliegenden Dissertation wurde eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zum Nachweis von *M. hyopneumoniae* in bronchoalveolärer Lavageflüssigkeit (BALF) vom Schwein entwickelt.

Die PCR wurde mit einem Primerpaar durchgeführt, das einen für *M. hyopneumoniae* spezifischen DNA-Abschnitt von 863 bp flankierte. Nach der Ermittlung der optimalen Reaktionsparameter für die PCR wurden verschiedene Aufbereitungsmethoden für den Einsatz der BALFs in der PCR getestet. Verdünnung mit Aqua dest., Kochen und Abzentrifugieren des Zelldebris, Proteinase K-Verdau sowie verschiedene DNA-Extraktionsmethoden. Zwei der DNA-Extraktionsmethoden erwiesen sich als geeignet und wurden in den folgenden Untersuchungen eingesetzt. Nach der Zentrifugation der BALFs wurde aus dem Zellpellet die DNA mit dem Nucleon II DNA-Extraktions-Kit oder mit der Cetyltrimethylammoniumbromid-Methode nach MAASS und DALHOFF (1994) extrahiert. 1 µg DNA wurde in der "hot start" PCR eingesetzt. Mit diesen Aufbereitungsmethoden ließen sich in der PCR 10<sup>2</sup> koloniebildende-Einheiten von *M. hyopneumoniae*/ml BALF von SPF-Schweinen nachweisen. Die DNA von 11 Mykoplasmen- und 17 Bakterienspezies, die im Respirationstrakt des Schweines vorkommen, wurde in der PCR nicht amplifiziert.

In einer Feldstudie wurden die BALFs von 40 Schweinen aus Beständen mit Problemen mit chronischen Pneumonien auf *M. hyopneumoniae* untersucht. Ein Teil der BALFs wurde in Friis-Medium inkubiert. Die auf festem Nährboden gewachsenen Mykoplasmenkolonien wurden immunologisch differenziert. Nach dem 3. Inkubationstag sowie nach Farbumschlag des Mediums wurde von allen Kulturen ein Aliquot entnommen und in der PCR untersucht. Auch die aus den BALFs extrahierte DNA wurde in der PCR auf das Vorhandensein von *M. hyopneumoniae* untersucht.

Von 19 Tieren wurden zusätzlich die Spitzenlappen der Lungen entnommen und mit dem Immunfluoreszenztest und der PCR auf *M. hyopneumoniae* untersucht. Die PCR wurde an DNA, die von der Waschflüssigkeit des Tracheobronchus extrahiert worden war, durchgeführt.

Kulturell konnte *M. hyopneumoniae* nur in einer der 40 untersuchten BALFs nachgewiesen werden. Dagegen wurde mit der PCR in der DNA von 22 BALFs das spezifische DNA-Fragment amplifiziert. Im Immunfluoreszenztest erwiesen sich 11 der 19 untersuchten Lungen als positiv in Bezug auf *M. hyopneumoniae*. Die Ergebnisse des Immunfluoreszenztests stimmten mit den PCR-Resultaten an aus BALFs extrahierter DNA überein.

Die Sensitivitäten des Nachweises von *M. hyopneumoniae* mittels PCR in den Kulturen der BALFs und an der aus Waschflüssigkeit des Bronchus trachealis extrahierten DNA betragen im Vergleich zum Nachweis an aus BALFs extrahierter DNA mittels PCR 26 % und 60 %. Die Spezifitäten lagen bei 100 %.

Die in dieser Studie etablierte PCR erwies sich als sensitiv und spezifisch für den Nachweis von *M. hyopneumoniae* in BALFs.

Die PCR mit DNA, die aus BALFs extrahiert wurde, wies die höchste Nachweisrate von *M. hyopneumoniae* auf. Die erzielten Ergebnisse zeigten eine gute Korrelation mit den Ergebnissen des Immunfluoreszenztests an Lungenschnitten. Der kulturelle Nachweis von *M. hyopneumoniae* in BALFs war erheblich weniger sensitiv.

Ebenfalls eine geringere Sensitivität zeigte die Untersuchung von Kulturen von BALFs sowie von aus der Waschflüssigkeit des Bronchus trachealis gewonnener DNA mittels der PCR.

Die Untersuchungen zeigen, daß es möglich ist, nicht kultivierbare *M. hyopneumoniae*-Stämme in den BALFs mit der PCR nachzuweisen. Da die Bronchoalveoläre Lavage am lebenden Tier durchgeführt wird, kann mit dieser Technik eine größere und für die Herde repräsentativere Zahl an Tieren untersucht werden als durch die postmortale Diagnose. Daher eignet sich die Untersuchung von BALFs mittels PCR zur Gewinnung zuverlässiger und schneller Ergebnisse über das Vorkommen von *M. hyopneumoniae* in einer Herde.

## 7 Summary

ANTJE KATRIN BAUMEISTER

### Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) from pigs by the polymerase chain reaction

*Mycoplasma (M) hyopneumoniae* is the primary agent of the worldwide distributed enzootic pneumonia of pigs. Due to its fastidious culture requirements, its extremely slow growth as well as to its crossreactivity with other mycoplasmas colonizing the respiratory tract of pigs *M. hyopneumoniae* is hard to detect by classical microbiological methods. In the present study a method was developed to detect *M. hyopneumoniae* in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) by the polymerase chain reaction (PCR).

The PCR was performed with a primer pair, flanking a DNA-fragment of 863 bp which appeared to be specific for *M. hyopneumoniae*. After optimizing the conditions of the PCR, several methods as dilution in aqua dest, boiling and centrifugation, digestion with proteinase K and different DNA-extraction methods were tested for the preparation of BALFs for PCR. Two of these appeared to be suitable and were used in the following investigations: BALFs were concentrated by centrifugation and the DNA was extracted with the Nucleon II DNA-extraction-kit or with the cetyltrimethylammoniumbromide-method according to MAASS and DALHOFF (1994). 1 µg DNA was used for PCR by "hot start"-technique. With this methods 10<sup>2</sup> colony changing units of *M. hyopneumoniae* could be detected in 1 ml BALF from SPF-swine. No amplification occurred with the DNA from 11 mycoplasma species and 17 bacteria species colonizing the respiratory tract of pigs.

In a field study BALFs of 40 pigs from farms with problems of chronic pneumonia were investigated for the occurrence of *M. hyopneumoniae*. One part of the BALF was cultivated in Friis-medium. Mycoplasma colonies were differentiated by immunological methods. After three days of incubation and after colour change of the medium an aliquot was taken and investigated by PCR. PCR was performed also on DNA extracted from BALFs.

In addition, the apical lobes of the lungs were taken from 19 of these pigs and investigated for *M. hyopneumoniae* by the immunofluorescence test and by the PCR. PCR was performed on DNA extracted from the washing fluid of the bronchus trachealis.

In one of the 40 BALFs investigated *M. hyopneumoniae* could be detected by culture, whereas 22 BALFs showed the amplification product specific for *M. hyopneumoniae* in the PCR on

extracted DNA from BALFs. By the immunofluorescence test 11 of the 19 lungs investigated were positive for *M. hyopneumoniae* corresponding to the results obtained by PCR on BALFs. The PCR on cultures of BALFs and on DNA extracted from the washing fluids of the bronchus trachealis of autopsy lungs showed in comparison to the PCR on DNA extracted from BALFs a sensitivity of 27 % and 60 % and a specificity of 100 %.

The PCR established proved to be specific and sensitive for the detection of *M. hyopneumoniae* in BALFs.

The highest detection rate of *M. hyopneumoniae* was reached by PCR on DNA extracted from BALFs. The PCR-results show a good correlation to the results obtained by immunofluorescence test. The detection of *M. hyopneumoniae* by culture proved to be less sensitive. The PCR on cultivated BALFs and on DNA extracted from washing fluids of the bronchus trachealis were also less sensitive.

The investigations demonstrate that it is possible to detect uncultivable *M. hyopneumoniae* strains by PCR in BALFs from living pigs. Since BAL can be performed on living pigs, which allows a random sampling of even healthy animals, the PCR on BALFs is a suitable method to obtain fast and reliable information about the occurrence of *M. hyopneumoniae* in a pig herd.