

Aus der Klinik für kleine Klautiere und forensische Medizin
und Ambulatorischen Klinik
der Tierärztlichen Hochschule Hannover

Untersuchungen zur Diagnostik und Prävalenz von Infektionen
durch *Lawsonia intracellularis*
bei Schweinen unterschiedlicher Altersgruppen.

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
DOKTORS DER VETERINÄRMEDIZIN
(Dr. med. vet.)
durch die Tierärztliche Hochschule Hannover

Vorgelegt von
ARNOLD BONITZ
aus Zweibrücken

Hannover 2001

Wissenschaftliche Betreuung: Univ.-Prof. Dr. Michael Wendt

- 1. Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Michael Wendt
- 2. Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Stefan Schwarz

Tag der mündlichen Prüfung: 30.05.2001

Meiner Familie

1	EINLEITUNG	1
2	SCHRIFTTUM	3
2.1	Ätiologie der porzinen proliferativen Enteropathie	3
2.2	Klinische Krankheitsbilder der porzinen proliferativen Enteropathie	7
2.3	Differenzierung verschiedener pathomorphologischer Krankheitsbilder der PPE	8
2.3.1	Porzine intestinale Adenomatose	9
2.3.2	Nekrotisierende Enteritis	10
2.3.3	Regionale Ileitis	10
2.3.4	Akute proliferative hämorrhagische Enteropathie	10
2.4	Epidemiologie	11
2.5	Pathogenese	13
2.6	Erregernachweis	15
2.7	Prophylaxe und Therapie	17
3	EIGENE UNTERSUCHUNGEN	21
3.1	Probenmaterialien	21
3.2	Nachweis von <i>Lawsonia intracellularis</i> mittels PCR	22
3.2.1	Prinzip	22
3.2.2	Extraktion der <i>Lawsonia</i> -DNA aus den Kotproben	23
3.2.3	PCR	24
3.2.4	Agarose-Gelelektrophorese	25
3.2.5	Auswertung der Gele	25
3.3	Nachweis von <i>Lawsonia intracellularis</i> mit Hilfe des indirekten Immunfluoreszenztestes (IFT)	26
3.3.1	Prinzip	26
3.3.2	Indirekter Immunfluoreszenztest	27

3.3.3	Nachweis von Serumantikörpern mittels indirekter Immunfluoreszenz	29
3.4	Absicherung der Methoden	30
4	STATISTISCHE AUSWERTUNG	31
4.1	Untersuchungszahlen und Häufigkeiten der Ergebnisse	32
4.1.1	Auswertung der Verlaufuntersuchungen der in der Klinik für kleine Klauentiere eingestellten Läufer	38
5	DISKUSSION	43
6	ZUSAMMENFASSUNG	50
7	SUMMARY	52
8	SCHRIFTTUMSVERZEICHNIS	54
9	ANHANG	64
9.1	Chemikalien und Reagenzien	64
9.2	Geräte	64
9.3	Lösungen	65
9.3.1	DNA-Extraktion	65
9.3.2	Lösungen für die PCR	66
9.3.3	Lösungen für die Elektrophorese	66
9.3.4	Lösungen für die Immunfluoreszenz	66
9.3.5	Lösungen für den serologischen Antikörpernachweis	67

Verzeichnis der Abkürzungen

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
A	Adenin
abs.	absolut
Aqua bidest.	2-fach destilliertes Wasser
Aqua dest.	destilliertes Wasser
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
ca.	circa
cm	Zentimeter
dATP	2'-Desoxy-Adenosin-5'-Triphosphat
dCTP	2'-Desoxy-Cytidin-5'-Triphosphat
DE	Diamotaceous Earth (Kieselgur)
dGTP	2'-Desoxy-Guanosin-5'-Triphosphat
DNA	desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	2'-Desoxy-Nukleotid-5'-Triphosphat
dTTP	2'-Desoxy-Thymidin-5'-Triphosphat
EDTA	Ethylendiamin- Tetraacetat- Natriumsalz- Dihydrat
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay (Enzym-gekoppelter Immunadsorptionstest)
et al.	et alii
etc.	et cetera
FITC	Fluorescein- Isothiocyanat
fragl.	fraglich
g	Gramm
g	Gravitationskonstante
G	Guanin
ggf.	gegebenfalls
GuSCN	Guanidinthiocyanat
h	Stunde
IFT	indirekte Immunfluoreszenztest

kDa	Kilo Dalton
l	Liter
M	Molarität (mol/l)
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
mol	relative Molmasse
n	Anzahl
neg.	negativ
nm	Nanometer
NS	nicht signifikant
p	Wahrscheinlichkeit
PBS	Phosphat- gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
PIA	porzine intestinale Adenomatose
pos.	positiv
PPE	Porzine proliferative Enteropathie
ppm	parts per million
rel.	relativ
RNA	ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
rRNA	ribosomale RNA
s	Sekunde
S	Svedberg-Einheit (Einheit für die Sedimentatonskonstante)
Sero	Serologische Untersuchung
spp.	Subspezies
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris- Acetat- EDTA
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i> (aus heißen Quellen stammendes Bakterium)
U	Umdrehungen
u.	und
UV	ultraviolett
v/v	volume per volume (Volumen pro Volumen)
w/v	weight per volume (Gewicht pro Volumen)

1 Einleitung

Das gramnegative Bakterium *Lawsonia intracellularis* ist ursächlich für die proliferative Enteropathie der Schweine verantwortlich, eine Darminfektion, die sich hinsichtlich ihrer Krankheitssymptome klinisch unterschiedlich manifestiert. Neben akuten Durchfallerkrankungen mit plötzlichen Todesfällen bei älteren Schweinen (Mastschweine, Jungsau) treten zumeist chronische Erkrankungen (Kümmern, Durchfall) bei Läuferschweinen auf. Die Erkrankung wird auch als porzine intestinale Adenomatose (PIA) oder Ileitis bezeichnet.

Die porzine proliferative Enteropathie (PPE) soll erheblichen wirtschaftlichen Schaden in der Schweinehaltung verursachen, so dass Mehrkosten pro Schwein von ca. 10 US\$ entstehen (McORIST et al. 1997). Da die Symptomatologie dieser Erkrankung recht unspezifisch ist, kann das reale Ausmaß des ökonomischen Schadens bzw. die Bedeutung der Erkrankung für die Schweinezucht noch nicht abschließend beurteilt werden. Daher sind für diese erst in jüngerer Zeit ätiologisch geklärte Erkrankung spezifische und sensitive Nachweisverfahren erforderlich, um eventuelle Infektionen rechtzeitig erkennen und therapieren zu können. Damit dürfte insbesondere der Diagnostik zukünftig eine besondere Bedeutung zukommen, zumal in der Literatur hinsichtlich der Prävalenz und der Epidemiologie des Erregers je nach untersuchtem Tiermaterial und der Methodik unterschiedliche Angaben bestehen.

Eine praxisgerechte und zuverlässige Diagnostik der PPE ist durch die pathomorphologische Untersuchung bei der Sektion möglich. Für die Erkennung von latent infizierten Schweinen sowie Erhebungen zum Ausscheiderstatus und zur Prävalenz ist jedoch ein Erregernachweis erforderlich. Die kulturelle Isolierung von Lawsonien ist schwierig und aufwendig, da die Erreger nur auf Zellkulturen angezüchtet werden können.

Als direkte Erregernachweisverfahren am lebenden Schwein eignen sich daher die indirekte Immunfluoreszenz (IFT) sowie die Polymerasekettenreaktion (PCR), wobei vergleichende Studien dieser beiden Methoden bisher kaum vorgenommen wurden. Letztlich kann auch die Bestimmung von Serumantikörpern zum Nachweis einer *Lawsonia intracellularis*-Infektion dienen.

Ziel dieser Arbeit war es, einen Beitrag zur Optimierung der Diagnostik von *Lawsonia intracellularis* zu leisten, und zwar besonders im Hinblick auf eine aussagekräftige und zuverlässige Befundbewertung in der kurativen Praxis. Hierzu ist die Kenntnis über die überbetriebliche Prävalenz des Erregers bei Schweinen unterschiedlicher Altersklassen erforderlich, die in dieser Arbeit mit Hilfe eines Erregernachweises für Läufer, Jungsauen und Altsauen ermittelt werden sollte.

Als Methoden zum Erregernachweis wurden die indirekte Immunfluoreszenz und die PCR eingesetzt und hinsichtlich ihrer Aussagekraft verglichen.

Parallel dazu wurde der Immunstatus der Herden durch Antikörpernachweis überprüft, um im Verbund mit dem Resultat aus dem Erregernachweis auch detaillierte Aussagen zur Epidemiologie des Erregers tätigen zu können.

2 Schrifttum

2.1 Ätiologie der porzinen proliferativen Enteropathie

Das Krankheitsbild der proliferativen Enteropathie ist bereits 1931 von BIESTER et al. beschrieben worden, die Identität des Erregers war zu der Zeit aber noch unbekannt. Erst größere Ausbrüche in England veranlassten Wissenschaftler, die Ursache dieser Erkrankung näher zu untersuchen (LAWSON u. ROWLAND 1974; ROWLAND u. LAWSON 1974).

ROWLAND und LAWSON (1974) schlugen vor, den Erreger aufgrund von Untersuchungen mittels Immunfluoreszenztechnik bzw. Elektronenmikroskopie als *Campylobacter (Vibrio) sputorum ssp. mucosalis* zu klassifizieren. Andere Untersucher vermuteten aufgrund morphologischer Kriterien *Campylobacter (C.) coli*, *C. jejuni*, *C. hyointestinalis* oder *C. mucosalis* als Krankheitsauslöser (ROBERTS et al. 1977; LAWSON et al. 1979; DUHAMEL u. WHEELDON 1982; LOMAX u. GLOCK 1982; GEBHART et al. 1983).

Aufgrund der unklaren taxonomischen Zuordnung wurden die im Darmepithel erkrankter Schweine feststellbaren Bakterien auch mit Bezeichnungen wie „Ileal-symbiont intracellularis“ oder „Campylobacter-like bacterium“ in der Literatur belegt (GEBHART et al. 1983).

Gereinigte Antikörper, die aus proliferierten Darmmukosaarealen gewonnen wurden, reagierten jedoch nur mit Bakterien aus infizierten Mukosazellen anderer Schweine und nicht mit einer der obengenannten auf Nährböden kultivierbaren *Campylobacter* spp. (McORIST et al. 1987).

In einer Vergleichsstudie verschiedener *Campylobacter* spp. (*C. jejuni*, *C. coli*, *C. fetus*, *C. pyloridis*) mit dem intrazellulär auffindbaren Erreger durch Gradienten-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Immunoblotting mit Kaninchenantiserum zeigte sich, dass die Antikörperreaktion bei Tieren mit einer proliferativen Enteropathie durch ein 25-27 kDa großes Oberflächenprotein ausgelöst wurde. Da bei allen *Campylobacter* spp. keine Immunreaktion mit einem Protein dieser Größe vorkam, gingen McORIST et al. (1989a) davon aus, dass *Campylobacter* spp. nicht die Verursacher der proliferativen Enteropathie sein können.

DNA-Sonden für *C. mucosalis* und *C. hyointestinalis* reagierten ebenfalls nicht mit dem intrazellulären Bakterium. Aufgrund dieser Untersuchungsergebnisse kamen GEBHART et al. (1990) zu dem Schluss, dass es sich bei dem intrazellulären Bakterium um einen noch nicht identifizierten Erreger handelt. DNA-Sonden, die speziell für das intrazellulär aufgefundene Bakterium entwickelt wurden (GEBHART et al. 1991), hybridisierten nur mit der DNA aus der Darmmukosa kranker Schweine und nicht mit DNA aus der Mukosa gesunder Schweine. Die Sonden verbanden sich nicht mit der DNA von Bakterien der betreffenden *Campylobacter spp.*

Auch mit Hilfe Übertragungs- und immunhistologischer Studien wurde gezeigt, dass die oben im Text genannten *Campylobacter spp.* nicht als Auslöser der porzinen proliferativen Enteropathie in Frage kamen (ROWLAND u. LAWSON 1992).

Dass der „Ileal-symbiont intracellularis“ als ein neues Genus und eine neue Spezies in der Klasse der Proteobakterien anzusehen ist, stellten GEBHART et al. (1993) mit Hilfe von genetischen Homologiestudien fest. Sequenzvergleiche der 16S rRNA von dem nun als *Lawsonia intracellularis* bezeichneten Erreger mit der rRNA-Datenbank ergaben eine 91%ige Übereinstimmung mit *Desulfovibrio desulfuricans* und eine weniger als 80%ige Übereinstimmung mit verschiedenen *Campylobacter spp.* oder *Heliobacter spp.* Weitere Vergleichsstudien mit 26 verschiedenen sulfatreduzierenden Eubakterien zeigten eine 86%ige Übereinstimmung mit der Familie der *Desulfovibrionaceae*.

Angehörige des Genus *Desulfovibrio* sind stäbchenförmig, helikal oder spiralförmig. Mit beweglichen Anhängseln sind die meisten *Desulfovibriobakterien* bewegungsfähig. Es besteht bei den Lawsonien zwar eine morphologische Ähnlichkeit zu manchen *Desulfovibrio spp.*, jedoch ist über die Fähigkeit der Lawsonien, Sulfat zu reduzieren, nichts bekannt (GEBHART et al. 1993).

Im Experiment konnte schon lange vor Identifikation des Erregers durch Verabreichung von homogenisierter Darmmukosa von typisch an PPE erkrankten Schweinen mit spezifischen intestinalen Läsionen die Erkrankung reproduziert werden (Roberts et al. 1977b).

Drei Wochen nach der oralen Aufnahme von in Rattenenterozyten kultivierten *Lawsonia intracellularis*-Bakterien konnten bei Absatzferkeln Lawsonien im Zytoplasma der Zellen proliferativ veränderter Darmabschnitte gefunden werden (McORIST et al. 1993, 1994a). Interessanterweise konnten Gnotobioten, die frei von

jeglicher natürlicher Flora sind, nicht infiziert werden (McORIST 1993). Die pathologisch veränderten Därme, die nach einer experimentellen Ansteckung auftraten, waren identisch mit den Veränderungen bei Felderkrankungen, was insbesondere auf die Mukosaproliferation und die intrazellulär vorkommenden Bakterien (McORIST et al. 1993; Knittel et al. 1996) zutrifft.

Morphologisch stellt sich der Erreger als gebogenes Stäbchen mit zugespitzten Enden dar (1,25-1,75 µm x 0,5-1,5 µm). Die Gestalt variiert von kommaförmig bis hin zur sigmoidalen Form. Das unpigmentierte, nicht sporenbildende, kapsellose Bakterium besitzt keine Flagellen, Pili oder Fimbrien und ist daher unbeweglich (McORIST et al. 1995a). Wie sich in der modifizierten Ziehl-Neelsen-Färbung zeigte, sind die Bakterien säurefest (ROWLAND u. LAWSON 1992). Mikroskopische Untersuchungen ergaben, dass das Bakterium eine wellige, dreischichtige Umhüllung besitzt, welche von der zytoplasmatischen Membran getrennt ist (McORIST et al. 1995a). Lawsonien lassen sich in Zellkulturen in einer mikroaerophilen Umgebung (5-18% Sauerstoff) anzüchten, optimale Wachstumsbedingungen hat der Erreger bei 8% Sauerstoff sowie einer Zellschichtdicke von 2-5 mm (McORIST et al. 1995a). Eine Kultivierung dauert im Schnitt 3–5 Tage (LAWSON et al. 1993).

Eine Kultivierung in embryonierten Hühnereiern wurde von JONES et al. (1993c) durchgeführt. Nach 4-5 Tagen Bebrütung konnten Schweine mit diesen Eiern infiziert werden, sie wiesen 10 bis 29 Tage post infectionem die für die porcine proliferative Enteropathie typischen Läsionen am Darm auf.

Die nicht an die Wirtsmembran gebundenen, nach der Aufnahme in die Zelle nicht mehr in Vakuolen vorkommenden Lawsonien liegen frei im apikalen Zytoplasma der Schweineenterozyten. Sie vermehren sich durch Zweiteilung, welche äquatorial stattfindet (GEBHART et al. 1993).

Kultivierungsversuche mit *Lawsonia intracellularis* in zellfreien Medien bei unterschiedlicher Temperatur und mit unterschiedlichen Substraten misslangen, sowohl bei aeroben, mikroaerophilen als auch bei anaeroben Bedingungen. McORIST und Mitarbeiter (1995a) postulierten daher ein obligat intrazelluläres Wachstum.

Mit Hilfe von in vitro-Versuchen an Enterozyten haben McORIST et al. (1995b) die Wirtszellpenetration von *Lawsonia intracellularis* in die Zelle untersucht. Eine Suspension aus *Lawsonia intracellularis* wurde verschiedenen Monolayerpräparaten aus Ratten- (IEC-18) bzw. Schweineenterozyten (IPEC-J2) hinzugegeben. Eine steigende Zahl von mit Lawsonien intrazellulär besiedelten Enterozyten war etwa 6 Tage später zu sehen. Hierbei konnten aber keine zytopathogenen Effekte festgestellt werden. Nach einer anfänglich engen Verbindung mit der Enterozytenzellmembran, wurden die Bakterien 3 Stunden später in membrangebundenen Vakuolen sichtbar. Eine Bildung von elektronendichten Verbindungen zwischen Zelle und Bakterium trat nur nach Zentrifugation auf. Nach weiteren 3 Stunden waren die Vakuolen aufgelöst und die Bakterien lagen frei im Zytoplasma. Die Bakterien waren meistens in der Nähe von Mitochondrien zu finden. 2-6 Tage post infectionem war eine Vermehrung der Erreger im Zytoplasma zu beobachten. Ab dem 6. Tag waren ballonartige zytoplasmatische Ausstülpungen zu erkennen, die zahlreich Lawsonien enthielten. Mit dem Aufplatzen dieser Protrusionen gelangten die Bakterien ins Darmlumen. Die gleichen Vorgänge sind auch bei natürlichen Infektionen zu beobachten.

Das Eindringverhalten der Lawsonien untersuchten auch LAWSON et al. (1995) an Rattenenterozyten (IEC-18). Sowohl lebende als auch durch Sauerstoff oder Neomycin geschädigte oder durch Formalin abgetötete Lawsonien wurden von den Enterozyten in gleichem Maße aufgenommen. Lebende und geschädigte Bakterien konnten die Zelle nicht infizieren und sich in ihr vermehren, wenn diese auf 5° C gekühlt wurde. Anhand dieser Studie kamen LAWSON et al. (1995) zu dem Schluss, dass die Infektion der Zelle in vitro von der Zellaktivität und nicht von *Lawsonia intracellularis* abhängig ist. Ein Teil des Aufnahmeprozesses schien Mikrofiliament-abhängig zu sein, trotzdem gab es auch Anzeichen für Aktin-unabhängige Mechanismen.

COLLINS et al. (1996) untersuchten mit Lawsonien infizierte Rattenenterozyten (IEC-18) während der letzten Phasen der Zellteilung und stellten fest, dass die Bakterien an die Tochterzellen weitergegeben werden. Die Zellteilung scheint auch zum Teil für eine schnellere Ausbreitung der Lawsonien im Monolayer verantwortlich zu sein.

Die von *Lawsonia intracellularis* hervorgerufenen pathologischen Veränderungen mit den Erscheinungsformen der porzinen proliferativen Enteropathie wurden auch bei

Nagetieren wie dem Hamster (FRISK u. WAGNER 1977) und der Ratte (VANDENBERGHE et al. 1985), bei Füchsen (ERIKSEN u. LANDSVERK 1985), Frettchen (FOX u. LAWSON 1988), Pferden (DUHAMEL u. WHEELDON 1982; WILLIAMS et al. 1996), Kaninchen (SCHOEB u. FOX 1990), Rotwild (DROLET et. al. 1996) sowie bei Laufvögeln wie Emu und Strauß (COOPER 1996) festgestellt. Bei all den obengenannten Spezies wurden Bakterien im Zytoplasma der Darmepithelzellen gefunden.

Neuesten Untersuchungen zufolge (JENSEN et al. 2000) sind Lawsonien bei erkrankten Schweinen auch in den Tonsillen gefunden worden.

2.2 Klinische Krankheitsbilder der porzinen proliferativen Enteropathie

Bei der Erkrankung der porzinen proliferativen Enteropathie unterscheidet man verschiedene Krankheitsbilder die porzine intestinalen Adenomatose (PIA), die nekrotische Enteritis (NE), die regionale Ileitis (RI) und die proliferative hämorrhagische Enteropathie (PHE).

Die klinischen Erscheinungen der chronischen Verlaufsform der proliferativen Enteropathie sind am häufigsten und treten meistens nach dem Absetzen bei Schweinen im Alter zwischen 6 und 20 Wochen auf. Die Symptome der porzinen intestinalen Adenomatose (PIA) bei Vorliegen der pathomorphologischen Form sind nur schwach ausgeprägt, meist ist nur ein unspezifisches Kümern bzw. eine allgemeine Appetitlosigkeit zu beobachten. Die mangelhafte Gewichtszunahme ist auch durch die schlechte Futtermittelverwertung zu erklären. Extremfälle weisen eine auffällige Apathie auf, infizierte Tiere können jedoch auch klinisch unauffällig sein. Durchfall tritt bei der PPE nur bei großflächigen Schädigungen der Darmschleimhaut als breiiger Kot mit normaler Farbe auf (ROWLAND u. LAWSON 1992; McORIST u. GEBHART 1999).

Die Tiere, die pathomorphologisch eine nekrotische Enteritis (NE) oder eine regionale Ileitis (RI) aufweisen, zeigen einen Konditionsverlust und hochgradiges Kümern. Plötzliche Todesfälle sind bei der regionalen Ileitis nicht selten und gehen meist mit einer Perforation der hypertrophen Ileumwand einher, was zu einer terminalen Peritonitis führt (ROWLAND u. LAWSON 1992; McORIST u. GEBHART 1999).

Im Gegensatz zu der chronischen Form, treten die Fälle von akuter, proliferativer hämorrhagischer Enteropathie (PHE) bei älteren Tieren im Alter von 4 bis 12 Monaten (Mastschweine und junge Zuchtschweine) mit dem klinischen Bild einer Anämie auf. Schwarzer, teerartiger Kot ist das erste Anzeichen, und diesem kann später Durchfall folgen. Manche Schweine sterben ohne veränderten Kotbefund, sie zeigen nur eine auffallende Blässe. Die Hälfte der anämischen Tiere stirbt und die Überlebenden erholen sich in einem relativ kurzen Zeitraum (McORIST u. GEBHART 1999). Tragende Sauen abortieren oft, meist innerhalb der ersten 6 Tage nach dem Auftreten von klinischen Zeichen (BEERS 1984).

In den meisten Fällen von unkomplizierter proliferativer Enteropathie tritt die Heilung spontan nach 4 bis 10 Wochen ein und trotz der Läsionen kann das Endschlachtgewicht erreicht werden. Der zeitweilige Rückgang der täglichen Tageszunahme und die daraus resultierende verlängerte Mastdauer verursacht jedoch erhebliche Mehrkosten (ROWLAND u. HUTCHINGS 1978). Genauere Untersuchungen haben ergeben, dass die infektionsbedingte Minderung der täglichen Zunahme 6-25% ausmacht und der Futteraufwand im Durchschnitt bis zu 25% höher liegt (McORIST et al. 1996b, 1997b).

2.3 Differenzierung verschiedener pathomorphologischer Krankheitsbilder der PPE

Die porcine proliferative Enteropathie ist durch Unreife und Proliferation der Darmmukosa gekennzeichnet. Sie tritt am häufigsten im Bereich des Ileums, gefolgt von Jejunum und seltener im proximalen Kolonabschnitt und Zäkum auf. Histologisch zeigt das betroffene Gewebe eine abgegrenzte Proliferation von unreifen Epithelzellen der intestinalen Krypten, welche eine hyperplastische bis adenomartige Mukosa bilden. Diese proliferierten Zellen enthalten fast alle das obligat intrazelluläre Bakterium *Lawsonia intracellularis* (McORIST u. GEBHART 1999). Anhand von pathologisch-anatomischen und histopathologischen Kriterien werden bei der chronischen Verlaufsform die porcine intestinale Adenomatose (PIA), die nekrotisierende Enteritis (NE) und die regionale Ileitis (RI) sowie bei der akuten Form die proliferative hämorrhagische Enteropathie (PHE) unterschieden.

2.3.1 Porzine intestinale Adenomatose

Als porzine intestinale Adenomatose (PIA), auch chronische proliferative Enteropathie genannt, wird die Verdickung der intestinalen Mukosa mit nur geringgradigen entzündlichen Veränderungen an ihrer Oberfläche bezeichnet.

An den betroffenen Stellen ist die Wand deutlich verdickt und der Gesamtdurchmesser des Darmstücks ist vergrößert. Ödeme der Subserosa und des Mesenteriums sind in der Regel zu diagnostizieren, wobei die netzartige Struktur der Serosa deutlich hervorgehoben wird. Bei unauffälligeren pathologischen Veränderungen sollte das Gebiet 10 cm proximal der ileozaekalen Klappe genauestens untersucht werden, da hier am häufigsten die Folgen der Infektion zu sehen sind. Manchmal haftet der Mukosa entzündliches Exsudat an. Die betroffene Mukosa wirft verstärkt Quer- und Längsfalten auf (ROWLAND u. LAWSON 1992).

Histologisch weist die Mukosa vergrößerte, verzweigte Krypten auf, welche zahlreiche unreife Epithelzellen enthalten. Die veränderten Krypten liegen oft über Ansammlungen lymphatischer Knötchen (Peyer'sche Platten) (LOMAX u. GLOCK 1982). Becherzellen fehlen vollständig, dafür ist eine moderate Lymphozyten- und Makrophageninfiltration der Mukosa zu sehen. In den Arealen in denen die Enterozyten intrazelluläre Bakterien aufweisen, sind nur wenige, schlecht entwickelte Villi zu sehen. Die Zellen weisen nur wenige endoplasmatische Retikula und Mitochondrien auf (McORIST et al. 1989b).

Die Kerne erkrankter Mukosazellen stellen sich als vergrößerte, vesikuläre Strukturen oder als kompakt gefärbte Spindeln dar. Bei unkomplizierten Fällen sind in der Lamina propria keine pathologischen Veränderungen zu finden (McORIST et al. 1989b).

Elektronenmikroskopisch werden viele frei im Zytoplasma liegende Bakterien gesehen. Meistens ist nur eine geringgradige entzündliche Reaktion zu sehen. Histologisch zeichnen sich die in Heilung befindlichen Stellen durch eine sinkende Apoptoserate, eine vermehrte Entwicklung von reifen Epithelzellen und einer Rückkehr von Becherzellen in den Krypten aus (McORIST et al. 1996a).

Die porzine intestinale Adenomatose kann beim Zusammenkommen verschiedener Faktoren in eine der folgenden Krankheitsbilder übergehen:

2.3.2 Nekrotisierende Enteritis

Die nekrotische Enteritis geht mit einer koagulativen Nekrose sowie mit einer auffallenden entzündlichen Exsudation einher, die zu den schon vorhandenen Läsionen der proliferativen intestinalen Adenomatose hinzukommen. Gelb-graue käsige Massen liegen der Mukosa fest an. Histologisch lassen sich Fibrinablagerungen und degenerierte Entzündungszellen erkennen. In den tieferen Schichten sieht man Reste des proliferierten Epithels. Bei länger anhaltender Erkrankung überwiegt Granulationsgewebe (ROWLAND u. LAWSON 1992;).

2.3.3 Regionale Ileitis

Bei der regionalen Ileitis fällt der kontrahierte, fast schon steife Teil des Dünndarms auf, woher der traditionelle Name „hose-pipe-gut“ („Gartenschlauchdarm“) stammt. Sie stellt eine progressive Granulationsgewebsproliferation der Lamina propria und Submukosa dar. Wird das Lumen eröffnet, erkennt man lineare Ulzerationen mit Inseln bzw. Streifen von ungeschädigter Mukosa, aber der auffallendste Befund ist die Hypertrophie der äußeren Muskelschichten (ROWLAND u. LAWSON 1992; McORIST u. GEBHART 1999).

2.3.4 Akute proliferative hämorrhagische Enteropathie

Die akute proliferative hämorrhagische Enteropathie ist mit einer massiven kapillären Blutung in das Darmlumen verbunden. Der betroffene Darmabschnitt ist verdickt und geschwollen. Zusätzlich ist ein Serosaödem zu erkennen. Die Oberfläche der Mukosa weist kaum sichtbare Schäden auf, blutende Stellen, Ulzera oder Erosionen sind nicht zu erkennen. Histologische Studien zeigen in den Krypten eine hochgradige Degeneration des adenomatösen Epithels mit einer auffälligen Anhäufung von lawsonienhaltigen Detritusmassen. Das Lumen enthält geformte Blutkoagula. Im Rektum befindet sich häufig schwarzer, klebriger Kot, welcher mit Blut vermischt ist. (ROWLAND u. LAWSON 1992).

Fließende Übergänge zwischen den verschiedenen Formen sind immer möglich. In der Literatur sind auch andere Begriffe verwendet worden um ähnliche Symptome zu beschreiben wie z. B. terminale Ileitis, regionale Enteritis, intestinale Adenomatose,

porzine proliferative Ileitis und muskuläre Hypertrophie mit Ileumstenose (ROWLAND u. LAWSON 1992).

2.4 Epidemiologie

In der Literatur sind nur wenige Informationen über die Prävalenz des Krankheitskomplexes der proliferativen Enteropathien in Schweineherden zu finden. Der Hauptgrund hierfür ist, dass die klinischen Symptome meist nicht dramatisch sind und dass bis vor kurzem keine geeigneten diagnostischen Methoden zur Verfügung standen, die Erkrankung am lebenden Tier sicher nachzuweisen. Die verschiedenen Autoren haben in den verschiedensten Ländern die unterschiedlichsten Methoden verwendet, um eine Prävalenz zu ermitteln, z. B. das Vorhandensein von Darmwandläsionen oder Antikörpern, manche bewerteten das Auftreten klinischer Symptome und wieder andere wiesen den Erreger nach.

Tab. 1: Prävalenzen in den verschiedenen Ländern inklusive der Nachweismethode

Land	Vorkommen	Untersuchung	Quelle
Großbritannien	0,7%	Darmläsionen bei Schlachtschweinen (n=281)	Rowland u. Hutchings 1978
USA	4,5% 16,7% 18,9% (3 Betriebe)	Klinik	Wilson et al. 1986
Australien	15-20% Morbidity 5-20% (bis 40%)	Pathomorphologische Befunde 106 Betriebe	Pointon 1989
Spanien	22%	Erregernachweis 16/73 Betrieben	Lanza et al. 1996
USA	a. 44% (12/27 Betriebe) b. 6,6% (1/15 Betriebe)	Erregernachweis a. mit b. ohne Klinik	Bane et al. 1997
Österreich	9,7% (10/103 Betriebe)	Erregernachweis Darm/Kot aus Sektion	Dünser et al. 1997
Großbritannien	31% (99/319 Betriebe)	Umfrage nach Klinik der PPE (3 Jahre)	Smith et al. 1998

Tab. 1: Prävalenzen in den verschiedenen Ländern inklusive der Nachweismethode

Land	Vorkommen	Untersuchung	Quelle
Dänemark	a. 75% (56/72 Betriebe) b. 39% (10/26 Betriebe)	a. Klinik b. unauffällig	Møller et al. 1998
USA	96,2% (177/184 Betriebe)	Serologie	Bane et al. 1998
Niederlande	a. 52,9% (9/17 Betriebe) b. 33,3% (1/3 Betriebe)	a. Klinik b. unauffällig	Duinhof et al. 1998
Italien	a. 25% (6/24 Betriebe) b. 20% (1/5 Betriebe)	a. Klinik b. unauffällig	Magistrali et al. 1998
Dänemark	93,7% (74/79 Betriebe)	Erregernachweis ohne Klinik, 20-30% der Tiere	Stege et al. 2000
Frankreich	25% (6/24 Betriebe)	Serologie (25% fragl.)	Fourchon et al. 2000
Norwegen	37,6% (35/93 Betriebe)	Erregernachweis 10,4% der Proben (n= 1167)	Flø et al 2000.
Schweden	32,9% (57/173 Tiere)	Erregernachweis bei Sektion 47/57 Tieren mit Durchfall	Jacobson et al. 2000
Brasilien	40,5% (60/148 Betriebe)	Erregernachweis	Moreno et al. 2000
Venezuela	31% (71/229 Tiere)	Serologie	Hurtado et al. 2000
Deutschland (NL, B)	a. 12,5% (93/745) b. 53,3% (80/150 Betriebe)	a. Erregernachweis (Darm/Kotproben) b. Serologie	Ohlinger et al. 2000
Deutschland	a. 12,4% (214/1722 Tiere) b. 39,3% (156/397 Tiere)	a. Erregernachweis b. Serologie alle Proben aus Betrieben mit klinischen Symptomen	Wendt et al. 2000

WILSON et al. beschrieben 1986 eine Prävalenz der proliferativen Enteropathie von 4,5-18,9% innerhalb einzelner Betriebe vor allen bei Schweinen im Alter von 7 bis 16 Wochen anhand klinischer Symptome. Ausbrüche von akuter, hämorrhagischer proliferativer Enteropathie sind vor allem nach dem Umställen bzw.

Zusammenstellen neuer Gruppen bei Jungebern und Jungsauen häufiger zu beobachten. Dem plötzlichen Auftreten akuter proliferativer Enteropathien gehen also eindeutig Stressfaktoren voraus. Dies können Transporte, Klimaschwankungen, Umgruppierungen oder auch nur ein Futterwechsel sein (McORIST u. GEBHART 1999).

Die Entwicklung einer spezifischen Polymerase-Kettenreaktion (PCR) sowie immunologische Nachweisverfahren haben es möglich gemacht, die Ausscheidung von *Lawsonia intracellularis* im Kot der Schweine nachzuweisen (McORIST u. LAWSON 1989b; McCORMICK et al. 1995). Diese Ausscheidung beginnt mit der 2. Woche post infectionem und kann bis zu 10 Wochen anhalten. Die Menge der dabei ausgeschiedenen Lawsonien, bis zu 10^8 Bakterien pro Gramm, ist ausreichend, um andere Schweine zu infizieren (SMITH u. McORIST 1997).

Da der Erreger aber nicht kontinuierlich ausgeschieden wird, ist das Risiko von falsch-negativen Diagnosen nicht zu vernachlässigen (KNITTEL et al. 1997).

Fäzesuntersuchungen haben ergeben, dass der Ausscheiderstatus geschlechtsunabhängig ist und sowohl bei Saugferkeln als auch bei adulten Tieren gegeben sein kann (McORIST u. LAWSON 1989c; McORIST et al. 1993; JONES et al. 1993a). Es ist anzunehmen, dass Schweine in betroffenen Betrieben und keimtragende Neuzugänge als potentielle Ansteckungsquelle fungieren und auch kontaminierte Stiefel und Gerätschaften für eine Keimverschleppung verantwortlich gemacht werden können. Weiterhin ist es möglich, dass über den Kot von infizierten Sauen der Erreger auf die Nachkommenschaft übertragen wird. Es hat sich jedoch gezeigt, dass ein frühes Absetzen der Ferkel mit einem Alter von 10 bis 14 Tagen nicht zur Elimination der proliferativen Enteropathie in diesem Betrieb führt (WINKELMAN 1996). Inwiefern eine Infektion über andere Haus- und Wildtiere stattfinden kann, ist bisher nicht ausreichend erforscht.

2.5 Pathogenese

Die proliferative Enteropathie kann reproduziert werden, indem man Schweine mit *Lawsonia intracellularis* oder damit befallener Darmmukosa infiziert (ROBERTS et al. 1977b; MAPOTHER et al. 1987; McORIST u. LAWSON 1989a; McORIST et al. 1993, 1994b). Intrazelluläre Bakterien sowie histologische Veränderungen am Darmepithel treten erstmals 8 bis 10 Tage nach Exposition mit dem Erreger auf. Die

Läsionen erreichen am 21. Tag post infectionem ihr Höchstmaß. Die Infektion von abgesetzten Ferkeln führt gewöhnlich bei 50% der Tiere 2 bis 3 Wochen nach der Infektion zu einer moderaten Diarrhoe (McORIST u. GEBHART 1999).

Das Bakterium *Lawsonia intracellularis* ist in der Lage, alle Formen der proliferativen Enteropathie auszulösen. In einem Versuch wurde Mukosa von chronisch erkrankten Schweinen gesunden Schweinen oral verabreicht. Die infizierten Schweine unterschiedlichster Altersklassen entwickelten alle Formen der proliferativen Enteropathie (MAPOTHER et al. 1987).

In einer anderen Studie wurden gesunde 7 und 28 Tage alte Schweine mit Lawsonienisolaten ($3,7 \times 10^6$ Bakterien) von einer akuten, hämorrhagischen proliferativen Enteropathie infiziert und zeigten danach die Symptome der chronischen Form (McORIST et al. 1993).

Bisher gibt es noch keine wissenschaftlich fundierten Erkenntnisse darüber, wie die von *Lawsonia intracellularis* verursachte Hyperplasie der Enterozyten ausgelöst wird. Folgende Theorien werden diskutiert (McORIST et al. 1996a):

1. Eine bakterielle Regulation von Genen, die für die Differenzierung der Zellen verantwortlich sind;
2. Eine bakterielle Produktion mitogener Stoffe;
3. Eine bakterielle Zellschädigung mit einer Zellproliferation als Wundheilung;
4. Eine Beeinflussung der rezeptorgebundenen Wachstumsfaktoren

Die intestinalen Drüsen sind bei infizierten Schweinen vergrößert und oft verzweigt. Der Verlust von körpereigenem Protein bei der hämorrhagischen und nekrotisierenden Enteritis mit dem Kot und die gestörte Aufnahme von Nährstoffen durch die verdickte, intestinale Mukosa sind die Gründe für eine verminderte Gewichtszunahme sowie schlechtere Futtermittelverwertung bei erkrankten Schweinen (WINKELMAN 1996).

Degenerative und reparative Veränderungen kommen zu der anfänglichen Enterozytenproliferation hinzu. Entzündungsbedingte Veränderungen reichen von einer oberflächlichen fibrinösen Reaktion bis hin zur tiefen koagulativen Nekrose, welche charakteristisch für die nekrotisierende Enteritis ist (ROWLAND u. LAWSON 1992).

Anfänglich enthalten die Schädigungen nur eine physiologische Anzahl von Entzündungszellen. Bei ausgeprägteren Läsionen ist eine mononukleäre

Leukozyteninfiltration der Lamina propria, meist CD-8-Zellen, zu erkennen (McORIST et al. 1992).

Falls es zu einer granulomatösen Gewebsreaktion kommt, kann diese zu einer fibrösen Gewebsinfiltration sowie zu einer muskulären Hypertrophie führen, dem charakteristischen Leitsymptom der regionalen Ileitis (ROWLAND u. LAWSON 1992).

Das auffälligste Merkmal der akuten, proliferativen hämorrhagischen Enteropathie ist die Blutung in das Lumen des Darmes. Die Sickerblutungen aus dem Kapillarbett entstehen zeitgleich mit der Degeneration und Desquamation vieler Epithelzellen (ROWLAND u. LAWSON 1992). Welche Umstände für das Auftreten der Blutungen verantwortlich sind, ist noch nicht genau erforscht. Es hat sich aber gezeigt, dass erstmalig mit *Lawsonia intracellularis* infizierte Tiere meist nur in Verbindung mit einem auslösenden Stressfaktor erkranken (McORIST u. GEBHART 1999). Aus einer Untersuchung von PEARCE (1999) ging hervor, dass eine Korrelation zwischen der Futterzusammensetzung, einem Helminthenbefall (*Trichuris suum*) und dem Auftreten von *Lawsonia intracellularis* besteht. Ein hoher Anteil an Zuckerverbindungen im Futter erhöht das Risiko einer *Trichuris*-Infektion. In Betrieben mit *Trichuris*-Infektionen wurde ein deutlich erhöhter Lawsonienbefall festgestellt. Dies könnte mit einer wurminduzierten lokalen Immunsuppression der Mukosa zusammenhängen. Die reziproke regulatorische Rolle der Zytokine von den T-Helfer-Zellen kann diesen Zusammenhang erklären. Die vermehrte Produktion der Th-2-Zellen zur Abwehr gegen die Würmer reduziert die Th-1-Zellproduktion, die zur Bekämpfung der Bakterien notwendig ist.

2.6 Erregernachweis

Die schwierige und langwierige Kultivierung der obligat intrazellulären Lawsonien im Labor erfordert die Etablierung einer passenden Zelllinie, wie zum Beispiel Rattenenterozyten (IEC-18) oder Schweineenterozyten (IPEC-J2). Zu diesen Zellen werden gereinigte *Lawsonia intracellularis*-Bakterien hinzugegeben. Mit Hilfe von Antibiotika wird das Wachstum anderer Bakterien gehemmt (LAWSON et al. 1993; McORIST et al. 1995b). Die Erhaltung und Passage der Bakterien erfordert eine mikroaerophile Atmosphäre (LAWSON et al. 1993).

Eine Absicherung der klinischen Diagnose kann durch den Erregernachweis im Kot mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (HOLYOAKE et al. 1996; McCORMICK et al. 1995) sowie durch eine Immunfluoreszenztechnik durchgeführt werden (McORIST et al. 1987). Unter Verwendung beider Methoden werden bei an Enteropathie klinisch erkrankten Schweinen gewöhnlich auch Erreger nachgewiesen (McORIST et al. 1987; McORIST et al. 1989b; JONES et al. 1993b). Es hat sich jedoch erwiesen, dass beide Tests nicht sensitiv genug sind, um Infektionen zu jedem Zeitpunkt, z.B. bei latentem Verlauf diagnostizieren zu können. Mittels der PCR können 10^2 bis 10^5 Bakterien pro Gramm Kot nachgewiesen werden. Dass die Bakterien nicht kontinuierlich ausgeschieden werden, erschwert die Diagnose zusätzlich (KNITTEL et al. 1997).

Für eine serologische Diagnose der proliferativen Enteropathie werden die Bakterien selbst als Antigenstrukturen für einen indirekten Immunfluoreszenztest (LAWSON et al. 1988; KNITTEL et al. 1997) sowie für einen ELISA-Test (HOLYOAKE et al. 1994) verwendet. Für diese Untersuchungen wurden Keime verwendet, die aus pathologisch veränderten Därmen sowie aus Kulturen extrahiert wurden. Die Resultate ergaben, dass die vom Schwein gebildeten Serumantikörper (IgM und IgG) spezifisch auf die Lawsonien reagieren. Während die Antikörperantwort gut mit dem Vorhandensein von intestinalen Läsionen übereinstimmte, kam es nicht bei jeder Infektion zu einer Serokonversion (KNITTEL et al. 1997).

Bei Sektionen ist der Erregernachweis im histologischen Präparat mit Hilfe einer Ziehl-Neelsen- oder einer Giemsa-Färbung eine einfache, schnelle und preiswerte Methode (LOVE et al. 1977). Die histopathologischen Untersuchungen können die für proliferative Enteropathien typischen pathologischen Veränderungen nachweisen. Ein spezieller Erregernachweis im eingebetteten, fixiertem Gewebe ist mit Hilfe von immunohistochemischen Färbungen möglich (LAWSON et al. 1985; McORIST et al. 1987). Falls keine speziellen immunologischen Reagenzien vorhanden sind, kann mit einer modifizierten Warthin-Starry-Silberfärbung ein Erregernachweis im Gewebe durchgeführt werden (Young 1969). Die betroffenen Krypten müssen aufgrund der geringen Größe der Lawsonien mit starker Vergrößerung untersucht werden. Steht ein Elektronenmikroskop zu Verfügung, kann der Erreger eindeutig nachgewiesen werden.

Bei der Untersuchung verschiedener Nachweisverfahren im Versuch (GUEDES et al. 2000) zeigte sich, dass mittels Immunperoxidasetest häufiger positive Tiere detektiert

werden als mit der PCR (im Mittel zu 15% häufiger). Die an 40 künstlich infizierten Tieren durchgeführten Untersuchungen ergaben weiterhin, dass sich zum Erregernachweis am toten Tier die immunohistochemische Methode vor der Warthin-Starry- und der Hematoxylin- Eosin -Färbung am besten eignet.

2.7 Prophylaxe und Therapie

Um Erkrankungen durch eine proliferative Enteropathie vorzubeugen, muss zuerst an eine Unterbrechung der Übertragungswege gedacht werden. Eine ordentliche Trennung der einzelnen Buchten und die Verwendung von Desinfektionswannen vor den Abteilen beugt einer Erregereinschleppung vor. Die Einnistung nach dem „Rein-Raus-Prinzip“ und zwischenzeitliche Reinigung mit heißem Wasser und anschließender Desinfektion minimiert den Keimdruck und die Ausbreitung der *Lawsonia intracellularis*-Bakterien. Eine Vermeidung von Klimamanagementfehlern (große Temperaturschwankungen) und anderer Stressoren wie zum Beispiel Überbelegung der Buchten beugt ebenfalls einem Krankheitsausbruch vor (WINKELMAN 1996; BUSSE 1998).

Kontrollierte Feldversuche ergaben, dass einer proliferativen Enteropathie durch ausreichende Dosen mit Tylosin (100 ppm, FLECK u. JONES 1994) oder Oxytetracyklinen (400 ppm, BEERS 1984) vorgebeugt werden kann. COLLINS und Mitarbeiter (2000) stellten fest, dass die Gabe von 400 ppm Chlortetracyklin vor einer Infektion mit *Lawsonia intracellularis* schützt, zugleich aber einer Immunität entgegenwirkt. Somit bleiben die Tiere weiterhin empfänglich für eine Infektion, was beim Absetzen des Antibiotikums und erneuter Infektion zum Ausbruch der Erkrankung führen kann. Eine bestehende klinische Lawsonieninfektion wird durch eine Dosis von 400 ppm kuriert. Werden diese Tiere wiederholt einer Infektion ausgesetzt, werden keine Erreger mehr ausgeschieden, dafür aber ein erhöhter Serumantikörpertiter nachgewiesen. Des weiteren erwies sich im Versuch, dass eine niedrige Dosis von 25 ppm Olaquinox 4 Tage ante infectionem nicht vor einer Infektion schützt, sondern den Ausbruch der Erkrankung nur verzögert und mildert. Werden diese Schweine einer wiederholten Lawsonieninfektion ausgesetzt, scheinen sie vor erneuter Infektion geschützt zu sein. Einige Tiere erkrankten bei der niedrigen Olaquinoxdosis nicht an PPE, entwickelten, wie sich später zeigte, aber auch keine belastbare Immunität.

Bestimmungen der in vitro-Empfindlichkeit gegenüber 20 verschiedenen Wirkstoffen ergaben ein weites Spektrum der gegen *Lawsonia intracellularis* wirksamen Medikamente (McORIST et al. 1995; McORIST u. GEBHART 1995). Diese beinhalten Makrolide (Erythromycin und Tylosin), Tetrazykline, Pleuromutine (Tiamulin), Penicilline und Fluochinolone. Aminoglykoside wie Neomycin, Gentamicin und Apramycin, stellten sich als unbrauchbar heraus, da der Erreger mehr oder weniger resistent dagegen war. Mit diesen Ergebnissen übereinstimmend konnte an künstlich infizierten Schweinen bewiesen werden, dass Tylosin, Lincomycin, Spectinomycin, Chlortetrazykline und Tiamulin auch in vivo therapeutisch und präventiv wirksam sind (McORIST et al. 1996b, 1997b).

WALTER und Mitarbeiter (2000) bewiesen die Wirksamkeit von Tiamulin zur Bekämpfung von proliferativen Enteropathien. Über das Trinkwasser wurden infizierten Schweinen mit klinischen Symptomen 60 ppm Tiamulin über 5 aufeinanderfolgende Tage verabreicht. Die therapierten Tiere zeigten deutlich weniger pathologische Veränderungen des Darmes, schieden deutlich weniger Bakterien aus und hatten bessere Tageszunahmen als die Tiere der unbehandelten Kontrollgruppe.

Die Behandlung einer akuten proliferativen Enteropathie in einer Zuchtherde, die bis zu diesem Zeitpunkt frei von Symptomen war, verlangt ein rasches und rigoroses Vorgehen. Es sollten sowohl die erkrankten als auch die klinisch gesunden Tiere einer Herde behandelt werden. Die bevorzugte Therapie besteht aus der Verabreichung von 120 ppm Tiamulin, 100 ppm Tylosin oder 400 ppm Chlortetrazyklin 14 Tage lang über das Trinkwasser oder über das Futter (McORIST u. GEBHART 1999).

Tiere, die zur Remontierung in vorrausichtlich infizierte Bestände verbracht werden, sollen 14 Tage lang antibiotisch versorgt werden, um einen klinischen Ausbruch der Erkrankung vorzubeugen. Hier sollten Tiamulin (120 ppm), Tylosin (100 ppm), Lincomycin (110 ppm) oder Chlortetrazyklin (300 ppm) über das Futter verabreicht werden (LOVE u. LOVE 1977). Diese Vorgehensweise ist geeignet, um der akuten proliferativen Enteropathie bei Jungsaunen vorzubeugen. Die proliferative Enteropathie kann aber immer noch im Anschluss an die Therapie auftreten. Bei Mastschweinen mit endemisch auftretender proliferativer Enteropathie ist eine kontinuierliche Therapie möglich, um schwere Produktionsverluste zu minimieren. In den meisten Fällen ist eine orale Dosis über das Futter von 50 ppm Tiamulin, 200

ppm Chlortetrazyklin, 110 ppm Lincomycin oder 100 ppm Tylosin für den obengenannten Zweck ausreichend. Die Gefahr in einer Dauertherapie besteht darin, dass die Tiere empfänglich für Infektionen bleiben und es nach Absatz der Medikamente zu erneuten Krankheitsausbrüchen kommen kann (WINKELMAN 1996). Versuche von WINKELMAN et al. (2000) mit Econor[®], einem Valnemulin-Hydrochlorid, zeigten, dass Gaben von 25, 37,5 und 50 ppm die proliferative Enteropathie unter Kontrolle bringt. Eine zahlenmäßige, aber nicht statistisch beweisbare Dosiskorrelation zum Durchfall ist erkennbar. Bei einer Dosis von 50 ppm kommt es zu einer deutlich erhöhten Tageszunahme.

Schwere chronische klinische Erkrankungen, die sich mit kümmernden Schweinen mit oder ohne nekrotisierende Enteritis manifestieren, werden gelindert durch das Verabreichen von Tylosin, Lincomycin, Chlortetrazyklin oder Tiamulin. Falls nur wenige Tiere in einer Schweineherde erkranken, sollte man die erkrankten Tiere von den anderen trennen, und mit einer unterstützenden Therapie (Antibiotikagabe über Futter oder Trinkwasser) die Verluste mindern.

Weitere Feldversuche wiesen darauf hin, dass eine Therapie mit Fütterungsantibiotika bei einem Alter von 4 bis 8 Wochen die besten Ergebnisse bringt. Diese Versuche ergaben weiterhin, dass eine Übertragung der Erreger mit einer Behandlung der Muttertiere nicht verhindert werden kann. Durch eine Behandlung tragender Jungsauen 1 bis 2 Wochen vor dem Abferkeln kann die Übertragung von Erregern auf die Nachkommen lediglich verringert werden. Da die Erkrankung selten Tiere, die älter als 2 Jahre sind oder eine Infektion bereits überstanden haben, befällt, kann man davon ausgehen, dass eine natürliche Immunität existiert. Desweiteren wurden spezifische zellgebundene als auch humorale Antikörper-Reaktionen bei einer Infektion festgestellt (LAWSON et al. 1988; McORIST u. LAWSON 1993a).

KNITTEL und Mitarbeiter (2000) zeigten im Versuch, dass eine intranasale Impfung mit avirulenten Lawsonienisolaten im Alter von 3 Wochen einen belastbaren Schutz vor Erkrankungen bietet. Da keine klinischen Symptome feststellbar waren, konnte der Effekt nur an einer deutlich erhöhten täglichen Tageszunahme, an einer deutlichen Verminderung der Erregerausscheidung als auch an einer Verminderung der pathologischen Darmveränderungen festgestellt werden. Bei der Auswertung

serologischer Befunde ist aber immer noch Vorsicht geboten, da es noch keine abgesicherten Korrelationen zwischen Serumantikörper und Infektionsschutz gibt.

3 Eigene Untersuchungen

3.1 Probenmaterialien

Im Zeitraum von September 1999 bis Mai 2000 wurden 20 verschiedene Betriebe aus dem norddeutschen Raum (n=15) sowie der Südwestpfalz (n=5) beprobt. Die Betriebe aus Norddeutschland waren allesamt einem Zuchtschweinerzeugerverband angeschlossen, während es sich bei den Betrieben aus der Südwestpfalz um unabhängige Ferkelerzeugerbetriebe handelte. Die Betriebe waren zum Zeitpunkt der Probennahme ohne klinische Erkrankung und in der Vergangenheit waren keine Fälle von chronischer oder akuter proliferativer Enteropathie aufgetreten.

Insgesamt wurden 410 Tiere beprobt. Dabei entfielen 106 Proben auf Altsauen, 109 auf Jungsauen und 195 auf Läufer Schweine. Bei diesen Tieren wurden einmalig sowohl Kotproben für den Erregernachweis mittels Immunfluoreszenztest und PCR als auch Serum für einen Antikörpernachweis entnommen. Pro Betrieb wurden in der Regel 5 Altsauen, 5 Jungsauen sowie 10 Läufer Schweine (10 - 25 kg) untersucht.

Im Januar 2000 wurden außerdem 2 Läufer Schweine (ca. 20 kg Lebendgewicht), die Durchfall zeigten und bei denen eine Infektion mit *Lawsonia intracellularis* nachgewiesen werden konnte, in die Klinik für kleine Klauentiere der Tierärztlichen Hochschule Hannover eingestellt und in regelmäßigen Abständen bis hin zur Schlachtung im Juni 2000 beprobt (gekoppelte Kot- und Blutprobe).

Die Kotproben wurden mit einem Einmalhandschuh rektal entnommen. Von dem Kot wurde mit Hilfe einer sterilisierten Platinöse ein Objektträgerausstrich für die Immunfluoreszenzuntersuchung angefertigt, luftgetrocknet, für 15 Minuten bei -20°C in Azeton fixiert und bei -20°C tiefgefroren. Für die PCR wurde ein Eppendorfgefäß mit Hilfe eines Einmalholzspatels mit Kot gefüllt und bis zur Untersuchung durch die PCR ebenfalls bei -20°C eingefroren.

Alle Blutproben (10 ml pro Tier) wurden mit einer sterilen Serummonovette aus der *Vena jugularis externa* oder der *Vena cava cranialis* entnommen, bei 4°C gekühlt transportiert und danach für 15 Minuten bei 2000 g (5000 U/min) zentrifugiert. Das Serum wurde in ein Eppendorfgefäß überführt und bei 4°C aufbewahrt, falls die Untersuchung am selben Tag stattfand, oder bei -20°C tiefgefroren, sofern es erst zu einem späteren Zeitpunkt untersucht werden konnte.

Alle verwendeten Gefäße sowie die Einmalhandschuhe zur Kotentnahme wurden mit einem wasserfesten Stift gekennzeichnet, so dass eine einwandfreie Identifikation der Proben jederzeit möglich war.

3.2 Nachweis von *Lawsonia intracellularis* mittels PCR

3.2.1 Prinzip

Die PCR stellt eine Methode zur enzymatischen Synthese spezifischer DNA-Sequenzen unter in vitro Bedingungen dar. Das Reaktionsprinzip der PCR entspricht der Replikation der DNA bei der Zellteilung. Für die Replikation werden eine DNA-Matrize, eine thermostabile DNA-abhängige DNA-Polymerase, Desoxynukleotide, zwei Oligonukleotidprimer, die als Starter für die Polymerase dienen, und ein passendes Puffersystem benötigt. Die gesamte Reaktion basiert auf drei Teilschritten:

1. Denaturierung: Aufschmelzung der DNA-Doppelstränge in Einzelstränge.
2. Annealing: Hybridisierung der Oligonukleotidprimer. Zwei sequenzspezifische Oligonukleotidprimer lagern sich über Wasserstoffbrückenbindungen an komplementäre Sequenzen der DNA-Stränge.
3. Polymerisation: Elongation der flankierenden Primer durch die DNA-Polymerase

Diese drei Schritte werden als Zyklus mehrfach wiederholt (Amplifikation der DNA-Stränge). Hierdurch wird der zwischen den beiden Primern gelegene DNA-Abschnitt vermehrt (amplifiziert), so dass er sich letztendlich in einer Agarose-Gelelektrophorese darstellen lässt.

Da die PCR-Untersuchungsmethode relativ empfindlich gegenüber Kontaminationen durch Fremd-DNA (von Probe zu Probe) oder Nukleasen ist, wurden mehrere Vorsichtsmaßnahmen getroffen.

Soweit möglich wurden alle verwendeten Lösungen bzw. deren Bestandteile autoklaviert. Beim Herstellen der Lösungen wurde streng auf sauberes Arbeiten geachtet, alle verwendeten Hilfsmittel wurden zuvor ebenfalls autoklaviert. Beim Arbeiten wurden überwiegend Einwegmaterialien verwendet.

Die Probenextraktion wurde unter einem Abzug in einem separaten Raum durchgeführt und es wurden ausschließlich für diese Zwecke bestimmte Pipetten verwendet. Zwischen den einzelnen Arbeitsschritten wurden jeweils neue, nicht sterile Einmalhandschuhe angezogen, die zuvor abgewaschen und mit 70%igem Ethanol desinfiziert wurden. Der Ansatz des Mastermixes erfolgte unter einer Sterilbank auf Eis unter Verwendung von Filterpipettenspitzen. Die Sterilbank wurde in regelmäßigen Abständen für 30 min mit UV-Licht bestrahlt, um Kontaminationen mit Nukleasen oder Fremd-DNA zu vermeiden.

Zur Absicherung der Methode wurden bei der PCR Proben, die wiederholt (mindestens dreimal) in der Immunfluoreszenz und in der PCR positive Ergebnisse lieferten, als Positivkontrolle bei der Extraktion verwendet. Um die Funktionsfähigkeit des Cyclers und die Kontaminationsfreiheit des Mastermixes abzusichern, lief ein Leerwert (autoklaviertes Aqua bidest. anstelle von DNA-Extraktionslösung) als Negativkontrolle sowie Plasmid-DNA als Positivkontrolle parallel zu jeder Versuchsreihe mit. Die Plasmid-DNA wurde von Prof. Dr. Till Rümenapf vom Institut für Virologie der Universität Gießen zur Verfügung gestellt. Somit konnten Verunreinigungen und Methodikfehler ausgeschlossen werden.

3.2.2 Extraktion der *Lawsonia*-DNA aus den Kotproben

Zur Extraktion der Lawsonien-DNA aus den Kotproben wurde eine modifizierte Kieselgur-Guanidinthiocyanat-Methode verwendet (JONES et al. 1993; DÜNSER et al. 1997). Das Prinzip dieser DNA-Extraktionsmethode beruht auf der Bindung von DNA an Kieselgur (Diatomaceous Earth (DE)) bei gleichzeitiger Anwesenheit von Guanidinthiocyanat in hoher Konzentration. Letzteres besitzt die Fähigkeit, Inhibitoren der PCR (Nukleasen) zu eliminieren und Proteine aufzuspalten.

In einen Eppendorfgefäß wurde 1 ml Lysis- Puffer mit 0,2 g Faeces 30 s lang auf einem Vortexer vermischt und 1 h bei Zimmertemperatur inkubiert. Danach wurden die Proben bei 16000 g für 3 min zentrifugiert und der Überstand in ein Eppendorfgefäß mit 50 µl DE-Suspension pipettiert, erneut 30 s gemischt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Proben wiederum 15 s lang gemischt und bei 16000 g für 3 min zentrifugiert. Der Überstand wurde

abpipettiert und verworfen. Das Pellet wurde folgenden 5 Waschschritten unterzogen:

Zuerst wurde das Pellet zweimal mit je 200 µl Waschpuffer, dann 2 mal mit je 200 µl eiskaltem 70 %igen Ethanol und abschließend einmal mit 200 µl eiskaltem Azeton gewaschen. Nach der Zugabe von 200 µl der jeweiligen Waschlösung wurde das Pellet im Vortexer resuspendiert, anschließend für 3 min bei 16000 g zentrifugiert und danach der Überstand verworfen. Das Azetonpellet wurde bei 56°C für 15 min getrocknet. Nach dem Trocknen wurden 75 µl Lagerungspuffer zum Pellet dazugegeben, 30 s vermischt und bei 16000 g zentrifugiert. Der Überstand, in welchem sich die extrahierte DNA befand, wurde bis zu seiner Verwendung in einem sterilen Eppendorfgefäß bei -20°C gelagert.

3.2.3 PCR

Die PCR wurde in einem Gesamtvolumen von 25 µl pro Probe angesetzt. Hierzu wurden die Primer A (5'-TAT GGC TGT CAA ACA CTC CG-3') und B (5'-TGA AGG TAT TGG TAT TCT CC-3') aus einem 375 bp Segment des *Lawsonia intracellularis*-spezifischen p78-DNA-Klons gewählt. Sie entsprechen den Nukleotiden 5-24 und 304-323 (Gebhart et al. 1991; Jones et al. 1993b). Die 375 bp Sequenz ist in der Genbank unter der Nummer L08049 zu finden.

Die PCR wurde in einem Peltier Thermal Cycler PTC-200 sowie einem Eppendorf Thermal Cycler durchgeführt. Beide Cycler wurden mit den gleichen Proben mehrmals beschickt um eine Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten.

Die initiale Denaturierung der DNA erfolgte über 10 min bei 94° C, dann wurden 35 Zyklen durchgeführt, die aus folgenden Schritten bestanden:

1. 40 s bei 94°C
2. 40 s bei 55°C
3. 40 s bei 72°C

Nach Beendigung des 35igsten Zyklus folgten 7 min bei 72°C zur Elongation der noch unvollständigen Stränge. Anschließend wurden die Proben bis zur Entnahme aus dem Cycler auf 4°C heruntergekühlt.

3.2.4 Agarose-Gelelektrophorese

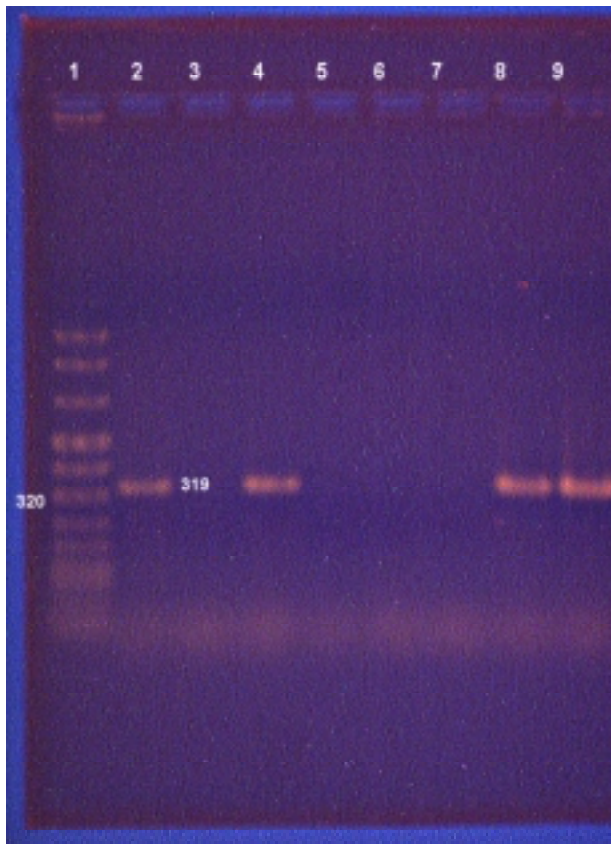
Für die Agarose-Gelanalyse der DNA-Banden wurden Horizontalgele mit einer Konzentration von 2% Agarose verwendet. Das Agarose-TAE-Puffergemisch wurde im Mikrowellenherd bis zum Kochen erhitzt und nach Abkühlung auf 50°C in die gereinigte Kammer gegossen. Nach dem Polymerisieren des Gels (ca. 40 min) wurden die Kämme herausgezogen und das Gel mit 1 x TAE-Puffer überflutet.

Vor dem Laden des Gels versetzte man die DNA-Proben mit 3 µl Ladepuffer pro 12 µl Probe. Danach wurden die Proben kurz an zentrifugiert und zügig in die Taschen des Gels pipettiert. Die Elektrophorese lief ca. 90 min mit 4-5 Volt pro Zentimeter Lauflänge. Das Gel wurde durch Schwenken in einer Lösung von 25 µl Gelstar® in 250 ml TAE-Puffer für etwa 30 min bei Raumtemperatur gefärbt.

3.2.5 Auswertung der Gele

Das 319 bp große DNA-Fragment war nach Anregung mit einem Blaulichttransilluminator als orangerote Bande sichtbar und wurde mit Hilfe einer Digitalkamera dokumentiert. Die Ergebnisse der PCR waren immer eindeutig, dass heißt es traten immer nur einzelne Banden in der zu erwartenden Länge auf, ansonsten blieb das Gel bandenfrei. Die Proben mit Banden von einer Länge von 319 bp wurden positiv beurteilt und Proben welche keine Banden aufwiesen negativ bewertet.

Abb. 1: PCR des 319 bp Segmentes von *Lawsonia intracellularis* (Foto : A. Bonitz)



- Spur 1: DNA Molekular Marker VIII
- Spur 2: Positiv Kontrolle (Plasmid DNA)
- Spur 3: Negativ Kontrolle (Aqua bidest. anstelle DNA- Extraktionslösung)
- Spur 4: Positive Probe
- Spur 5: Negative Probe
- Spur 6: Negative Probe
- Spur 7: Negative Probe
- Spur 8: Positive Probe
- Spur 9: Positive Probe

3.3 Nachweis von *Lawsonia intracellularis* mit Hilfe des indirekten Immunfluoreszenztestes (IFT)

3.3.1 Prinzip

Bei der indirekten Immunfluoreszenz kommt es zu einer Bindung unkonjugierter Antikörper an das Antigen im Präparat (in diesen Fall *Lawsonia intracellularis*). Um diese Anlagerung zu lokalisieren, wird ein Farbstoff-konjugierter-Sekundärantikörper verwendet, der gegen den Primärantikörper gerichtet ist. Durch eine UV-induzierte Anregung des Farbstoffes werden die spezifischen Antigen-Antikörperkomplexe sichtbar gemacht. Diese können mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops aufgrund des hell gelbgrünen Leuchtens ausgemacht werden.

3.3.2 Indirekter Immunfluoreszenztest

Auf die Objektträger wurde mit einem Wachsstift ein Kreis gezogen, in welchen mit einer Öse Kot aufgetragen wurde. Nach dem Lufttrocknen wurde der Objektträger für 15 min bei -20°C in Azeton fixiert und dann getrocknet.

Der Primärantikörper (monoklonaler-Maus-Hybridom-Antikörper) wurde 1 zu 300 mit PBS-Puffer (pH 7,6) in einem Polypropylenröhrchen verdünnt, der markierte Sekundärantikörper (mit Fluoreszein-Isothiocyanat konjugiertes Ziege-Anti-Maus-IgG) wurde ebenfalls mit PBS-Puffer (pH 7,6) 1 zu 1000 verdünnt. Bis zu seiner Verwendung wurde das Konjugat lichtgeschützt im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt.

Die Objektträger, inklusive einer Positivkontrolle, wurden mit jeweils $100\ \mu\text{l}$ verdünntem Primärintiserum überschichtet und in einer feuchten Kammer für 60 min bei 37°C inkubiert. Die Negativkontrolle wurde nur mit PBS-Puffer überschichtet.

Nach der Inkubation wurden die Ausstriche mit PBS-Puffer (pH 7,6) abgespült, in einer lichtgeschützten Kammer 2 mal für 10 min gewaschen und wiederum im Brutschrank getrocknet.

Anschließend wurden sämtliche Ausstriche, auch die Negativkontrolle, mit $100\ \mu\text{l}$ Konjugat überschichtet und für 30 min bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

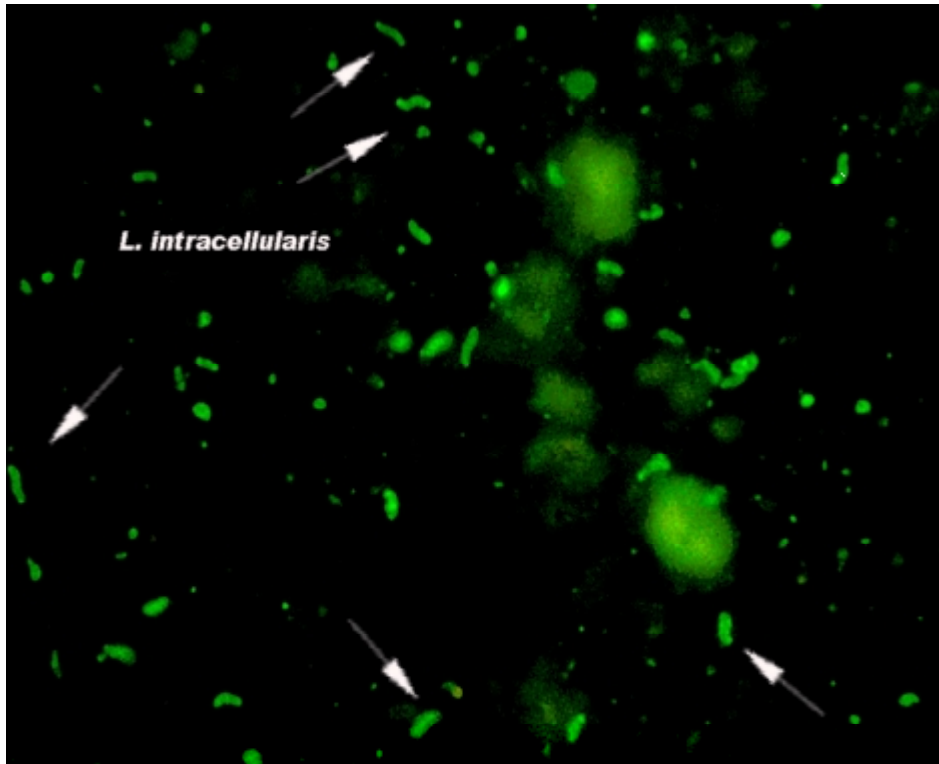
Wie oben beschrieben wurden die Proben abgespült und gewaschen.

Nach dem Trocknen wurden die Ausstriche mit Glycerin (1 zu 30 verdünnt mit PBS-Puffer) eingedeckt und mit einem Deckglas versehen.

Mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops wurden die Ausstriche bei einer Wellenlänge von 495 nm untersucht. Sobald Lawsonien mit einer brillanten Randfluoreszenz gefunden wurden, wurde die Probe als positiv bewertet. Als fraglich wurden die Proben eingestuft, die deutlich fluoreszierende Bakterienfragmente aufwiesen, deren Form nicht mehr eindeutig den Lawsonien zuzuordnen war. Ebenfalls als fraglich wurden Proben beurteilt, in denen nur 1-2 *Lawsonia*-ähnliche Bakterien im gesamten Präparat oder entsprechende Bakterien mit nur geringer Fluoreszenz gefunden wurden.

Zur Methodenabsicherung wurden Proben, welche bei wiederholten Untersuchungen mittels Immunfluoreszenz und PCR mindestens 3 mal hochgradig positiv waren, für die Positivkontrollen verwendet. Bei der Negativkontrolle wurde Antiserum durch PBS-Puffer (pH 7,6) ersetzt. Durch dieses Vorgehen konnten Kontaminationen und Fehler in der Methode ausgeschlossen werden.

Abb. 2: IFT einer positiven Kotprobe. (Foto: Klinik für kleine Klautiere, TiHo Hannover)



3.3.3 Nachweis von Serumantikörpern mittels indirekter Immunfluoreszenz

Für diesen Nachweis wurden Objektträger verwendet, die insgesamt 15 Kavitäten enthielten, in denen sich *Lawsonia intracellularis*-Bakterien befanden. Die ggf. im Serum befindlichen Antikörper haften an dem *Lawsonia*-Antigen (Protein) und werden mit Fluoreszein-Isothiocyanat-konjugierten Ziege-Anti-Schwein-Antikörpern mittels eines Fluoreszenzmikroskops sichtbar gemacht.

Um sich bei diesem Nachweisverfahren vor Kontaminationen und Methodikfehlern zu schützen wurde Gnotobiotenserum als Negativkontrolle und von Steven McOrist zu Verfügung gestelltes Kontrollserum als Positivkontrolle verwendet.

Alle Serumproben, inklusive der Positiv- und Negativkontrolle (Gnotobiotenserum), wurden nach dem Auftauen mit PBS-Puffer (pH 7,2) 1 zu 30 verdünnt.

In jede Kavität wurden 5 µl einer Probenverdünnung pipettiert und die Objektträger über Nacht im Kühlschrank bei 4°C in einer feuchten Kammer inkubiert.

Am nächsten Tag wurden die Objektträger gewaschen, indem man sie lichtgeschützt in PBS-Puffer (pH 7,2) fünf Minuten lang schwenkte. Dieser Vorgang wurde mit frischem PBS-Puffer insgesamt viermal wiederholt.

Anschließend wurden die Objektträger bei 37°C im Brutschrank getrocknet.

Nach dem Trocknen wurden 5 µl verdünntes Konjugat in jede Kavität gegeben und die Objektträger erneut für 30 min bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

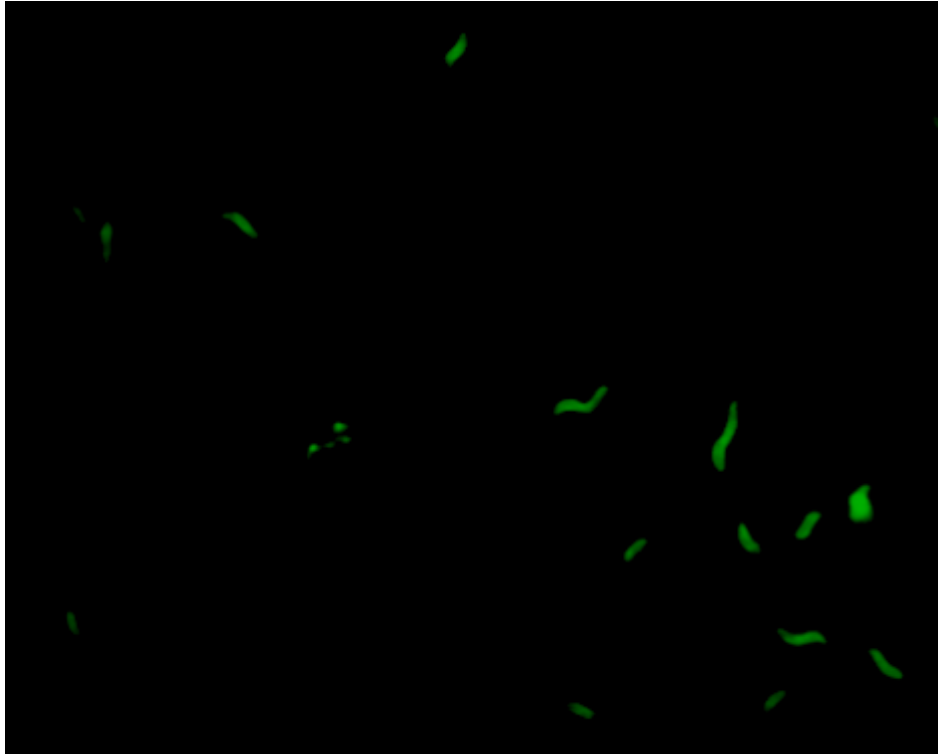
An die Inkubation schloss sich wieder das Waschen der Objektträger wie oben beschrieben an.

Die Objektträger wurden mit verdünntem Glycerin (PBS-Puffer 1 zu 30) eingedeckt.

Bei 100facher Vergrößerung wurden die Proben mit einem Fluoreszenzmikroskop untersucht.

Positive Proben zeigten Lawsonien mit brillianter Randfluoreszenz. Fragliche Proben wiesen Lawsonien mit einer geringgradigen Fluoreszenz auf (Titer < 1:30).

Abb. 3: IFT einer positiven serologischen Probe. (Foto: A. Bonitz)



3.4 Absicherung der Methoden

Um die Wiederholbarkeit der Ergebnisse zu überprüfen, wurden nach dem Zufallsprinzip 30 Blutproben mittels Serologie und je 20 Kotproben mittels PCR und Immunfluoreszenz zweimal wiederholt untersucht. Bei der PCR und der Serologie wurde eine 100%ige Übereinstimmung festgestellt, bei der Immunfluoreszenz eine nur 85%ige (2 zuvor fragliche Proben waren anschließend negativ und 1 zuvor fragliche Probe anschließend positiv).

4 Statistische Auswertung

Sensitivität und Spezifität dienen dazu, den Wert einer diagnostischen Methode zu charakterisieren. Die Sensitivität gibt die Wahrscheinlichkeit an, dass mit dem Test *Lawsonia intracellularis*-infizierte Tiere detektiert werden, während die Spezifität die Wahrscheinlichkeit ausdrückt, dass der Test bei *Lawsonia intracellularis*-freien Schweinen negativ ausfällt. Im Gegensatz dazu, sind die Vorhersagewerte keine testspezifischen Größen, sondern hängen zusätzlich von der Prävalenz des untersuchten Merkmals in der Stichprobe ab. Der positive Vorhersagewert gibt die Wahrscheinlichkeit an, dass eine Infektion mit *Lawsonia intracellularis* bei Tieren mit einem positiven Testergebnis auch tatsächlich vorliegt. Der negative Vorhersagewert gibt umgekehrt die Wahrscheinlichkeit wieder, dass ein Tier mit negativem Testergebnis auch wirklich nicht mit *Lawsonia intracellularis* infiziert ist.

Da mittels PCR nicht immer alle positiven Tiere detektiert werden und die PCR hier als Referenzmethode gilt, wird nur von der relativen Spezifität und der relativen Sensitivität gesprochen.

Relative Sensitivität, relative Spezifität, Prävalenz, positive und negative Vorhersagewerte der Nachweismethoden für *Lawsonia intracellularis* wurden mit Hilfe der folgenden Formeln im Vergleich zu der Referenzmethode (PCR) ermittelt:

$$\text{Relative Sensitivität [\%]} = \frac{\text{Anzahl positiver Proben mit der untersuchten Methode}}{\text{Anzahl positiver Proben mit der Referenzmethode}} \cdot 100$$

$$\text{Relative Spezifität [\%]} = \frac{\text{Anzahl negativer Proben mit der untersuchten Methode}}{\text{Anzahl negativer Proben mit der Referenzmethode}} \cdot 100$$

$$\text{Positiver Vorhersagewert [\%]} = \frac{\text{Anzahl der sowohl mit Referenz – als auch mit untersuchter Methode positiven Proben}}{\text{Anzahl positiver Proben mit der untersuchten Methode}} \cdot 100$$

$$\text{Negativer Vorhersagewert [\%]} = \frac{\text{Anzahl der sowohl mit Referenz – als auch mit untersuchter Methode negativen Proben}}{\text{Anzahl positiver Proben mit der Referenzmethode}} \cdot 100$$

Für die statistische Signifikanzberechnung wurde der Chi-Quadrat-Test verwendet.

4.1 Untersuchungszahlen und Häufigkeiten der Ergebnisse

Von den insgesamt 410 untersuchten Tieren aus den 20 verschiedenen Betrieben, entfielen 106 Schweine auf die Altsauen (25,9%), 109 auf die Jungsauen (26,6%) und 195 auf die Läufer (47,6%). Bei der Untersuchung mittels IFT ergaben 34 Proben (8,2%) einen fraglichen Befund, in der serologischen Untersuchung 16 (3,9%) Proben. Ein Tier hatte sowohl im IFT als auch in der Serologie ein fragliches Ergebnis. Die Ergebnisse der Untersuchungen werden in den folgenden Tabellen mit ihren prozentualen Verteilungen bezüglich der untersuchten Altersgruppe und bezüglich der Gesamtzahl der untersuchten Tiere dargestellt.

Tab. 2: Befunde der PCR- Untersuchungen im Vergleich mit den verschiedenen Altersklassen

Befund PCR- Nachweis	Läufer N	Jungsauen n	Altsauen n	Summe n
positiv	45 (23,1%)	19 (17,4%)	12 (11,3%)	76 (18,5%)
negativ	150 (76,9%)	90 (82,6%)	94 (88,7%)	334 (81,5%)
Summe n	195	109	106	410

Insgesamt waren 76 der mittels PCR untersuchten Proben (18,5%) *Lawsonia*-positiv, 334 Proben dagegen *Lawsonia*-negativ (81,5%). Die Läufer waren mit 23,1% signifikant häufiger positiv als die Altsauen mit 11,3% ($p < 0,05$, Chi-Quadrat-Test). Sonst gab es bezüglich des Alters keine signifikanten Unterschiede.

Tab. 3: Befunde der IFT- Untersuchungen im Vergleich mit den verschiedenen Altersklassen

Befund IFT- Nachweis	Läufer n	Jungsauen N	Altsauen n	Summe n
positiv	22 (11,3%)	13 (11,9%)	8 (7,5%)	43 (10,5%)
fraglich	19 (9,7%)	8 (7,3%)	7 (6,6%)	34 (8,3%)
negativ	154 (79,0%)	88 (80,7%)	91 (85,8%)	333 (81,2%)
Summe n	195	109	106	410

Auch hier zeigt sich, dass die meisten positiven Proben (22 von 43) in der Gruppe der Läufer zu finden sind. Ebenso entfallen die meisten fraglich Proben (19 von 34) auf die Läufer. Die Unterschiede sind hier aber nicht statistisch signifikant. Eine

Häufung der Befunde zugunsten der Läufer ist auch durch den mengenmäßigen Überhang zugunsten der Läufer erklärbar.

Tab. 4: Befunde der serologischen Untersuchung im Vergleich mit den verschiedenen Altersklassen

Befund Serologie	Läufer n	Jungsauen n	Altsauen n	Summe n
positiv	45 (23,1%)	92 (84,4%)	92 (86,8%)	229 (55,9%)
fraglich	11 (5,6%)	2 (1,8%)	3 (2,8%)	16 (3,9%)
negativ	139 (71,3%)	15 (13,8%)	11 (10,4%)	165 (40,2%)
Summe n	195	109	106	410

Insgesamt waren 229 (55,9%) Proben serologisch positiv, wobei die Jung- und Altsauen jeweils 92 positive Proben aufwiesen. Die Sauen hatten mit jeweils 84,4% bzw. 86,8% positiver Proben signifikant häufiger Antikörper als die Läufer (23,1%, $p < 0,05$). In der Gruppe der Läufer traten dafür die meisten fraglichen Befunde auf (11 von 16).

Tab. 5: Methodenvergleich der beiden Antigennachweise (PCR/IFT)

	PCR -				PCR +				Summe ges.
	L	JS	AS	Summe IFT	L	JS	AS	Summe IFT	
IFT -	136	82	88	306	18	6	3	27	333
IFT fragl.	8	6	6	20	11	2	1	14	34
IFT +	6	2	0	8	16	11	8	35	43
Summe PCR	150	90	94	334	45	19	12	76	410

L=Läufer, JS=Jungsau, AS=Altsau

Von den 334 PCR-negativen Proben erwiesen sich auch 306 im IFT negativ (91,6%). Die übrigen Proben fielen im IFT entweder fraglich aus ($n=20$ (6%)) oder waren falsch positiv ($n=8$ (2,4%)). Von den 76 PCR-positiven Proben waren nur 35 auch im IFT positiv (46,1%), dagegen waren 14 (18,4%) fraglich bzw. 27 (35,5%) falsch negativ (Tab. 5).

Tab. 6: Berechnung der relativen Spezifität und relativen Sensitivität vom IFT im Vergleich zur PCR

	relative Spezifität (%)				relative Sensitivität (%)				Vorhersagewert (%)
	L	JS	AS	Summe	L	JS	AS	Summe	
ohne IFT- frgl. Proben	95,8	97,6	100	97,5	47,1	64,7	72,7	56,5	neg.=91,9 pos.=81,4
IFT-frgl. Proben als negativ	96,0	97,8	100	97,6	35,6	57,9	66,7	46,1	neg.=88,8 pos.=81,4
IFT-frgl. Proben als positiv	90,7	91,1	93,1	91,6	60,0	68,4	75,0	64,5	neg.=91,9 pos.=63,6

L=Läufer, JS=Jungsau, AS=Altsau

Betrachtet man nun zunächst einmal die eindeutigen Proben ergibt sich eine relative Spezifität von 97,5% und eine relative Sensitivität von 56,5%. Das heißt, mit einer Wahrscheinlichkeit von 97,5% wird ein PCR-negatives Schwein mittels IFT als negativ befundet, wohin gegen mit einer Wahrscheinlichkeit von 56,5% ein PCR-positives Schwein als positiv getestet wird. Mit einer Wahrscheinlichkeit von 91,9% ist das als negativ untersuchte Tier auch tatsächlich frei von Lawsonien und mit 81,4%iger Wahrscheinlichkeit das positive Tier infiziert. Werden die fraglichen Proben zu den positiven dazugerechnet, bleibt eine gute Spezifität erhalten (91,6%) und die Sensitivität wird auf 64,5% gesteigert. Der positive Vorhersagewert sinkt aber auf 63,6% ab, was bedeuten würde, dass mehr positive Tiere detektiert würden, diese aber nur noch mit einer Wahrscheinlichkeit von 63,6% tatsächlich infiziert sind. Werden die fraglichen Proben zu den negativen dazugezählt, sinkt die Sensitivität auf 46,1%, d.h. es werden weniger tatsächlich positive Tiere detektiert. Die übrigen Parameter ändern sich dabei kaum (Tab. 6).

Relative Spezifität und Sensitivität für den IFT zeigten eine deutliche Altersabhängigkeit. Die Ergebnisse waren am schlechtesten bei den jungen Schweinen und am besten bei den Altsauen.

Tab. 7: Vergleichende Betrachtung der Serologie mit der PCR im Bezug auf das Alter

	n	K+/S+	K+/S-	K-/S+	K-/S-	K+	S+
Läufer	184	21 (11,4%)	22 (12,0%)	24 (13,0%)	117 (63,6%)	23,4%	24,4%
Jungsauen	107	18 (16,8%)	1 (0,9%)	74 (69,2%)	14 (13,1%)	17,7%	86,0%
Sauen	103	11 (10,7%)	1 (1,0%)	81 (78,6%)	10 (9,7%)	11,7%	89,3%
Gesamt	394	50 (12,7%)	24 (6,1%)	179 (45,4%)	141 (35,8%)	18,8%	58,1%

K=Kotproben, S=Serologie, die 16 serologisch fraglichen Tiere (11 Absatzferkel, 2 Jungsauen und 3 Altsauen mit einem Titer < 1:30) wurden bei dieser Betrachtung nicht berücksichtigt.

Bei der vergleichenden Betrachtung der Ergebnisse von PCR und Serologie wird offensichtlich, dass die Läufer zwar häufiger den Erreger ausscheiden als Jung-/Altsauen, jedoch nur etwa die Hälfte dieser Tiere auch serokonvertiert haben (11,4%). Etwa die gleiche Zahl an Läufern zeigt seropositive Titer, ohne dass Erreger nachgewiesen werden können (13%). Der überwiegende Anteil junger Schweine war sowohl im Erregernachweis als auch in der Serologie negativ (63,6%). Sauen dagegen weisen sehr häufig positive Serotiter auf (86,0 bzw. 89,3%), der Erreger kann jedoch dabei nur selten im Kot gefunden werden (16,8 bzw. 10,7%). Sauen mit Erregernachweis, aber ohne Serokonversion bilden die Ausnahme (0,9 bzw. 1,0%) (Tab. 7).

Tab. 8: Berechnung der relativen Spezifität und relativen Sensitivität der Serologie im Vergleich zur PCR

	relative Spezifität (%)				relative Sensitivität (%)				Vorhersagewert (%)
	L	JS	AS	Summe	L	JS	AS	Summe	
ohne Serol.-frgl. Proben	83,0	15,9	11,0	44,0	48,8	94,7	91,7	67,6	neg.=85,5 pos.=21,8
Serol.- frgl. Proben als negativ	84,0	17,8	13,8	46,4	46,6	94,7	91,7	65,8	neg.=85,6 pos.=21,8
Serol.- frgl. Proben als positiv	78,0	15,6	10,6	42,2	51,1	94,7	91,7	68,4	neg.=85,5 pos.=21,2

L=Läufer, JS=Jungsau, AS=Altsau

Für die Jung- und Altsauen ergibt sich eine relative hohe Sensitivität (über 90%) für die serologische Untersuchung, was bedeutet, dass Ausscheider mit hoher Wahrscheinlichkeit positiv befundet werden. Serologisch positiv befundete Sauen weisen aber nur mit einer Wahrscheinlichkeit um 21% Lawsonien im Kot auf, die

relative Spezifität liegt nur bei 15,9% (Jungsauen) bzw. 11,0% (Altsauen). Bei den Läufern zeigt sich ein anderes Bild. Hier liegt, im Gegensatz zu den älteren Schweinen, die relative Spezifität bei 83%, die Tiere ohne Erregerausscheidung waren demnach entsprechend häufiger serologisch negativ. Die Sensitivität lag bei den Läufern für den serologischen Test bei 48,8%, d.h. nur etwa die Hälfte der in der PCR positiv getesteten Schweine zeigte eine Serokonversion. Die entsprechenden Werte für das gesamte Tierkollektiv sind aus Tabelle 8 zu entnehmen.

Die Zugehörigkeit der fraglichen Serumproben spielt für die relative Spezifität und Sensitivität nur eine untergeordnete Rolle, da es kaum Veränderungen bei der Zuordnung zu den positiven oder negativen Proben gibt (Tab. 8).

Tab. 9: Ergebnisse der Betriebe im Erregernachweis und Antikörperstatus unter Berücksichtigung des Alters

Bestand	PCR +/gesamt (n)			Serologie +/fraglich/gesamt (n)		
	Läufer	Jungsau	Altsau	Läufer	Jungsau	Altsau
1	1/9	1/5	1/5	0/2/9	5/0/5	5/0/5
2	3/10	2/5	0/5	7/0/10	3/0/5	4/0/5
3	1/10	1/5	0/5	1/1/10	1/0/5	4/0/5
4	3/10	0/5	0/5	0/0/10	3/0/5	5/0/5
5	3/10	0/5	1/5	0/2/10	4/1/5	5/0/5
6	2/10	0/5	1/5	2/0/10	4/1/5	5/0/5
7	0/10	1/5	0/5	0/0/10	5/0/5	4/0/5
8	2/10	1/5	0/5	6/1/10	5/0/5	3/1/5
9	3/10	1/5	1/5	1/1/10	5/0/5	5/0/5
10	2/10	0/5	3/5	1/1/10	4/0/5	3/0/5
11	2/10	1/5	0/5	5/1/10	5/0/5	4/1/5
12	3/10	2/5	0/5	0/0/10	4/0/5	5/0/5
13	3/10	0/5	0/5	1/0/10	5/0/5	5/0/5
14	3/10	1/5	3/5	2/0/10	5/0/5	5/0/5
15	5/10	0/5	1/5	4/1/10	3/0/5	5/0/5
16	0/10	1/5	1/5	0/0/10	4/0/5	5/0/5
17	2/6	3/9	0/6	6/0/6	9/0/9	6/0/6
18	2/10	2/5	0/5	4/0/10	5/0/5	3/0/5
19	2/10	1/10	0/10	2/1/10	9/0/10	8/1/10
20	3/10	1/5	0/5	3/0/10	4/0/5	3/0/5

Tab. 10: Vergleich der Betriebe in Norddeutschland (n=15)/Süddeutschland (n=5) in Bezug auf den Erregernachweis

	Norddeutschland				Süddeutschland				Signifikanz
	PCR -	%	PCR +	%	PCR -	%	PCR +	%	
Läufer	116	77,8	33	22,2	34	73,9	12	26,1	n.s.
Jungsau	68	85,0	12	15,0	22	75,9	7	24,1	n.s.
Altsau	70	87,5	10	12,5	24	92,3	2	7,7	n.s.
gesamt	254	82,2	55	17,8	80	79,2	21	20,8	n.s.

Bei dem Vergleich der Betriebe nach geographischer Lage wird ersichtlich, dass es keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Betrieben im Norden und Süden Deutschland bezüglich des Erregernachweises gibt (Tab. 10).

Tab. 11: Vergleich der Betriebe in Norddeutschland (n=15)/Süddeutschland (n=5) in Bezug auf die Serologie

	Norddeutschland						Süddeutschland						Signifi- kanz
	Serol. -	%	Serol. fragl.	%	Serol. +	%	Serol. -	%	Serol. fragl.	%	Serol. +	%	
L	111	74,5	10	6,7	28	18,8	28	60,9	1	2,2	17	37,9	*
JS	11	13,8	2	2,5	67	83,7	4	13,8	0	0	25	86,2	n.s.
AS	7	8,8	3	3,7	70	87,5	4	15,4	0	0	22	84,6	n.s.
ges	129	41,7	15	4,9	165	53,4	36	35,6	1	1	64	63,4	n.s.

L=Läufer, JS=Jungsau, AS=Altsau

* $p < 0,05$, wenn fragliche Proben nicht berücksichtigt werden oder als negativ eingestuft werden, $p > 0,05$, wenn fragliche Proben als positiv eingestuft werden.

In der serologischen Untersuchung hat sich gezeigt, dass, falls die fraglichen Proben nicht bewertet werden oder als negativ eingestuft werden, es geringe, signifikante Unterschiede bezüglich der Nord-Südverteilung nur bei den Läufern gibt. Die Läufer der südlicheren Betriebe sind geringgradig häufiger serologisch positiv als die gleichaltrigen Tiere aus dem Norden. Sonst waren keine signifikanten Unterschiede feststellbar (Tab. 11).

4.1.1 Auswertung der Verlaufuntersuchungen der in der Klinik für kleine Klauentiere eingestellten Läufer

Die Schweine waren Teil einer routinemäßigen Tierlieferung, die am 24.01.2000 von einem 55 km von der Tierärztlichen Hochschule entfernten Betrieb für studiumbegleitende Demonstrationszwecke an die Klinik geliefert wurden. Mehrfach war zuvor bei aus dem Betrieb bezogenen Tieren *Lawsonia intracellularis* und *Brachyspira hyodysenteriae* nachgewiesen worden. Am Tag nach dem Transport zeigten die beiden Tiere Diarrhoe. Im Kot konnten *Lawsonia intracellularis* und *Brachyspira spp.* nachgewiesen werden. Daraufhin wurden sie in regelmäßigen Abständen über 4½ Monate mittels indirekter Immunfluoreszenz und PCR auf *Lawsonia intracellularis* und gleichzeitig auf Antikörper gegen selbigen Erreger untersucht.

Die Läufer Schweine wurden in einer Bucht zusammen auf Stroh gehalten, welches täglich komplett gewechselt wurde. Vor dem erneuten Einstreuen wurde die Bucht ausgefegt und mit Wasser ausgespült. Der profuse Durchfall verschwand ohne Therapie nach ca. 6 Tagen. Die beiden eingestellten Schweine waren bei der Einlieferung serologisch negativ und konvertierten innerhalb der 4. Woche nach Einnahme und blieben bis zum Ende der Studie serologisch positiv. Der Ausscheiderstatus blieb über einen Zeitraum von 2 (Tier 82) bzw. 4 Wochen (Tier 84) nach Serokonversion erhalten (Tab. 12). Nachdem der Erregernachweis erstmalig negativ verlief, wurden die beiden Tiere mit anderen Schweinen zusammen verladen und insgesamt über ca. 2 h mit einem Tiertransport auf der Straße bewegt, um den Einfluss einer Stresssituation auf die Erregerausscheidung zu testen. Daraufhin wurden wiederum Kotproben auf den Erreger untersucht. Die Ergebnisse fielen jeweils negativ aus und Anzeichen von Durchfall waren nicht feststellbar. Die beiden Tiere wurden am 14.06.2000 geschlachtet und die Ileozäkalklappen mit Anteilen von Ileum und Dickdarm im Institut für Pathologie der Tierärztlichen Hochschule Hannover untersucht.

Das Tier mit der Nr. 82 zeigte eine hochgradige Hyperplasie der Lymphfollikel, fokale Nekrosen in den lymphoglandulären Komplexen und eine geringgradige Kryptenhyperplasie im Ileozäkalkalzapfen.

Das Tier mit der Nr. 84 zeigte zusätzlich zu den Befunden des Tieres 82 auch noch eine herdförmige, eitrig-nekrotisierende Colitis und mit Warthin-Starry-Silberfärbung schwarzangefärbte, kokkoide *Lawsonia*-ähnliche Fragmente im Bereich des Oberflächenepithels.

In beiden Fällen bestanden keine sicheren Anhaltspunkte für das Vorliegen einer intestinalen Adenomatose.

Eine Untersuchung des Darmmaterials mittels IFT fiel bezüglich *Lawsonia intracellularis* bei beiden Tieren negativ aus, *Brachyspira* spp. konnten aber jeweils festgestellt werden.

Tab. 12: Ergebnisse der Verlaufsstudie der Tiere 82 und 84

Tag	Tier Nr. 82 PCR/IFT Kot	Tier Nr. 82 Serologie	Tier Nr. 84 PCR/IFT Kot	Tier Nr. 84 Serologie
1	+/+	-	+/+	-
14	+/+	-	+/+	-
21	+/+	-	+/+	-
29	+/+	+	+/+	+
42	+/-	+	+/+	+
52	-/-	+	+/-	+
70	-/-	+	-/-	+
84	-/-	+	-/-	+
90	-/-	+	-/-	+
103	-/-	+	-/-	+
127	-/-	+	-/-	+

Aufgrund des Erregernachweises wurde der Betrieb in die Untersuchungen der Dissertation mitaufgenommen, um eine genauere Aussage bezüglich des Infektionsstatus machen zu können. Deshalb wurde im Vergleich zu den anderen Betrieben ein größeres Probenkontingent genommen.

Tab. 13: Befunde im Betrieb Nr. 19 (n=40)

Tier	Alter	IFT	PCR	Serologie
1	Jungsau	negativ	negativ	positiv
2	Jungsau	negativ	negativ	positiv
3	Jungsau	negativ	positiv	positiv
4	Jungsau	negativ	negativ	positiv
5	Jungsau	negativ	negativ	positiv
6	Jungsau	negativ	negativ	positiv
7	Jungsau	negativ	negativ	positiv
8	Jungsau	negativ	negativ	positiv
9	Jungsau	negativ	negativ	positiv
10	Jungsau	negativ	negativ	negativ
11	Altsau/tragend	negativ	negativ	positiv
12	Altsau/tragend	negativ	negativ	fraglich
13	Altsau/tragend	negativ	negativ	negativ
14	Altsau/tragend	negativ	negativ	positiv
15	Altsau/tragend	negativ	negativ	positiv
16	Altsau/säugend	negativ	negativ	positiv
17	Altsau/säugend	negativ	negativ	positiv
18	Altsau/säugend	negativ	negativ	positiv
19	Altsau/säugend	negativ	negativ	positiv
20	Altsau/säugend	negativ	negativ	positiv
21	Ferkel von 16	nicht untersucht	nicht untersucht	negativ
22	Ferkel von 16	nicht untersucht	nicht untersucht	positiv
23	Ferkel von 17	nicht untersucht	nicht untersucht	positiv
24	Ferkel von 17	nicht untersucht	nicht untersucht	negativ
25	Ferkel von 18	nicht untersucht	nicht untersucht	positiv
26	Ferkel von 18	nicht untersucht	nicht untersucht	positiv
27	Ferkel von 19	nicht untersucht	nicht untersucht	positiv
28	Ferkel von 19	nicht untersucht	nicht untersucht	positiv
29	Ferkel von 20	nicht untersucht	nicht untersucht	positiv
30	Ferkel von 20	nicht untersucht	nicht untersucht	positiv
31	Läufer	negativ	negativ	positiv
32	Läufer	negativ	negativ	negativ
33	Läufer	negativ	negativ	negativ
34	Läufer	fraglich	negativ	negativ
35	Läufer	negativ	negativ	fraglich
36	Läufer	negativ	negativ	negativ
37	Läufer	negativ	negativ	negativ
38	Läufer	negativ	negativ	negativ
39	Läufer	negativ	negativ	negativ
40	Läufer	negativ	positiv	positiv

Bei der Auswertung dieses Betriebs fiel vor allem der fast 100%ige negative Erregernachweis und der 90%ige positive Antikörpernachweis (in der Gruppe der Alt- und Jungsaunen) auf (Tab. 13). Nur in 2 Fällen konnte mittels der PCR ein positives Ergebnis erzielt werden (1x Läufer und 1x Jungsau). Der Nachweis mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz fiel, außer eines fraglichen Ergebnisses bei den

Läufem, im gesamten Betrieb negativ aus. Die serologische Untersuchung der Saugferkel (21-30) ergab bis auf 2 negative nur positive Befunde, so dass es eine 80%ige Übereinstimmung der Antikörperbefunde zwischen den Saugferkeln und deren Muttersauen gab.

5 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden aus 20 verschiedenen Betrieben insgesamt 410 Kotproben von Schweinen unterschiedlicher Altersklassen mittels einer indirekten Immunfluoreszenztechnik und einer Polymerase-Kettenreaktion auf den Erreger *Lawsonia intracellularis* untersucht. Parallel dazu wurden Blutproben dieser Tiere auf Antikörper gegen den selbigen Erreger mit Hilfe einer indirekten Immunfluoreszenztechnik untersucht (positives Ergebnis bei einem Titer $\geq 1:30$).

In den untersuchten Betrieben waren zum Zeitpunkt der Untersuchung keine akuten Fälle von Durchfallerkrankungen oder sonstigen Symptomen einer proliferativen Enteropathie aufgetreten. In einigen Betrieben waren bei routinemäßigen Untersuchungen *Brachyspira* spp. diagnostiziert worden.

Ob bei den im Rahmen dieser Dissertation untersuchten Tieren durch Lawsonien bedingte Darmveränderungen vorhanden waren, wurde nicht untersucht. Man kann aufgrund der fehlenden klinischen Symptome aber davon ausgehen, dass, bei entsprechender Kontrolle, nur ein geringer Teil der Tiere, wahrscheinlich geringgradige, pathologische Veränderungen des Darmes aufgewiesen hätte. Wegen des Fehlens von Symptomen war auch nur eine geringe Erregerausscheidung zu erwarten.

Vergleicht man die Untersuchungsergebnisse der PCR mit denen des indirekten Immunfluoreszenztests, dann wurde der Erreger durch die PCR häufiger nachgewiesen als im IFT (um 8% mehr positive Tiere in der PCR). Die relative Sensitivität des IFT im Vergleich zur PCR betrug nur 56,5%. In Übereinstimmung dazu zeigten KNITTEL et al. (1997), dass bei der Untersuchung von Darmmukosa die PCR dem IFT überlegen war. Im Gegensatz dazu ergaben Studien von JENSEN et al. (1997), dass der immunhistochemische Erregernachweis, unter Verwendung monoklonaler Antikörper, bei makroskopisch veränderten Därmen der PCR gleichwertige Ergebnisse lieferte. Bei makroskopisch unveränderten Därmen stellte sich die PCR als nur geringgradig besser heraus. Bei von JENSEN und MØLLER (1996) durchgeführten Untersuchungen an Darmmaterial von Tieren mit Durchfall erwies sich der IFT wiederum als ebenso gut wie die PCR. GUEDES et al. (2000) erreichten für den Erregernachweis im Kot bei experimentell infizierten, klinisch erkrankten Schweinen mittels Immunhistochemie bessere Ergebnisse als mittels

PCR. Die Unterschiede zwischen den Literaturangaben und der eigenen Untersuchung sind in der unterschiedlichen Auswahl der Probenmaterialien begründet. In der vorliegenden Arbeit wurden statt Darmschleimhaut oder Kot von zumeist klinisch kranken Tieren Kotproben von klinisch unverdächtigen, gegebenenfalls nur latent infizierten Tieren untersucht. Da die Tiere den Erreger im Kot nur diskontinuierlich und ohne klinische Erkrankung in geringen Mengen ausscheiden, ist der Nachweis des obligat intrazellulären Bakteriums schwieriger als in der infizierten Mukosa. Nach Untersuchungen von HOLYOAKE et al. (1996) und KNITTEL et al. (1997) ist man, mit Hilfe der PCR-Untersuchung in der Lage, Lawsonien ab einer Menge zwischen 10^2 und 10^5 Keimen pro Gramm Kot nachzuweisen. Der Grund für die Diskrepanz zwischen den PCR und IFT-Ergebnissen der vorliegenden Arbeit liegt wahrscheinlich darin, dass zur PCR-Untersuchung mit 0,2 g Kot ca. ein 10faches der Menge verwendet wurde, die zur Untersuchung mittels indirekter Immunfluoreszenz auf dem Objektträger ausgestrichen wurde (durchschnittlich 20 mg).

Die Qualität des jeweiligen Nachweisverfahrens hängt somit stark von der Keimzahl und der Auswahl des Probenmaterials ab. Bei latent infizierten Schweinen ist die PCR dem IFT beim Erregernachweis im Kot eindeutig überlegen.

Eine weitere mögliche Fehlerquelle der Immunfluoreszenz kann in der Belastung des Untersuchers beim Auswerten der Proben liegen. Da die Untersuchung der Proben in einem abgedunkelten Raum am Fluoreszenzmikroskop stattfindet, kann es bei einem hohen Probenaufkommen zu einer starken Ermüdung der Augen kommen und somit zu einer eventuellen Ungenauigkeit beim Beurteilen der Proben. Aus diesem Grund wurde bei der vorliegenden Arbeit das Probenkontingent auf 20 Proben pro Durchgang beschränkt, was etwa 60-90 min in Anspruch nahm. Zwischen den einzelnen Durchgängen lagen mindestens 3 Stunden Pause.

Das Entstehen der fraglichen Proben bzw. Befunde kann mehrere Ursachen haben, wobei Fehlbeurteilungen beim IFT (unspezifische Fluoreszenz oder wenige bzw. zerstörte Lawsonien) sowie grenzwertige Antikörpertiter bei der serologischen Untersuchung (Fluoreszenz vorhanden, aber nicht ausgeprägt) wahrscheinlich die größte Rolle spielen. Die im IFT fraglichen Proben erwiesen sich in der PCR zu 58,8% positiv und zu 41,2% negativ, es ist somit keine auffällige Häufung eines Ergebnisses zu erkennen und folglich ist eine einheitliche Zuordnung der fraglichen Proben nicht möglich. Betrachtet man nun zunächst einmal die eindeutigen Proben,

ergibt sich eine relative Spezifität zur PCR von 97,5%, was bedeutet, dass mit einer hohen Wahrscheinlichkeit Tiere, die den Erreger nicht ausscheiden, mittels IFT als negativ getestet werden und falsch positive Befunde sehr selten sind. Würde man jetzt die fraglichen Proben zu den positiven dazurechnen, würde eine relativ gute Spezifität erhalten bleiben (91,6%), die Sensitivität auf 64,5% gesteigert, der positive Vorhersagewert würde aber auf 63,6% absinken. Falls die fraglichen Proben zu den negativen dazugezählt würden, würde sich außer einer auf 46,1% gesenkten Sensitivität kaum etwas verändern. Diese Berechnungen führen dazu, dass man die fraglichen Proben wohl eher zu den positiven Proben zählen sollte, wenn es darum geht, infizierte Bestände ausfindig zu machen, sicherer ist jedoch eine Wiederholungsuntersuchung fraglicher Proben.

Bezüglich des Erregernachweises belegen die eigenen Ergebnisse, dass Läufer signifikant häufiger *Lawsonia intracellularis* ausscheiden als Altsauen und damit für den Erregernachweis im Bestand besser geeignet sind. Die Jungsaunen nehmen eine intermediäre Stellung dabei ein. In jedem der untersuchten 20 Bestände (Tab. 9) wurde mindestens 1 Schwein gefunden, das Lawsonien im Kot aufwies.

Im Gegensatz dazu zeigten bei der serologischen Untersuchung hauptsächlich die Sauen positive Ergebnisse, wobei Jung- und Altsauen übereinstimmend zu 84,4% bzw. 86,8% Antikörpertiter gegen Lawsonien aufwiesen. Im Vergleich dazu konnte nur bei 23,1% der Läufer ein positives Resultat beobachtet werden. Mit insgesamt 55,9% serologischer Reagenten liegt die Häufigkeit über den Ergebnissen von HURTADO (2000) (31%) und WENDT et al. (2000) (39,3%). In Bezug auf die einzelnen Bestände konnten wie beim Erregernachweis in jedem der 20 Betriebe seropositive Tiere entdeckt werden (Tab. 9). Für die USA beschreiben BANE et al. (1998) eine ähnlich hohe Seroprävalenz (96,2%), untersuchten jedoch wesentlich mehr Betriebe (n=184). Zwar ist die Stichprobengröße in der eigenen Studie nicht repräsentativ, es muss jedoch aufgrund der zufälligen Auswahl der Herden damit gerechnet werden, dass zahlreiche Bestände in Deutschland mit *Lawsonia intracellularis* infiziert sind.

Interessanterweise waren die verschiedenen Betriebe bezüglich der Befundverteilung sehr ähnlich. Die Betriebe im Norddeutschen Raum, die einer Erzeugergemeinschaft angehörten und ein eher besseres Hygieneprogramm besaßen (n=15, komplettes „Rein/Raus- Verfahren“ bei der Belegung der verschiedenen Abteile, Reinigung und Desinfektion nach bestimmten

vorgeschriebenen Kriterien), wiesen fast identische Ausscheiderraten bzw. Antikörperprävalenzen auf, im Vergleich zu den selbständigen, konventionell geführten Betrieben im rheinland-pfälzischen Raum (Betrieb Nr. 15, 16, 17, 18, 20), welche die Tiere teilweise noch auf Stroh zum Nebenerwerb hielten, die Ställe und Abteile kontinuierlich belegten und oft nur besenrein reinigten. Aufgrund der schlechteren Haltungs- und Managementbedingungen in letzteren Betrieben wäre aufgrund der Hinweise in der Literatur im Vergleich ein häufigerer Infektionsnachweis sowie das Auftreten von klinischen Krankheitserscheinungen zu erwarten gewesen (WINKELMAN 1996). Allein der mögliche signifikante Unterschied bei den serologischen Ergebnissen in der Gruppe der Läufer (im Süden häufiger positiv als im Norden) könnte auf eine schnellere Durchseuchung aufgrund der hygienischen Diskrepanzen hinweisen.

Der geringe Erregernachweis, die häufigen Serotiter und die Tatsache, dass für ältere Schweine keine klinischen Erkrankungen beschrieben wurden (WINKELMAN 1996), lässt darauf schließen, dass sich eine belastbare Immunität bei den Altsauen entwickelt (KNITTEL et al. 2000). Berücksichtigt man die Ergebnisse aus dem Betrieb 19 sowie der Verlaufsstudie, kann man den Schluss ziehen, dass während der Säugezeit die Ferkel durch maternale Antikörper weitgehend geschützt sind (Titernachweis bei 8 von 10 Tieren, Tab.13), so dass es zu keiner Erkrankung kommt (POZO et al. 2000). Ob sich Ferkel schon bei der Sau infizieren und den Erreger als unauffällige Carrier mit in das Flatdeck bringen oder ob sie sich erst im Flatdeckbereich infizieren, ist nicht genau geklärt. Wahrscheinlich können beide Varianten gleichermaßen vorkommen, da einzelne Altsauen trotz Antikörpertitern Lawsonien ausscheiden können.

Der relativ große Anteil an serologisch negativen Läufern (71,3%) lässt sich damit erklären, dass sich die Tiere zur Zeit der Untersuchung noch nicht infiziert hatten bzw. frisch infiziert waren. Etwa zu gleichen Teilen wurden Läufer ermittelt, die entweder nur den Erreger ausschieden (12,0%) oder seropositiv waren (13,0%) oder sowohl Lawsonien im Kot als auch Antikörper gegen den Erreger aufwiesen (11,4%) (Tab. 7). Klinische Symptome der porzinen proliferativen Enteropathie, die in den untersuchten Herden nicht beobachtet werden konnten, treten meist erst nach einer Stressbelastung, wie z.B. Überbelegung, Umstellungen, Futterwechsel oder Klimamängel auf (SMITH et al. 1996; WINKELMAN 1996; BUSSE 1998). Im Falle der beiden Läufer aus Betrieb 19, die in die Klinik eingestallt wurden, kam es

wahrscheinlich durch den Transportstress zur Auslösung von klinischen Symptomen, die sich in profusem Durchfall äußerten. Jedoch kann zusätzlich eine latente *Brachyspira*-Infektion eine Rolle gespielt haben. Nach einer Zeit von etwa 3 Wochen hatten die Tiere eigene Antikörper gegen die Lawsonien gebildet. Für eine sich entwickelnde, belastbare Immunität spricht, dass nach einer wiederholten Stressbelastung keine erneuten Krankheitssymptome auftraten und 2-4 Wochen nach dem ersten Antikörpernachweis keine Erregerausscheidung mehr beobachtet werden konnten. Auch KNITTEL et al. (2000) belegen eine Immunitätsentwicklung, die sie bei Schweinen nach Vakzination gegen *Lawsonia intracellularis* feststellten. Die Tiere entwickelten nach darauffolgender experimenteller Infektion keine Krankheitserscheinungen im Gegensatz zu einer ungeimpften Kontrollgruppe.

Beim Vergleich der Serologie mit den PCR-Erregernachweisen zeigte sich damit auch eine vergleichsweise hohe relative Spezifität bei Läuferschweinen (83,0%) bzw. niedrige Spezifität für Jungsauen und Altsauen (15,9 bzw. 11,0%), im Mittel bei 44,0%. Umgekehrt sah es für die relative Sensitivität aus (Läufer 48,8%, Jungsauen 94,7%, Altsauen 91,7%), die im Mittel bei 67,6% lag. Die serologisch fraglichen Proben beeinflussten das Resultat nur unwesentlich. Hieraus kann geschlossen werden, dass die Serologie nicht geeignet ist, um Aussagen zum Ausscheiderstatus von Schweinen zu machen, sie ist deshalb als Untersuchungsmethode bei aktuellen Krankheitsfällen nur bedingt einsetzbar. Sie kann jedoch sehr gut als Herdenscreening zum Nachweis einer stattgefundenen Infektion mit Lawsonien genutzt werden, wobei vornehmlich Sauen getestet werden sollten. Sie kann außerdem bei latent infizierten Herden dem Erregernachweis aufgrund der eventuell diskontinuierlichen Erregerausscheidung überlegen sein. Auch für mögliche Herdensanierungen könnte die Serologie als Hilfsmittel zur Erfolgskontrolle dienen. Des weiteren bietet die serologische Kontrolle von Schweinen, die zugekauft und in den Bestand eingeführt werden sollen, eine sehr gute Möglichkeit, den Immunitätsstatus dieser Tiere (z.B. Absetzferkel, Mastläufer, Jungsauen) zu kontrollieren. Dies ist von Bedeutung, wenn in der Ferkelaufzucht oder in der Mast Tiere aus verschiedenen Herkunftten aufgestellt werden oder wenn nicht immune Jungsauen in eine infizierte Sauenherde verbracht werden. Zu beachten ist außerdem, dass seropositive Schweine durchaus noch Erreger ausscheiden können. Die Gefahr der Verbreitung einer *Lawsonia intracellularis*-Infektion durch Ausscheider ist bei jungen Schweinen wesentlich größer als bei Sauen.

Um einen möglichst objektiven Befund über den Ausscheiderstatus zu erlangen, bleibt nur die Untersuchung mittels der PCR, da hier mit der größten Sicherheit der Erreger nachgewiesen werden kann. Bei der Auswahl der Probestiere sollten am besten jüngere Tiere (Absetzer oder Läufer) untersucht werden, vor allem Kümmerer und Schweine mit Durchfall.

Die Untersuchung mit der PCR ist aber vergleichsweise sehr zeit- und damit kostenaufwendig und bei den heutigen Schweinepreisen muss die Rentabilität dieser Nachweismethode in Frage gestellt werden.

Mit Hilfe der von ELDER et al. (1997) etablierten Multiplex-PCR könnten Salmonellen, Brachyspiren und Lawsonien in einer Untersuchung zugleich nachgewiesen werden. Somit wäre die PCR ein Nachweisverfahren von herausragender Bedeutung, da mit einem Extraktionsschritt, welcher meist der langwierigste Teil der PCR ist, gleich mehrere Durchfallerreger nachgewiesen werden könnten. Mit Hilfe der PCR ist der Erregernachweis am lebenden Tier bei latent infizierten Schweinen ebenso möglich wie bei klinisch erkrankten Schweinen, wobei immer noch zu klären wäre, ob die nachgewiesenen Lawsonien tatsächlich am Krankheitsbild beteiligt sind. Diese letzte Frage ist nur durch eine Sektion und eine histologische Untersuchung des Darmes sicher zu beantworten.

Schlussfolgerungen

Aufgrund der eigenen Untersuchungen ist zum Erregernachweis von *Lawsonia intracellularis* im Kot von latent infizierten Schweinen die PCR dem IFT aufgrund der höheren Sensitivität eindeutig überlegen. Aus Kostengründen wäre der IFT dem PCR-Nachweis zwar zu bevorzugen, jedoch müsste aufgrund der geringeren Sensitivität ggf. die Stichprobenzahl erhöht werden. Der IFT erscheint aber eine geeignete diagnostische Methode bei Schweinen mit klinischen Anzeichen einer porzinen proliferativen Enteropathie, da bei solchen Tieren mit einer stärkeren Erregerausscheidung gerechnet werden kann. Am sichersten erfolgt der Erregernachweis aus Darmmaterial (Ileum).

Für ein Herdensingreening empfiehlt sich vor allem die serologische Untersuchung auf Antikörper gegen *Lawsonia intracellularis* bei älteren Tieren wie z.B. Sauen. Soll ein Herdensingreening mittels Erregernachweis erbracht werden, sollten zur Beprobung besser Läufer Schweine herangezogen werden, wobei besonders vorhandene Kümmerer und an Durchfall erkrankte Tiere berücksichtigt werden sollten.

Es stellte sich heraus, dass Infektionen mit *Lawsonia intracellularis* in Deutschland weit häufiger vorkommen als bisher angenommen. Die Infektionen verlaufen dabei sehr oft latent. Als Auslöser für klinische Erkrankungen kommen verschiedene Haltungs- und Managementfaktoren in Frage. Die ätiologische Diagnose einer porzinen proliferativen Enteropathie bei Symptomen wie Durchfall oder Kümern kann deshalb nur sicher in Verbindung mit den typischen pathomorphologischen Veränderungen gestellt werden bzw. ergibt sich im Ausschlussverfahren bei ausreichender diagnostischer Breite (insbesondere *Brachyspira* spp., *Salmonella* spp., *E. coli*, u.a.).

Infektionen und klinische Erkrankungen treten hauptsächlich im Läuferalter auf, selten dagegen bei älteren Tieren wie Mastschweinen oder Jungsauen, weil sich bei diesen Altersgruppen zumeist schon eine belastbare Immunität entwickelt hat. Ältere Sauen erkranken in der Regel nicht mehr. Die Immunität wird von der Muttersau kolostral auf die Saugferkel übertragen, so dass auch bei diesen Tieren keine Krankheitserscheinungen zu erwarten sind. Sinnvoll sind serologische Kontrollen vor der Eingliederung von Tieren mit unbekanntem Immunstatus (Läufer, Jungsauen) hinsichtlich *Lawsonia intracellularis*, damit die Tiere ggf. rechtzeitig behandelt werden können. Auf den Einsatz von Antibiotika könnte verzichtet werden, wenn eine Vakzine zur Prophylaxe verfügbar wäre (KNITTEL et al. 2000).

6 Zusammenfassung

Das gramnegative, obligat intrazellulär vorkommende Bakterium *Lawsonia intracellularis* ist der primäre Erreger der weltweit vorkommenden porzinen proliferativen Enteropathie der Schweine. Aufgrund des schwierigen und aufwendigen kulturellen Nachweises ist der Erreger deswegen mit herkömmlichen mikrobiologischen Verfahren nur schwer nachweisbar. In der vorliegenden Dissertation wurden drei verschiedene diagnostische Verfahren, eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und eine indirekte Immunfluoreszenz (IFT) zum Erregernachweis sowie ein serologisches Verfahren zum Nachweis von Antikörpern gegen *Lawsonia intracellularis* bezüglich ihrer Aussagekraft bei Alt- und Jungsauen als auch bei Läufer Schweinen untersucht.

In einer Feldstudie wurden 20 verschiedene Betriebe aus dem norddeutschen (n=15) und rheinland-pfälzischem Raum (n=5) beprobt. Pro Betrieb wurden jeweils von 20 Schweinen eine Kot- sowie eine Blutprobe entnommen, wobei pro Betrieb 5 Altsauen 5 Jungsauen und 10 Läufer beprobt wurden. Die Probennahme fand zwischen September 1999 und Mai 2000 statt. Keiner der Betriebe war in der Vergangenheit durch Erkrankungen an proliferativen Enteropathien aufgefallen.

Zusätzlich wurden zwei, mit Durchfallssymptomen in die Klinik für kleine Klauentiere der Tierärztlichen Hochschule eingestellte Läufer Schweine in regelmäßigen Abständen, über 4½ Monate, mit Hilfe der PCR und der indirekten Immunfluoreszenz auf die Ausscheidung von *Lawsonia intracellularis* untersucht. Gleichzeitig wurde jeweils ein Antikörpernachweis bei beiden Tieren durchgeführt.

In allen 20 Betrieben traten Tiere mit nachweisbarem Antikörpertiter ($\geq 1:30$) auf, in jedem Betrieb war sowohl mittels PCR als auch mit dem IFT mindestens ein erregerausscheidendes Tier detektierbar. Über 80% der Alt- und Jungsauen waren serologisch positiv, die meisten Läufer (71,3%) hatten jedoch keinen nachweisbaren Antikörpertiter. Am häufigsten wurden in der Gruppe der Läufer Erregerausscheider mittels PCR entdeckt (23,1%) bei den Jungsauen waren es noch 17,4% und die Altsauen schieden am seltensten Lawsonien aus (11,3%).

Die PCR-Untersuchung ergab häufiger positive Befunde beim Erregernachweis im Vergleich zum IFT und ist die sensitivere Methode, besonders bei latenten

Infektionen mit *Lawsonia intracellularis*. Ohne Berücksichtigung der im IFT fraglichen Proben ergibt sich zwar eine relative Spezifität von 97,5%, aber nur eine relative Sensitivität von 56,5% im Vergleich zur PCR. Mittels des IFT ist eine ausreichend sichere Aussage über den Ausscheiderstatus nur bei klinisch erkrankten Tieren zu machen. Für ein Herdensingreening zum Infektionsnachweis ist die serologische Untersuchung, insbesondere von Jung- oder Altsauen zu bevorzugen, die Serologie zeigt jedoch nur eine geringe Korrelation zur Erregerausscheidung.

Wie in der Verlaufsstudie gezeigt wird, kommt es frühestens nach 3 Wochen zu einer Serokonversion. Die aus einem klinisch unauffälligen Betrieb stammenden, zunächst seronegativen Tiere schieden noch bis 2-4 Wochen nach der Serokonversion Lawsonien aus. Wahrscheinlich führte der Transportstress zum Auftreten klinischer Symptome (Durchfall), wobei auch das gleichzeitige Vorhandensein von *Brachyspira* spp. eine Rolle gespielt haben kann. Genauere Untersuchungen des Herkunftsbestandes belegten eine Serokonversion im Sauenbereich sowie das Vorhandensein von maternalen Antikörpern bei Saugferkeln, bei Läuferschweinen waren Serotiter nur im Einzelfall feststellbar.

Die vorliegenden Untersuchungen haben gezeigt, dass Infektionen mit *Lawsonia intracellularis* auch in klinisch unauffälligen Betrieben gehäuft vorkommen. In Betrieben mit klinischer Symptomatik (Durchfall, Kümern) sollte der Erregernachweis deshalb erst unter Berücksichtigung möglicher pathomorphologischer Befunde zu einer ätiologischen Diagnose führen.

7 Summary

Arnold Bonitz

A study on diagnostic methods and the prevalence of *Lawsonia intracellularis* infections among pigs of different ages

Lawsonia intracellularis is the primary causive agent of the worldwide occurring porcine proliferative enteropathy of swine. Because it cannot be cultivated in cell-free media, the obligate intracellular bacterium can hardly be detected by common microbiological techniques. This study compares three different diagnostic methods: a polymerase chain reaction (PCR) assay, an indirect immunofluorescence antibody test (IFAT) for specific detection of *Lawsonia intracellularis* and an IFAT as a serological test. These methods were compared in relation to their validity in sows, gilts and weaners.

This field study includes 20 different farms in the North (n=15) and Southwest (n=5) of Germany. On each farm 20 fecal and 20 blood samples were taken (5 sows, 5 gilts and 10 weaners). Sampling was performed from September 1999 until May 2000. None of the farms had been known for showing any clinical signs of proliferative enteropathies in the past.

Two weaners with moderate diarrhea were brought into the Swine Clinic of the Hanover School for Veterinary Medicine, and blood and fecal samples were taken in regular intervals (over a period of 4½ months) for the examination by PCR and indirect immunofluorescence. The objective was to detect shedding of *Lawsonia intracellularis* or to confirm the presence of antibody titres.

On each farm animals were found with detectable antibody titres ($\geq 1:30$) against *Lawsonia intracellularis*, and there was at least one animal on each farm that was shedding the bacterium. Over 80% of the sows and gilts had detectable antibody titres, but 71,3% of the weaners were negative in the serological test. About 23,1% of the weaners were shedding detectable amounts of *Lawsonia* bacteria, followed by the gilts with 17,4% and the sows with 11,3% had the lowest percentage of *Lawsonia*-shedding of all groups.

The PCR technique showed, when compared with indirect immunofluorescence, positive results more often and thus is considered to be the more sensitive and more precise method for detecting *Lawsonia intracellularis*, particularly in case of latent infections.

Leaving the questionable results apart, we can say that the IFAT came up with a specificity of 97,5%. However, the relative sensitivity was 56,5% in comparison to the PCR results.

The IFAT of feces may deliver satisfactory results for the examination of animals suffering with diarrhea.

After all, serological testing seems to be the method of choice for herd screenings, especially with gilts and sows. Serological investigation showed only little correlation to bacterial shedding.

The examination of two weaners in the clinic revealed that it took at least 3 weeks for seroconversion. The two weaners coming from a farm unsuspected of enteropathy shedded *Lawsonia intracellularis* until 2 - 4 weeks after seroconversion. This study shows the role of major stressors, such as transporting, as a trigger for proliferative enteropathies. The simultaneous infection with *Brachyspira* spp. also might have influenced the onset of diarrhea.

The investigation of the originating farm demonstrated seroconversion of sows and maternal antibodies in piglets, but high antibody titres in single weaner pigs only.

The present study shows that infections with *Lawsonia intracellularis* are quite common on farms without clinical signs of porcine proliferative enteropathy. On farms with symptoms of the disease, such as diarrhea and wasting, only the combination of the detection of *Lawsonia* and and typical post mortem results could lead to a precise diagnosis.

8 Schrifttumsverzeichnis

- Bane, D., C.J. Gebhart u. I. Gardener (1997):
Epidemiology of porcine proliferative enteropathy: A case control study.
Am. Ass. Swine Prac., 429 – 431
- Bane, D., B. Norby, I. Gardener, M. Roof, E. Bush u. C.J. Gebhart (1998):
The epidemiology of porcine proliferative enteropathy.
In: 15th Int. Pig Vet. Soc. Congr., Birmingham 1998, Proc., S. 107
- Beers, P.T. (1984):
Studies on porcine proliferative adenomatosis with particular reference to proliferative haemorrhagic enteropathy.
Sydney, Univ., Ph. D.- Thesis
- Biester, H.E., u. L.H. Schwarte (1931):
Intestinal adenoma in swine.
Am. J. Path. 7, 175 – 185
- Biester, H.E., L.H. Schwarte u. D.F. Eveleth (1939):
Studies on a rapidly developing intestinal adenoma in a pig.
Am. J. Path. 15, 385 - 389
- Busse, F.- W. (1998):
Verdickungen der Dünndarmschleimhaut des Schweines: Hygiene hilft,
Erkrankungen durch PIA zu vermeiden.
DGS Magazin 6/98, 36 – 37
- Christensen, G., L. Vraa- Anderson u. J. Mousing (1995):
Causes of mortality among sows in Danish pig herds.
Vet. Rec. 137, 395 – 399
- Collins, A.M., I. Swift u. R.P. Monckton (1996):
Replication of Australian porcine isolates of ileal symbiont intracellularis in tissue culture.
Vet. Microbiol. 49, 249 – 255
- Collins, A.M., M. van Dijk, S. McOrist u. R.J. Love (2000):
Strategic medication and development of immunity to *Lawsonia intracellularis*.
In: 16th Int. Pig Vet. Soc. Congr., Melbourne 2000, Proc., S. 30
- Cooper, D.M. (1996):
Proliferative enteritis in the hamster, horse, deer and ostrich: detection and characterisation of *Lawsonia intracellularis*.
Minnesota, Univ., M. Sc. Thesis

- Drolet, R., D. Larochelle u. C.J. Gebhart (1996):
Proliferative enteritis associated with *Lawsonia intracellularis* (ileal symbiont intracellularis) in white-tailed deer.
J. Vet. Diag. Invest. 8, 250 – 253
- Duhamel, G.E. u. E.B. Wheeldon (1982):
Intestinal adenomatosis in a foal.
Vet. Path. 19, 447 – 450
- Duinhof, T.F., M.F. de Jong, J. Bakker, H.M.J.F. van der Heijden u. E. de Ridder (1998):
Diagnosis of proliferative enteropathy with polymerase chain reaction in faeces on dutch pig farms, results of a pilot study
In: 15th Int. Pig Vet. Soc. Congr., Birmingham 1998, Proc., S. 117
- Dünser, M., H. Schweighardt u. G. Krassig (1997):
Nachweis von *Lawsonia intracellularis*, des Erregers der proliferativen Enteropathie des Schweins (Adenomatose-Komplex), mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) in Oberösterreich.
Wien. Tierärztl. Monatsschr. 84, 307 – 313
- Elder, R.O., G.E. Duhamel, M.R. Mathiesen, E.D. Erickson, C.J. Gebhart u. R.D. Oberst (1997):
Multiplex polymerase chain reaction for simultaneous detection of *Lawsonia intracellularis*, *Serpulina hyodysenteriae*, and *Salmonellae* in porcine intestinal specimens.
J. Vet. Diagn. Invest. 9, 281 – 286
- Eriksen, K. u. T. Landsverk (1985):
Intestinal adenomatosis in the blue fox.
Nord. Vet. Med. 37, 254 – 255
- Fleck, M.K. u. G.F. Jones (1994):
Porcine proliferative outbreak and treatment using tylosin.
In: 13th Int. Pig Vet. Soc. Congr., Bangkok 1994, Proc., S. 345
- Flø, H., B. Bergsjø u. S. Grove (2000):
The prevalence of *Lawsonia intracellularis* in Norwegian swine herds.
In: 16th Int. Pig Vet. Soc. Congr., Melbourne 2000, Proc., S. 67
- Fourchon, P. u. S. Chouët (2000):
Technical results of swine herds and serological results on pigs for *Lawsonia intracellularis*.
In: 16th Int. Pig Vet. Soc. Congr., Melbourne 2000, Proc., S. 62
- Fox, J.K. u. G.H.K. Lawson (1988):
Campylobacter-like omega intracellular antigen in proliferative colitis in ferrets.
Lab. Anim. Sci. 38, 34 – 36

- Frisk, C. S. u. J.E. Wagner (1977):
Experimental hamster enteritis: an electron microscopic study.
Am. J. Vet. Res. 38, 1861 – 1868
- Gebhart, C.J., G.E. Ward, K. Chang u. H.J. Kurtz (1983):
Campylobacter hyointestinalis (new species) isolated from swine with lesions of
proliferative ileitis.
Am. J. Vet. Res. 44, 361 – 367
- Gebhart, C.J., G.E. Ward u. M.P. Murtaugh (1990):
Species-specific DNA probes for *Campylobacter* species isolated from pigs with
proliferative enteropathies.
Vet. Microbiol. 24, 367 – 379
- Gebhart, C.J., G.-F. Lin, S. McOrist, G.H.K. Lawson u. M.P. Murtaugh (1991):
Cloned DNA probes specific for intracellular-like organism of porcine proliferative
enteropathies.
J. Clin. Microbiol. 29, 1001 - 1015
- Gebhart, C.J., S.M. Barns, S. McOrist, G.-F. Lin u. G.H.K. Lawson (1993):
Ileal symbiont intracellularis, an obligate intracellular bacterium of porcine intestines
showing a relationship to *Desulfovibrio* species.
Int. J. Syst. Bact. 43, 533 – 538
- Guedes, R.M.C., C.J. Gebhart, N.L. Winkelman, R.A. Mackie-Nuss u T.A. Marsteller
(2000):
Comparison of different methods for diagnosis of porcine proliferative enteropathy.
In: 16th Int. Pig Vet. Soc. Congr., Melbourne 2000, Proc., S. 26
- Holyoake, P.K. u. R.S. Cutler (1995):
Outbreaks of proliferative haemorrhagic enteropathy on two pig farms.
Austr. Vet. J. 72, 253 – 256
- Holyoake, P.K., G.F. Jones, P.R.Davies, D.L.Foss u. M. P. Murtaugh (1996):
Application of a polymerase chain reaction assay for detection of proliferative
enteritis-affected swine herds.
J. Vet. Diagn. Invest. 8, 181 – 185
- Holyoake, P.K., R.S. Cutler, I.W. Caple u. R.P. Monckton (1994):
Enzyme-linked immunosorbent assay for measuring ileal symbiont intracellularis-
specific immunoglobulin G response in sera of pigs.
J. Clin. Microbiol. 32, 1980 – 1985
- Hurtado, M.E., R. Maestro, M. Rolo, L. Palencia u. J. Sandoval (2000):
Seroepidemiologic evaluation of *Lawsonia intracellularis* in swine farms in
Venezuela.
In: 16th Int. Pig Vet. Soc. Congr., Melbourne 2000, Proc., S. 28
- Jacobson, M., C. Fellström, M. Heldtander u. A. Gunnarsson (2000):
The prevalence of *Lawsonia intracellularis* in Swedish pigs submitted for autopsy.
In: 16th Int. Pig Vet. Soc. Congr., Melbourne 2000, Proc., S. 74

- Jensen, T.K., K. Møller, T.D. Leser u. S.E. Jorsal (1997):
Comparison of histology, immunohistochemistry and polymerase chain reaction for detection of *Lawsonia intracellularis* in natural porcine proliferative enteropathy.
Euro. J. Vet. Path. 3, 115 – 123
- Jensen, T.K., K. Møller, R. Lindecrona u. S.E. Jorsal (2000):
Detection of *Lawsonia intracellularis* in the tonsils of pigs with proliferative enteropathy.
Res. Vet. Sci. 68, 23 – 26
- Joens, L.A., S. Nibbelink u. R.D. Glock (1997):
Induction of gross and microscopic lesions of porcine proliferative enteritis by *Lawsonia intracellularis*.
Am. J. Vet. Res. 58, 1125 – 1131
- Jones, G.F., G.E. Ward, M.P. Murtaugh, R. Rose u. C.J. Gebhart (1993a):
Relationship between ileal symbiont intracellularis and porcine proliferative enteritis.
Infect. Immun. 61, 5237 – 5244
- Jones, G.F., G.E. Ward, M.P. Murtaugh, G. Lin u. C.J. Gebhart (1993b):
Enhanced detection of intracellular organism of swine proliferative enteritis, ileal symbiont intracellularis, in faeces by polymerase chain reaction.
J. Clin. Microbiol. 31, 2611 – 2615
- Jones, G.F., G.E. Ward, J.E. Collins u. C.J. Gebhart (1993c):
Transmission of proliferative enteritis to swine by use of embryonating chicken eggs.
Am. J. Vet. Res. 54, 1256 - 1261
- Knittel, J.P., D.I. Larson, D.L. Harris, M.B. Roof u. S. McOrist (1996):
United States isolates of *Lawsonia intracellularis* from porcine proliferative enteropathy resample European isolates.
Swine Health Prod. 4, 119 – 122
- Knittel, J.P., M. Roof, K.J. Schwartz, D.M. Jordan, D.L. Harris u. S. McOrist (1997):
Diagnosis of porcine proliferative enteropathy.
Comp. Cont. Educ. Vet. Pract. 19, 26 – 29
- Knittel, J.P., J. Kroll, M. Mathes, F. Sick, M. Roof u. S. McOrist (2000):
Efficacy of an avirulent *Lawsonia intracellularis* vaccine in swine.
In: 16th Int. Pig Vet. Soc. Congr., Melbourne 2000, Proc., S. 24
- Kubo, M., T. Ohaya u. H. Watase (1984):
Proliferative hemorrhagic enteropathy detected at an abattoir in Kagoshima.
Jap. Vet. Sci. 46, 413 – 417
- Lanza, I., J. Ponzo, M. Muñoz, P. Rubio u. P. Cármenes (1996):
Epidemiological study of porcine proliferative enteropathy in Spain.
In: 14th Int. Pig Vet. Soc. Congr., Bologna 1996, Proc., S. 259

- Lawson G.H.K. u. A.C. Rowland (1974):
Intestinal adenomatosis in the pig: a bacteriological study.
Res. Vet. Sci. 17, 331 – 336
- Lawson, G.H.K., A.C. Rowland u. N. MacIntyre (1985):
Demonstration of a new intracellular antigen in porcine proliferative adenomatosis
and hamster proliferative ileitis.
Vet. Microbiol. 10, 303 – 313
- Lawson, G.H.K., A.C. Rowland, L. Roberts, G. Fraser u. E. McCartney (1979):
Proliferative haemorrhagic enteropathy.
Res. Vet. Sci. 27, 46 – 51
- Lawson, G.H.K., R.A. Mackie, D.G.E. Smith u. S. McOrist (1995):
Infection of cultured rat enterocytes by ileal symbiont intracellularis depends on host
cell function and actin polymerisation.
Vet. Microbiol. 45, 339 – 350
- Lawson, G.H.K., S. McOrist, A.C. Rowland, E. McCartney u. L. Roberts (1988):
Serological diagnosis of the porcine proliferative enteropathies: implications for
aetiology and epidemiology.
Vet. Rec. 122, 554 – 557
- Lawson, G.H.K., S. McOrist, S. Jasni u. R.A. Mackie (1993):
Intracellular bacteria of porcine proliferative enteropathy: cultivation and maintenance
in vitro.
J. Clin. Microbiol. 31, 1136-1142
- Lomax, L.G., u. R.D. Glock (1982):
Naturally occurring porcine proliferative enteritis: pathologic and bacteriologic
findings.
Am. J. Vet. Res. 43, 1608 – 1614
- Love, R.J., u. D.N. Love (1977):
Control of proliferative haemorrhagic enteropathy in pigs.
Vet. Rec. 100, 473
- Love, R.J., D.N. Love u. M.J. Edwards (1977):
Proliferative haemorrhagic enteropathy in pigs.
Vet. Rec. 100, 65 – 68
- Magistrali, C., V. Sala, P. Giovanardi, M. Paolini (1998)
First data about *Lawsonia intracellularis* infection in Italy.
In: 15th Int. Pig Vet. Soc. Congr., Birmingham 1998, Proc., S. 120
- Mapother, M.E., L.A. Joens u. R.D. Glock (1987):
Experimental reproduction of porcine proliferative enteritis.
Vet. Rec. 121, 533 – 536

- McCormick, B.M., D. Hasse u. R.P. Monckton (1995):
Detection of ileal symbiont intracellularis in porcine faecal samples by polymerase chain reaction.
Vet. Microbiol. 47, 387 – 393
- McOrist, S. u. C.J. Gebhart (1995):
In vitro testing antimicrobial agents for proliferative enteropathy (ileitis).
Swine Health Prod. 3, 146 – 149
- McOrist, S. u. G.H.K. Lawson (1989a):
Proliferative enteropathies: *Campylobacter* species in the faeces of normal and contact pigs.
Vet. Rec. 124, 41
- McOrist, S. u. G.H.K. Lawson (1989b):
Reproduction of proliferative enteritis in gnotobiotic piglets.
Res. Vet. Res. 46, 27 – 33
- McOrist, S. u. G.H.K. Lawson (1993):
Interactions of porcine lymphocytes with *Campylobacter*-like organism membranes purified from proliferative enteropathy.
Vet. Microbiol. 34, 381 - 388
- McOrist, S., C.J. Gebhart u. G.H.K. Lawson (1994a):
Polymerase chain reaction for diagnosis of porcine proliferative enteropathy.
Vet. Microbiol. 41, 205 – 212
- McOrist, S. u. C.J. Gebhart (1999):
Porcine proliferative enteropathies.
In: A.D. Leman, B.E. Straw, W.L. Mengeling, S. D´Allaire u. D.J. Taylor: Diseases of Swine, 8thed..
Iowa State Univ. Press, S. 521 – 534
- McOrist, S., C.J. Gebhart, R. Boid u. S.M. Barns (1995a):
Characterization of *Lawsonia intracellularis* gen. nov., sp. nov., the obligately intracellular bacterium of porcine proliferative enteropathy.
Int. J. Syst. Bacteriol. 45, 820 – 825
- McOrist, S., G.H.K. Lawson, A.C. Rowland u. N. MacIntyre (1989b):
Early lesions of proliferative enteritis in pigs and hamsters.
Vet. Pathol. 26, 260 – 264
- McOrist, S., J. Morgan, M. Fleck Veenhuizen, K. Lawrence u. H.W. Kroger (1997b):
Oral administration of tylosin phosphate for treatment and prevention of proliferative enteropathy in pigs.
Am. J. Vet. Res. 58, 136 – 139

- McOrist, S., L. Roberts, S. Jasni, A.C. Rowland, G.H.K. Lawson, C.J. Gebhart u. B. Bosworth (1996a):
Developed and resolving lesions in porcine proliferative enteropathy: possible pathogenic mechanisms.
J. Comp. Pathol. 115, 35 – 45
- McOrist, S., M.F.H. Shearn u. J. Morgan (1999):
Control of proliferative enteropathy by oral administration of chlortetracyclines.
Vet. Rec. 144, 48 - 49
- McOrist, S., N. McIntyre, C.R. Stokes u. G.H.K. Lawson (1992):
Immunocytological responses in porcine proliferative enteropathies.
Infect. Immun. 60, 4184 – 4191
- McOrist, S., R. Boid u. G.H.K. Lawson (1989a):
Antigenic analysis of *Campylobacter* species and an intracellular *Campylobacter*- like organism associated with porcine proliferative enteropathies.
Infect. Immun. 57, 957 – 962
- McOrist, S., R. Boid, G.H.K. Lawson u. I. McConnell (1987):
Monoclonal antibodies to intracellular *Campylobacter* organisms of the porcine proliferative enteropathies.
Vet. Rec. 121, 421 – 422
- McOrist, S., R.A. Mackie, N. Neef, I. Aitken u. G.H.K. Lawson (1994b):
Synergism of ileal symbiont intracellularis and gut bacteria in the reproduction of porcine proliferative enteropathy.
Vet. Rec. 134, 331 – 332
- McOrist, S., S. Jasni, R.A. Mackie, H.M. Berschneider, A.C. Rowland u. G.H.K. Lawson (1995b):
Entry of bacterium ileal symbiont intracellularis into cultured enterocytes and its subsequent release.
Res. Vet. Sci. 59, 255 – 260
- McOrist, S., S. Jasni, R.A. Mackie, N. MacIntyre, N. Neef u. G.H.K. Lawson (1993):
Reproduction of porcine proliferative enteropathy with pure culture of ileal symbiont intracellularis.
Infect. Immun. 61, 4286 – 4292
- McOrist, S., S.H. Smith u. L.E. Green (1997a):
Estimate of direct financial losses due to porcine proliferative enteropathy.
Vet. Rec. 140, 579 – 581
- McOrist, S., S.H. Smith, M.F.H. Shearn, M.M. Carr u. D.J.S. Miller (1996b).
Treatment and prevention of porcine proliferative enteropathy with oral tiamulin.
Vet. Rec. 139, 615 – 618

- Møller, K., T.K. Jensen u. S.E. Jorsal (1996):
Bacteriological examination and PCR analysis of faeces from growing pigs originating from herds with or without diarrhea.
In: 14th Int. Pig Vet. Soc. Congr., Bologna 1996, Proc., S. 325
- Moreno, A.M., M.R. Baccaro u. L.L. Coutinho (2000):
Porcine proliferative enteritis: anatomopathological and epidemiological aspects.
In: 16th Int. Pig Vet. Soc. Congr., Melbourne 2000, Proc., S. 63
- Ohlinger, V.F., S. Pesch u. J. Knittel (2000):
Prevalence of *Lawsonia intracellularis* in diagnostic samples from Germany, the Netherlands and Belgium.
In: 16th Int. Pig Vet. Soc. Congr., Melbourne 2000, Proc., S. 71
- Pearce, G.P. (1999):
Interactions between dietary fibre, endo-parasites and *Lawsonia intracellularis* bacteria in grower-finisher pigs.
Vet. Parasitol. 87, 51 – 61
- Pointon, A.M. (1989):
Campylobacter associated intestinal pathology in pigs.
Austr. Vet. J. 66, 90 – 91
- Pozo, J., A.M. Collins, P.Rubio u. R.J. Love (2000):
Maternal immunity in *Lawsonia intracellularis* infection
In: 16th Int. Pig Vet. Soc. Congr., Melbourne 2000, Proc., S. 108
- Roberts, L., G.H.K. Lawson u. A.C.Rowland (1977a):
Porcine intestinal adenomatosis associated with serologically distinct *Campylobacter sputorum* subspecies *mucosalis*.
Res. Vet. Sci. 23, 257 – 258
- Roberts, L., A.C.Rowland u G.H.K. Lawson. (1977b):
Experimental reproduction of porcine intestinal adenomatosis and necrotic enteritis.
Vet. Rec. 100, 12 – 13
- Rowland, A.C. u. D.A. Hutchings (1978):
Necrotic enteritis and regional ileitis in pigs at slaughter.
Vet. Rec. 103, 338 – 339
- Rowland, A.C. u. G.H.K. Lawson (1974):
Intestinal adenomatosis in the pig: immunofluorescent and electron microscopic studies.
Res. Vet. Sci. 17, 323 – 330
- Rowland, A.C. u. G.H.K. Lawson (1992):
Porcine proliferative enteropathies.
In: A.D. Leman, B.E. Straw, W.L. Mengeling, S. D'Allaire u. D.J. Taylor. Diseases of Swine. 7thed.
Iowa State Univ. Press, S. 560 - 569

Rowland, A.C. u. P.G.M. Rowntree (1972):
A haemorrhagic bowel syndrome associated with intestinal adenomatosis in the pig.
Vet. Rec. 91, 235 – 241

Rowland, A.C., G.H.K. Lawson u. L. Roberts (1978):
Intestinal adenomatosis in the pig: histochemical and electron microscopic studies of the mucosa.
Res. Vet. Sci. 24, 191 – 199

Schoeb, T.R. u. J.G. Fox (1990):
Enterocolitis associated with intraepithelial *Campylobacter*-like bacteria in rabbits.
Vet. Path. 27, 73 – 80

Smith, S.H., R.A. Mackie u. S. McOrist (1996):
Porcine proliferative enteropathy is a present, subclinical disease.
In: 14th Int. Pig Vet. Soc. Congr., Bologna 1996, Proc., S. 260

Smith, S.H. u. S. McOrist (1997):
Development of persistent intestinal infection and excretion of *Lawsonia intracellularis* by piglets.
Res. Vet. Sci. 62, 6 – 10

Smith, S.H. (1997):
Epidemiological features of porcine proliferative enteropathies.
Edinburgh, Univ., Ph. D. Thesis

Smith, S.H., S. McOrist u. L.E. Green (1998):
Questionnaire survey of proliferative enteropathy on British pig farms.
Vet. Rec. 142, 690 - 693

Stege, H., T.K. Jensen, K. Moller, P. Baekbo, S.E. Jorsal (2000):
Prevalence of intestinal pathogens in Danish finishing pig herds.
Prev. Vet. Med. 46, 279 – 292

Vandenberghe, J., A. Verheyen, S. Lauwers u. K. Geboes (1986):
Spontaneous adenocarcinoma of the ascending colon in wistar rats: the intracytoplasmic presence of a *Campylobacter*-like bacterium.
J. Comp. Pathol. 95, 45 – 55

Walter, D., J.P. Knittel, K. Schwartz, J. Kroll u. M. Roof (2000):
Effectiveness of Tiamulin in drinking water for treatment and control of porcine proliferative enteropathy (Ileitis) due to *Lawsonia intracellularis* infection.
In: 16th Int. Pig Vet. Soc. Congr., Melbourne 2000, Proc., S. 31

Wendt, M., A. Bonitz u. S. McOrist (2000):
Prevalence of *Lawsonia intracellularis* infection in german breeding herds.
In: 16th Int. Pig Vet. Soc. Congr., Melbourne 2000, Proc., S. 27

Williams, N.M., L.R. Harrison u. C.J. Gebhart (1996):
Proliferative enteropathy in a foal caused by *Lawsonia intracellularis*-like bacterium.
J. Vet. Diagn. Invest. 8, 254 – 256

Wilson, T.M., K. Chang, C.J. Gebhart, H.J. Kurtz, T.R. Drake u. V. Lintner (1986):
Porcine proliferative enteritis: Serological, microbiological and pathological studies
from three field epizootics.
Can. J. Vet. Res. 50, 217 – 220

Winkelman, N.L (1996):
Ileitis: An update.
Comp. Contin. Educ. Pract. Vet. 18, 19 – 25

Winkelman, N.L., J.T. Holck, L. Kesl, V. Turner u. L. Luempert (2000):
Dose evaluation of Econor (Valemulin Hydrochloride) for the control of porcine
proliferative enteritis using a *Lawsonia intracellularis* mucosal homogenate challenge.
In: 16th Int. Pig Vet. Soc. Congr., Melbourne 2000, Proc., S. 33

Young, B.J. (1969):
A reliable method for demonstrating spirochaetes in tissue sections.
J. Med. Lab. Technol. 26, 248 – 252

9 Anhang

9.1 Chemikalien und Reagenzien

Agarose für die DNA-Elektrophorese, Seakam, Biozym, Hess. Oldendorf
Ampli Taq Polymerase gold, Perkin Elmer, Weiterstadt
Azeton, Merck, Darmstadt
Bromphenolblau, reinst, Serva, Heidelberg
Diamotaceous Earth (SiO₂), Sigma, Deisenhofen
di-Natriumhydrogenphosphat, (Na₂HPO₄), wasserfrei, Merck, Darmstadt
di-Natriumhydrogenphosphat-Monohydrat, (Na₂HPO₄ x H₂O), Merck, Darmstadt
DNA-Weight-Marker VIII, Boehringer Ingelheim
DNTP's (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), Perkin Elmer, Weiterstadt
Eisessig, 96%[v/v] Merck, Darmstadt
Ethanol, 96%[v/v], Merck, Darmstadt
Ethylendiamin-Tetraacetat-Natriumsalz-Dihydrat (EDTA, C₁₀H₁₆NO₃), Serva, Heidelberg
Gelstar, Biozym, Hess. Oldendorf
Glyzerin, 87% [v/v], Merck, Darmstadt
Guanidinthiocyanat (GuSCN), Sigma, Deisenhofen
Monoklonale Antikörper gegen *Lawsonia intracellularis* (Maus-Hypridom), Steven McOrist, Veterinary Pathology Services, Glenside, Australien
Natriumchlorid, (NaCl), Merck, Darmstadt
Natronlauge, 1M, Merck, Darmstadt
Salzsäure, 1M, Merck, Darmstadt
Taq Polymerase Puffer, (100 mM Tris-HCl, pH 8,3, 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂ 0,01% [w/v] Gelatine), Perkin Elmer, Weiterstadt
Primer, A: 5'- TAT GGC TGT CAA ACA CTC CG- 3', B: 5'- TGA AGG TAT TGG TAT TCT CC- 3', Roth, Karlsruhe
Plasmid-DNA, Prof. Till Rümenapf, Institut für Virologie der Tierärztlichen Universität, Gießen,
Tris(Hydroxymethyl)-aminomethan-HCl (C₄H₉NO₃ x HCl), Serva, Heidelberg
Triton X-100, Sigma, Deisenhofen
Xylenzyanol, Merck, Darmstadt
Ziege-Anti-Maus-IgG, FITC gekoppelt, Dianova, Hamburg
Ziege-Anti-Schwein-IgG, FITC gekoppelt, Dianova, Hamburg

9.2 Geräte

Abzug, Wesemann, Syke
Analysenwaage, Satorius, Omnilab, Hannover
Brutschrank, Memmert, Omnilab, Hannover
Digitalkamera, Donpisha 3 CCD, Biozym, Hess. Oldendorf
Elektrophoresekammer, horizontal, ComPhor mini/maxi Biozym, Hess. Oldendorf
Fluoreszenzmikroskop, Laborlux S, Leitz, Wetzlar
Magnetprüher, Heidolph MR 202, Omnilab, Hannover

Mikrowellengerät, Bauknecht EMWS 2818, Brinkmann, Hannover
Objektträger Kot, Superfrost Color, Menzel, Landgraf, Hannover
Objektträger Serologie, Steven McOrist, Veterinary Pathology Services, Glenside, Australien
pH-Meter, Mikroprozessor pH-Meter, Omnilab, Hannover
Pipetten, 10µl, 20µl, 200µl, Biozym, Hess. Oldendorf, 10µl, 20µl, 100µl, 500µl, 1000µl, Eppendorf
Polypropylenröhrchen, Whitecaps, 15 ml, Landgraf, Hannover
Schwenker, IKA-Schüttler MTS-4, Omnilab, Hannover
Sterilfiltertips, 10µl, 20µl, Biozym, Hess. Oldendorf
Sterilwerkbank, Heraeus/ Kendro, Omnilab, Hannover
Stromversorgungsgerät, für Elektrophorese, Biometra, Biozym, Hess. Oldendorf
Thermal Cycler, MJ Research PTC-200, Peltier Thermal Cycler, Biozym, Hess. Oldendorf
Transilluminator, Flu-o-blu, Biozym, Hess. Oldendorf
Vortexer, Mixomat, Omnilab, Hannover
Zentrifugen, Heraeus Biofuge pico und Labofuge AL, Kendro, Omnilab, Hannover

9.3 Lösungen

9.3.1 DNA-Extraktion

Lösung A:

GuSCN	283,00 g
Tris-HCl	4,84 g
2 fach autokl. Aqua bidest. ad	400,00 ml

Lysispuffer:

Lösung A	200,00 ml
EDTA	1,63 g
Triton X-100	1,3 ml

Mit NaOH auf einen pH von 6,4 einstellen.

DE- Suspension:

Diamotaceous Earth	10,00 g
HCl 37%	0,75 ml
2 fach autokl. Aqua bidest. ad	50,00 ml

Lichtgeschützte Lagerung nach dem Autoklavieren

Waschpuffer:

Lösung A	200,00 ml
----------	-----------

Mit NaOH auf einen pH von 6,4 einstellen.

Lagerungspuffer:

Tris-HCl in 25 ml Aqua bidest. mit NaOH auf einen pH von 8,4 einstellen	39,4 mg
EDTA	7,31 mg

Aqua bidest. ad Nach dem Ansetzen Autoklavieren	50 ml
----------------------------------------------------	-------

9.3.2 Lösungen für die PCR

Mastermix für die PCR

Extrahierte DNA	2,5	µl
je dNTP	200	µM
MgCl ₂ -Puffer	2,5	mM
10xPuffer II (100 mM Tris-HCl, pH 8,3, 500 mM KCl)	2,5	µl
Ampli Taq Polymerase	0,5	U
Autoklaviertes Aqua bidest. ad	25	µl

9.3.3 Lösungen für die Elektrophorese

TAE-(Tris/Acetat/EDTA)Puffer:

Stocklösung (50fach konzentriert)		
Tris-HCl	242,0	g
Eisessig	57,1	ml
0,5 M EDTA, pH 8,0	100,0	ml
Aqua bidest ad	1000,0	ml
Stocklösung vor 1 zu 50 mit Aqua bidest. Verdünnen		

Gelladepuffer:

Bromphenolblau	250	µl
Xylenzylanol	250	µl
30% Glycerin in Aqua bidest.	500	µl

Gelfärbelösung:

Gelstar	25	µl
Aqua bidest. ad	250	ml

9.3.4 Lösungen für die Immunfluoreszenz

Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (PBS):

NaCl	17,00	g
Na ₂ HPO ₄	2,56	g
NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	0,312	g
Aqua dest. ad	2,00	l
NaCl zur pH-Titrierung (7,6)		

9.3.5 Lösungen für den serologisch Antikörpernachweis

Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (PBS):

NaCl	17,00	g
Na ₂ HPO ₄	2,56	g
NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	0,312	g
Aqua dest. ad	2,00	l
NaCl zur pH-Titrierung (7,2)		

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Michael Wendt danke ich für die Stellung des Themas, seine Unterstützung, sein Vertrauen und nicht zuletzt für die Bereitstellung der Mittel.

Der Firma Elanco Animal Health möchte ich für das Bereitstellen von Diagnostika danken.

Dank schulde ich auch dem Institut für Pathologie der Tierärztlichen Hochschule Hannover für die Durchführung der histopathologischen Untersuchung.

Bedanken möchte ich mich bei Frau Antje Müller, Frau Petra Röhrig, Frau Barbara Schwert, Frau Jutta Seifert und Frau Jacqueline Wolfsen, den „guten Seelen“ aus dem Labor der Klinik für kleine Klauentiere, die mich, wo immer es ihnen möglich war, unterstützten. Das gleiche gilt auch für die restlichen Angehörigen der Klinik.

Besonderer Dank gilt Frau Dr. Korinna Huber aus dem physiologischen Institut, ohne deren Hilfe ich die PCR in der kurzen Zeit nie hätte erlernen können. Danke für das offene Ohr und die Geduld, die noch so banalsten Fragen zu ertragen, des weiteren für hilfreiche Tipps beim Zusammenschreiben der vorliegenden Arbeit.

Bei der Familie Barbara und Detlef Wieberneit möchte ich mich für die Hilfe beim Probensammeln, für das Korrekturlesen und für die moralische Unterstützung bedanken.

Des weiteren möchte ich Frau Gabi Wallner, Herrn Hans-Jürgen Füngers und Herrn Dieter Busse für ihre Hilfe bei der Probenentnahme danken.

Herrn Peter Grittner danke ich für die PC-Hotline und für die Hilfe bei der Erstellung des Layouts.

Nicht zuletzt danke ich allen Landwirten, die es mir erlaubten, in ihren Betrieben meine Proben zu nehmen.

Ganz großer Dank geht an meine Familie und Nicole Jung, die mich immer mit allen Mitteln unterstützten und diese Arbeit erst ermöglichten.