

Lara Maria Nike Stein

Untersuchungen ausgewählter Virulenzfaktoren
anhand deutscher *Haemophilus parasuis*-Isolate in
Assoziation zu Pathogenität und Klinik beim Schwein



Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei dem Autor dieses Werkes.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2018

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2018

© 2018 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition linguistique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus der Klinik für Wiederkäuer und Schweine
Professur für Schweinekrankheiten
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. Dr. habil. G. Reiner

**Untersuchungen ausgewählter Virulenzfaktoren anhand
deutscher *Haemophilus parasuis*-Isolate in Assoziation
zu Pathogenität und Klinik beim Schwein**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines

Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von

**Lara Maria Nike Stein
geb. Jansing**

Tierärztin aus Düsseldorf

Gießen, 2018

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan Prof. Dr. Dr. h. c. M. Kramer

1. Gutachter: Prof. Dr. Dr. habil. G. Reiner

2. Gutachterin: Prof. Dr. C. Ewers

Tag der Disputation: 04.04.2018

meiner Familie

Teile der Dissertation wurden veröffentlicht:

L. Stein, H. Willems, R. Tegeler, K. Strutzberg-Minder, G. Reiner (2016): Virulence markers of *Haemophilus parasuis* associated with clinical and pathological outcome in the field. In: 24th International Pig Veterinary Society Congress und 8th European Symposium of Porcine Health Management, 07. – 10. 06. 2016 (Poster)

Inhalt

I.	Abbildungsverzeichnis	IV
II.	Tabellenverzeichnis	V
III.	Abkürzungsverzeichnis	VII
1	Einleitung	1
2	Literaturübersicht.....	2
2.1	<i>Haemophilus parasuis</i>	2
2.2	Pathogenese, Klinik und pathologische Veränderungen	3
2.3	Serotypen und Prävalenzen.....	6
2.4	Diagnostik.....	7
2.4.1	Anzucht.....	8
2.4.2	PCR.....	9
2.4.3	Serotypisierung.....	10
2.4.4	Sonstige Verfahren	11
2.5	Differentialdiagnosen.....	11
2.6	Bekämpfung und Therapie.....	13
2.6.1	Antibiotische Behandlung akut erkrankter Tiere.....	13
2.6.2	Impfung	15
2.6.3	Beseitigen prädisponierender Faktoren	17
2.7	Virulenzfaktoren	17
2.7.1	Kapselbildung.....	18
2.7.2	Virulenz-assoziierte trimerische Autotransporter (VTAA).....	18
2.7.3	Extrazelluläre Serinproteasen	20
2.7.4	Äußere Membranproteine (Outer Membrane Proteins).....	21
2.7.5	Fimbrien	21
2.7.6	Cytolethal Distending Toxine.....	22
2.7.7	Bakteriophagen.....	23

2.7.8	Weitere Virulenzfaktoren	23
3	Material und Methoden	26
3.1	Material	26
3.1.1	Bakterienstämme und genetisches Material	26
3.1.2	Herkunft der Isolate	26
3.2	Methoden	30
3.2.1	Auswahl der Stämme.....	31
3.2.2	Einteilung nach Krankheitskategorie (KKat)	31
3.2.3	Molekulargenetische Untersuchungen	36
3.2.4	Statistische Auswertung	44
4	Ergebnisse.....	45
4.1	Serotypen	45
4.1.1	Zusammenfassende Betrachtung	45
4.1.2	Einfluss der Herkunft	46
4.2	Virulenzfaktoren	49
4.2.1	Zusammenfassende Betrachtung	49
4.2.2	Einfluss der Herkunft	50
4.3	Antibiotikaresistenzen	51
4.3.1	Zusammenfassende Betrachtung	51
4.3.2	Einfluss der Herkunft	52
4.4	Zusammenhang zwischen Serotypen, Virulenzfaktoren und Antibiotikaresistenz ...	58
4.5	Einflüsse der Tierkategorie	58
4.5.1	Assoziationen mit Serotypen	58
4.5.2	Assoziationen mit Virulenzfaktoren.....	59
4.5.3	Assoziationen mit dem Resistenzverhalten	60
4.6	Einflüsse der beprobten Organe.....	60
4.6.1	Assoziationen mit Serotypen	60

4.6.2	Assoziationen mit Virulenzfaktoren.....	60
4.6.3	Assoziationen mit dem Resistenzverhalten	61
4.6.4	Assoziationen mit der Tierkategorie	61
4.7	Morphologische Veränderungen.....	62
4.7.1	Assoziationen mit Serotypen	62
4.7.2	Assoziationen mit Virulenzfaktoren.....	63
4.7.3	Assoziationen mit dem Resistenzverhalten	63
4.7.4	Assoziationen zwischen Sektionsbild und Tierkategorie	63
4.8	Krankheitskategorie	64
4.8.1	Assoziationen mit Serotypen	65
4.8.2	Assoziationen mit Virulenzfaktoren.....	65
4.8.3	Assoziationen mit dem Resistenzverhalten	67
4.8.4	Assoziationen mit dem beprobten Organ	67
4.8.5	Assoziationen mit der Tierkategorie	68
4.8.6	Assoziationen mit pathologisch-anatomischen Befunden.....	69
5	Diskussion	71
6	Zusammenfassung	80
7	Summary.....	81
8	Anhang	82
8.1.1	Chemikalien.....	106
8.1.2	Lösungen und Puffer	107
8.1.3	Geräte.....	107
8.1.4	Datenbanken und Computerprogramme.....	108
9	Danksagung	131

I. **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1: Herkunft der untersuchten <i>H. parasuis</i> -Isolate nach Organen.....	27
Abbildung 2: Verteilung der einzeln nachgewiesenen Serotypen [n=45] in den serotypisierten Isolaten [n=34].....	45
Abbildung 3: Serotypenverteilung [n = 45 Serotypen] nach Herkunftsorten Bakum [n = 26; links] und Gießen [n = 19; rechts].....	46
Abbildung 4: Prozentuale Verteilung der Virulenzfaktorgene in den Isolaten	49
Abbildung 5: Resistenzsituation für die untersuchten Antibiotika.....	51
Abbildung 6: Nachweisrate der <i>H. parasuis</i> -Isolate in den einzelnen Krankheitskategorien..	67

II. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Prävalenzen verschiedener Serovare in den verschiedenen Ländern	6
Tabelle 2: Untersuchte Antibiotika und angewandte Verfahren (x) zur Empfindlichkeitstestung in den jeweiligen Instituten.....	28
Tabelle 3: Definition der Tierkategorie nach Alter und Gewicht.....	30
Tabelle 4: Alter der der Tiere bei Isolation	30
Tabelle 5: Einteilung der Krankheitskategorien (KKat) auf Basis der Organbefunde sowie des Nachweises von <i>H. parasuis</i> und anderer Erreger im beprobten Organ bzw. Tier.....	32
Tabelle 6: Zusammenfassende Einteilung der Krankheitskategorien	36
Tabelle 7: Verwendete Primer.....	38
Tabelle 8: Zusammensetzung für einen 10 µl PCR-Ansatz	42
Tabelle 9: Thermocyclerprogramm zur Durchführung der PCR.....	43
Tabelle 10: Touchdown-PCR Programm	43
Tabelle 11: Verteilung der einzelnen Serotypen insgesamt [n = 45] und nach Herkunftsort der Proben (Bakum [n = 26] und Gießen [n = 19])	47
Tabelle 12: Stämme mit zwei oder mehreren gleichwertig positiven Serotyp-Reaktionen im indirekten Hämagglutinationshemmtest.....	48
Tabelle 13: Vorkommen der Virulenzfaktoren nach Einzugsbereich der Proben (Bakum, Gießen)	50
Tabelle 14: Resistenzstatus der Isolate für die einzelnen Antibiotika.....	52
Tabelle 15: Auftreten von mindestens einem resistenten oder intermediären Isolat im Probenarsenal der beiden Herkunftsorte.....	56
Tabelle 16: Virulenzfaktoren der Isolate in Abhängigkeit von der Altersgruppe der Schweine	59
Tabelle 17: Prävalenz der Virulenzfaktoren in den beprobten Organen	60
Tabelle 18: <i>H. parasuis</i> -Nachweisrate (%) in den beprobten Organen in Abhängigkeit von der Altersgruppe der Schweine.....	62
Tabelle 19: Pathologisch-anatomische Befunde in Abhängigkeit von der Altersklasse der Schweine.....	63

Tabelle 20: Prozentualer Anteil an Isolaten mit Virulenzfaktoren in den eingeteilten Krankheitskategorien.....	65
Tabelle 21: <i>H. parasuis</i> positive Befunde in den beprobten Organen in Abhängigkeit von der Krankheitskategorie (alle Angaben in Prozent)	68
Tabelle 22: Zusammenhang zwischen Kategorie der beprobten Tiere und Beteiligung von <i>H. parasuis</i> an der Krankheitskategorie	69
Tabelle 23: Pathologisch-anatomische Befunde der erfassten Fälle in Abhängigkeit von der Krankheitskategorie (alle Angaben in Prozent)	70
Tabelle 24: Bereits bekannte Sequenzen	82
Tabelle 25: <i>H. parasuis</i> -Isolate aus dem Institut für Mikrobiologie Bakum [n=46].....	82
Tabelle 26: <i>H. parasuis</i> -Isolate aus der KWS-S (Gießen) [n=93]	84
Tabelle 27: Auftreten der Virulenzfaktoren in Abhängigkeit vom Serotypen	88
Tabelle 28: Vorkommen von Resistenzen gegenüber den überprüften Antibiotika verteilt auf die einzeln nachgewiesenen Serotypen	89
Tabelle 29: Resistenzen gegen die untersuchten Antibiotika bei Isolaten aus den verschiedenen Tierkategorien.....	91
Tabelle 30: Vorkommen von Antibiotikaresistenzen und den Virulenzfaktoren Kapsel, GP36 und VTAA2	92
Tabelle 31: Positive Erreger-Nachweise in den Organen verteilt auf die Krankheitskategorie bei <i>H. parasuis</i> -positiven Tieren	94
Tabelle 32: Positive Erreger-Nachweise in den Organen verteilt auf die Tierkategorie.....	97
Tabelle 33: Verteilung der Virulenzfaktoren auf das pathologisch-anatomische Bild	99

III. Abkürzungsverzeichnis

A.	<i>Actinobacillus</i>
AB	Antibiotikum
abs.	absolut
ad	auffüllen auf
ADT	Agardiffusionstest
AMC	Amoxicillin-Clavulansäure
AMX	Amoxicillin
Amp	Ampicillin
Apra	Apramycin
APP	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> / <i>A. pleuropneumoniae</i>
Aq. bidest.	Aqua bidestillata
AT	Annealing-Temperatur
B.	<i>Bordetella</i>
BALF	Bronchio-Alveoläre-Lavage-Flüssigkeit
BH	Bauchhöhle
bp	Basenpaare
BP	Bronchopneumonie
BRO	Bronchus
BRU	Brusthöhle
BU	bakteriologische Untersuchung
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
<i>capD</i>	Kapselgen
CDT	Cytolethal Distending Toxin
Cefq	Cefquinom

Ceft	Ceftiofur
Ceph	Cephalothin
Clind	Clindamycin
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
cm	Zentimeter
d	Tag
DNA	Deoxyribonucleic acid
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
Enro	Enrofloxacin
Ery	Erythromycin
ESPP2	extrazelluläre Serin-ähnliche Protease P2
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
F	Forward-Primer
Fa.	Firma
Flor	Florfenicol
g	Gramm
x g	Erdbeschleunigung
Genta	Gentamicin
GER	Deutschland
ges.	gesamt
GET	Gelenkstuffer
ggr.	geringgradig
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
GP36	Bakteriophagen-Gen
h	Stunde

H.	<i>Haemophilus</i>
häm.	hämolyisierend
HB	Herzbeutel
hgr.	hochgradig
HPS	<i>Haemophilus parasuis</i>
Hz	Hertz
IP	Interstitielle Pneumonie
JPN	Japan
JLU	Justus-Liebig-Universität Gießen
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
KGW	Körpergewicht
KH	Körperhöhle
KKat	Krankheitskategorie
KWS-S	Klinik für Wiederkäuer und Schweine, Professur für Schweinekrankheiten, Justus-Liebig-Universität Gießen
Linc	Lincomycin
LOS	Lipooligosaccharide
LPS	Lipopolysaccharide
LW	Lebenswoche
M	Molar
M.	<i>Mycoplasma</i>
Marbo	Marbofloxacin
MBD	Mikro-Bouillondilutionstest
mgr.	mittelgradig
MHK	Minimale Hemmkonzentration
min	Minute

ml	Milliliter
mM	Millimolar
MM	Mastermix
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
n	Anzahl
NAT	Nasentupfer
NCBI	National Center for Biotechnology Information
Neo	Neomycin
NL	Niederlande
NSAID	Non Steroidale Antiinflammatory Drug
n. s.	nicht signifikant
nt	non typeable / nicht typisierbar
NW	Nachweis
o. b. B.	ohne besonderen Befund
OMP	Outer Membrane Protein (äußeres Membranprotein)
ORT	oberer Respirationstrakt
Oxa	Oxacillin
P.	<i>Pasteurella</i>
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PCV2	Porcine Circovirus Typ 2
Pen	Penicillin
PFGE	Pulsed Field Gel Electrophoresis
p. i.	post infectionem
PILF/ <i>pilF</i>	Fimbriengen F
pos.	positiv
PRDC	Porcine Respiratory Disease Complex

PRRSV	Porzines Reproduktives und Respiratorisches Syndrom Virus
qPCR	quantitative PCR
R	Reverse-Primer
rel.	relativ
RNA	Ribonucleic acid
RT	Raumtemperatur
S.	<i>Streptococcus</i>
sp.	Spezies
Spec	Spectinomycin
SIV	Schweine-Influenza Virus
St.	<i>Staphylococcus</i>
ST	Serotyp
T.	<i>Trueperella</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TE	Tris EDTA
Tetra	Tetracyclin
Tiam	Tiamulin
TiHo	Tierärztliche Hochschule Hannover
Tilm	Tilmicosin
TrimSulf	Trimetoprim-potenzierte Sulfonamide
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TON	Tonsille
TSA	Tryptikase-Soja-Agar
Tula	Tulathromycin
Tylo	Tylosin
UK	Vereinigtes Königreich Großbritannien
URT	unterer Respirationstrakt

USA	Vereinigte Staaten von Amerika
V	Volt
VF	Virulenzfaktor
VTAA	Virulenz-assoziiertes trimerischer Autotransporter
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Einleitung

Haemophilus parasuis (*H. parasuis*) ist bekannt als Erreger der Glässer'schen Krankheit. Dabei handelt es sich um eine generalisierte Erkrankung des Schweines mit Ausprägung von Polyserositis, Polyarthritits und Meningitis. Allerdings dominieren derzeit bei ätiologischer Beteiligung des Erregers insbesondere Erkrankungen des Respirationstrakts. Der Erreger ist weltweit ubiquitär verbreitet und kann zu hohen Verlusten im Schweinebestand führen.

Er zählt im Respirationstrakt mit zu den am häufigsten nachgewiesenen Erregern. Aufgrund der Vielzahl von Stämmen, die sich deutlich in ihrer Virulenz und Antigenität unterscheiden, ergeben sich erhebliche Probleme für Diagnostik, Therapie und Impfprophylaxe. Die geringe Tenazität von *H. parasuis* erschwert zusätzlich die Anzüchtung des Erregers aus der Gruppe der *Pasteurellaceae*. Methoden zu entwickeln, die eine Aussage zur Virulenz nachgewiesener Isolate erlauben und zu einer verbesserten Einschätzung ihrer Ätiologie in einem bestimmten Krankheitsgeschehen beitragen könnten sind daher von hoher wissenschaftlicher und praktischer Priorität.

Die Hypothesen für die vorliegende Arbeit gehen davon aus, dass die unter Feldbedingungen vorkommenden Stämme nicht nur in ihren Serotypen variieren, sondern auch in ihrer Ausstattung an Virulenzfaktoren aus der sich Assoziationen mit den beteiligten Krankheitsbildern ableiten lassen. Außerdem vermuten wir aufgrund des ubiquitären Vorkommens von *H. parasuis* einen hohen Grad an Resistenzen gegen antimikrobielle Wirkstoffe und deren Abhängigkeit von der Produktionsintensität der Herkunftsregion der Isolate.

2 Literaturübersicht

2.1 *Haemophilus parasuis*

Haemophilus parasuis (*H. parasuis*) ist ein gramnegatives Bakterium aus der Familie der *Pasteurellaceae* (Raßbach 1992). *H. parasuis* wurde zuerst 1910 von Karl Glässer aus einem Schwein isoliert (Glässer 1910). Nach ihm ist auch die systemische Form der Erkrankung benannt, die von *H. parasuis* ausgelöst werden kann: die Glässer'sche Krankheit. Hierbei handelt es sich um eine serofibrinöse Polyserositis, Polyarthritits und Leptomeningitis beim Schwein (Glässer 1910).

Zuerst war der Erreger unter dem Namen *Haemophilus suis* bekannt. Das Präfix *para* wurde später hinzugefügt, da der Erreger bei der mikrobiologischen Anzucht den V-Faktor (NAD) benötigt (Biberstein 1969; Kilian 1976).

Der Erreger kommt weltweit und ubiquitär in Schweinebeständen vor (Blanco et al. 2004). Dabei erreichen die Prävalenzen länderspezifisch und innerhalb eines Landes nach Region bis zu 96 % (MacInnes et al. 2008). Auch in Wildschweinen kann der Erreger isoliert werden, wobei die Prävalenz bei weitem nicht so hoch ist, wie bei konventionell gehaltenen Schweinen (Vengust et al. 2006; Olvera et al. 2007a; Kolb 2009; Reiner et al. 2010).

Auch in Abhängigkeit von der Nachweismethode können die Prävalenzen extrem schwanken (Kolb 2009).

In Beständen können mehrere *H. parasuis*-Serotypen nebeneinander koexistieren (Blackall et al. 1996; Sack 2008; Mullins et al. 2009; Cerdà-Cuéllar et al. 2010). Sogar in einem Tier konnten mehrere Stämme von *H. parasuis* gleichzeitig nachgewiesen werden (Mullins et al. 2009; Pina et al. 2009; Turni und Blackall 2010; Zimmerman et al. 2012).

H. parasuis wird aus Nasenabstrichen klinisch gesunder Schweine isoliert (Mullins et al. 2013) und gilt als Kommensale der Nasenschleimhaut (Jin et al. 2006; Olvera et al. 2012). Unter besonderen Umständen aber kann er zur Erkrankung der Tiere führen (Glässer 1910; Lappe 2011). Zurzeit sind mindestens 14 voll sequenzierte *H. parasuis*-Stämme bekannt (Tabelle 24) (Yue et al. 2009; Mullins et al. 2011; Kuehn et al. 2013; Li et al. 2013a; Li et al. 2013b; Brockmeier et al. 2014; Dai et al. 2016).

H. parasuis kann als Erreger auch am Porcine Respiratory Disease Complex (PRDC) beteiligt sein (Brockmeier et al. 2002). Dabei handelt es sich um einen respiratorischen Erkrankungskomplex des Schweines, der durch verschiedene Faktoren ausgelöst wird. Zu den nicht-

infektiösen Ursachen zählen das Zusammenstallen verschiedener Herkünfte, kontinuierliche Belegung, falsche Stalltemperaturen, Probleme bei der Lüftung, zu hohe Gehalte an Stallstaub, Ammoniak und Stickstoff sowie Überbelegung.

Die infektiösen Ursachen können viraler und / oder bakterieller Genese sein. Zu den viralen Primärerregern zählen das Schweine-Influenza Virus (SIV) A, das Porzine Circovirus Typ 2 (PCV2) und das Porzine Reproduktive und Respiratorische Syndrom Virus (PRRSV). Zu den bakteriellen Primärerregern zählen *Actinobacillus pleuropneumoniae* (APP), *Mycoplasma hyopneumoniae* (Mhyo) und je nach Autor *H. parasuis*, *Streptococcus suis*, *Pasteurella multocida* und *Bordetella bronchiseptica* gehören den Sekundärerregern an (Brockmeier et al. 2002; Lappe 2011).

Eine Erkrankung durch *H. parasuis* wird meist bei jungen Schweinen im Alter von sieben bis acht Lebenswochen diagnostiziert (Oliveira et al. 2002). Während Zhang et al. Geschlechtsabhängigkeit postulierten – männliche Schweine sollten signifikant häufiger infiziert sein als weibliche –, konnten Reiner et al. dies nicht bestätigen (Zhang et al. 2014a; Reiner et al. 2010). Wichtig für das Entstehen der Erkrankung ist die Immunitätslage des Tieres bzw. des Bestandes. In naiven Betrieben kann es zu einer hohen Morbidität und Mortalität der Tiere kommen (Zimmerman et al. 2012). Die meisten Bestände sind jedoch endemisch infiziert, hier kommt es in Einzelfällen zu Mortalitätsraten bis 5% (Nedbalcová et al. 2006; Kolb 2009).

2.2 Pathogenese, Klinik und pathologische Veränderungen

Eine Erkrankung durch *H. parasuis* kann alle Altersstufen betreffen (Lahrmann und Plonait 2004). Sie findet aber ihren Fokus bei Ferkeln im Alter von zwei bis vier Wochen nach dem Absetzen (Oliveira et al. 2003b).

Die Ansteckungsquelle für die Ferkel ist ihre Mutter. Die Ausscheidungsrate ist aber gering, sodass sich nur einige Ferkel des Wurfes an der Sau direkt durch oro-nasalen Kontakt infizieren (Nedbalcová et al. 2006; Quinn et al. 2011). Durch Immunsuppression kann es in seltenen Fällen innerhalb von Stunden bei Saugferkeln zu einer eitrigem Rhinitis kommen (Vahle et al. 1997).

Stress, wie z. B. die Trennung von der Mutter beim Absetzen und Umstallen, führt zur massiven Ausscheidung des Erregers im Flatdeck. Der Schutz der maternalen Antikörper hält ca. zwei bis drei Wochen nach dem Absetzen an. Tiere, die sich nicht an der Sau infiziert haben, werden danach hochempfindlich, denn sie besitzen weder eigene Antikörper, noch die der Mutter. Es

kommt zur klinischen Manifestation der Erkrankung in diesem Zeitraum (Oliveira et al. 2002; Oliveira und Pijoan 2004; Nedbalcová et al. 2006). Ähnliche Verläufe können auch zwei bis drei Wochen nach Einstellung in die Mast beobachtet werden, da hier eine ähnliche Situation bei der Zusammenstallung verschiedener Herkünfte entsteht (Lahrman und Plonait 2004).

Dennoch führt nicht jede Infektion mit *H. parasuis* zu einer klinischen Erkrankung. Denn der Erreger kommt wie oben beschrieben als Kommensale in der Nasenhöhle vor (Quinn et al. 2011). Deshalb stellt sich immer wieder die Frage, ob, wann und warum *H. parasuis* zur Erkrankung im Schweineorganismus führt.

Es scheint, als seien vor allem die Fähigkeit, dem Immunsystem des Schweins zu entgehen und die Abwehr zu stimulieren, für die Entstehung der Krankheit wichtig (Zhang et al. 2016). Bis jetzt wurden vor allem Virulenzfaktoren untersucht, die es *H. parasuis* ermöglichen, auch außerhalb der Nasenschleimhaut im Schwein zu überleben (Bello-Orti et al. 2015). Hierzu zählen Faktoren, die die Anheftung und Invasion begünstigen, sowie Transportersysteme (Pina et al. 2009) und Stoffe, die die Immunabwehr modulieren (Zhou et al. 2012; Wei et al. 2014). Auch die Fähigkeit zur Kapselbildung (Wang et al. 2013) und Zellmembranbestandteile wie LPS und OMPs (Mullins et al. 2009) sowie Gene, die nötige Nährstoffe aus dem Blut akquirieren (Zou et al. 2013; Bello-Orti et al. 2015), dürften für die Pathogenese eine entscheidende Rolle spielen. Dennoch ist über die genauen zellulären Mechanismen, die zur Erkrankung führen, immer noch sehr wenig bekannt (Bouchet et al. 2008).

Eine große Rolle bei der Entstehung einer Erkrankung durch *H. parasuis* spielt vor allem die Stimulation von Makrophagen, die über die Ausscheidung von Interleukin 8 und Präsentation von CD163 im Blut zu einer teilweise generalisierten entzündlichen Immunantwort führt. Verschiedene Studien belegen, dass virulentere Stämme von *H. parasuis* die Fähigkeit besitzen, der Phagozytose zu entgehen. Das wiederum führt zu einer anfänglich verzögerten, aber nicht minder heftigen Immunantwort (Costa-Hurtado et al. 2013; Zhang et al. 2016). Pathologisch-anatomisch und histopathologisch spiegelt sich dies in fibrinösen bis eitrigen Entzündungen der betroffenen Organe wieder (Frاندoloso et al. 2011).

Zum Vollbild der Glässer'schen Krankheit kommt es meist nur, wenn die Tiere naiv sind (Nedbalcová et al. 2006). Die Klinik richtet sich nach der Lokalisation des betroffenen Organs: Husten, abdominal betontes Atmen, geschwollene Gelenke bzw. Lahmheiten und zentralnervöse Störungen (Vahle et al. 1995). Dabei kann es zu hohem Fieber mit Temperaturen bis zu 41,5°C kommen (Zimmerman et al. 2012; Biberstein 1969).

Schon 1910 beschrieb Glässer zwei Formen von Erkrankungen, die durch den Erreger ausgelöst werden können: die serofibrinöse Polyserositis und Arthritis und eine katarrhalisch-eitrige Bronchopneumonie (Glässer 1910). Auch spätere Veröffentlichungen bestätigen diese Aufteilung (Oliveira et al. 2002).

Die typisch pathologisch-anatomischen Veränderungen bei Erkrankung mit *H. parasuis* werden meist durch Mischinfektionen verschleiert (Martin et al. 1977). Daher muss zwischen Infektionen unter Versuchsbedingungen und im Feld unterschieden werden.

In der pathologisch-anatomischen Untersuchung sind bei perakutem Verlauf kaum Veränderungen zu erkennen. Eventuell können Petechien auf verschiedenen Organen diagnostiziert werden. Ansonsten zeigt sich der Tierkörper völlig unauffällig (MacInnes und Desrosiers 1999). Im akuten Stadium können fibrinöse Entzündungen der Serosen und der Leptomeninx beobachtet werden. Auch die Gelenke können fibrinös bis fibrinopurulent verändert sein (Amano et al. 1994; Nedbalcová et al. 2006; Martín de la Fuente et al. 2009b). Im chronischen Verlauf zeigen sich häufig Fibrosen der Serosen und eine chronische Arthritis (Zimmerman et al. 2012; Baumgärtner und Gruber 2015).

Beschränkt sich die Infektion nur auf die Lunge, zeigt sich eine katarrhalisch-eitrige bis fibrinös-eitrige Bronchopneumonie (Oliveira und Pijoan 2002).

Das histologische Bild korreliert mit dem pathologisch-anatomischen Bild und kann nur einen Verdacht erhärten (Martín de la Fuente et al. 2009a). Es zeigen sich im akuten Stadium Fibrin, Makrophagen, Neutrophile und Lymphozyten in den Auflagerungen der Serosen (Vahle et al. 1995). In der Lunge kann ebenfalls fibrinöses Exsudat, in dem Neutrophile, Lymphozyten und Makrophagen vorhanden sind, nachgewiesen werden (Vahle 1996).

Dieses fibrinopurulente Exsudat ist ebenfalls auf den Meningen und in den Gelenken zu finden (Solano et al. 1997; Martín de la Fuente et al. 2009b).

Ist nur die Lunge betroffen, zeigen sich hier typische Läsionen, wie sie bei einer Pneumonie mit bakterieller Beteiligung entstehen. Es herrschen vor allem Neutrophile und Makrophagen im betroffenen Gewebe vor (Brockmeier et al. 2002). Elektronenmikroskopisch können die Bakterien in den Phagosomen der Makrophagen und Neutrophilen detektiert werden (Amano et al. 1994).

2.3 Serotypen und Prävalenzen

H. parasuis ist durch eine große Serotypenvielfalt gekennzeichnet (MacInnes und Desrosiers 1999). Neben den 15 bekannten Serotypen existieren viele nicht serotypisierbare Isolate (Kielstein und Rapp-Gabrielson 1992). Langezeit wurde davon ausgegangen, dass der Serotyp eine Aussage über die Virulenz des Erregers zulässt. Der Serotyp ist jedoch nicht zuverlässig mit der Virulenz von *H. parasuis* assoziiert (Zimmerman et al. 2012). Vielmehr sind Unterschiede in der Virulenz auch innerhalb der Serovare bekannt (Blackall et al. 1997). So sind weder die Fähigkeit zu invadieren und adhären, noch der Resistenzstatus des Stammes mit dem Serotyp assoziiert (Aragón et al. 2010a; Aragón et al. 2010b; Zhou et al. 2010b). Auch das Vermögen, einen Biofilm zu bilden und so resistenter gegen die Abwehr des Schweins zu sein, korreliert nicht mit dem Serotyp (Zhang et al. 2014c). Es gibt jedoch Gene, die sowohl mit der Virulenz von *H. parasuis* als auch mit dem Serotyp assoziiert sein können: zu diesen zählen die Kapselgene (Jin et al. 2006). Trotzdem konnte nie eine klare Assoziation zwischen Serotyp und Virulenz des Erregers hergestellt werden (Olvera et al. 2006).

Jahrelang herrschten in Deutschland die Serotypen 4 (23,8 %) und 5 (17,2 %) vor (Kielstein und Rapp-Gabrielson 1992). Zurzeit dominieren in Deutschland die Serotypen 4 (17,2 %), 2 und 13 (je 12,4 %) (Banholzer et al. 2014). Tabelle 1 zeigt die Prävalenzen der Serotypen aus verschiedenen Ländern.

Tabelle 1: Prävalenzen verschiedener Serovare in den verschiedenen Ländern

Land	Vorherrschender Serotyp	Literaturstelle
Brasilien	4 (26 %), 5 (17,4 %) und 14 (8,7 %)	Castilla et al. 2012
China	4 (24,2 %), 5 (19,2 %), 13 (12,5 %), 14 (7,1 %), 12 (6,8 %), nt (12,1 %)	Cai et al. 2005; Wang et al. 2017
	nt (28 %), 5 (26 %), alle anderen < 15 %	Zhou et al. 2010b
Dänemark	5 (36 %), 13 (22 %), 4 (13 %), NT (15 %)	Angen et al. 2004
Deutschland	4 (17,32 %), 2 und 13 (je 12,4 %), 5 (10,3 %), 1 (9,9 %), 12 (6,8 %), 15 (6,6 %)	Banholzer et al. 2014
Italien	nt (27,3 %), 4 (24,5 %), 13 (19,8 %),	Luppi et al. 2013

Land	Vorherrschender Serotyp	Literaturstelle
	5 (11,3 %)	
Großbritannien	1, 2, 5, 7, 10*	Martín de la Fuente et al. 2007
Niederlande	4 (21,4 %), 13 (14,5 %), nt (13,7 %), 1 (11,1 %), 2 (9,4 %)	Dijkman et al. 2012
Spanien	nt (29,3 %), 5 (18,4 %), 4 (16 %), 2 (9,2 %), 13 (8 %),	Rúbies et al. 1999
Ungarn, Rumänien und Serbien	2 und 5*	Docic und Bilkei 2004
USA und Kanada	nt (30 %), 4 (27 %), 5 (15 %), 13 (14 %), 2 (8 %), 7 (2 %), 12 (5 %)	Tadjine 2004

nt: nicht typisierbar; *: keine prozentualen Anteile in der Veröffentlichung angegeben

In den Niederlanden ist die Diversität von *H. parasuis*-Isolaten hoch. Nicht nachgewiesen wurden die Serotypen 3 und 10 (Dijkman et al. 2012). In Ungarn, Rumänien und Serbien konnten Docic und Bilkei in Freilandhaltung im Gegensatz zur Stallhaltung ebenfalls eine „hohe Serotypendiversität“ nachweisen (Docic und Bilkei 2004).

2.4 Diagnostik

Der alleinige Nachweis des Erregers reicht für eine Diagnose der Erkrankung durch *H. parasuis* nicht aus, da das Bakterium auch im Atemtrakt gesunder Tiere nachgewiesen werden kann (Aragón 2013). Eine Kombination aus Klinik, Pathologie und Erregernachweis ist entscheidend (Olvera et al. 2007b). Die Isolation von *H. parasuis* aus den jeweils veränderten Geweben ist beweisend (Quinn et al. 2011). Deshalb ist es wichtig, die Probe aus pathologisch veränderten Organen zu entnehmen (Oliveira und Pijoan 2004; Olvera et al. 2006).

Für die Probennahme eignen sich in der akuten Erkrankungsphase Sammeltpuffer oder Ergussflüssigkeit von betroffenen Körperhöhlen (Nedbalcová et al. 2006). In der chronischen Phase

sollten eher Synovia- oder Gelenkspunktate entnommen werden. Geht es darum, Veränderungen im ZNS nachzuweisen, eignet sich Liquor besser als das Gewebe selbst (Palzer et al. 2015b).

Ein Problem ist, dass bei Mischinfektionen, wie sie unter Praxisbedingungen üblicherweise vorkommen, teilweise nur die Lunge betroffen ist und keine pathologisch-anatomischen Veränderungen am Rest des Tierkörpers zu entdecken sind (Oliveira und Pijoan 2004; Luppi et al. 2013). Die Nachweisrate sinkt stark, wenn die Sektionstiere schon tot angeliefert wurden. Dann kann es sein, dass *H. parasuis* nicht aus den veränderten Organen nachgewiesen werden kann (Oliveira und Pijoan 2004; Nedbalcová et al. 2006).

Der indirekte Nachweis von *H. parasuis* erfolgt über einen Antikörper-ELISA (Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay) (Nedbalcová et al. 2006; Fei 2012). Er reagiert gegen die Oligopeptidpermease A, die spezifisch für *H. parasuis* ist (Zheng et al. 2014; Macedo et al. 2016). Ab fünf Tagen p. i. kann mit positiven Ergebnissen gerechnet werden (Oliveira und Pijoan 2004). Die Antikörper gegen dieses Protein sind gute Biomarker, die anzeigen, dass eine Infektion oder Impfung stattgefunden hat. Sie schützen allerdings nicht vor einer Erkrankung (Palzer et al. 2015a; Macedo et al. 2016).

2.4.1 Anzucht

Die kulturelle Anzucht von *H. parasuis*-Isolaten erfolgt auf Blutagarplatten, die vorher mit einem *Staphylococcus (St.) aureus*-Stamm als Amme beimpft wurden. *H. parasuis* zeigt hierbei in Anwesenheit von *St. aureus* ein ausgeprägtes Ammenphänomen, da dieser den zum Wachstum benötigten V-Faktor (NAD) zur Verfügung stellt. Des Weiteren kann Kochblutagar (sog. Schokoladenagar) verwendet werden, bei dem das Blut vorher thermisch behandelt und so die entsprechenden Faktoren freigesetzt wurden (Raßbach 1992). Innerhalb von ein bis drei Tagen wachsen kleine graue Kolonien (Kochblutagar) bzw. kleine transluzierende nicht hämolytische Kolonien (Blutagar) (Zimmerman et al. 2012).

In der biochemischen Differenzierung zeigt sich *H. parasuis* Katalase- und Maltose-positiv sowie Urease-, Indol- und Arabinose-negativ (Raßbach 1992).

Eine vorangegangene antibiotische Behandlung kann zu falsch negativen Ergebnissen führen (Oliveira et al. 2001). Hier bringt häufig nur noch eine PCR den positiven Nachweis. Die kulturelle Anzucht von *H. parasuis* ist allerdings unverzichtbar, um eine anschließende Serotypisierung und einen Resistenztest durchführen zu können (Oliveira 2007). Zur Resistenztestung

veterinärmedizinisch relevanter Erreger gibt das international anerkannte *Clinical Laboratory and Standards Institute* eine Methodensammlung heraus. Allerdings gibt es für *H. parasuis* noch keine standardisierte CLSI-Methode (Clinical and Laboratory Standards Institute 2017). Deshalb sollen die Standardmethoden für *A. pleuropneumoniae* verwendet werden (Oliveira 2007). Hierbei gibt es zwei mögliche Verfahren: den Agar-Diffusionstest und den Bouillondilutionstest (Schwarz et al. 2003).

Beim Agardiffusionstest wird eine Agarplatte komplett mit dem Erreger ausgestrichen und anschließend werden mit dem Antibiotikum getränkte kleine Platten aufgelegt und angedrückt. Beim Bouillondilutionstest wird für jedes Antibiotikum eine Verdünnungsreihe angesetzt und mit dem zu untersuchenden Erreger beimpft (Schwarz et al. 2003). Durch die Verdünnungsreihe kann nachher eine Minimale-Hemmkonzentration (MHK) angegeben werden, die die kleinste Konzentration meint, bei der das Antibiotikum noch wirksam ist (Oliveira 2007).

H. parasuis wird nach 18 Stunden Bebrütung bei 5% CO₂ und 37°C beurteilt (Olvera et al. 2010). Beide Methoden führen zu der Einteilung „sensibel“, „intermediär“ und „resistent“ nach CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute 2008). Da es kein einheitliches empfohlenes Verfahren für die Testung der Resistenzen bei *H. parasuis* gibt (Prüller et al. 2017), sind beide nebeneinander zu akzeptieren und gleich zu setzen (Dayao et al. 2014; Prüller 2016). Auch in weiteren Publikationen, die sich mit Resistenztests von anderen gramnegativen und –positiven Erregern auseinandersetzen, wird beschrieben, dass beide Verfahren (Agardiffusion und Bouillondilution) nebeneinander in gleichbewerteter Weise eingesetzt werden (Luber et al. 2003; Mayrhofer et al. 2008). Neueste Entwicklungen zeigen Korrekturen in der Inkubationszeit sowie Modifikationen des Nährmediums. Eine Standardisierung ist auf absehbare Zeit in Aussicht (Prüller et al. 2017).

2.4.2 PCR

In den letzten Jahren hat sich die Diagnostik für *H. parasuis* deutlich entwickelt (Howell et al. 2015). Eine erste PCR wurde von Oliveira im Jahr 2001 publiziert (Oliveira et al. 2001). Diese zeigte allerdings noch Positiv-Reaktionen mit *A. indolicus*, welcher apathogen für das Schwein sein soll (Oliveira et al. 2001). 2007 wurde eine Multiplex-PCR für *H. parasuis* entwickelt, die jetzt 100 % speziesspezifisch, aber etwas weniger sensitiv als die PCR von Oliveira et. al war (Angen et al. 2007).

Sack und Baltes entwickelten 2009 eine Multiplex-PCR, die gleichzeitig verschiedene mögliche Virulenzfaktoren nachweisen kann (Sack und Baltes 2009). Turni et al. entwickelten 2010 eine qPCR für *H. parasuis* anhand des *infB*-Gens, welches speziesspezifisch ist. Diese PCR soll sensitiver und spezifischer sein als die vorhergenannten (Turni et al. 2010).

Vorteil der PCR ist, dass es keinen lebenden Organismus braucht, um den Erreger nachzuweisen. Dies erhöht die Nachweisrate von *H. parasuis* massiv, macht aber die Entscheidung, ob *H. parasuis* an der Entstehung der Erkrankung beteiligt ist, noch schwieriger (Kolb 2009).

2.4.3 Serotypisierung

Eine erste Serotypisierung wurde von Bakos 1955 beschrieben und teilte *H. parasuis* in 4 Serotypen (A-D) ein (Nicolet et al. 1980). 1986 teilten Morozumi und Nicolet *H. parasuis* per Präzipitationstest in 7 Serovare ein. 1992 beschrieben Rapp-Gabrielson und Kielstein ein diagnostisches Verfahren per Immunodiffusion, nach dem sich 15 Serotypen unterscheiden lassen. Dabei teilten sie die verschiedenen Serovare in drei Gruppen ein. Als hochvirulent galten die Serotypen 1, 5, 10 und 12-14. Eine Infektion mit einem dieser Serotypen führte meist zum Tode. Die als moderat virulent geltenden Serotypen 2, 4 und 15 sollen zu Polyserositis führen und schlechtes Allgemeinbefinden zur Folge haben. Als avirulent stuften die Forscher die Serotypen 3, 6 bis 9 und 11 ein. In welche Gruppen die vielen nicht serotypisierbaren Stämme gehören, ließen die Wissenschaftler offen (Kielstein und Rapp-Gabrielson 1992).

Im Lauf der Zeit wurden die Geldiffusion und der indirekte Hämagglutinationstest (IHA) für die Serotypisierung von *H. parasuis* entwickelt. Kreuzreaktionen im Feld sind möglich, aber eher selten. Ein Problem bleibt immer noch die Gruppe nicht serotypisierbarer Stämme (Turni und Blackall 2005).

Eine Serotypisierung mittels PCR basierend auf der Varianz eines Kapselgens ist seit Anfang 2016 bekannt. Ein Vorteil dieser Methode ist, dass keine Anzucht mehr für die Serotypisierung nötig ist (Howell et al. 2015). Es gibt aber auch bei diesem Verfahren nicht typisierbare Stämme, die sich keinem der 15 Serovare zuordnen lassen (Wang et al. 2017). Zurzeit wird diese Methode in führenden Diagnostiklabors parallel zur Serotypisierung mittels IHA durchgeführt (<http://www.ivd-gmbh.de/quicklinks/neuigkeiten/>, Stand 18.08.2017).

2.4.4 Sonstige Verfahren

Eine Immunhistochemie für den direkten Nachweis von *H. parasuis* ist möglich, erscheint aber nicht praktikabel: Einerseits ist die Kreuzreaktivität zu anderen Bakterien ein Problem und andererseits stehen zu wenig monoklonale Antikörper zu Verfügung, deren deduktive Wirkungskraft in Formaldehyd und Paraffin-Gewebe intakt bleibt (Olvera et al. 2007b).

Einige molekularbiologische Verfahren werden für epidemiologische Studien und die Erforschung der Virulenz von *H. parasuis* genutzt. Sie finden aber eher keine Anwendung in der Routinediagnostik. Die „suppression subtractive hybridisation“ (Zhou et al. 2010a), bei der zwei Stämme miteinander verglichen werden können, und das „Multilocus sequence typing“ (MLST) (Mullins 2010) dienen der Erforschung von Virulenzunterschieden. Die „Pulsed field gel electrophoresis“ (PFGE), die im Anschluss an eine Anzucht und einem Verdau mit Restriktionsenzymen durchgeführt wird, ist sehr aufwendig und zeigt schlecht reproduzierbare Ergebnisse (Melles et al. 2007).

Eine „Enterobacterial repetitive intergenic consensus PCR“ (ERIC PCR) kann für epidemiologische Studien genutzt werden und dient der Genotypisierung anhand von repetitiven DNA-Mustern im Genom des Bakteriums (Olive und Bean 1999; Olvera et al. 2007a).

Die „Multiple loci VNTR analysis“ (MLVA) ist für viele Mikroorganismen etabliert und kann anhand von tandemartigen Wiederholungen einer kurzen DNA-Sequenz ebenfalls für epidemiologische Studien, aber auch Virulenz-Beurteilungen genutzt werden (Zaiß 2010; Boerlin et al. 2013).

2.5 Differentialdiagnosen

Wichtigste Differentialdiagnose zu *H. parasuis* ist eine Polyarthrititis oder Leptomeningitis verursacht durch *Streptococcus (S.) suis*. Die klinischen Symptome und das zeitliche Auftreten stimmen in weiten Teilen überein und können im Flatdeck zu hohen Verlusten führen (Reams et al. 1994; Oliveira und Pijoan 2004). Pathologisch-anatomisch und histologisch herrscht bei einer Infektion mit *S. suis* die purulente Entzündung vor, es kann aber auch zu Fibrinausschüttungen auf den Serosen kommen (Reams et al. 1994). Nur ein bakteriologischer oder molekularbiologischer Nachweis kann den jeweils anderen Erreger ausschließen (Zimmerman et al. 2012). Oliveira und Pijoan beschreiben, dass der Nachweis von *S. suis* in Schweinen mit Polyserositis vorsichtig zu interpretieren ist, da dieser Erreger durch sein ubiquitäres Vorkommen

und schnelles Wachstum *H. parasuis* im Sektionstier schnell überwuchern kann (Oliveira et al. 2002).

Auch *M. hyorhinis* zeigt eine ähnliche, jedoch mildere Klinik als *H. parasuis* und kann auf Serosen und in Gelenken nachgewiesen werden (Decker und Barden 1971). Da beide Erreger meist in Assoziation zueinander zu detektieren sind, spricht Haedke von einem sogenannten Polyserositis-Komplex (Haedke 2008). Auch andere Autoren sehen in praxi eine Assoziation des Erregers zu *H. parasuis* (Palzer et al. 2015c). Weitere Autoren kommen zu dem Schluss, dass das histologische Bild in Kombination mit Klinik und Erregernachweis erst beweisend für eine Krankheitsbeteiligung von *M. hyorhinis* seien (Gomes et al. 2012). Grundsätzlich wird die Funktion von *M. hyorhinis* als obligater Krankheitserreger diskutiert und die Positionen der Wissenschaftler sind hierzu unterschiedlich (Brockmeier et al. 2002).

Die Ödemkrankheit, bedingt durch *E. coli*, ruft ähnliche Symptome hervor wie *H. parasuis* (Rademacher 2001). Der Zeitpunkt und die betroffenen Tiere sind aber unterschiedlich: Während die Erkrankung durch *H. parasuis* bedingt durch das Sinken maternaler Antikörper zwei bis vier Wochen nach dem Absetzen auftritt, kommt eine Erkrankung durch *E. coli* fünf bis vierzehn Tage nach dem Absetzen zum Ausbruch. Die Tiere zeigen in der Sektion bei ansonsten meist gutem Ernährungszustand typische Veränderungen: Ödeme, Vaskulitis und hämorrhagische Enteritis. Auch durch den kulturellen Nachweis lässt sich diese Differentialdiagnose schnell abklären (Zimmerman et al. 2012).

Bei systemischer Erkrankung sollten auch Salmonellen durch das pathologisch-anatomische Bild und kulturell als Erreger diskutiert werden (Nedbalcová et al. 2006).

Beim alleinigen Auftreten von Arthritiden müssen je nach Zeitpunkt außer den bereits genannten Erregern *M. hyosynoviae* oder *E. rhusiopathiae* berücksichtigt werden. Sie kommen aber eher bei älteren Schweinen gegen Ende der Mast vor und zeigen nicht purulente, chronische Arthritiden (Zimmerman et al. 2012). Sie lassen sich außerdem durch den Erregernachweis bestimmen (Nedbalcová et al. 2006).

Tritt eine Pneumonie ohne Polyserositis, Arthritis oder Leptomeningitis auf, müssen weitere Erreger des PRDC abgeklärt werden.

Im pathologischen Bild kann zwischen einer Pneumonie, verursacht durch *H. parasuis* oder anderen Pasteurellaceae (*P. multocida*, gering virulente Formen von APP) nicht unterschieden werden. Auch das histologische Bild kann die Erreger nur bedingt abgrenzen (Brockmeier et

al. 2002; Nedbalcová et al. 2006). Ebenso können Bordetellen zu einer fibrinösen Pneumonie führen. Hier muss der Erregernachweis Klarheit verschaffen.

In jedem Fall muss immer das Vorliegen eines PRDC abgeklärt werden. Viren, wie PRRSV, SIV und PCV2 bereiten bakteriellen Sekundärerregern wie *H. parasuis* den Weg (MacInnes und Desrosiers 1999). PRRSV scheint Läsionen, verursacht von *H. parasuis*, zu verschlimmern (Solano et al. 1998), aber dessen Verteilung im Körper nicht zu beeinflussen (Segalés et al. 1999). All diese Erreger können per PCR nachgewiesen werden.

Liegt eine PRDC vor, kann von *H. parasuis* als Primär- bzw. Haupterreger, aber nicht als Alleinverursacher der Krankheit gesprochen werden (Brockmeier et al. 2002; Zimmerman et al. 2012).

Wichtigste Differentialdiagnosen für Pneumonien in der Mast sind *A. pleuropneumoniae* und SIV, für Arthritiden sind es *S. suis* und *M. hyosynoviae* (Nedbalcová et al. 2006).

Natürlich müssen der Vollständigkeit halber auch die anzeigepflichtigen Tierseuchen erwähnt werden, die zu zentralnervösen Ausfällen und Pneumonie führen könnten. Eine amtliche Ausschlussuntersuchung auf Aujeszky'sche Krankheit, Klassische und Afrikanische Schweinepest, die regelmäßig bei jeder Sektion durchgeführt werden sollte, in Verbindung mit der klinischen Bestandsuntersuchung, kann den Verdacht entkräften (Glässer 1910).

2.6 Bekämpfung und Therapie

Die Bekämpfung von Infektionen mit *H. parasuis* gliedert sich in drei Bereiche, die im Folgenden vorgestellt werden.

2.6.1 Antibiotische Behandlung akut erkrankter Tiere

Weltweit werden für bakterielle Infektionskrankheiten in großen Mengen Antibiotika eingesetzt (Aarestrup et al. 2008). Die Behandlung einer akuten Erkrankung mit *H. parasuis* erfolgt ebenfalls durch Antibiotika (Nedbalcová et al. 2006). Dieses Verfahren sollte aber nur so lange praktiziert werden, bis die prädisponierenden Faktoren für die Erkrankung abgestellt sind und ein Impfkonzentrat steht (Lappe 2011). Viehmann et al. haben die kombinierte Behandlung der Tiere mit Enrofloxacin-Arginin und einem nicht steroidal Antiphlogistikum (NSAID) getestet. Dabei fanden sie heraus, dass die Tiere schneller genesen und bessere Tageszunahmen

aufweisen, wenn sie zeitgleich zur Antibiose mit einem NSAID behandelt werden (Viehmann et al. 2013).

Je nach klinischem Erscheinungsbild werden für die Behandlung einer Erkrankung mit *H. parasuis* Penicillin, Aminopenicilline, Tetracyclin, Cephalosporine oder Makrolide eingesetzt (Waldmann und Wendt 2004; Tegeler 2013; Reiner 2015). Beim Einsatz von Antibiotika ist immer die aktuelle Resistenzlage zu berücksichtigen (Martín de la Fuente et al. 2007; Bundestierärztekammer 2015). Hierfür werden die Bakterien Empfindlichkeitsprüfungen unterzogen. Dies kann semiquantitativ mittels Agardiffusionstest oder quantitativ mittels Bestimmung der Minimalen Hemmkonzentration (MHK) erfolgen (Tegeler 2013).

Für *H. parasuis* sind Resistenzen gegen fast alle Antibiotika bekannt, allerdings ist die Resistenzsituation der einzelnen Isolate regional stark unterschiedlich (Nedbalcová et al. 2006). Während es in Dänemark, Großbritannien, Tschechien und Deutschland wenig Resistenzen gegenüber den üblicherweise angewendeten Antibiotika zu geben scheint, zeigen sich viele Isolate aus Spanien resistent (Aarestrup et al. 2004; Martín de la Fuente et al. 2007; Nedbalcová und Kučerová 2013; Tegeler 2013). In Australien zeigten sich erhöhte MHKs gegenüber den Antibiotika Trimethoprim-Sulfamethoxazol (40 %), Tetracyclin (31 %), Tilmicosin (22 %), Tulathromycin (9 %) und Erythromycin (7 %) (Dayao et al. 2014). In den USA sind vermehrt Resistenzen gegenüber Apramycin, Clindamycin, Erythromycin, Penicillin, Tylosin und Trimethoprim-potenzierten Sulfonamiden bekannt (MacInnes und Desrosiers 1999). Neuere Daten aus den USA fehlen jedoch. Für *H. parasuis* ist wenig über die Resistenzmechanismen gegenüber den verschiedenen Antibiotika bekannt (Lancashire et al. 2005; Chen et al. 2012). Diese können auf Protein- und Genebene vorliegen. In letzterem Fall kann weiterhin zwischen Plasmid-vermittelten oder chromosomal gelegenen Resistenzgenen unterschieden werden (Hoelzel 2006).

Außerdem werden weitere Mechanismen vermutet und zurzeit untersucht. Ein Beispiel hierfür ist die Effluxpumpe AcrAB, die vor allem Makrolidantibiotika unter Energieaufwand aus dem Bakterium herausschleusen kann (Feng et al. 2014).

Die Empfindlichkeit eines Bakteriums gegenüber einem Antibiotikum hängt aber nicht nur von seiner Gen- oder Proteinausstattung ab, sondern auch von der Umgebung, in der es sich befindet. So ist es nicht verwunderlich, dass resistent getestete Stämme *in vitro*, trotzdem Empfindlichkeit gegenüber dem Antibiotikum *in vivo* zeigen und wirtsgebundene Faktoren zum Erfolg oder Misserfolg einer antibiotischen Behandlung führen können (Davis 1974; Devriese und Dutta 1981). Auch die Fähigkeit, einen Biofilm zu bilden, kann die Antibiotikasensibilität

beeinflussen: Zhang et al. wiesen nach, dass die Befähigung zur Bildung eines Biofilms mit einer gesteigerten Resistenz gegen β -Lactam-Antibiotika korreliert (Zhang et al. 2014c). Insgesamt kann die antibiotische Behandlung von Infektionen mit *H. parasuis* nur eine kurzfristige Lösung sein. Der Fokus muss auf der Minimierung krankheitsbegünstigender Faktoren liegen. Hierzu zählt neben Verbesserungen in Hygiene und Management auch ein angemessenes Impfregime (Bundestierärztekammer 2015).

2.6.2 Impfung

Neben dem Abstellen der prädisponierenden Faktoren und der antibiotischen Behandlung akut erkrankter Tiere gibt es die Möglichkeit einer Impfung des Bestandes. Sie kann auf langfristige Sicht den Immunstatus der Herde stabilisieren und die Ferkel schützen.

Zurzeit sind in Deutschland zwei kommerzielle Impfstoffe gegen *H. parasuis* zugelassen (Paul Ehrlich-Institut):

Suvaxyn® M. hyo – Parasuis der Firma Zoetis Deutschland GmbH ist ein bivalenter Totimpfstoff, der zusätzlich zu den *H. parasuis* Serotypen 4 und 5 den Erreger *M. hyopneumoniae* enthält. Er darf nur an nicht tragende oder laktierende Tiere ab einem Alter von sieben Lebenstagen verimpft werden. Eine zweite Impfung erfolgt zwei bis drei Wochen später (Zoetis Deutschland GmbH 2015).

Porcilis® Glässer ist ein monovalentes Totvakzin der Intervet Deutschland GmbH und enthält 0,05 mg *H. parasuis*, Serotyp 5. Nach Zulassung darf der Impfstoff zweimalig ab der 3. Lebenswoche und zur passiven Immunisierung der Ferkel verimpft werden (Intervet Deutschland GmbH 2009).

Nach §11 Tiergesundheitsgesetz ist es möglich, einen bestandsspezifischen Impfstoff gegen *H. parasuis* herzustellen (Bundesministerium der Justiz und für Verbraucherschutz 2016). Hierfür erfolgt eine diagnostische Tötung erkrankter, nicht behandelter Tiere, die typisch für das Bestandsproblem sind. Nach Isolation aus dem betroffenen Gewebe werden die Stämme von einer zur Herstellung bestandsspezifischer Impfstoffe zugelassenen Firma in einem Impfstoff zusammengefasst. Es darf aber nur dann ein Impfstoff hergestellt werden, wenn Serotypen nachgewiesen wurden, die nicht im kommerziellen Impfstoff enthalten sind, oder wenn der Impfstoff im betroffenen Betrieb nachweislich nicht wirkt (Zentralstelle der Länder für Gesundheitsschutz bei Arzneimitteln und Medizinprodukten 2015). Der bestandsspezifische

Impfstoff darf nur auf dem Bestand, für den er hergestellt worden ist, eingesetzt werden (Bundesministerium der Justiz und für Verbraucherschutz 2016).

Bei der Impfung gegen *H. parasuis* kommt den maternalen Antikörpern eine besondere Rolle zu. Sie sind wichtig, damit sich die Ferkel unter deren Schutz infizieren und eine eigene, belastbare Immunität ausbilden können (Blanco et al. 2004; Cerdà-Cuéllar et al. 2010; Olvera et al. 2011; Lappe 2011). Zur Interferenz maternaler mit Ferkel-Antikörpern gibt es verschiedene Aussagen in der Literatur. Einige Autoren sehen ganz klar eine Interaktion zwischen den Antikörpern (Pomorska-Mól et al. 2011; Siegrist 2003). Andere Autoren beschränken sich auf die Aussage, dass die Impfung der Ferkel und maternale Antikörper ab der ersten Lebenswoche keinen spürbaren Einfluss aufeinander haben. Ferkel von geimpften Sauen, die in der ersten und dritten Lebenswoche geimpft wurden, zeigten sogar weniger pathologische Veränderungen im Tierkörper (Oliveira und Pijoan 2004). In einem Punkt sind sich aber die meisten Autoren einig: Der Zeitpunkt der Infektion und damit auch der Impfung ist entscheidend für den Schutz der Ferkel (Oliveira und Pijoan 2004; Pomorska-Mól et al. 2011; Oliveira 2015; Cerdà-Cuéllar et al. 2010; Siegrist 2003).

Um eine belastbare Immunität der Ferkel zu erreichen, muss die Immunisierung knapp zwei Wochen vor dem typischen Ausbruchzeitpunkt im Bestand abgeschlossen sein (Reiner 2015). Dies hat mehrere Impfkonzeppte zur Folge:

Treten Probleme ein bis drei Wochen nach dem Absetzen auf, sollten die Sauen vier und zwei Wochen vor der Geburt geimpft werden. Treten die Probleme später auf, können die Ferkel selbst in der zweiten und vierten Lebenswoche geimpft werden (Oliveira 2015).

Auch die Jungsauen müssen bei der Eingliederung in den Bestand der Immunitätslage angepasst und ggf. zweimalig geimpft werden (Lappe 2011). Oliveira und Pijoan empfehlen aufgrund der Interferenz von maternalen Antikörpern mit denen der Ferkel, beide zu impfen (Oliveira und Pijoan 2002).

Verschiedene Impfstudien haben belegt, dass es teilweise Kreuzreaktionen zwischen den Serovaren gibt. So konnte ein Impfstoff gegen Serotyp 4 und 5 auch gegen die Serotypen 13 und 14 schützen (Oliveira und Pijoan 2004), ein anderer, der nur Serotyp 5 enthielt, schützte zusätzlich gegen die Serotypen 1 und 12 – 14 (Bak und Rijsing 2002).

2.6.3 Beseitigen prädisponierender Faktoren

Da die Erkrankung an *H. parasuis* durch Umweltfaktoren begünstigt wird, sollten bei der Bekämpfung auch diese mit einbezogen werden (Glässer 1910; MacInnes und Desrosiers 1999). Die alleinige antibiotische Behandlung der Tiere reicht allein schon aus Gründen der guten veterinärmedizinischen Praxis nicht aus (Bundestierärztekammer 2015).

Zu den begünstigenden nicht infektiösen Ursachen zählen wie oben erwähnt Überbelegung, zu geringe Lüftungsrate, falsch eingestellte Stalltemperaturen, Stress, hohe Ammoniak- und Staublevel und eine kontinuierliche Belegung (Brockmeier et al. 2002; Zimmerman et al. 2012; Brockmeier et al. 2013). *H. parasuis* zeigt außerhalb des Wirts eine geringe Tenazität. So kann der Erreger in physiologischer Kochsalzlösung und phosphatgepufferter Salzlösung bei 42°C eine Stunde und bei Raumtemperatur höchstens 8 Stunden nachgewiesen werden (Morozumi und Hiramune 1982). Wird nach guter Praxis gereinigt und desinfiziert, sollte der Erreger in der Umgebung nicht mehr nachweisbar sein (Ferri et al. 2010).

Neben der Optimierung der Haltungsbedingungen sind auch immunschwächende Faktoren wie Co-Erreger zu berücksichtigen und nach Möglichkeit zu bekämpfen. Die Sauenherde sollte einen stabilen Gesundheitsstatus aufweisen, damit die Ferkel genügend maternale Antikörper erhalten und damit optimal geschützt bleiben (Brockmeier et al. 2002).

2.7 Virulenzfaktoren

In der Vergangenheit wurde zur Aussage der Virulenz vor allem die Einteilung in Serotypen verwendet, die durch Kielstein und Rapp-Gabrielson veröffentlicht wurde. Sie definierten die Serotypen 1, 5, 10, und 12-14 als hochvirulent, während die Serotypen 2, 4 und 15 als mäßig virulent galten. Die Serotypen 3, 6, 7, 9 und 11 wurden von Kielstein und Rapp-Gabrielson als gering virulent eingestuft (Kielstein und Rapp-Gabrielson 1992). Es blieb die Frage offen, wie mit den vielen nicht serotypisierbaren Stämmen zu verfahren ist. Neuere Untersuchungen zeigten, dass die Serotypen nicht durch Lipopolysaccharide, sondern durch einfache Polysaccharide definiert werden (Howell et al. 2013). Desweiteren gibt es nicht nur Unterschiede zwischen virulenten und nicht virulenten Stämmen. Auch innerhalb der Gruppe der virulenten *H. parasuis*-Stämme gibt es Abstufungen (Blackall und Turni 2013). Das Serovar allein kann also keine Aussage zur Virulenz beitragen (Aragón et al. 2010b).

Unter anderem wird auch die Empfindlichkeit des Schweines selbst darüber entscheiden, ob sich eine Infektion klinisch manifestiert oder das Tier phänotypisch ohne Befund bleibt

(Wilkinson et al. 2010). Darüber hinaus wird vermutet, dass die Virulenz von vielen Faktoren abhängt (Assavacheep et al. 2012; Bello-Orti et al. 2014). Die unterschiedlichsten Virulenzfaktoren können in allen Phasen im Laufe einer Infektion in das Geschehen eingreifen. Es können Bestandteile der Zellmorphologie, Toxine, Transporter, oder auch Prophagen sein. Sie werden in den nächsten Unterkapiteln vorgestellt.

2.7.1 Kapselbildung

Verschiedene Stämme von *H. parasuis* haben die Fähigkeit, eine Kapsel auszubilden (Zimmerman et al. 2012). Sie soll signifikant mit der Virulenz von *H. parasuis* assoziiert sein (Wang et al. 2013; Howell 2014). Stämme ohne Kapsel sind extrem sensibel gegenüber Schweineserum, während kapselbildende Stämme generalisiert im Schwein nachweisbar sind (Wang et al. 2013). Gegen eine Opsonisierung durch Lungenmakrophagen und dadurch auch gegen Phagozytose scheint die Kapsel zu schützen. *In vitro* lässt sich die Kapselbildung nicht nachweisen. Dies kann als Hinweis darauf gesehen werden, dass es Faktoren *in vivo* braucht, die das Ausbilden der Kapsel auslösen (Olvera et al. 2009). Wahrscheinlich wird dieser Prozess unter anderem durch die Anwesenheit von Lungenmakrophagen induziert. Durch das Ausbleiben der Phagozytose wird auch die Ausschüttung von Komplementfaktoren verhindert (Costa-Hurtado und Aragón 2013; Zhang et al. 2014c). Mutanten, die das Kapselgen *capD* nicht tragen, sollen avirulent sein, bzw. sind empfindlich gegenüber der Opsonisierung durch das Komplementsystem und Zellen des angeborenen Immunsystems (Costa-Hurtado und Aragón 2013).

2.7.2 Virulenz-assoziierte trimerische Autotransporter (VTAA)

Adhäsine, Hämagglutinine und Invasine gehören zur Familie der Autotransporter gramnegativer Bakterien. Die Adhäsine entstammen der Autotransporterfamilie 2, die zur Bindung an die extrazelluläre Matrix eukaryotischer Zellen befähigt ist. Da manche der Autotransporter nur bei pathogenen Stämmen verschiedener Arten vorkommen, nennt man sie Virulenz-assoziierte Autotransporter (Pina et al. 2009).

Trimerische Autotransporter (TA) werden intrazellulär in der Bakterienzelle gebildet und bestehen aus drei Bereichen: Der Ausschleusungsmechanismus ist ein Membrananker, der allen TA gemeinsam ist. Er vermittelt den selbstständigen (Auto-) Transport der zwei anderen Bereiche aus der Zelle. Der Passengerbereich besteht unter anderem aus Kollagenfasern und

kurzen Wiederholungssequenzen bestimmter Aminosäuren, den der dritte Bereich, das N-terminale Ende abschließt. Letzteres vermittelt die Adhäsion an der Wirtszelle (Linke et al. 2006). Virulenz-assoziierte trimerische Autotransporter (VTAA) wurden in der Vergangenheit schon für *H. influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *H. ducreyi*, *Neisseria meningitidis* und Yersinien nachgewiesen und scheinen auch bei *H. parasuis* eine Rolle in der Pathogenese zu spielen (Pina et al. 2009). *YadA* ist der Prototyp hierfür und wurde bei *Yersinia enterocolitica* nachgewiesen. Er vermittelt die Adhäsion zwischen dem Erreger und Wirtszelle und spielt dadurch eine wichtige Rolle für die Virulenz des Bakteriums (Cotter et al. 2005). Bei *H. influenzae* ist diese Zell-Zell-Interaktion mit dem respiratorischen Epithel des Menschen nachgewiesen (Meng et al. 2008).

Durch ihre lange Stielstruktur sind virulenzassoziierte Autotransporter teilweise sehr immunogen, weshalb man versucht, sie in der Impfstoffherstellung zu nutzen. Da es aber eine Vielzahl von virulenzassoziierten Autotransportern zu geben scheint, ist es schwierig, den einen Impfstoffkandidaten zu benennen (Olvera et al. 2011). Zwar soll es Kreuzreaktionen zwischen den verschiedenen VTAA geben, sie reichen aber nicht für eine belastbare Immunität der Tiere aus (Olvera et al. 2013). Neueste Untersuchungen lassen vermuten, dass diese gemeinsame Grundstruktur nahe dem C-terminalen Ende der Autotransporter liegt (Correa-Fiz et al. 2017). Ein weiteres Problem ist, dass VTAA nicht permanent in der Zellmembran der Bakterien präsentiert werden, sondern erst ausgebildet werden müssen. Daher gelten sie als „spätes Antigen“, worauf der Wirt mit einer verzögerten Bildung von Immunglobulin G reagiert (Olvera et al. 2010). Im Gegensatz dazu stehen die äußeren Membranproteine (Outer Membrane Proteins, OMP, Kapitel 2.7.4), die als fester Bestandteil der Zellmembran immer präsentiert werden.

Für *H. parasuis* sind bis zu 13 verschiedene VTAA bekannt, die in drei Gruppen eingeteilt werden können. In einigen Stämmen von *H. parasuis* wurden bis zu zehn Genkopien für diese verschiedenen VTAA nachgewiesen. Dies legt die Vermutung nahe, dass die verschiedentliche Nutzung des vorhandenen Genrepertoires einen Mechanismus zur Immunevasion des Erregers darstellt (Pina et al. 2009). Die VTAA der Gruppen 1 und 2 wurden dabei in klinisch relevanten Fällen nachgewiesen, die VTAA der Gruppe 3 schienen in allen *H. parasuis*-Stämmen zu existieren und können damit einer Speziesdiagnose per PCR dienen (Olvera et al. 2012).

2.7.3 Extrazelluläre Serinproteasen

Eine Sonderform der VTAA sind die extrazellulären Serinproteasen (ESP). Bei Serinproteasen handelt es sich um Enzyme, die in ihrem aktiven Zentrum die Aminosäure Serin besitzen und verschiedene Proteine und Peptide katalytisch spalten können (Fallert-Müller 1999). Hierzu zählen auch die Verdauungsenzyme Trypsin, Chymotrypsin und Elastase.

Extrazelluläre Serinproteasen sind bereits bei einigen gramnegativen Erregern nachgewiesen worden, z.B. EHEC (Lichtenwald et al. 2013). Sie wirken proteolytisch gegenüber Proteinen, die in der Blutgerinnung und Immunabwehr eine Rolle spielen. Zur Familie der Serinproteasen gehört auch die IgA1-Protease, welche zuerst bei *Neisseria* sp. und Streptokokken nachgewiesen worden ist. Sie spaltet humanes IgA1, welches vor allem in der Nasenhöhle vorkommt. IgA inhibiert die mikrobielle Adhäsion und Invasion und neutralisiert bakterielle Toxine. Die IgA-Protease spaltet die Untereinheiten von IgA und verhindert so die Agglutination mit den Bakterien (Costa-Hurtado und Aragón 2013). Auch *H. influenzae* besitzt die Genausstattung für eine IgA1-Protease und kann so in der Nasenhöhle kolonisieren. Dabei ist die IgA1-Protease nur bei virulenten Stämmen dieser Gattung zu finden. Die Protease entgeht der Spaltung durch das Immunsystem durch Abspaltung der Passenger-Domäne von der beta-barrel-Domäne, die in die bakterielle Membran eingebettet ist (Spahich 2011).

Bei *H. parasuis* konnte man bereits eine IgA-Protease-Aktivität feststellen, aber das IgA-Proteasegen, welches man bei *H. influenzae* gefunden hatte, ist bei *H. parasuis* nicht nachgewiesen (Mullins 2010). Deshalb wird in letzter Zeit ein besonderer Fokus auf die Entdeckung einer extrazellulären Serin-ähnlichen Protease gelegt, die bis dahin nur bei *H. influenzae* nachgewiesen werden konnte (Pina-Pedrero et al. 2012).

Die extrazellulären Serin-ähnlichen Proteasen gehören zur Familie der Autotransporter. Prinzipiell werden solche Proteine immer als Vorläufer im Bakterium gebildet und haben dann drei Abschnitte: 1. ein N-terminales Signalpeptid, 2. die Passengerdomäne und 3. die C-terminale Translokator-domäne. Letztere bleibt in der Zellwand der gramnegativen Bakterien verankert und schleust das fertige Protein durch eine Pore nach außen (Zhang et al. 2012c). Wei et al. konnten 2014 zum ersten Mal eine extrazelluläre Serin-ähnliche Protease für *H. parasuis* nachweisen. Die ESP können auf Plasmiden oder aber im Chromosom der Bakterien codiert sein (Bonn 2010; Hiery 2013). Für dieses Enzym codieren zwei Genabschnitte (Wei et al. 2014). Für beide Proteine wird aber eine hohe Ähnlichkeit in der Aminosäuresequenz berichtet, was die Vermutung nahelegt, dass es sich bei den zwei Genkopien ursprünglich um ein Duplikat handelte (Xu et al. 2011). Da es sich bei dem Protein um Zellmembranbestandteile handelt,

wurde untersucht, ob sich die extrazelluläre Serin-ähnliche Protease auch als Vakzinekandidat eignet. Das 85 kDa große immunogene Protein muss aber noch weiter untersucht werden (Zhang et al. 2012c).

2.7.4 Äußere Membranproteine (Outer Membrane Proteins)

Ca. 50% der bakteriellen Zellwandmasse bestehen aus Proteinen. Diese äußeren Membranproteine (OMP) sitzen verankert mit dem C-terminalen Ende in der Zellwand gramnegativer Bakterien und erfüllen viele Aufgaben (Koebnik et al. 2000). Die OMPs werden im Zytosol der Bakterien gebildet und durch BAM-Komplexe in der Zellmembran der Bakterien sekretiert (Rossiter et al. 2011; Kim et al. 2012). Sie sind sehr immunogen und Impfungen gegen *H. parasuis* beruhen auf einer Antikörperproduktion gegen diese Proteine (Oliveira und Pijoon 2004).

Das am häufigsten vertretene OMP bei *H. parasuis* ist OMP P2 (Zhou et al. 2009). Es gehört, wie auch das OMP P5 zur Familie der Porine und wurde 2009 zum ersten Mal für *H. parasuis* nachgewiesen (Mullins et al. 2009). OMP P5 ist bei anderen Bakterienspezies unter dem Namen OMP Pa bekannt (Costa-Hurtado et al. 2013). Beide Proteine scheinen eine Serumresistenz zu vermitteln und zeigen in Deletionsexperimenten vermindertes Wachstum. Während sich $\Delta ompP2$ -Mutanten empfindlicher gegenüber Opsonisierung und einer Komplementbindungsreaktion zeigten, konnten $\Delta ompP5$ -Mutanten diesen Mechanismen entgehen (Zhang et al. 2012a). Dieser Unterschied liegt wahrscheinlich in einer geänderten Genexpression der $\Delta ompP5$ -Mutante, welche die sonst drohenden Verluste ausgleicht (Zhang et al. 2012c). Beide Proteine zeigen sich in ihrer Ausbildung sehr variabel innerhalb der Spezies *H. parasuis*. Eine kürzere Variante des OMP P2 führt zu signifikant höherer Serumresistenz (Zhang et al. 2012a). Während Mullins (2009) noch keine Assoziationen zur Virulenz von *H. parasuis* sah, postulieren spätere Studien signifikante Zusammenhänge zwischen den Genen für OMP P2 und P5 und einem klinischen Geschehen im Schwein (Zhang et al. 2014a).

2.7.5 Fimbrien

Die Annäherung und Adhäsion an die Wirtszelle sind eine Grundvoraussetzung für die Infektiosität vieler bakterieller Erreger (Reid und Busscher 1992). Sie kann durch Adhäsine, aber

auch durch Fimbrien vermittelt werden. Für *H. parasuis* wurden Fimbrien erstmalig von Münch et al. per Elektronenmikroskopie nachgewiesen (1992).

Mittlerweile sind mehrere Gene bekannt, die für Fimbrien codieren können. Forschungen am Stamm SH0165 (sog. Nagasaki-Stamm, Serotyp 5) entschlüsselten vier Gene, die für vier Typ-IV-Fimbrien (Pili) codieren: *pilA* bis *pilD*. Ein weiteres Fimbriengen *pilF* wurde später im Stamm ZJ0906 entdeckt (Xu et al. 2011). Ursprünglich wurde es für *Pseudomonas aeruginosa* nachgewiesen, bei denen der Verlust des Gens zu Unbeweglichkeit und Verlust der Fähigkeit zur Pilibildung auf der Zelloberfläche führt (Koo et al. 2008). Diese Fimbrie soll auch bei *H. parasuis* nicht nur zur Anheftung an die Wirtszelle, sondern auch der Beweglichkeit dienen (Li et al. 2013b).

2.7.6 Cytolethal Distending Toxine

Das Cytolethal Distending Toxin (CDT) gehört zur Familie der AB₂-Typ-Toxine und ist funktional eine DNase (Zhou et al. 2012). Die Wirkung des Toxins besteht darin, die Zelle in der G₂-Phase (hämatopoetische Zellen) bzw. M-Phase (Endothelien, Epithelien und Fibroblasten) zu binden. Das Zytoplasma und der Kern dehnen sich durch das Verbleiben in der M-Phase unaufhörlich aus. Die Zelle sieht deshalb aufgebläht (engl. distend) aus, bevor sie durch Apoptose zugrunde geht (Jinadasa et al. 2011). Dieser Vorgang scheint p53-signalabhängig zu sein (Li et al. 2017).

Das Toxin besteht aus drei Untereinheiten. Dabei bilden die Gene *cdtA* und *cdtC* die Bindungs- und Einschleuseeinheit, *cdtB* codiert für die aktive bzw. toxische Einheit, die DNase (Lara-Tejero und Galan 2001). Sobald die CDT-B-Untereinheit in die Wirtszelle eingeschleust ist, wird die DNase aktiv und führt über intrazelluläre Signalwege zum Ausstoß von Zytokinen. Dieser Schritt wird wahrscheinlich durch Permeabilitätsänderungen im Gewebe ausgelöst (Zhang et al. 2012a und 2014a).

Bisher konnte dieses Toxin für einige Bakterienarten, z. B. *E. coli* oder auch *Salmonella* sp. nachgewiesen werden (Jinadasa et al. 2011). Zhou et al. haben zwei Formen des Toxins bereits für *H. parasuis* nachgewiesen und festgestellt, dass die genetische Grundlage in allen von ihnen untersuchten Stämmen vorliegt. Ein Grund für mehrere Kopien der Gene, die für das CDT codieren, könnte die Notwendigkeit einer erweiterten Genausstattung durch Evolution der Säugerzellen sein (Zhou et al. 2012).

Die Unterschiede in der Genausstattung und der tatsächlichen Aktivität des Giftes können durch Punktmutationen in den Untereinheiten des Toxins, bzw. im Operon entstehen (Jinadasa et al. 2011). Verschiedene Untersuchungen zeigten zusätzlich, dass *H. parasuis*-Stämme, die keine CDT-Aktivität besitzen, empfindlich gegenüber Opsonisierung durch den Wirt sind (Costa-Hurtado und Aragón 2013). Außerdem zeigten die Stämme reduzierte Wachstumsraten und eine verschlechterte Anheftung an die Wirtszelle (Zhang et al. 2012b). Durch die toxische Wirkung, bzw. die Zerstörung der Zelle, kommt es zur Ausschüttung von Cytokinen und Interferonen. Deshalb ist das Cytolethal Distending Toxin auch direkt an der Adhäsion an und Invasion in die Wirtszelle beteiligt (Zhang et al. 2012b). Eine geringere Bedeutung scheint das Cytolethal Distending Toxin für das Überleben von *H. parasuis* in der Lunge zu haben. Aus Transkriptomuntersuchungen ist bekannt, dass die Gene, die für das Toxin codieren, in der Lunge herunter reguliert werden (Bello-Orti et al. 2015).

2.7.7 Bakteriophagen

Die Virulenz von Bakterien kann auch mit dem Befall durch einen Bakteriophagen positiv assoziiert sein (Weinbauer und Rassoulzadegan 2004). Der Einbau des Genoms eines Bakteriophagen in die Wirtszelle kann dabei nicht nur Gene ausschalten, sondern auch den lateralen Gentransfer zwischen zwei Bakterien vermitteln. Mu-ähnliche Prophagen aus der Familie *Myoviridae* sind für *H. influenzae* und *Neisseria* sp. bekannt (Morgan et al. 2002). Für *H. parasuis* wurde der Befall mit dem Mu-ähnlichen Bakteriophagen *SuMu* und seine mögliche Rolle bei der Assoziation zur Virulenz diskutiert (Zehr und Tabatabai 2011). Charakteristikum der Virusfamilie ist die doppelsträngige DNA und ein zusammenziehbarer Schwanz. Eines der Schwanzproteine, GP36, könnte mit der Virulenz von *H. parasuis* assoziiert sein. Man vermutet, dass durch den Befall die Heterogenität in der Virulenz bei *H. parasuis* begründet sein könnte (Zehr et al. 2012).

2.7.8 Weitere Virulenzfaktoren

Neben den oben genannten werden noch weitere Eigenschaften von *H. parasuis* als Virulenzfaktoren diskutiert.

Zur Anheftung und Invasion sind unter anderem auch die Lipopoly- und Lipooligosaccharide (LPS und LOS) von Bakterien befähigt. Zwei Gene, die bei der LOS-Synthese beteiligt sind,

wurden beschrieben. *lgtB* und *lex-1* codieren für das Enzym Glykosyltransferase und vermitteln durch die Bildung von Lipooligosacchariden Serumresistenz, Adhäsion und Invasion an und in Wirtszellen (Zhou et al. 2016). Weitere bekannte Enzyme sind die Heptosyltransferasen, die von LPS Heptosen abspalten und so die äußere Zellmembran modifizieren (Zhang et al. 2014a). Die Fähigkeit zur Bildung eines Biofilms scheint ebenfalls mit der Virulenz von *H. parasuis* assoziiert zu sein, wird aber kontrovers diskutiert. Avirulente Stämme von *H. parasuis* scheinen demnach signifikant häufiger einen Biofilm zu bilden als virulente Stämme (Bello-Orti et al. 2014). Tatsächlich beeinflusst die Biofilmbildung die Antibiotikasensibilität: Zhang et al. wiesen nach, dass die Befähigung zur Bildung eines Biofilms mit einer gesteigerten Resistenz gegen β -Lactam-Antibiotika korreliert (2014c). Auch kann der Verbund einzelner Bakterien im Biofilm gegen die Abwehr des Schweins schützen und so das Überleben im Wirt sichern. Diese Eigenschaft korreliert allerdings nicht mit dem Serotyp, eine weitere Untermauerung der These, dass dieser nicht zur Aussage über die Virulenz von *H. parasuis* herangezogen werden kann (Zhang et al. 2014c).

Das Vermögen, den Biofilm durch LOS und Polysaccharide zu bilden, soll stark mit zwei Enzymen assoziiert sein, die in der Nähe des Kapselgens *capD* liegen. Die UDP-Glucose-Pyrophosphorylase synthetisiert aus UTP und Glucose-1-Phosphat UDP-Glucose und die UDP-Glucose-4-Epimerase wandelt das Produkt in einem weiteren Schritt zu UDP-Galactose um (Zou et al. 2013). Diese Glyco-Konjugate sollen eine entscheidende Rolle für die Biofilmbildung und somit die Interaktion zwischen Erreger und Wirt spielen (Zhou et al. 2010a). Daneben wurden weitere Gene, die in der LOS-Synthese wirken, beschrieben (Zhang et al. 2014b).

Zwei weitere mögliche Virulenzfaktoren sind die Virulenz-assoziierten trimerischen Autotransporter 8 und 9. Sie binden an Rezeptoren des angeborenen Immunsystems und verhindern teilweise die Ausschüttung von Zytokinen und Interleukinen, was wie bei anderen VTAA zu einer verspäteten Immunreaktion führt (Costa-Hurtado 2012).

Neben der Adhäsion an Wirtszellen und der Immunevasion, spielt auch die Akquirierung von Nährstoffen aus diesen eine entscheidende Rolle für das Überleben des bakteriellen Erregers im Wirt. Hämolytine sind Proteine, die Erythrozyten auflösen und somit zu einer klinischen Verschlimmerung einer Infektion führen. Sie sind bei einigen Bakterienarten als Virulenzfaktor nachgewiesen. Die bekanntesten Vertreter sind Streptokokken und Staphylokokken (Nizet 2002; Vandenesch et al. 2012). Bei *H. parasuis* konnte bereits ein für Hämolytin codierendes Gen in Isolaten aus Deutschland nachgewiesen werden. Allerdings hatte dieses Gen keinen nachweisbaren Einfluss auf die Pathogenität, da auch Isolate, die dieses Gen nicht aufwiesen,

in klinischen Fällen mit *H. parasuis* vorkamen (Sack und Baltes 2009). Assavacheep zeigte, dass zwar keines seiner *H. parasuis*-Isolate aus der Nase von Schweinen das für Hämolysin codierende *hhdbA*-Gen trug. Wohl aber zeigten auch hier als avirulent geltende Stämme die Genausstattung für das Enzym (2012).

In Transkriptom- und Microarraystudien wurde die Hochregulation von weiteren Genen zur Eisen-, Zucker- und Kohlenstoffbereitstellung für *H. parasuis* nachgewiesen (Melnikow et al. 2005; Bello-Orti et al. 2015). Ein weiteres bekanntes Gen ist das *fur*-Gen, was bei *H. parasuis* die Eisenaufnahme reguliert. Mangelmutanten zeigen eine Störung des intrazellulären Eisenspiegels und sind nicht überlebensfähig (Bigas et al. 2005).

Für *H. parasuis* sind Resistenzgene gegen folgende Antibiotika bzw. Antibiotikaklassen bekannt: β -Lactam-Antibiotika (San Millan et al. 2010), Sulfonamide und Streptomycin (Chen et al. 2012), Tetracycline (Lancashire et al. 2005) und Makrolide (Yang et al. 2013).

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Bakterienstämme und genetisches Material

In dieser Arbeit wurden 46 Stämme vom Mikrobiologischen Institut der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover (TiHo), Außenstelle für Epidemiologie in Bakum (Tabelle 25) sowie 15 Stämme und 77 DNA-Proben der Spezies *Haemophilus parasuis* (*H. parasuis*) von der Klinik für Schweine, JLU Gießen (KWS-S) (Tabelle 26) verwendet. Im Folgenden wird das Wort „Isolat“ für die Gesamtheit der *H. parasuis*-Proben (Stämme und DNA-Proben) verwendet. Die 138 Isolate stammten von insgesamt 101 Tieren (36 aus Bakum, 65 aus Gießen) aus den Jahren 2009 bis 2015 und stellten ausschließlich Feldisolate dar.

3.1.2 Herkunft der Isolate

Untersucht wurden insgesamt 61 Stämme und 77 DNA-Proben von *H. parasuis* aus Organproben. Die Speziesdifferenzierung wurde in Bakum mittels Anzucht und biochemischer Differenzierung durchgeführt. 72 Isolate der KWS-S wurden aus klinischen Fällen allein mittels speziesspezifischer PCR identifiziert. 15 Isolate wurden per Anzucht und biochemischen Verfahren nachgewiesen. Fünf dieser Isolate wurden zusätzlich zur Anzucht auch per PCR nachgewiesen. Die bakteriologische Anzucht der 20 Isolate aus Gießen sowie die darauffolgende Erstellung der Resistenztests wurden vom Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere der JLU Gießen durchgeführt. Alle Proben der KWS-S stammten aus dem Bundesland Hessen. 30 der 46 Isolate aus der TiHo stammten aus Niedersachsen, zehn aus Nordrhein-Westfalen, eines entstammte dem Bundesland Brandenburg und bei fünf Isolaten konnte keine Angabe über die Herkunft gemacht werden. Abbildung 1 zeigt die Herkunft der Isolate aus den beprobten Organen. Dabei wurden einige Entnahmeorte wie folgt in Gruppen zusammengefasst. Nase und Tonsille werden in dieser Arbeit unter „oberer Respirationstrakt“ (ORT) zusammengefasst und nicht weiter differenziert. In gleicher Weise werden Bronchialabstrich, Lungengewebe und Broncho-alveoläre-Lavage-Flüssigkeit als „unterer Respirationstrakt“ (URT) zusammengefasst. Weiterhin erscheinen Herzbeutel-, Brusthöhlen- und Bauchhöhlenabstriche als „Serosen“.

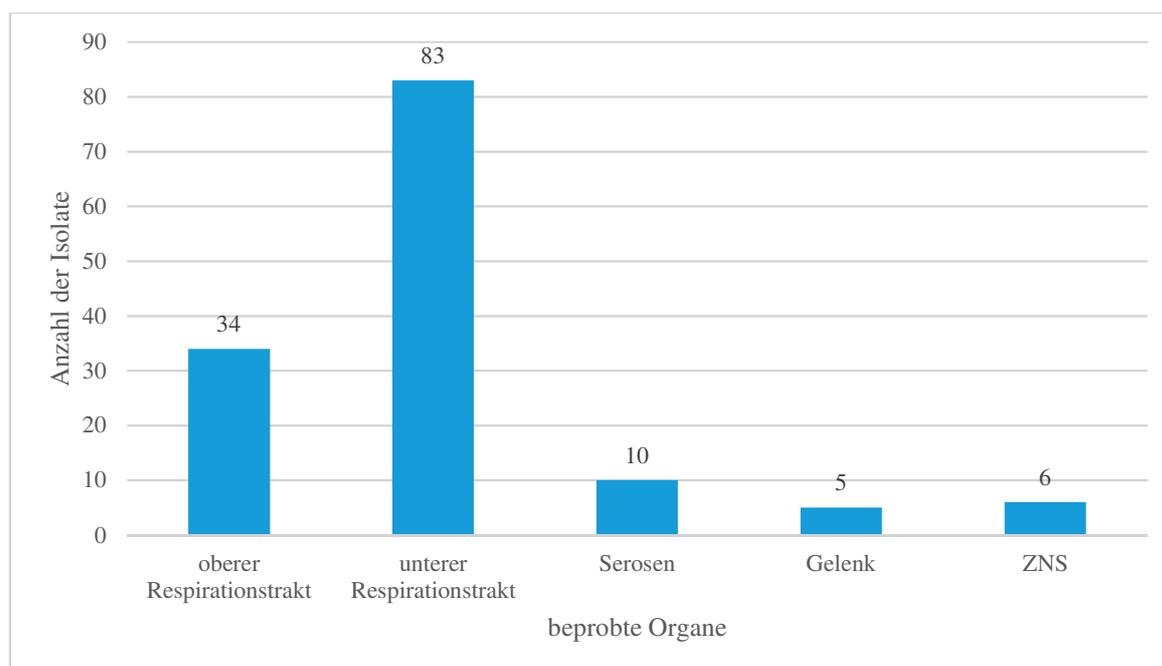


Abbildung 1: Herkunft der untersuchten *H. parasuis*-Isolate nach Organen

ZNS: Zentrales Nervensystem

In 44 Fällen lagen Ergebnisse zur Resistenztestung auf die unten genannten Antibiotika für die Stämme vor: Die Daten lagen für 28 Isolate aus Bakum und 16 Isolate aus Gießen vor. Beide Labore untersuchten folgende zwölf Antibiotika: Amoxicillin allein und in Verbindung mit Clavulansäure, Ceftiofur, Cefquinom, Colistin, Enrofloxacin, Erythromycin, Florfenicol, Gentamicin, Penicillin, Tetracyclin und Trimethoprim-potenzierte Sulfonamide. Zusätzlich wurden elf weitere Antibiotika nur in Bakum untersucht: Ampicillin, Apramycin, Cephalothin, Clindamycin, Lincomycin, Neomycin, Oxacillin, Spectinomycin, Tiamulin, Tilmicosin und Tylosin. Tulathromycin und Marbofloxacin wurden nur in Gießen untersucht (Tabelle 2). Alle Isolate aus Gießen und 15 der Isolate aus Bakum wurden mittels Agardiffusionstest untersucht, 13 Isolate mittels Mikro-Bouillondilution. Da die Isolate von den jeweiligen Instituten zur Verfügung gestellt wurden, konnte kein Einfluss auf das angewendete Testverfahren genommen werden. Die Durchführung und Auswertung erfolgte in beiden Instituten nach CLSI M31-A3 (Clinical and Laboratory Standards Institute 2008). Für Schweine liegen derzeit noch keine tierartspezifischen klinischen Grenzwerte für *H. parasuis* und die angewendeten Testverfahren vor. Daher erfolgte die Interpretation der Befunde, die zum Ergebnis „Sensibel“, „Intermediär“ oder „Resistent“ führte, über eine Ableitung aus dem Verfahren für *A. pleuropneumoniae*. Der Wirkstoff Colistin wurde bei der Auswertung aufgrund von Hinweisen des Clinical and

Laboratory Standards Institute (CSLI) und des European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing EUCAST bezüglich der Möglichkeiten der Befundinterpretation (Matuschek 2017) sowie der fehlenden Zulassung zur Behandlung von *H. parasuis*, nicht weiter berücksichtigt.

Tabelle 2: Untersuchte Antibiotika und angewandte Verfahren (x) zur Empfindlichkeitstestung in den jeweiligen Instituten

Herkunft	Bakum		Gießen
	Mikro-Bouillondilution	Agardiffusion	Agardiffusion
Testsystem →			
Antibiotikum ↓			
Penicillin	x	x	x
Ampicillin	x	x	
Amoxicillin		x	x
Amoxicillin-Clavulansäure	x		x
Oxacillin		x	
Cephalothin	x		
Cefquinom	x		x
Ceftiofur	x	x	x
Trimethoprim-potenzierte Sulfonamide	x	x	x
Florfenicol	x		x
Enrofloxacin	x	x	x
Marbofloxacin			x
Apramycin	x	x	
Gentamicin	x	x	x
Neomycin	x	x	
Spectinomycin	x	x	

Herkunft	Bakum		Gießen
	Mikro- Bouillondilution	Agardiffusion	Agardiffusion
Testsystem →			
Antibiotikum ↓			
Clindamycin	x		
Lincomycin		x	
Erythromycin	x	x	x
Tilmicosin	x		
Tiamulin	x		
Tulathromycin			x
Tylosin		x	
Tetracyclin	x		

Der Großteil der 138 Isolate wurde aus Ferkeln isoliert (Tabelle 4): Nur 31 Isolate entstammten Tieren, die älter als zwölf Wochen bzw. schwerer als 32 kg KGW waren. 56 der Ferkel waren weiblichen und 50 männlichen Geschlechts. Zu 39 Tieren lagen keine Angaben zum Geschlecht vor. In 73 Fällen wurden die Tiere lebend untersucht, vor Ort eingeschläfert und dann direkt in die Pathologie überwiesen und dort untersucht. 19 Tiere waren eines natürlichen Todes verstorben. In Tabelle 25 und Tabelle 26 im Anhang sind die beprobten Organe, Herkunft und das Jahr der Isolation aufgelistet. Alle broncho-alveolären Flüssigkeiten wurden am lebenden Tier im Rahmen der Bestandsdiagnostik unter Narkose gewonnen. Die Isolate aus Gießen entstammten in den meisten Fällen ferkelerzeugenden (n = 37) oder geschlossenen Betrieben (n = 19) sowie 31 reinen Mastbetrieben. Sechs Isolate entstammten anderen Betriebsformen.

Tabelle 3: Definition der Tierkategorie nach Alter und Gewicht

Tierkategorie	Alter [Wochen]	Gewicht [kg]
Saugferkel	1-4	1 bis ca. 7,5
Flatdeck/Aufzucht	ab 4. LW bis 12. LW	7,5 bis ca. 28-32
Mast	ab 12. LW bis Schlachtung	28-32 bis ca. 120

LW: Lebenswoche

Tabelle 4: Alter der der Tiere bei Isolation

Tierkategorie	Anzahl [n]	Verhältnis [%]
Saugferkel	16	11,6
Flatdeck	89	64,5
Mast	31	22,5
unbekannt	2	1,4
gesamt	138	100

3.2 Methoden

Die Isolate aus Bakum wurden von Frau Dr. Regina Tegeler vom Mikrobiologischen Institut der Stiftung TiHo Hannover, Außenstelle für Epidemiologie in Bakum, zur Verfügung gestellt. Die Gießener Isolate entstammten klinischen Fällen aus der Klinik für Schweine (KWS-S) der JLU. Die angezüchteten Stämme und die Resistenztests wurden vom Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere der JLU Gießen durchgeführt und zur Verfügung gestellt. Die Serotypisierungen wurden von der IVD Gesellschaft für innovative Veterinärmedizin mbH durchgeführt. Die molekulare Analyse der Isolate wurde selbstständig im Labor der KWS-S der JLU Gießen durchgeführt.

3.2.1 Auswahl der Stämme

Die untersuchten Isolate entstammten ausnahmslos Betrieben und Fällen, bei denen im Rahmen der Bestandsdiagnostik *H. parasuis* nachgewiesen werden konnte. Für 86 % der Fälle lag eine pathologisch-anatomische, für 44 % der Fälle zusätzlich eine pathohistologische Untersuchung vor. Die pathologisch-anatomische und histologische Untersuchung wurde von den Pathologen der entsprechenden Einrichtung durchgeführt. Eine interstitielle Pneumonie konnte leider nicht vollständig nachgewiesen werden, da nur in 52 Fällen auch eine histologische Untersuchung vorlag. Als makroskopischer Hinweis auf eine interstitielle Pneumonie wurde eine mäßig bis schlechte Retraktion der Lunge angenommen.

Da ausschließlich klinische Fälle aus Praxisbetrieben beprobt wurden, musste stets von Mischinfektionen der Schweine mit anderen Erregern ausgegangen werden. Die Co-Erreger wurden kulturell und per PCR erfasst, dienten in der vorliegenden Arbeit jedoch nur zur Unterstützung der Abschätzung der Rolle von *H. parasuis* im Krankheitsgeschehen.

3.2.2 Einteilung nach Krankheitskategorie (KKat)

Zur Abschätzung der Rolle von *H. parasuis* im Krankheitsgeschehen der untersuchten *H. parasuis*-positiven Tiere wurden diese in vier Krankheitskategorien eingeteilt.

Schweine der Kategorie 0 – es wurden keinerlei Organveränderungen festgestellt.

Schweine der Kategorie 1 – Schweine mit pathologisch-anatomischen Organbefunden, die nicht als *H. parasuis*-spezifisch angesehen und auf die Existenz von Co-Erregern zurückgeführt wurden. Hierzu zählten die Reinformen der interstitiellen und eitrig-nekrotisierenden Pneumonien. Weiterhin eine katarrhalisch-eitrig Bronchopneumonie in Verbindung mit mittel- bis hochgradigem Nachweis von Co-Erregern sowie fehlendem *H. parasuis*-Nachweis. Außerdem Schweine mit purulenten Entzündungen anderer Organe in Verbindung mit dem Nachweis von Co-Erregern. Traumata wurden ebenso in diese KKat eingestuft.

Kategorie 2 – Schweine mit leichten *H. parasuis*-spezifischen klinischen Befunden in Kombination mit mittel- bis hochgradigem Co-Erregernachweis und fehlendem bis geringgradigem *H. parasuis*-Nachweis in den betroffenen Organen. Hierzu zählten auch purulente Arthritiden und Leptomeningitiden sowie Serositiden, eine katarrhalisch-eitrig Bronchopneumonie und fibroplastische Entzündungen.

Kategorie 3 – Schweine mit *H. parasuis*-spezifischen Befunden, hochgradigem Nachweis von *H. parasuis* und keinem bzw. nur geringgradigem Nachweis von Co-Erregern. Als *H. parasuis*-spezifisch wurde angesehen, wenn die untersuchten Organe sero-fibrinös verändert waren. Auch fibrino-purulente Arthritiden waren in Kombination mit dem Nachweis des Erregers ein hochgradig spezifischer Befund. In chronischen Fällen galten auch Synechien und Fibrosen der Gewebe als *H. parasuis*-spezifischer Befund.

In Tabelle 5 sind die einzelnen Parameter zur Einteilung der Krankheitskategorien beschrieben.

Tabelle 5: Einteilung der Krankheitskategorien (KKat) auf Basis der Organbefunde sowie des Nachweises von *H. parasuis* und anderer Erreger im beprobten Organ bzw. Tier

Organbefund	Co-Erreger	HPS NW im Organ	Bemerkungen/ Sonstiges	KKat
o. b. B.	unspezifisch und ggr.	nein	HPS nur auf Tonsille positiv	0
Interstitielle Pneumonie (IP)	mgr. – hgr.	nein	HPS nur auf Tonsille positiv	1
Eitrig-nekrotisierende Pneumonie	mgr. – hgr.	nein	HPS nur auf Tonsille positiv	
Katarrhalisch-eitrige Bronchopneumonie (BP)		nein	HPS nur auf Tonsille positiv	
Katarrhalisch-eitrige BP (+ IP)	SIV und/oder <i>B. bronchiseptica</i> \geq ++ und/oder toxinogene <i>P. multocida</i> \geq ++, PRRSV pos.	ja	HPS ggr., nur Lunge betroffen	
Katarrhalisch-eitrige BP (+ IP)	PCV2 \geq 10^6 und/oder <i>M. hyopneumoniae</i> \geq 10^3	ja	nur Lunge betroffen	

Organbefund	Co-Erreger	HPS NW im Organ	Bemerkungen/ Sonstiges	KKat
Purulente Arthritis	<i>S. suis</i> \geq ++ und/oder <i>E. coli</i> \geq ++ und/oder <i>M. hyosynoviae</i> und/oder <i>M. hyorhinitis</i> pos.	nein	HPS in anderem Organ ggr. positiv	
Purulente Leptome- ningitis	<i>S. suis</i> : ++ bis +++ oder <i>E. coli</i> ++ bis +++	nein		
Purulente Serositis	<i>S. suis</i> : ++ bis +++ oder <i>E. coli</i> ++ bis +++	nein	HPS in anderem Organ (Lunge) positiv	
purulente Leptome- ningitis	<i>S. suis</i> +	nein	HPS in anderem Organ (Lunge) positiv, Hemm- stofftest positiv	
Purulente Leptome- ningitis	<i>S. suis</i> ++ bis +++ oder <i>E. coli</i> ++ bis +++	ja		
sonstiger Befund	Co-Erreger ++ bis +++	nein	HPS nur auf Tonsille positiv	
Purulente Arthritis	<i>S. suis</i> \geq ++ und/oder <i>E. coli</i> \geq ++ und/oder <i>M. hyosynoviae</i> und/oder <i>M. hyorhinitis</i> pos.	ja		2
Katarrhalisch-eitrige BP (+IP)	SIV pos., sonstige Co- Erreger ggr. /negativ	ja	Hemmstofftest positiv und/oder sonstige	

Organbefund	Co-Erreger	HPS NW im Organ	Bemerkungen/ Sonstiges	KKat
			Organe HPS typisch, aber kein Nachweis	
Katarrhalisch-eitrige BP	unspezifisch bzw. ggr.	ja		
Fibroplastische Ent- zündung		nein	Hemmstofftest positiv, anamnestisch bekannte antibiotische Behand- lung, HPS in anderem Organ positiv	
Fibroplastische Ent- zündung	Co-Erreger ++ bis +++	nein	HPS in anderem Organ mgr. bis hgr. positiv	
Katarrhalisch-eitrige BP (+IP)	SIV und/oder PRRSV und/oder <i>B. bron-</i> <i>chiseptica</i> \geq ++ und/ oder Toxingen besit- zende <i>P. multocida</i> \geq ++	ja	weitere pathologisch- anatomische Befunde sprechen für Beteiligung von HPS (fibrinöse Se- rositis, fibrinöse Arthri- tis, Ergüsse in KH und Gelenken), typische PRDC	
Eitrige Leptomenin- gitis	<i>S. suis</i> und/oder <i>E.</i> <i>coli</i> + bis ++	nein	HPS in anderem Organ positiv, Klinik HPS spe- zifisch, Hemmstofftest positiv	
Katarrhalisch-eitrige BP	unspezifisch bzw. ggr.	ja		
Purulente Meningi- tis	unspezifisch bzw. ggr.	ja		

Organbefund	Co-Erreger	HPS NW im Organ	Bemerkungen/ Sonstiges	KKat
Purulente Serositis und/oder Synechien der serösen Häute	unspezifisch bzw. ggr.	ja		
Fibrinöse Entzündung		nein	HPS in anderem Organ ≥ ++, Hemmstofftest pos., (Kümmerer)	
Fibrinöse Entzündung	unspezifisch bzw. ggr.	ja		
Fibrino-purulente Arthritis	unspezifisch bzw. ggr.	ja		
Fibroplastische Entzündung	unspezifisch bzw. ggr.	nein	HPS in anderem Organ ++ bis +++ (BU) oder pos. (PCR), Kümmerer, Hemmstofftest positiv	3
Katarrhalisch-eitrige BP (+IP)	Keine/unspezifische Co-Erreger; <i>M. hyorhina</i> nur in Lunge positiv	ja	Hemmstofftest positiv, evtl. HPS-spezifische Klinik (+NW)	

B.: *Bordetella*; BP: Bronchopneumonie; BU: bakteriologische Untersuchung; ggr.: geringgradig; *E. Escherichia*; hgr.: hochgradig; HPS: *H. parasuis*; IP: interstitielle Pneumonie; KH: Körperhöhle; KKat: Krankheitskategorie; M.: Mykoplasma; mgr.: mittelgradig; NW: Nachweis; o. b. B.: ohne besonderen Befund; P.: *Pasteurella*; PCR: Polymerase Chain-Reaction; pos.: positiv; PCV2: Porcine Circovirus Typ 2; PRDC: Porcine Respiratory Disease Complex; PRRSV: Porzines Reproduktives und Respiratorisches Syndrom Virus; SIV: Schweine-Influenza Virus; +: geringgradig; ++: mittelgradig; +++: hochgradig;

Tabelle 6: Zusammenfassende Einteilung der Krankheitskategorien

Krankheitskategorie	Bedeutung
0	keine Organbefunde
1	Organbefunde und Co-Erreger, keine <i>H. parasuis</i> -Organbefunde
2	leichte <i>H. parasuis</i> -Organbefunde
3	hochgradig <i>H. parasuis</i> -spezifische Organbefunde

3.2.3 Molekulargenetische Untersuchungen

Die molekulargenetischen Untersuchungen wurden selbstständig im Labor der Klinik für Schweine der JLU Gießen durchgeführt.

3.2.3.1 Vorbereitung des Probenmaterials

Die Isolation der DNA aus den Proben wurde mit dem Instant Virus RNA Kit® der Firma Analytik Jena AG (Jena, GER) durchgeführt. Dieses Kit hatte sich in dieser Fragestellung in zahlreichen Vorversuchen als den anderen Tests überlegen erwiesen.

Gewebe

In ein 2 ml Reaktionsgefäß wurden ca. 25-50 mg Gewebe, 450 µl Lysispuffer und eine 5 mm Stahlkugel gegeben. Das Reaktionsgefäß wurde in eine Kugelmühle (MM300) eingespannt und das Gewebe bei 25 Hz für 2 min zerkleinert. Anschließend wurde das Gefäß bei Raumtemperatur (RT) für 30 min inkubiert. Um noch vorhandene Gewebestückchen abzutrennen, wurde die Probe im Anschluss bei 16.000 x g für 3 min zentrifugiert. Der Überstand wurde für die Extraktion der DNA in ein 2 ml Reaktionsgefäß pipettiert.

Tupfer

Der Tupfer wurde kurz oberhalb des Tupfermaterials abgeschnitten und in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 450 µl Lysispuffer wurde die Probe bei RT für 30 min inkubiert.

Kulturmaterial

Das Kulturmaterial wurde mit einer Impföse von der Agarplatte abgenommen, in 450 µl Lysispuffer resuspendiert und bei RT für 30 min inkubiert.

3.2.3.2 Isolation der DNA

Zu dem vorbereiteten Probenmaterial (Kap. 6.2.3.1) wurden 450 µl Binding solution RBS gegeben und geschüttelt. Hiervon wurden 650 µl auf eine Zentrifugationssäule pipettiert, die sich in einem Auffanggefäß befand, und bei 10.000 x g für 1 min zentrifugiert. Die Säule wurde in ein neues Auffanggefäß gesetzt und die restliche Probe auf die Säule pipettiert und wie oben zentrifugiert. Anschließend erfolgten zwei Waschschrirte: beim ersten Waschschrirte wurden 500 µl Waschlösung HS auf die Säule pipettiert und 1 min bei 16.000 x g zentrifugiert. Nach Umsetzen der Säule in ein neues Auffanggefäß wurde gleichermaßen mit Waschlösung LS verfahren, nur dass 3 min bei 16.000 x g zentrifugiert wurde. Danach wurde die Säule in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gesetzt und 60 µl RNase-freies Wasser hinzu pipettiert. Nach einer 3minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde bei 8.000 x g für 1 min zentrifugiert. Die eluierte DNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

3.2.3.3 Konzentrationsmessung der Proben-DNA

Die Konzentrationsmessung der Proben-DNA erfolgte am Spektrometer Nanodrop 2000c der Firma Thermo Fisher Scientific (Wilmington, Delaware, USA). Hierfür wurde 1 µl der Proben-DNA auf die Messfläche des Gerätes pipettiert und ein Spektrum von 220 bis 350 nm aufgenommen. Die Konzentration der DNA wurde anhand der Absorption bei 260 nm vom Gerät automatisch berechnet und in ng/µl ausgegeben.

3.2.3.4 Auswahl und Herstellung der Primer (Primerdesign)

Für folgende Virulenzfaktoren von *H. parasuis* wurden Primerpaare entwickelt: Kapselgen (*capD*), Gene für äußere Membranproteine (*ompp2* und *ompp5*), Gene für Virulenz-assoziierte trimerische Autotransporter (*vtaA1*, *vtaA2* und *vtaA3*), Cytolethal Distending Toxingen (*cdtA*, *cdtB*, *cdtC*), Fimbriengen (*pilF*), Bakteriophagen-Gen (*gp36*), und Gene für extrazelluläre Serin-ähnliche Proteasen (*espP2a* und *espP2b*). Die Primersequenzen für die Gene der Gruppen 1 bis 3 der Virulenz-assoziierten trimerischen Autotransporter *vtaA1*, *vtaA2* und *vtaA3*, sowie für das Bakteriophagen-Gen *gp36* wurden aus der Literatur übernommen (Olvera et al. 2012; Zehr et al. 2012). Alle anderen Primer wurden selbst entwickelt. Dazu wurden die Sequenzen der Virulenzgene aus der NCBI-Datenbank extrahiert und die Primer mit der Software OLIGO

4.0 (Vondelpark, USA) konstruiert. Die Primersequenzen wurden mit dem *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) gegen alle Sequenzen der NCBI-Nucleotiddatenbank auf ihre Spezifität für *H. parasuis* abgeglichen (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). Alle Primer wurden von der Firma Biolegio (Nimwegen, NL) hergestellt.

Für das Kapselgen *capD* wurden zwei Primerpaare eingesetzt. Bei dem ersten Primerpaar (CapDPF/CapDPR) wurde der Vorwärtsprimer (CapDPF) in die Promotorregion des Gens gelegt, während das zweite Primerpaar (CapDF/CapDR) vollständig im *capD*-Gen lag. Das zweite Primerpaar (CapDF/CapDR) war gegen interne Sequenzen des *capD*-Gens gerichtet.

Vom Cytolethal Distending Toxingen liegen laut Literatur zwei nicht identische Kopien im Genom von *H. parasuis* vor (Zhou et al. 2012), die aus drei Untereinheiten (*cdtA*, *cdtB* und *cdtC*) bestehen. Zur Amplifikation wurden daher für beide Kopien und für alle drei Untereinheiten Primerpaare entwickelt (Kopie 1: Primerpaare CDT1F/CDT1R, CDT2F/CDT2R und CDT3F/CDT3R; Kopie 2: Primerpaare CDT4F/CDT4R, CDT5F/CDT5R und CDT6F/CDT6R). Ebenso wird von zwei Kopien des Serin-ähnlichen Proteasegens im Genom von *H. parasuis* berichtet (Wei et al. 2014). Hierfür wurde je ein Primerpaar (ESPP2aF/ESPP2aR und ESPP2bF/ESPP2bR) entwickelt.

In Tabelle 7 sind die verwendeten Primer (Bezeichnungen und Sequenzen), die Amplifikatgrößen und die optimalen Annealing-Temperaturen (Kap. 6.2.3.6) aufgelistet.

Tabelle 7: Verwendete Primer

Primerbezeichnung	Amplifikatgröße (bp)	Primersequenz (5' → 3')	AT
CapDPF	437	GAT ACG GGG TAT TCA GAT GAA AT	55°C
CapDPR		ATA CCA CAA ACG ATC AAA CTT GC	
CapDF	531	GGT TCA GAA TGT ACT TCA AGC	55°C
CapDR		AGT AAT TTA CGA GGC TGA TTG C	
CDT1F	801	GCC AAG CGA TTG ATG AAG A	55°C
CDT1R		GTG GTA CTC ACC GCA TTG	
CDT2F	653	TTG CAG AGT TCC GTT GTA AAT T	55°C

Primerbezeichnung	Amplifikatgröße (bp)	Primersequenz (5' → 3')	AT
CapDPF	437	GAT ACG GGG TAT TCA GAT GAA AT	55°C
CapDPR		ATA CCA CAA ACG ATC AAA CTT GC	
CDT2R		GTG GTA CTC ACC GCA TTG	
CDT3F	704	CCA TTA TAG GAG GAA AAA TGA CGT T	60°C
CDT3R		TGG GTA GGT TCC GTT GGT GC	
CDT4F	201	ATT ATG CAG TGT TAC ACA ATG C	Touchdown ³
CDT4R		TTC TGC AAG GGA AAA CTG	
CDT5F	2244	CAC CGG AAC CAA ATG G	57°C
CDT5R		GTG GTA CTC ACC GCA TTG	
CDT6F	621	AAG TAA ACA TTG ACT ATA GAT TTT CTC	Touchdown ³
CDT6R		GTG GTA CTC ACC GCA TTG	
GP36F ¹	228	CGA TGT TGA AGA TTT TGT TGT CC	57°C
GP36R ¹		TTA CTG GTC AGA TGA TAA CGA GC	
ESPP2aF	347	TTG ATA AGC AAA AAG GTT GG	Touchdown ³
ESPP2aR		ATT AGA GTC GTA ACG CTC AGT	
ESPP2bF	421	CTT ATT GGG CAA GTG GAG TC	57°C
ESPP2bR		GCA ACA ACG TTT CCT GTC TTA A	
PILFF	211	TAA TTT GGC TCT TGC TTA CCT TG	57°C
PILFR		GCG AAC TTG ATT GTT TTT GCT C	
OMPP2F	552	GGT CAA TTG CGT CTT CTT TTA GA	57°C
OMPP2R		TTC CGC AAT CTT AGC TGT GTA TT	
OMPP5F	338	AAA AAT CTT TAA TTG CAT TAG C	57°C
OMPP5R		GTG TGT ACC GTG TGC AGA G	
VTAA1F ²	406	AGG TAA AGA TAA GCA AGG AAA TCC	60°C

Primerbezeichnung	Amplifikatgröße (bp)	Primersequenz (5' → 3')	AT
CapDPF	437	GAT ACG GGG TAT TCA GAT GAA AT	55°C
CapDPR		ATA CCA CAA ACG ATC AAA CTT GC	
VTAA1R ²		CAA AAC CTA CCC CTC CTC	
VTAA2F ²	294	TTA ATA TCT CAG CAC AAG GTG C	60°C
VTAA2R ²		ATA ACC TAC CCC CAC AGA G	
VTAA3F ²	291	AAT GGT AGC CAG TTG TAT AAT GTT GC	60°C
VTAA3R ²		CCA CTG TAA TGC AAT ACC TGC ACC	

Die Primersequenzen sind in 5' → 3' Richtung angegeben.

AT: Annealing-Temperatur; bp: Basenpaare; F: Forward-Primer; R: Reverse-Primer

¹ Primer wurden aus der Literatur übernommen (Zehr et al. 2012).

² Primer wurden aus der Literatur übernommen (Olvera et al. 2012).

³ Bedingungen für die Touchdown-PCR siehe Tabelle 9

3.2.3.5 Konzentrationsbestimmung der Primer

Zur Konzentrationsbestimmung der Primer wurden 10 µl Primerlösung mit 390 µl TE-Puffer verdünnt und die Absorption photometrisch gemessen (Photometer Ultrospec 1100pro der Firma Biochrom, Cambridge, UK). Die DNA-Konzentration wurde nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz berechnet:

$$A = \epsilon * c * d$$

A: Absorption (Extinktion) bei 260 nm abzüglich der Absorption bei 320 nm

ϵ : Extinktionskoeffizient [L/mol*cm]

c: Konzentration der Lösung [mol/L]

d: Schichtdicke des durchstrahlten Materials [cm]

Nach Umstellung der Gleichung und unter Beachtung des Verdünnungsfaktors der Lösung gilt also für die Konzentration:

$$c = A/\varepsilon * d * VF \text{ [mol/L]}$$

Der Extinktionskoeffizient ist bei Oligonukleotiden von deren Basenzusammensetzung abhängig. Deshalb wurde er für den jeweiligen Primer einzeln nach folgender Formel berechnet:

$$\varepsilon = (15200 * \#A) + (7050 * \#C) + (12010 * \#G) + (8400 * \#T)$$

#A = Anzahl Adeninbasen

#C = Anzahl Cytosinbasen

#G = Anzahl Guaninbasen

#T = Anzahl Thyminbasen des Oligonukleotids

Anschließend wurden anhand der berechneten Konzentrationen 20 μ M Stammlösungen der Primermixe (Vorwärts- und Rückwärtsprimer je 10 μ M) hergestellt. Diese wurden mit TE-Puffer auf eine 4 μ M Gebrauchslösung verdünnt, die dann für die PCR verwendet wurde.

3.2.3.6 Ermittlung der optimalen Annealing-Temperatur

Um die optimale Temperatur für das Anlagern der Primer zu bestimmen, wurden für jeden Primermix mehrere PCR-Ansätze bei unterschiedlichen Annealing-Temperaturen durchgeführt (Gradientencycler TGradient, Biometra, Göttingen, GER). Als Startpunkt diente die von Oligo 4.0 errechnete optimale Annealing-Temperatur.

Die Zusammensetzung der PCR-Ansätze ist in Tabelle 8 und das PCR-Programm in Tabelle 9 wiedergegeben.

3.2.3.7 Polymerasekettenreaktion (Polymerase Chain-Reaction, PCR)

Alle PCR wurden mit dem 2x Multiplex Mastermix (2xMM) Kit der Firma Qiagen (Hilden, GER) durchgeführt. Die Proben-DNA wurde auf eine Konzentration von 100 ng/ μ l eingestellt. Das Gesamtvolumen des PCR-Ansatzes betrug 10 μ l (Tabelle 8).

Tabelle 8: Zusammensetzung für einen 10 μ l PCR-Ansatz

Reagenz	Volumen
2xMM	5 μ l
Primermix (4 μ M)	1 μ l
Wasser	3 μ l
DNA	1 μ l

DNA: Deoxyribonucleic acid; MM: Mastermix; PCR: Polymerase Chain Reaction (Polymerase-Kettenreaktion)

Das Thermocyclerprogramm (Tabelle 9) war bis auf drei Primerpaare für alle Primerpaare identisch, lediglich die Annealing-Temperaturen variierten. Für drei Primerpaare (Tabelle 7) wurde eine Touchdown-PCR (Tabelle 10) verwendet. Hierbei wird die Annealing-Temperatur, startend 10°C über der errechneten Annealing-Temperatur von 65°C je Zyklus um 1°C gesenkt, bis nach zehn Zyklen die optimale Annealing-Temperatur von 55°C erreicht ist. Bei der optimalen Annealing-Temperatur von 55°C werden dann die restlichen 30 Zyklen durchgeführt.

Tabelle 9: Thermocyclerprogramm zur Durchführung der PCR

Arbeitsschritt	Temperatur (°C)	Dauer (min)	Vorgang	# Zyklen
1	95	15	Aktivierung der DNA-Polymerase	1
2	95	0,5	Denaturierung	35
	berechnete AT	1,5	Annealing (Anheften der Primer)	
	72	1	Extension (Verlängerung)	
3	72	10	Abschließende Verlängerung	1
4	4	∞	Stoppen der Reaktion	

AT: Annealing-Temperatur; DNA: Deoxyribonucleic acid; MM: Mastermix; PCR: Polymerase Chain Reaction (Polymerase-Kettenreaktion)

Tabelle 10: Touchdown-PCR Programm

Arbeitsschritt	Temperatur (°C)	Dauer (min)	Vorgang	# Zyklen
1	95	15	Aktivierung der DNA-Polymerase	1
2	95	0,5	Denaturierung	9
	65 bis 55 ¹	1,5	Annealing (Anheften der Primer)	
	72	0,5	Extension (Verlängerung)	
3	95	0,5	Denaturierung	30
	55	1,5	Annealing (Anheften der Primer)	

Arbeitsschritt	Temperatur (°C)	Dauer (min)	Vorgang	# Zyklen
	72	0,5	Extension (Verlängerung)	
4	72	10	Abschließende Verlängerung	1
5	4	∞	Stoppen der Reaktion	

¹pro Zyklus wird die Annealing-Temperatur um 1°C gesenkt.

DNA: Deoxyribonucleic acid; MM: Mastermix; PCR: Polymerase Chain Reaction (Polymerase-Kettenreaktion)

3.2.3.8 Gelelektrophorese

Für die Gelelektrophorese wurde ein 1,5 %iges Agarosegel mit Midori-Green (1 µl auf 100 ml Gel) als Farbstoff hergestellt. Die Geltaschen wurden mit 4 µl PCR-Produkt beschickt. Anschließend wurde eine Spannung von 120 V für 20 min angelegt. Als Längenstandard wurde eine 100 bp-Leiter (Life Technologies, Carlsbad, USA) in der mittleren Geltasche aufgetragen. Die Gele wurden bei einer Wellenlänge von 260 nm digital fotografiert und archiviert.

3.2.4 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit dem Programm IBM SPSS Statistics Version 23 (Fa. IBM Deutschland GmbH, Ehningen). Zur graphischen Darstellung der Ergebnisse diente Microsoft Office Excel 2016.

Die jeweiligen Signifikanzwerte (p) wurden mittels χ^2 -Test nach Pearson berechnet. Als Schwellenwert für die statistische Signifikanz wurde grundsätzlich $p \leq 0,05$ angenommen. Im Fall von geringen Probenzahlen wurde der exakte Test nach Fisher angewandt. Unterschiede an der Signifikanzgrenze wurden mit angegeben.

4 Ergebnisse

4.1 Serotypen

4.1.1 Zusammenfassende Betrachtung

Insgesamt wurden 34 der 138 untersuchten Isolate per indirektem Hämagglutinationshemmtest serotypisiert. 18 der serotypisierten Isolate stammten aus dem Einzugsgebiet der Außenstelle für Epidemiologie der TiHo Hannover in Bakum, 16 aus dem Einzugsgebiet der Klinik für Schweine der JLU Gießen. Für acht der Proben wurden gleichzeitig mehrere Serotypen mit gleichwertiger Reaktion nachgewiesen, sodass sich eine Gesamtzahl von 45 ergibt.

In Abbildung 2 und Tabelle 11 ist die prozentuale Verteilung der einzeln nachgewiesenen Serotypen dargestellt. Es zeigte sich eine weitgehend homogene Verteilung. Am häufigsten wurde Serotyp 13 (13 %) nachgewiesen, gefolgt von Serotyp 2 und 9, sowie den nicht typisierbaren Isolaten (je 11 %). Die Serotypen 1, 4, 6, 7, 12 und 15 kamen mit einer Verteilung von je 7 % vor. Die Serotypen 8 und 14 wurden nicht nachgewiesen.

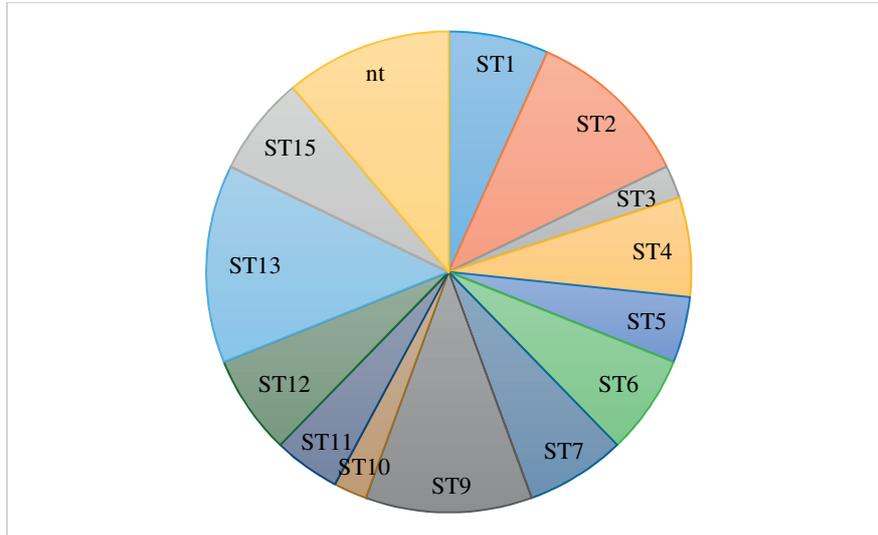


Abbildung 2: Verteilung der einzeln nachgewiesenen Serotypen [n=45] in den serotypisierten Isolaten [n=34].

nt: nicht typisierbar; ST: Serotyp

Mehrfachnachweise mit gleichwertigen Reaktionen sind enthalten. Für detaillierte Angaben siehe Tabelle 11 und Tabelle 12.

4.1.2 Einfluss der Herkunft

Abbildung 3 zeigt die prozentuale Verteilung der einzelnen Serotypen verteilt auf die beiden Herkunftsorte Bakum und Gießen. Im Bakumer Probenmaterial kam der Serotyp 13 am häufigsten vor (15 %), gefolgt von den Serotypen 1, 7 und 12 (je 12 %). Die Serotypen 8, 10 und 14 konnten nicht nachgewiesen werden. Im Gießener Probenmaterial wurden die nicht serotypisierbaren Isolate (21 %) am häufigsten nachgewiesen. Serotyp 2 und 9 waren mit je 16 % die am häufigsten nachgewiesenen Serotypen. Die Serotypen 1, 3, 5, 7, 10, 12 und 14 kamen in den Gießener Proben nicht vor.

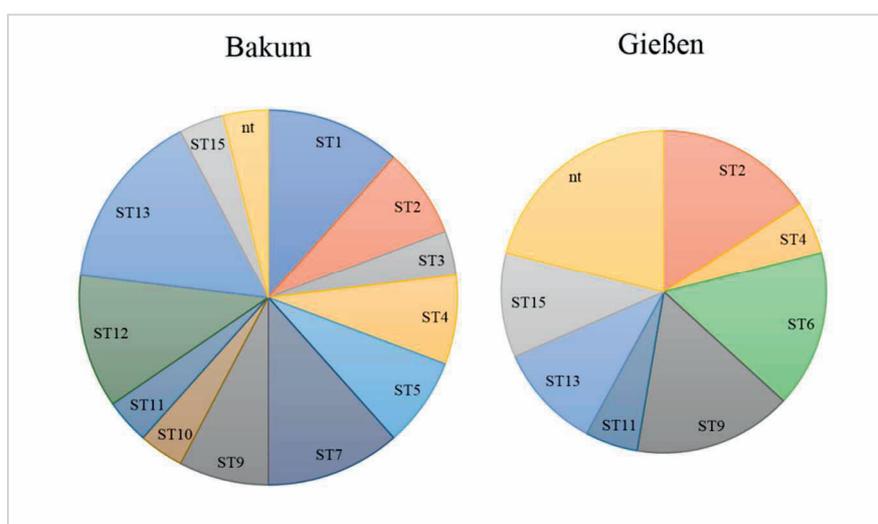


Abbildung 3: Serotypenverteilung [n = 45 Serotypen] nach Herkunftsorten Bakum [n = 26; links] und Gießen [n = 19; rechts]

nt: nicht typisierbar; ST: Serotyp

Mehrfachnachweise mit gleichwertigen Reaktionen sind enthalten.

In Tabelle 11 ist das Auftreten der einzelnen Serotypen verteilt auf ihre Herkunft dargestellt. Zusätzlich zur Fallzahl (n) sind die prozentualen Werte angegeben. Die Signifikanzen wurden über einen χ^2 -Test nach Pearson bestimmt.

Tabelle 11: Verteilung der einzelnen Serotypen insgesamt [n = 45] und nach Herkunfts-ort der Proben (Bakum [n = 26] und Gießen [n = 19])

Herkunft →	Insgesamt		Bakum		Gießen		Signifikanz- wert [p]
	abs. [n]	rel. [%]	abs. [n]	rel. [%]	abs. [n]	rel. [%]	
Gesamt	45	100	26	100	19	100	-
1	3	6,7	3	11,5	0	0	n. s.
2	5	11,1	2	7,7	3	15,8	n. s.
3	1	2,2	1	3,8	0	0	n. s.
4	3	6,7	2	7,7	1	5,3	n. s.
5	2	4,4	2	7,7	0	0	n. s.
6	3	6,7	0	0	3	15,8	0,054
7	3	6,7	3	11,5	0	0	0,087
8	0	0	0	0	0	0	n. s.
9	5	11,1	2	7,7	3	15,8	n. s.
10	1	2,2	1	3,8	0	0	n. s.
11	2	4,4	1	3,8	1	5,3	n. s.
12	3	6,7	3	11,5	0	0	0,087
13	6	13,3	4	15,4	2	10,5	n. s.
14	0	0	0	0	0	0	n. s.
15	3	6,7	1	3,8	2	10,5	n. s.
nt	5	11,1	1	3,8	4	21,1	n. s.

abs.: absolut; n. s.: nicht signifikant; nt: nicht typisierbar; rel.: relativ; die jeweiligen Signifikanzwerte (p) wurden mittels χ^2 -Test nach Pearson berechnet; Unterschiede an der Signifikanzgrenze wurden mit angegeben

Serotyp 6 kam ($p = 0,054$) häufiger in den Gießener Proben, als in den Proben des Einzugsbereichs von Bakum vor. Eine der Proben mit Serotyp 6 zeigte eine gleichwertige Reaktion auf Serotyp 15. Tabelle 12 fasst die Mehrfachnachweise im indirekten Hämagglutinationshemmtest zusammen. In sechs der acht Fälle handelt es sich um Bakumer Isolate.

Tabelle 12: Stämme mit zwei oder mehreren gleichwertig positiven Serotyp-Reaktionen im indirekten Hämagglutinationshemmtest

Herkunft →	Insgesamt		Bakum		Gießen		Signifikanzwert [p]
	abs. [n]	rel. [%]	abs. [n]	rel. [%]	abs. [n]	rel. [%]	
Gesamt	8	100	6	100	2	100	n. s.
1, 7, 13	1	12,5	1	16,7	0	0	n. s.
1, 15	1	12,5	1	16,7	0	0	n. s.
2, 7	2	25,0	2	33,3	0	0	n. s.
3, 5, 12	1	12,5	1	16,7	0	0	n. s.
5, 13	1	12,5	1	16,7	0	0	n. s.
6, 15	1	12,5	0	0	1	50	n. s.
9, 13, 15	1	12,5	0	0	1	50	n. s.

abs.: absolut; n. s.: nicht signifikant; rel.: relativ; dargestellt sind die absolute Anzahl der Kombinationen (n) und deren relativer Anteil (%); die jeweiligen Signifikanzwerte (p) wurden mittels χ^2 -Test nach Pearson berechnet; Unterschiede an der Signifikanzgrenze wurden mit angegeben

4.2 Virulenzfaktoren

4.2.1 Zusammenfassende Betrachtung

In dieser Arbeit wurden 138 Isolate (66 Stämme und 72 DNA-Proben) mittels PCR auf 10 potenzielle Virulenzfaktoren untersucht. 46 dieser Isolate stammten aus Bakum, 92 aus Gießen. Die Entnahmeorte sind in Abbildung 1, Kap. 3.1.2 dargestellt. Wie im Folgenden aus Abbildung 4 zu ersehen ist, kamen alle untersuchten Virulenzfaktoren im Probenmaterial vor. Die meisten der Virulenzfaktoren fanden sich bei 80 bis 90 % der Isolate. Das Bakteriophagen-Gen *gp36* und das Kapselgen *capD* konnten lediglich in 59 % bzw. 21,2 % der Fälle nachgewiesen werden.

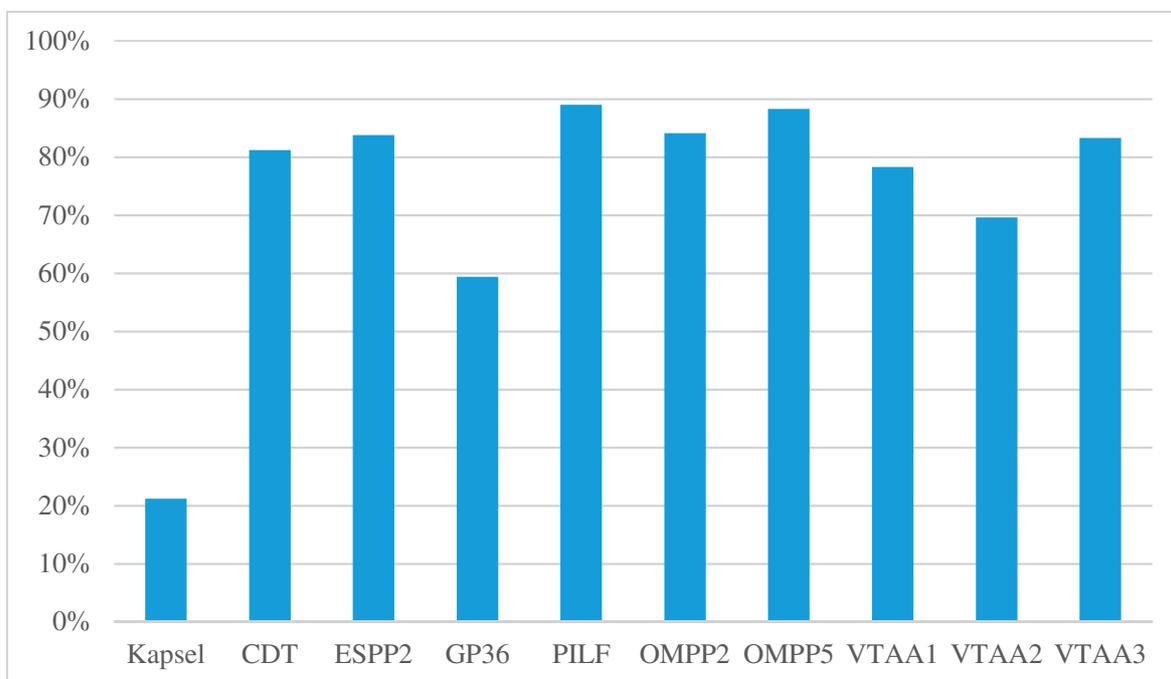


Abbildung 4: Prozentuale Verteilung der Virulenzfaktorgene in den Isolaten

CDT: Cytolethal Distending Toxin; ESPP2: extrazelluläre Serin-ähnliche Protease P2; GP36: Bakteriophagen-Gen; OMP: äußeres Membranprotein; PILF: Fimbriengen F; VTAA: Virulenz-assoziiertes trimerisches Autotransporter

4.2.2 Einfluss der Herkunft

Wie Tabelle 13 zeigt, ist die Prävalenz der getesteten Virulenzfaktoren hoch signifikant mit dem Herkunftsort der Proben assoziiert. Alle zehn Virulenzfaktoren konnten signifikant häufiger im Probenmaterial des Standortes Bakum, als in den Gießener Isolaten nachgewiesen werden.

Tabelle 13: Vorkommen der Virulenzfaktoren nach Einzugsbereich der Proben (Bakum, Gießen)

Herkunft →	Insgesamt		Bakum		Gießen		Signifikanzwert [p]
	abs. [n]	rel. [%]	abs. [n]	rel. [%]	abs. [n]	rel. [%]	
Kapsel	43	21,2	21	45,7	22	23,9	0,009
CDT	112	81,2	46	100	66	70,2	<0,000
ESPP2	114	83,8	44	100	70	76,1	<0,000
GP36	82	59,4	39	84,8	43	46,7	<0,000
PILF	121	89,0	44	100	77	83,7	0,005
OMPP2	116	84,1	46	100	70	76,1	<0,001
OMPP5	121	88,3	46	100	76	82,6	0,001
VTAA1	106	78,3	46	100	62	67,4	<0,001
VTAA2	96	69,6	43	93,5	53	57,6	<0,001
VTAA3	115	83,3	46	100	69	75,0	<0,001

abs.: absolut; CDT: Cytolethal Distending Toxin; ESPP2: extrazelluläre Serin-ähnliche Protease P2; GP36: Bakteriophagen-Gen; OMPP: äußeres Membranprotein P; PILF: Fimbriengen F; rel.: relativ; VTAA: Virulenz-assoziiertes trimerisches Autotransporter; dargestellt sind die absolute Anzahl der Kombinationen (n) und deren relativer Anteil (%); die jeweiligen Signifikanzwerte (p) wurden mittels χ^2 -Test nach Pearson berechnet

4.3 Antibiotikaresistenzen

4.3.1 Zusammenfassende Betrachtung

Untersucht wurde die Resistenzlage von insgesamt 44 Stämmen bezüglich 24 in der Praxis gebräuchlicher Antibiotika (s. Tabelle 2, Kap. 3.1.1). Von diesen Isolaten stammten 28 aus Bakum und 16 aus Gießen. Es wurden insgesamt 662 einzelne Resistenztests durchgeführt, welche im Folgenden als je ein Fall bezeichnet werden. Dabei zeigten sich die untersuchten Stämme in 100 Fällen (15,1 %) resistent, in 35 Fällen (5,3 %) intermediär und in 527 Fällen (79,6 %) sensibel.

Die Resistenzsituation der untersuchten *H. parasuis*-Stämme gegenüber den getesteten Antibiotika ist in Abbildung 5 dargestellt. Gegenüber Tylosin erwiesen sich alle getesteten Isolate als resistent. Eine Lincospectin-Resistenz zeigten 53,3 % der Isolate, nur 6,7 % waren sensibel gegen dieses Antibiotikum. In Bezug auf die Trimethoprim-potenzierten Sulfonamide zeigten sich 15,6 % der untersuchten Isolate intermediär und 42,2 % resistent. Für Cephalothin, Cefquinom, Ceftiofur, Enrofloxacin, Florfenicol, Marbofloxacin, Spectinomycin, Tiamulin und Tulathromycin wurden keine Resistenzen nachgewiesen.

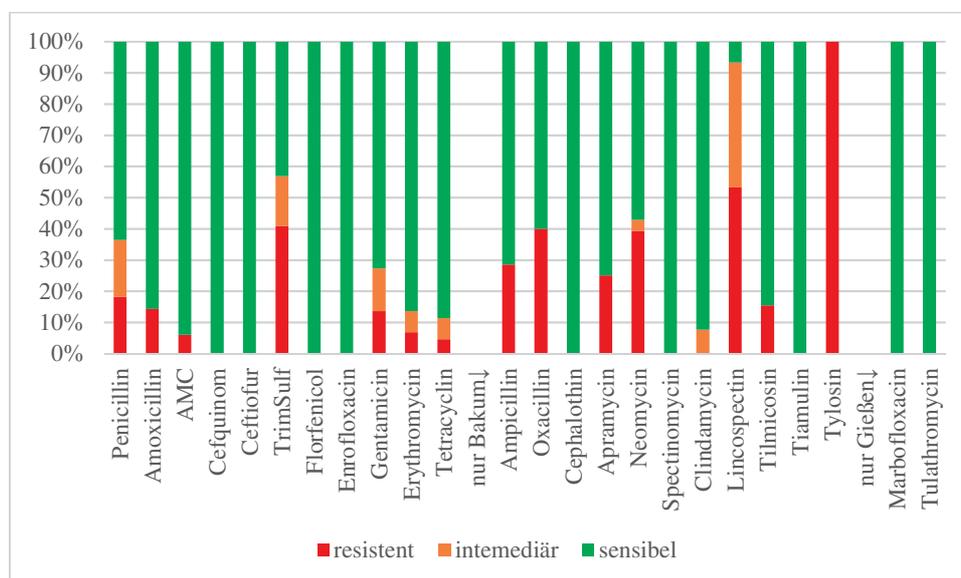


Abbildung 5: Resistenzsituation für die untersuchten Antibiotika

AMC: Amoxicillin-Clavulansäure; TrimSulf: Trimethoprim-potenzierte Sulfonamide

4.3.2 Einfluss der Herkunft

Für die Antibiotika, die an beiden Herkunftsorten getestet wurden, lagen insgesamt 426 einzelne Resistenztests vor. Dabei zeigten sich die untersuchten Isolate in 43 Fällen (10,1 %) als resistent, in 6,3 % der Fälle als intermediär und in 83,6 % der Fälle als sensibel. Den größten Anteil machten Resistenzen gegen Trimethoprim-potenzierte Sulfonamide (40,9 %) und gegen Penicillin (18,2 %) aus, gefolgt von Resistenzen gegen Amoxicillin (14,1 %) und Gentamicin (13,6 %).

Tabelle 14 zeigt die Resistenzsituation für die getesteten Wirkstoffe insgesamt und aufgeteilt nach Herkunft der Proben. Für beide Herkunftsorte entfielen die meisten Resistenzen auf die Trimethoprim-potenzierten Sulfonamide. Zusätzlich fiel in Gießen noch je ein Resistenztest mit dem Ergebnis resistent gegen Erythromycin und gegen Tetracyclin aus.

Während sich die hessischen Proben vollständig sensibel gegen Penicillin und Gentamicin zeigten, waren 42,9 % (Penicillin), bzw. 57,1 % (Gentamicin) der Stämme aus dem Einzugsgebiet von Bakum resistent gegen diesen Wirkstoff. Der Unterschied zwischen den Probenherkünften war statistisch hoch signifikant ($p = 0,001$ [Penicillin], bzw. $p = 0,009$ [Gentamicin]). Für Amoxicillin zeigte sich eine ähnliche Tendenz: Alle Isolate aus Gießen reagierten im Resistenztest sensibel. Hingegen waren 26,7 % der Isolate aus Bakum resistent ($p = 0,067$). Gegenüber den Trimethoprim-potenzierten Sulfonamiden waren 53,6 % der Isolate aus Bakum, jedoch nur 18,8 % der Isolate aus Gießen resistent ($p = 0,070$).

An keinem der Standorte konnten Resistenzen gegenüber Enrofloxacin, Marbofloxacin und Florfenicol, Cephalothin, Ceftiofur, Cefquinom und Tulathromycin, Tiamulin und Spectinomycin nachgewiesen werden.

Tabelle 14: Resistenzstatus der Isolate für die einzelnen Antibiotika

Antibiotikum ↓	Herkunft→	Insgesamt		Bakum		Gießen		Signifikanzwert [p]
	Resistenzstatus ↓	abs. [n]	rel. [%]	abs. [n]	rel. [%]	abs. [n]	rel. [%]	
Trimethoprim-potenzierte Sulfonamide	sensibel	19	43,2	9	32,1	10	62,5	0,070
	intermediär	7	15,9	4	14,3	3	18,8	
	resistent	18	40,9	15	53,6	3	18,8	

Antibiotikum ↓	Herkunft→	Insgesamt		Bakum		Gießen		Signifikanzwert [p]
	Resistenzstatus ↓	abs. [n]	rel. [%]	abs. [n]	rel. [%]	abs. [n]	rel. [%]	
Penicillin	sensibel	28	63,6	12	42,9	16	100	0,001
	intermediär	8	18,2	8	28,6	0	0	
	resistent	8	18,2	8	28,6	0	0	
Amoxicillin ^A	sensibel	24	85,7	11	73,3	13	100	0,067
	intermediär	0	0	0	0	0	0	
	resistent	4	14,3	4	26,7	0	0	
Gentamicin	sensibel	32	72,7	16	57,1	16	100	0,009
	intermediär	6	13,6	6	21,4	0	0	
	resistent	6	13,6	6	21,4	0	0	
Erythromycin	sensibel	38	86,4	25	89,3	13	81,3	n. s.
	intermediär	3	6,8	2	7,1	1	6,3	
	resistent	3	6,8	1	3,6	2	12,5	
Amoxicillin-Clavulansäure ^B	sensibel	31	93,9	15	88,2	16	100	n. s.
	intermediär	0	0	0	0	0	0	
	resistent	2	6,1	2	11,8	0	0	
Tetracyclin ^B	sensibel	39	88,6	24	85,7	15	93,8	n. s.
	intermediär	3	6,8	3	10,7	0	0	
	resistent	2	4,5	1	3,6	1	6,3	
Florfenicol ^B	sensibel	28	100	13	100	15	100	n. s.
	intermediär	0	0	0	0	0	0	
	resistent	0	0	0	0	0	0	
Enrofloxacin	sensibel	44	100	28	100	16	100	n. s.

Antibiotikum ↓	Herkunft→	Insgesamt		Bakum		Gießen		Signifikanzwert [p]
	Resistenzstatus ↓	abs. [n]	rel. [%]	abs. [n]	rel. [%]	abs. [n]	rel. [%]	
	intermediär	0	0	0	0	0	0	
Cefquinom ^B	sensibel	29	100	13	100	16	100	n. s.
	intermediär	0	0	0	0	0	0	
	resistent	0	0	0	0	0	0	
Ceftiofur	sensibel	44	100	28	100	16	100	n. s.
	intermediär	0	0	0	0	0	0	
	resistent	0	0	0	0	0	0	
Tylosin ^A	sensibel	0	0	0	0	nicht getestet		
	intermediär	0	0	0	0			
	resistent	15	100	15	100			
Lincomycin ^A	sensibel	1	6,7	1	6,7	nicht getestet	-	
	intermediär	6	40,0	6	40,0			
	resistent	8	53,3	8	53,3			
Oxacillin ^A	sensibel	9	60,0	9	60,0	nicht getestet	-	
	intermediär	0	0	0	0			
	resistent	6	40,0	6	40,0			
Neomycin	sensibel	16	57,1	16	57,1	nicht getestet	-	
	intermediär	1	3,6	1	3,6			
	resistent	11	39,3	11	39,3			
Ampicillin	sensibel	20	71,4	20	71,4	nicht getestet	-	
	intermediär	0	0	0	0			

Antibiotikum ↓	Herkunft→	Insgesamt		Bakum		Gießen		Signifikanzwert [p]
	Resistenzstatus ↓	abs. [n]	rel. [%]	abs. [n]	rel. [%]	abs. [n]	rel. [%]	
	resistent	8	28,6	8	28,6			
Apramycin	sensibel	21	75,0	21	75,0	nicht getestet		
	intermediär	0	0	0	0			
	resistent	7	25,0	7	25,0			
Tilmicosin ^B	sensibel	11	84,6	11	84,6	nicht getestet		
	intermediär	0	0	0	0			
	resistent	2	15,4	2	15,4			
Clindamycin ^B	sensibel	12	92,3	12	92,3	nicht getestet		
	intermediär	1	7,7	1	7,7			
	resistent	0	0	0	0			
Tiamulin ^B	sensibel	13	100	13	100	nicht getestet		
	intermediär	0	0	0	0			
	resistent	0	0	0	0			
Cephalothin ^B	sensibel	13	100	13	100	nicht getestet		
	intermediär	0	0	0	0			
	resistent	0	0	0	0			
Spectinomycin	sensibel	28	100	28	100	nicht getestet		
	intermediär	0	0	0	0			
	resistent	0	0	0	0			
Marbofloxacin	sensibel	13	100	nicht getestet		13	13	
	intermediär	0	0			0	0	
	resistent	0	0			0	0	

Antibiotikum ↓	Herkunft→	Insgesamt		Bakum		Gießen		Signifikanzwert [p]
	Resistenzstatus ↓	abs. [n]	rel. [%]	abs. [n]	rel. [%]	abs. [n]	rel. [%]	
Tulathromycin	sensibel	14	100	nicht getestet		14	14	-
	intermediär	0	0			0	0	
	resistent	0	0			0	0	

^A: Test wurde in Bakum nur mittels Agardiffusionstest durchgeführt; ^B: Test wurde in Bakum nur mittels Mikro-Bouillondilution durchgeführt; n. s.: nicht signifikant; -: nicht geprüft; dargestellt sind die absolute Anzahl der Kombinationen (n) und deren relativer Anteil (%); die jeweiligen Signifikanzwerte (p) wurden mittels χ^2 -Test nach Pearson berechnet; Unterschiede an der Signifikanzgrenze wurden mit angegeben

Aus Tabelle 15 wird ersichtlich, dass die Gießener Isolate nur gegen drei Antibiotika resistent waren: Erythromycin, Tetracyclin und die Trimethoprim-potenzierten Sulfonamide. Die Isolate aus Bakum zeigten gegen folgende Wirkstoffe Resistenzen: Insbesondere β -Lactame, Aminoglycoside (außer Neomycin), Makrolide (Tilmicosin und Tylosin) sowie Lincomycin.

Tabelle 15: Auftreten von mindestens einem resistenten oder intermediären Isolat im Probenarsenal der beiden Herkunftsorte

Herkunftsort →	Bakum		Gießen	
Status →	resistent	intermediär	resistent	intermediär
Antibiotikum ↓				
in beiden Herkunftsorten durchgeführte Resistenztests				
Penicillin				
Amoxicillin				
AMC				

Herkunftsort →	Bakum		Gießen	
Status →	resistent	intermediär	resistent	intermediär
Antibiotikum↓				
Cefquinom				
Ceftiofur				
TrimSulf				
Florfenicol				
Enrofloxacin				
Gentamicin				
Erythromycin				
Tetracyclin				
nur in Bakum durchgeführte Resistenztests				
Tilmicosin			-	-
Tiamulin			-	-
Tylosin			-	-
Ampicillin			-	-
Oxacillin			-	-
Cephalothin			-	-
Apramycin			-	-
Neomycin			-	-
Spectinomycin			-	-
Clindamycin			-	-
Lincomycin			-	-
nur in Gießen durchgeführte Resistenztests				
Marbofloxacin	-	-		

Herkunftsort →	Bakum		Gießen	
Status →	resistent	intermediär	resistent	intermediär
Antibiotikum↓				
Tulathromycin	-	-		

AMC: Amoxicillin-Clavulansäure; TrimSulf: Trimethoprim-potenzierte Sulfonamide; -: nicht untersucht; Feld schwarz ausgefüllt: mindestens 1 nicht sensibles Isolat; Feld leer: alle Isolate sensibel.

4.4 Zusammenhang zwischen Serotypen, Virulenzfaktoren und Antibiotikaresistenz

Aufgrund der Vielzahl an Serotypen war es nicht möglich, eine fundierte statistische Aussage zu treffen hinsichtlich der Assoziation zwischen den einzelnen Serotypen und deren unterschiedlichen Eigenschaften von Virulenz und Antibiotika-Resistenz. Die entsprechenden Ergebnisse finden sich im Anhang (s. Tabelle 27 und Tabelle 28). Die Virulenzfaktoren Cytolethal Distending Toxin, extrazelluläre Serin-ähnliche Protease P2, Fimbrie, die äußeren Membranproteine P2 und P5, der Virulenz-assoziierte trimerische Autotransporter 1 und 3 kamen bei mindestens 97 % der Isolate vor. Hier fehlte somit die Vergleichsgruppe von Isolaten ohne den jeweiligen Virulenzfaktor, um Assoziationen zu anderen Merkmalen sinnvoll herstellen zu können. Statistisch signifikante Assoziationen zwischen dem Vorkommen von Antibiotikaresistenzen und den Virulenzfaktoren Kapsel, GP36 und VTAA2 konnten nicht nachgewiesen werden (Tabelle 30 im Anhang).

4.5 Einflüsse der Tierkategorie

4.5.1 Assoziationen mit Serotypen

Fundierte Assoziationen zwischen Tierkategorie und Serotypen konnten aufgrund der hohen Anzahl unterschiedlicher Serotypen statistisch nicht erbracht werden.

4.5.2 Assoziationen mit Virulenzfaktoren

Die untersuchten Virulenzfaktoren traten sowohl in den Isolaten aus der Gruppe der Saug- und Absatzferkel, als auch in denen der Mastschweine auf. Tendenziell konnten die niedrigsten Prävalenzen bei den Isolaten der Saugferkel festgestellt werden (Tabelle 16). Dieser Effekt ließ sich für die Virulenzfaktoren VTAA1 und VTAA2 signifikant absichern.

Tabelle 16: Virulenzfaktoren der Isolate in Abhängigkeit von der Altersgruppe der Schweine

Altersstufe →	Saugferkel	Flatdeck	Mast	Signifikanz-
Virulenzfaktor ↓	[n = 16]	[n = 89]	[n = 31]	wert [p]
Kapsel	18,8	36,0	19,4	n. s.
CDT	75,0	82,0	75,8	n. s.
ESPP2	68,8	86,2	83,9	n. s.
GP36	43,8	65,2	54,8	n. s.
PILF	75,0	92,0	87,1	n. s.
OMPP2	75,0	86,5	80,6	n. s.
OMPP5	87,5	90,9	80,6	n. s.
VTAA1	50,0	83,1	77,4	0,013
VTAA2	37,5	77,5	64,5	0,004
VTAA3	87,5	83,1	80,6	n. s.

CDT: Cytolethal Distending Toxin; ESPP2: extrazelluläre Serin-ähnliche Protease P2; GP36: Bakteriophagen-Gen; n. s.: nicht signifikant; OMPP: äußeres Membranprotein P; PILF: Fimbriengen F; VTAA: Virulenz-assoziiertes trimerisches Autotransporter; die jeweiligen Signifikanzwerte (p) wurden mittels χ^2 -Test nach Pearson berechnet; Unterschiede an der Signifikanzgrenze wurden mit angegeben

4.5.3 Assoziationen mit dem Resistenzverhalten

Eine differenzierte Betrachtung der Resistenzsituation in Abhängigkeit vom Lebensalter der Tiere war nur teilweise möglich. Für die Antibiotika Cephalothin, Cefquinom, Ceftiofur, Florfenicol, Enrofloxacin, Marbofloxacin, Spectinomycin, Tiamulin und Tulathromycin gab es nur sensible Isolate. Für die Antibiotika Ampicillin, Oxacillin, Cephalothin, Apramycin, Neomycin, Spectinomycin, Clindamycin, Lincospectin, Tilmicosin, Tiamulin und Tylosin standen nicht genügend Isolate von Saugferkeln und/oder Mastschweinen zur Verfügung. Für die übrigen Assoziationen zeigte sich eine Tendenz höherer Resistenzraten bei Absetzferkeln als bei Saugferkeln und Mastschweinen. Aufgrund der geringen Zahl an Isolaten der letztgenannten Kategorien konnten diese Trends jedoch statistisch nicht abgesichert werden (Tabelle 29 im Anhang).

4.6 Einflüsse der beprobten Organe

4.6.1 Assoziationen mit Serotypen

Assoziationen zwischen beprobtem Organ und Serotypen konnten aufgrund der hohen Anzahl unterschiedlicher Serotypen statistisch nicht erhoben werden.

4.6.2 Assoziationen mit Virulenzfaktoren

Die untersuchten Virulenzfaktoren konnten in Isolaten aus allen beprobten Organen nachgewiesen werden (Tabelle 17). Ein statistisch signifikantes Verteilungsungleichgewicht ergab sich jedoch lediglich für den Virulenzfaktor VTAA2 ($p = 0,041$).

Tabelle 17: Prävalenz der Virulenzfaktoren in den beprobten Organen

Organ→	ORT [n = 34]	URT [n = 83]	Serosen [n = 10]	ZNS [n = 6]	Gelenke [n = 5]	Signifikanzwert [p]
VF↓						
Kapsel	26,5	27,7	50,0	66,7	40,0	n. s.
CDT	88,2	77,1	100	66,7	80,0	n. s.

Organ→	ORT [n = 34]	URT [n = 83]	Serosen [n = 10]	ZNS [n = 6]	Gelenke [n = 5]	Signifikanzwert [p]
VF↓						
ESPP2	75,8	84,1	100	83,3	100	n. s.
GP36	50,0	65,1	70,0	33,3	40,0	n. s.
PILF	94,1	85,4	100	83,3	100	n. s.
OMPP2	85,3	81,9	100	66,7	100	n. s.
OMPP5	88,2	85,5	100	100	100	n. s.
VTAA1	70,6	75,9	100	100	100	n. s.
VTAA2	55,9	74,7	90,0	33,3	80,0	0,041
VTAA3	88,2	77,1	100	100	100	n. s.

CDT: Cytolethal Distending Toxin; ESPP2: extrazelluläre Serin-ähnliche Protease P2; GP36: Bakteriophagen-Gen; ORT: oberer Respirationstrakt; OMPP: äußeres Membranprotein P; PILF: Fimbriengen F; URT: unterer Respirationstrakt; VF: Virulenzfaktor; VTAA: Virulenz-assoziiertes trimerisches Autotransporter; die jeweiligen Signifikanzwerte (p) wurden mittels χ^2 -Test nach Pearson berechnet; Unterschiede an der Signifikanzgrenze wurden mit angegeben

4.6.3 Assoziationen mit dem Resistenzverhalten

Signifikante Unterschiede im Resistenzverhalten von Isolaten aus unterschiedlichen Organen konnten nicht nachgewiesen werden.

4.6.4 Assoziationen mit der Tierkategorie

Mit Ausnahme der Serosatupfer wurden alle Organe in allen Alterskategorien beprobt. Mit Ausnahme des unteren Respirationstraktes (URT) konnten die niedrigsten Prävalenzen bei den Isolaten der Mastschweine festgestellt werden (Tabelle 18). Aus dem URT von Aufzuchtferkeln konnte *H. parasuis* signifikant häufiger isoliert werden als aus dem URT der anderen Alterskategorien ($p < 0,001$).

Tabelle 18: *H. parasuis*-Nachweisrate (%) in den beprobten Organen in Abhängigkeit von der Altersgruppe der Schweine

Organ [n beprobt]	Gesamt	Saugferkel	Flatdeck	Mast	Signifikanzwert p
ORT [n = 53]	100	100	100	100	-
URT [n = 132]	86,4	31,3	96,6	86,2	< 0,001
Serosen [n = 13]	61,5	-	66,7	0	n. s.
ZNS [n = 54]	20,4	42,9	21,1	0	n. s.
Gelenke [n = 44]	27,3	14,3	32,4	0	n. s.

n. s.: nicht signifikant; ORT: oberer Respirationstrakt; URT: unterer Respirationstrakt; ZNS: Zentrales Nervensystem; -: nicht getestet; die jeweiligen Signifikanzwerte (p) wurden mittels χ^2 -Test nach Pearson berechnet; Unterschiede an der Signifikanzgrenze wurden mit angegeben

4.7 Morphologische Veränderungen

Sektionsergebnisse lagen in 91 der insgesamt 101 zur Verfügung stehenden Schweine vor, 36 aus Bakum und 65 aus Gießen (Tabelle 19). Häufigster Befund war die katarrhalisch-eitrige Bronchopneumonie (38,9 % der Lungen). Als Hinweis auf eine interstitielle Pneumonie konnte bei 27 % der Lungen eine schlechte Retraktion festgestellt werden. Histopathologische Befunde zur Bestätigung der interstitiellen Pneumonie standen allerdings nur in 52 Fällen zur Verfügung, da je nach Fragestellung des Einsenders in der Routinediagnostik nicht in allen Fällen die Lunge histologisch untersucht wurde. Als weitere häufige Befunde traten fibroplastische Pleuritis und fibroplastische Peritonitis (je 23,8 %) und mit Flüssigkeit gefüllte Herzbeutel (19,8 %) auf. Die stärksten Befunde wurden bei Absatzferkeln festgestellt. Bei fibrinös und fibroplastisch verändertem Gewebe bestand Verdacht auf ursächliche Beteiligung von *H. parasuis*.

4.7.1 Assoziationen mit Serotypen

Assoziationen zwischen den Krankheitsbildern und Serotypen konnten aufgrund der hohen Anzahl unterschiedlicher Serotypen statistisch sinnvoll nicht erhoben werden.

4.7.2 Assoziationen mit Virulenzfaktoren

Die untersuchten Virulenzfaktoren waren vor allem mit pathologisch-anatomischen Befunden, die auf *H. parasuis* hinweisen, signifikant assoziiert. Den häufigsten Zusammenhang wiesen die Virulenzfaktoren zu den Merkmalen „fibroplastische Peritonitis“ und „fibroplastische Perikarditis“ auf. Auch die fibroplastische Pleuritis, Arthritis und die Polyserositis waren signifikant mit dem Nachweis von Virulenzfaktoren assoziiert. Die Zusammenhänge sind in Tabelle 33 im Anhang dargestellt.

4.7.3 Assoziationen mit dem Resistenzverhalten

Die Verteilung der Isolate mit vollständigem Resistenztest erlaubte keine statistisch sinnvolle Beurteilung der Resistenzsituation in Abhängigkeit vom pathologisch-anatomischen Sektionsbild.

4.7.4 Assoziationen zwischen Sektionsbild und Tierkategorie

Die Befunde katarrhalisch-eitrige Bronchopneumonie, Retraktion (als Hinweis auf eine interstielle Pneumonie), Arthritis, sowie fibroplastische Pleuritis und Perikarditis waren signifikant mit der Alterskategorie der Tiere assoziiert.

Tabelle 19: Pathologisch-anatomische Befunde in Abhängigkeit von der Altersklasse der Schweine

pathologisch-anatomische Befunde	Gesamt	Saugferkel	Flatdeck	Mast	Signifikanzwert [p]
n	138	16	89	31	
katarrhalisch-eitrige BP	38,9	0	45,9	40	0,003
Retraktion	27	6,3	36,5	8	0,003
fibroplastische Pleuritis	23,8	0	29,4	20	0,036
fibroplastische Perikarditis	23,8	0	29,4	20	0,036
Arthritis	23	43,8	25,9	0	0,003
Herzbeutel gefüllt	19,8	12,5	22,4	16	n. s.

pathologisch-anatomische Befunde	Gesamt	Saugferkel	Flatdeck	Mast	Signifi- kantz-wert [p]
n	138	16	89	31	
Polyserositis	19	0	23,5	16	0,081
fibroplastische Peritonitis	15,1	0	20	8	0,066
Leptomeningitis	10,3	0	14,1	4	n. s.
fibrinöse Pneumonie	9,5	0	9,4	16	n. s.
fibrinöse Perikarditis	5,6	0	8,2	0	n. s.
fibrinöse Peritonitis	4	0	5,9	0	n. s.
nekrotisierende Pneumonie	2,4	0	1,2	8	n. s.
fibrinöse Pleuritis	1,6	0	2,4	0	n. s.

BP: Bronchopneumonie; n. s.: nicht signifikant; die jeweiligen Signifikanzwerte (p) wurden mittels χ^2 -Test nach Pearson berechnet; Unterschiede an der Signifikanzgrenze wurden mit angegeben.

4.8 Krankheitskategorie

Zur Abschätzung der Rolle von *H. parasuis* im Krankheitsgeschehen der untersuchten Tiere wurden diese in 4 Krankheitskategorien eingeteilt (s. Kap. 3.2.2):

- Kategorie 0: Tiere ohne Organbefunde.
- Kategorie 1: Tiere mit pathologisch-anatomischen Organbefunden und Nachweis von Co-Erregern, kein Hinweis auf Beteiligung von *H. parasuis* im betroffenen Organ.
- Kategorie 2: Tiere mit geringgradigen pathologisch-anatomischen Organbefunden und Nachweis von Co-Erregern, Hinweis auf Beteiligung von *H. parasuis*
- Kategorie 3: Tiere mit hochgradigen, *H. parasuis*-spezifischen Organbefunden, dem Nachweis von *H. parasuis* im betroffenen Organ und nur geringgradigem Nachweis von Co-Erregern.

Eine Übersicht über die nachgewiesenen Co-Erreger findet sich in Tabelle 31 im Anhang.

4.8.1 Assoziationen mit Serotypen

Fundierte Assoziationen zwischen Krankheitskategorie und Serotypen konnten aufgrund der hohen Anzahl unterschiedlicher Serotypen statistisch nicht erbracht werden.

4.8.2 Assoziationen mit Virulenzfaktoren

Alle untersuchten Virulenzfaktoren zeigten sich statistisch signifikant mit der Krankheitskategorie der Tiere, aus denen die jeweiligen Isolate stammten, assoziiert (Tabelle 20). Die engsten Zusammenhänge ergaben sich dabei für ESPP2, OMPP2, VTAA1, VTAA2 und VTAA3. Die Prävalenz der jeweiligen Virulenzfaktoren nahm in den Gruppen mit Krankheitskategorien ohne *H. parasuis*-Beteiligung, mit Mitbeteiligung von *H. parasuis* und mit *H. parasuis* als Haupterreger gegenüber der gesunden Vergleichsgruppe durchschnittlich um 29 %, 53 % bzw. 75 % zu.

Tabelle 20: Prozentualer Anteil an Isolaten mit Virulenzfaktoren in den eingeteilten Krankheitskategorien

Virulenzfaktor	KKat 0 [n = 19]	KKat 1 [n = 29]	KKat 2 [n = 54]	KKat 3 [n = 36]	Signifikanzwert (p)
Kapsel	15,8	20,7	31,5	47,2	0,048
CDT	63,2	72,4	83,3	94,4	0,020
ESPP2	57,9	71,4	88,9	100	< 0,001
GP36	36,8	48,3	70,4	63,9	0,037
PILF	73,7	85,7	88,9	100	0,027
OMPP2	63,2	75,9	87,0	97,2	0,005
OMPP5	73,7	86,2	87,0	100	0,032
VTAA1	31,6	72,4	83,3	100	< 0,001
VTAA2	36,8	51,7	77,8	88,9	< 0,001
VTAA3	57,9	72,4	87,0	100	< 0,001

CDT: Cytolethal Distending Toxin; ESPP2: extrazelluläre Serin-ähnliche Protease P2; GP36: Bakteriophagen-Gen; KKat 0: keine Organbefunde; KKat 1: Organbefunde und Co-Erreger, keine *H. parasuis*-Organbefunde; KKat 2: leichte *H. parasuis*-Organbefunde; KKat 3: hochgradig *H. parasuis*-spezifische Organbefunde; neg.: negativ; n. s.: nicht signifikant; OMPP: äußeres Membranprotein P; PILF: Fimbriengen F; pos.: positiv; VTAA: Virulenz-assoziiertes trimerischer Autotransporter; die jeweiligen Signifikanzwerte (p) wurden mittels χ^2 -Test nach Pearson berechnet; Unterschiede an der Signifikanzgrenze wurden mit angegeben.

Die Virulenzfaktoren extrazelluläre Serin-ähnliche Protease P2, äußeres Membranprotein P2 und die Virulenz-assoziierten trimerischen Autotransporter der Gruppe 1 bis 3 waren am engsten mit der Krankheitskategorie assoziiert. In Abbildung 6 ist das Vorkommen der Isolate in den vier Krankheitskategorien dargestellt. In Krankheitskategorie 0 kamen alle drei Varianten ungefähr gleich häufig vor. Für die Isolate, bei denen alle fünf Virulenzfaktoren zusammen nachgewiesen werden konnten, lag die Nachweisrate in Krankheitskategorie 0 bei 31,6 %. Mit ebenfalls 31,6 % kamen die Isolate ohne den Nachweis dieser fünf Virulenzfaktoren ebenso häufig vor. Für die Isolate mit Nachweis von einem bis vier der Virulenzfaktoren lag sie bei 36,8 %. Im weiteren Verlauf ist deutlich die gegenläufige Tendenz der drei Isolatgruppen zu erkennen. Während die Isolate ohne Nachweis der fünf Virulenzfaktoren nur in Kategorie 0 bis drei mit sinkender Tendenz nachzuweisen waren, stieg der Anteil an Isolaten mit allen Virulenzfaktoren von 0 bis vier an. In Kategorie drei konnte kein Isolat ohne Virulenzfaktoren nachgewiesen werden, während 86% der Isolate dieser Kategorie alle fünf Virulenzfaktoren aufwiesen. Diese Unterschiede waren statistisch hoch signifikant.

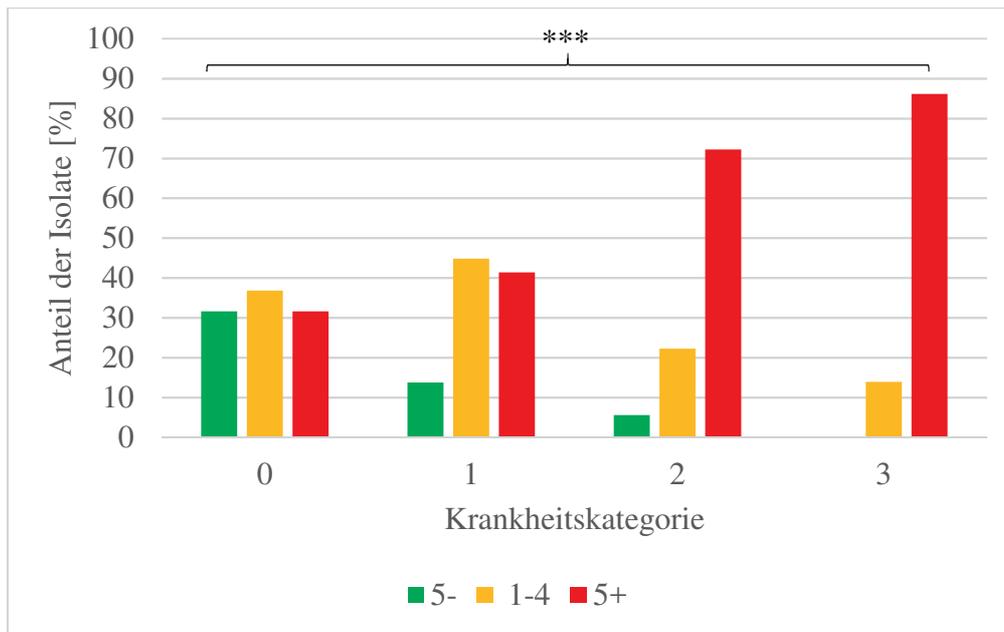


Abbildung 6: Nachweisrate der *H. parasuis*-Isolate in den einzelnen Krankheitskategorien

Krankheitskategorie 0: keine Organbefunde; Krankheitskategorie 1: pathologische Organbefunde und Co-erreger, keine *H. parasuis*-spezifischen Organbefunde; Krankheitskategorie 2: leichte *H. parasuis*-spezifische Organbefunde; Krankheitskategorie 3: hochgradig *H. parasuis*-spezifische Organbefunde; VF: Virulenzfaktor; ***: $p < 0,001$.

Dargestellt sind die Isolate, aufgeteilt nach kombiniertem Vorkommen der 5 Virulenzfaktoren (VF) extrazelluläre Serin-ähnliche Protease, äußeres Membranprotein P2, sowie die Virulenz-assoziierten trimerischen Autotransporter der Gruppe 1 bis 3 (grün: keiner der 5 VF wurde nachgewiesen; gelb: Nachweis eines bis vier der VF; rot: alle 5 VF positiv).

4.8.3 Assoziationen mit dem Resistenzverhalten

Die Verteilung der Isolate mit vollständigem Resistenztest erlaubte keine sinnvolle Beurteilung der Resistenzsituation in Abhängigkeit von der Krankheitskategorie.

4.8.4 Assoziationen mit dem beprobten Organ

Für die vorliegende Arbeit wurden ausschließlich Schweine mit *H. parasuis*-Nachweis verwendet. Dieser Nachweis konnte mit BU und/oder PCR aus Proben von oberem oder unterem Respirationstrakt, Serosen, dem ZNS oder den Gelenken geführt worden sein. *H. parasuis* konnte

aus allen untersuchten Geweben des oberen Respirationstraktes und aus 86,4 % der Proben des unteren Respirationstraktes isoliert oder mittels PCR nachgewiesen werden (Tabelle 21). Es konnten für alle beprobten Organe außer dem oberen Respirationstrakt signifikante Zusammenhänge zur Krankheitskategorie festgestellt werden.

Tabelle 21: *H. parasuis* positive Befunde in den beprobten Organen in Abhängigkeit von der Krankheitskategorie (alle Angaben in Prozent)

Organ [n beprobt]	Gesamt	KKat 0	KKat 1	KKat 2	KKat 3	p
ORT [n = 53]	100	100	100	100	100	-
URT [n = 132]	86,4	78,9	51,9	98,1	100	< 0,001
Serosen [n = 13]	61,5	0	0	0	100	0,035
ZNS [n = 54]	20,4	0	20	0	47,4	0,002
Gelenke [n = 44]	27,3	0	0	14,3	55,6	0,005

KKat 0: keine Organbefunde; KKat 1: Organbefunde und Co-Erreger, keine *H. parasuis*-Organbefunde; KKat 2: leichte *H. parasuis*-Organbefunde; KKat 3: hochgradig *H. parasuis*-spezifische Organbefunde; ORT: oberer Respirationstrakt; URT: unterer Respirationstrakt; ZNS: Zentrales Nervensystem; die jeweiligen Signifikanzwerte (p) wurden mittels χ^2 -Test nach Pearson berechnet; Unterschiede an der Signifikanzgrenze wurden mit angegeben

4.8.5 Assoziationen mit der Tierkategorie

Zwischen der Tierkategorie und der Krankheitskategorie konnte ein signifikanter Zusammenhang nachgewiesen werden ($p < 0,001$). Im Gegensatz zur Situation der Mastschweine und insbesondere der Absetzer war *H. parasuis* bei Saugferkeln nur in wenigen Fällen am Krankheitsgeschehen beteiligt (Tabelle 22).

Tabelle 22: Zusammenhang zwischen Kategorie der beprobten Tiere und Beteiligung von *H. parasuis* an der Krankheitskategorie

KKat→	0	1	2	3	p
Tier-Kategorie ↓					
Saugferkel	50,0	37,5	6,3	6,3	< 0,001
Flatdeck	10,1	15,7	39,3	34,8	
Mast	6,5	29,0	58,1	6,5	
gesamt	14,0	21,3	39,7	25	

KKat 0: keine Organbefunde; KKat 1: Organbefunde und Co-Erreger; keine *H. parasuis*-Organbefunde; KKat 2: leichte *H. parasuis*-Organbefunde; KKat 3: hochgradig *H. parasuis*-spezifische Organbefunde; KKat: Krankheitskategorie; die jeweiligen Signifikanzwerte (p) wurden mittels χ^2 -Test nach Pearson berechnet.

4.8.6 Assoziationen mit pathologisch-anatomischen Befunden

Ein signifikanter Zusammenhang ließ sich für folgende pathologisch-anatomische Befunde im Zusammenhang mit der Krankheitskategorie nachweisen: katarrhalisch-eitrige Bronchopneumonie, Retraktion, fibroplastische Pleuritis und Perikarditis, Arthritis, mit Flüssigkeit gefüllte Herzbeutel und fibrinöse Pneumonie.

Fibrinöse Veränderungen der Serosen traten so selten auf, dass es keine Vergleichsgruppen in Kategorie 0 und 1 gab. Chronische Befunde dieser pathologischen Organveränderungen waren hochgradig signifikant mit der Krankheitskategorie assoziiert (Tabelle 23).

Tabelle 23: Pathologisch-anatomische Befunde der erfassten Fälle in Abhängigkeit von der Krankheitskategorie (alle Angaben in Prozent)

Pathologisch-anatomische Befunde	gesamt	KKat 0	KKat 1	KKat 2	KKat 3	Signifikanzwert [p]
n	138	19	29	54	36	
katarrhalisch-eitrige BP	38,9	10,5	25	61,7	34,4	< 0,001
Retraktion	27	0	17,9	25,5	53,1	< 0,001
fibroplastische Pleuritis	23,8	0	3,6	21,3	59,4	< 0,001
fibroplastische Perikarditis	23,8	0	3,6	17	65,6	< 0,001
Arthritis	23	10,5	17,9	10,6	53,1	< 0,001
Herzbeutel gefüllt	19,8	0	10,7	17	43,8	< 0,001
Polyserositis	19	0	7,1	17	43,8	< 0,001
fibroplastische Peritonitis	15,1	0	5,3	12,8	37,5	< 0,001
Leptomeningitis	10,3	0	10,7	6,4	21,9	0,055
fibrinöse Pneumonie	9,5	0	0	14,9	15,6	0,048
fibrinöse Perikarditis	5,6	0	0	6,4	12,5	n. s.
fibrinöse Peritonitis	4	0	0	6,4	6,3	n. s.
nekrotisierende Pneumonie	2,4	0	0	6,4	0	n. s.
fibrinöse Pleuritis	1,6	0	0	0	6,3	n. s.

BP: Bronchopneumonie; KKat 0: keine Organbefunde; KKat 1: Organbefunde und Co-Erreger; keine *H. parasuis*-Organbefunde; KKat 2: leichte *H. parasuis*-Organbefunde; KKat 3: hochgradig *H. parasuis*-spezifische Organbefunde; die jeweiligen Signifikanzwerte (p) wurden mittels χ^2 -Test nach Pearson berechnet; Unterschiede an der Signifikanzgrenze wurden mit angegeben

5 Diskussion

Über die Beteiligung von *H. parasuis* am Krankheitsgeschehen in Schweinebeständen wird seit Jahren immer wieder berichtet (Nedbalcová et al. 2006; Quinn et al. 2011; Zimmerman et al. 2012; Aragón et al. 2010b). Ein wesentliches Problem ist sein ubiquitäres Vorkommen (Blanco et al. 2004). So wird *H. parasuis* bei Untersuchungen sehr häufig nachgewiesen, ohne jedoch eine sichere Aussage darüber machen zu können, ob er am jeweiligen Krankheitsgeschehen beteiligt ist und, wenn ja, in welcher Weise: hauptursächlich oder als Miterreger (Brockmeier et al. 2002; Lappe 2011).

Es gibt Hinweise darauf, dass die Untersuchung verschiedener Virulenzfaktoren bei dieser Bewertung Klarheit schaffen könnte (Nedbalcová et al. 2006; Zimmerman et al. 2012). Ob es einen dominierenden Virulenzfaktor oder begünstigende Faktoren gibt, konnte noch nicht ermittelt werden (Sack und Baltes 2009; Zhou et al. 2010a). Teilweise widersprüchliche Ergebnisse sind ebenfalls für ein und denselben Virulenzfaktor bekannt (Mullins et al. 2009; Bello-Orti et al. 2014; Wei et al. 2014; Loera-Muro und Ramírez-Castillo 2015).

Daher war es ein wesentliches Ziel der vorliegenden Arbeit, Feldisolate von *H. parasuis* hinsichtlich ausgewählter Virulenzfaktoren zu charakterisieren und Assoziationen zwischen diesen Faktoren und den Krankheitsbildern der Schweine, von denen diese Isolate stammten, zu untersuchen.

Zusätzlich wurde die Vielfalt an Serotypen und das Vorkommen von Resistenzen gegen antimikrobielle Substanzen mituntersucht. Um den Einfluss der Produktionsintensität der Herkunftsregion der Isolate mit betrachten zu können, wurden in der vorliegenden Arbeit Isolate aus zwei verschiedenen Einzugsgebieten mit unterschiedlicher Dichte hinsichtlich der Schweinehaltung untersucht und beurteilt. Zum einen war dies Bakum (Mikrobiologisches Institut der Stiftung TiHo Hannover, Außenstelle für Epidemiologie) in Niedersachsen und zum anderen Gießen (Klinik für Schweine der JLU Gießen) in Hessen. Laut statistischem Bundesamt gilt Niedersachsen mit 7.481 Betrieben und durchschnittlich 1.192 Schweinen pro Betrieb als schweinedichteste Region Deutschlands. Hessen ist mit 3.450 Betrieben und 178 Schweinen pro Betrieb epidemiologisch als eher schweinearm zu betrachten (Statistisches Bundesamt 2016). Die Isolate wurden über einen Zeitraum von sechs Jahren (2009 – 2015) gesammelt. Durch die pathologisch-anatomischen Befunde und anamnestischen Parameter lag für die jeweiligen Isolate ein umfassendes Arsenal an Metadaten vor. Die in der vorliegenden Arbeit entwickelte Einteilung in vier Krankheitskategorien von 0 – 3 (0 „o. b. B.“ bis 3 „hochgradig

H. parasuis-spezifische Befunde“) erlaubte eine Abschätzung der Virulenz des jeweils untersuchten Isolates.

In dieser Arbeit wurde die DNA von 138 Isolaten von *H. parasuis* mittels PCR auf das Vorliegen zehn ausgewählter Virulenzfaktoren untersucht und das Ergebnis vor dem Hintergrund des Krankheitsgeschehens der betreffenden Schweine betrachtet. Die untersuchten Virulenzfaktoren sind in vier Gruppen je nach Lokalisation bzw. Wirkungsweise einzuteilen: Von den Virulenzfaktoren auf der Zellmembran wurden das Kapselgen *capD*, das Fimbriengen *pilF* und zwei Gene für die äußeren Membranproteine P2 und P5 untersucht. Von den Virulenz-assoziierten trimerischen Autotransportern (VTAA) wurden die Gene für die extrazelluläre Serin-ähnliche Protease 2 und die VTAA der Gruppen 1 bis 3, und aus der Gruppe der intrazellulär wirksamen Virulenzfaktoren wurden das Cytolethal Distending Toxin (CDT; Wirtszelle) und das Bakteriophagen *gp36* (Bakterienzelle) untersucht.

Für die untersuchten Virulenzfaktoren liegen bisher verschiedene Prävalenzschätzungen vor, die sich jedoch nur auf virulente Isolate beziehen. Sie schwanken zwischen 100 % für die zellwandständigen Virulenzfaktoren *capD* sowie die äußeren Membranproteine P2 und P5 (Sack 2008; Mullins et al. 2009; Howell et al. 2015) und zwischen 85 bis 90 % bei den intrazellulären Virulenzfaktoren CDT (nur allgemein für die Familie *Pasteurellaceae* vorliegend) und dem Bakteriophagen-Gen *gp36* (Jinadasa et al. 2011; Zehr et al. 2012). Olvera et al. wiesen für die VTAA der Gruppen 1 bis 3 Prävalenzen zwischen 33 und 78 % in klinischen Isolaten nach (Olvera et al. 2012). Letztgenannte Studie war die einzige, die auch nicht-virulente *H. parasuis*-Isolate in die Arbeit mit einbezogen hat. Für die extrazelluläre Serin-ähnliche Protease P2 liegen zurzeit noch keine Daten vor. Die hohe Prävalenz der Virulenzfaktoren ließ sich in vorliegender Arbeit bestätigen: Die untersuchten Virulenzfaktoren lagen mit Ausnahme des Kapselgens *capD*, des Bakteriophagens *gp36* und der VTAA der Gruppe 2 in 70 bis 90 % der Isolate vor.

Es gibt derzeit noch keine Studien, die sich mit den Prävalenzen ausgewählter Virulenzfaktoren in unterschiedlichen Regionen beschäftigt haben. In dieser Arbeit gelang der Vergleich leider ebenfalls nur bedingt, da die Bakumer Proben im Gegensatz zu den Gießener Proben nur von Schweinen mit *H. parasuis*-spezifischen Krankheitsanzeichen vorlagen. Der signifikant häufigere Nachweis der Virulenzfaktoren aus Bakum entsprach daher auch den Erwartungen.

Das Zusammenspiel der verschiedenen Virulenzfaktoren scheint entscheidend bei der Verbreitung von *H. parasuis* im Organismus zu sein. Systemisch pathologisch-anatomische Veränderungen werden für neun der zehn untersuchten Virulenzfaktoren angenommen (Kielstein und

Rapp-Gabrielson 1992; Oliveira et al. 2003a; Costa-Hurtado et al. 2013; Zhang et al. 2014c). Kapselgene und äußere Membranproteine sollen durch Immunevasions-Mechanismen zur Serumresistenz und damit der systemischen Verbreitung von *H. parasuis* im Schwein führen (Howell 2014; Wei et al. 2014). Die DNase Cytolethal Distending Toxin (CDT) zeigt eine ähnliche Wirkung durch Auslösen der Apoptose sich schnell teilender Zellen (Costa-Hurtado und Aragón 2013). Auch das Fimbrien-Gen *pilF*, sowie die Gene für die Virulenz-assoziierten trimerischen Autotransporter (VTAA) der Gruppen 1 bis 3 und die extrazelluläre Serin-ähnliche Protease P2 führen zu systemischer Ausbreitung im Schwein und damit zu Polyserositiden und Arthritiden (Pina et al. 2009; Olvera et al. 2010; Xu et al. 2011). Nur das Bakteriophagen-Gen *gp36* wirkt indirekt durch Einbau verschiedener DNA-Stücke in *H. parasuis* und wird deshalb für die Heterogenität in der Virulenz verantwortlich gemacht (Zehr et al. 2012).

Da in bisherigen Arbeiten noch kein dominierender oder allein verantwortlicher Virulenzfaktor ermittelt wurde (Sack und Baltes 2009; Zhou et al. 2010a), scheint erst das Zusammenwirken mehrerer Faktoren zur erhöhten Virulenz beim Schwein zu führen. Als typische Befunde für *H. parasuis* wurden die katarrhalisch-eitrige Bronchopneumonie und fibrinöse Veränderungen bzw. im chronischen Verlauf der Erkrankung fibroplastische Veränderungen der Organe beschrieben (Glässer 1910; Oliveira und Pijoan 2002). Die vorliegende Arbeit bestätigt diese Befunde: Für alle untersuchten Virulenzfaktoren konnten signifikante Assoziationen mit dem klinischen bzw. pathologisch-anatomischen Status der Tiere hergestellt werden: Für die fibroplastische Pleuritis zeigten sich signifikante Assoziationen zum Kapselgen *capD* und den VTAA der Gruppen 1 bis 3. Für die fibroplastische Perikarditis wurden für alle Virulenzfaktoren bis auf das Kapselgen und das äußere Membranprotein P5 signifikante Assoziationen nachgewiesen. Für die fibroplastische Peritonitis waren es alle außer dem Fimbrien-Gen *pilF*. Dies stützt die Vermutung, dass nicht ein einzelner, sondern das Zusammenspiel verschiedener Virulenzfaktoren für die Ausbildung des klinischen Bildes bei Infektion mit *H. parasuis* entscheidend sind (Costa-Hurtado und Aragón 2013; Wang et al. 2013; Howell 2014; Wei et al. 2014 (Costa-Hurtado und Aragón 2013; Wang et al. 2013; Howell 2014; Wei et al. 2014).

Um noch detailliertere Aussagen über die potentielle Virulenz des einzelnen Isolates machen zu können, wurden in der vorliegenden Arbeit die pathologisch-anatomischen Befunde in einen selbst erstellten Bewertungsscore mit einbezogen. Hierbei wurde ein hoch signifikanter Zusammenhang zwischen dem Nachweis der folgenden fünf Virulenzfaktoren und der Krankheitskategorie hergestellt: die extrazelluläre Serin-ähnliche Protease 2, das äußere Membranprotein P2 und die VTAA der Gruppen 1 bis 3. Es gab keinen einzigen Fall in Krankheitskategorie 3, in

dem keiner dieser fünf Virulenzfaktoren nachgewiesen wurde. Ein umgekehrtes Bild zeigte sich bei Krankheitskategorie 0: Wurde hier ein *H. parasuis*-Isolat ohne alle dieser fünf Virulenzfaktoren nachgewiesen, lag die Wahrscheinlichkeit bei 45 %, dass das Tier klinisch ohne besonderen Befund blieb. Bei Nachweis der fünf genannten Virulenzfaktoren sank diese auf 6,8 %. Isolate mit einem bis vier dieser fünf Virulenzfaktoren wurden vor allem in den Krankheitskategorien 1 und 2 nachgewiesen (67,5 %) und kamen nur selten in den beiden extremen Krankheitskategorien 0 und 3 vor. Damit konnten die fünf genannten Virulenzfaktoren als wichtige Grundlage der Beurteilung der Virulenz von *H. parasuis* nachgewiesen werden.

H. parasuis wird häufig im Probenmaterial von Tieren mit dem Porcine Respiratory Disease Complex nachgewiesen, seine pathogene Rolle konnte aber bis jetzt nie sicher eruiert werden (Loera-Muro und Ramírez-Castillo 2015). Die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Erkenntnisse bringen uns der Lösung dieses Problems jedoch endlich näher. Die Entwicklung einer Multiplex-PCR für die fünf genannten Virulenzfaktoren wird also in der Zukunft für die Diagnostik von maßgeblicher Bedeutung sein. Basierend auf diesen Ergebnissen können betriebsindividuell Prophylaxe- und Therapiekonzepte erstellt werden.

Von den bisher einzeln bei *H. parasuis* untersuchten Virulenzfaktoren lag der Fokus vor allem auf der Gruppe der Virulenz-assoziierten trimerischen Autotransporter (VTAA), insbesondere denen der Gruppe 1 (Costa-Hurtado und Aragón 2013). Isolate, die diesen Virulenzfaktor tragen, wurden in systemischen Lokalisationen im Schwein nachgewiesen (Pina et al. 2009). Olvera et al. belegten für die Gruppe 1 der VTAA bereits eine verbesserte Adhärenz an den Epithelien von Lunge und ZNS (Olvera et al. 2010; Olvera et al. 2012). In der vorliegenden Arbeit wurde ein signifikantes Verteilungsungleichgewicht für die VTAA der Gruppe 2 beim Nachweis in den verschiedenen Organen festgestellt. Vor allem in Gelenken und auf den Serosen war die Prävalenz mit 80 bzw. 90 % sehr hoch. Da der Fokus der bisherigen Forschungen auf den VTAA der Gruppe 1 lag, ist zum jetzigen Zeitpunkt wenig über die VTAA der Gruppe 2 bekannt. Sie wurden lediglich zusammen mit den VTAA der Gruppe 1 in systemischen Isolaten nachgewiesen (Pina et al. 2009).

In der vorliegenden Arbeit wurde des Weiteren eine signifikant geringere Assoziation der VTAA der Gruppen 1 und 2 bei der Altersklasse Saugferkel im Gegensatz zu Aufzuchtferkeln und Mastschweinen festgestellt. Dies bestätigt Aussagen von Blanco et al., die eine verringerte Besiedlungsrate des Erregers durch immunkompetente Muttertiere für weniger Erkrankungsfälle in dieser Altersgruppe verantwortlich machen (Blanco et al. 2004). Aber auch die Impfung der Zuchtsauen soll zu einem späteren Besiedeln der Ferkel und einer verbesserten

Herdengesundheit führen (Cerdà-Cuéllar et al. 2010). Für die VTAA der Gruppe 3 konnten in dieser Arbeit keine signifikanten Unterschiede zwischen den Altersgruppen nachgewiesen werden. Dies bestätigt die Forschungsergebnisse von Olvera et al., die keine Assoziation zur Virulenz von VTAA der Gruppe 3 bei *H. parasuis* nachweisen konnten. Da sie aber diesen Virulenzfaktor in all ihren Isolaten nachweisen konnten, empfahlen sie, die VTAA der Gruppe 3 als Kandidatengen für eine speziesspezifische PCR zu verwenden (Olvera et al. 2012). Diese Aussage steht wiederum konträr zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit. Hier konnten die VTAA aus Gruppe 3 nur in 83,3 % der Isolate nachgewiesen werden und sind damit für den sicheren (sensitiven) Speziesnachweis nicht geeignet.

Leider war es in der vorliegenden Arbeit aufgrund der weitgehenden Co-Existenz der untersuchten Virulenzfaktoren innerhalb der jeweiligen Isolate nicht möglich, die Effekte einzelner Virulenzfaktoren exakt voneinander zu trennen. Um eine exakte Klärung der Einzelwirkung der untersuchten Virulenzfaktoren zu erreichen, müssten letztlich Infektionsversuche mit genetisch veränderten *H. parasuis*-Stämmen durchgeführt werden, die nur noch einen einzigen isolierten Virulenzfaktor exprimieren. Solche Studien sind wegen der difizilen Fragestellung, sowie der Schwierigkeit bei der Durchführung und aufgrund tierschutzrechtlicher Aspekte allerdings noch nicht in Sicht.

Bei akuten Erkrankungen mit Beteiligung von *H. parasuis* ist der Einsatz von Antibiotika nach wie vor unverzichtbar. Diesem sollte im optimalen Fall immer ein Resistenztest vorangehen (Bundestierärztekammer 2015). International wurden hierzu bislang zwei Verfahren weitgehend gleichwertig eingesetzt: die Agargelddiffusion und die Mikrobouillondilution (Oliveira 2007; Martín de la Fuente et al. 2007; Zhou et al. 2010b). Aufgrund widersprüchlicher Ergebnisse zwischen diesen Testverfahren und auch zwischen durchführenden Laboren (Oliveira 2007) schlug das Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) bereits im Jahr 2008 vor, ein einheitliches Testverfahren für *H. parasuis* zu entwickeln (Clinical and Laboratory Standards Institute 2008). In Deutschland wurde in neueren Arbeiten für *H. parasuis* die Mikrobouillondilution bevorzugt (Tegeler 2013). In der vorliegenden Arbeit wurden Befunde beider Testverfahren ausgewertet und signifikante Unterschiede in den Ergebnissen zwischen den Methoden am Standort Bakum festgestellt, wo beide Verfahren nebeneinander – aber nicht für die gleichen Stämme - eingesetzt wurden. Die Ergebnisse decken sich weitgehend mit Untersuchungsergebnissen von Prüller et al. (2017), die von der Agargelddiffusion als Testmethode ab-raten. Zurzeit der vorliegenden Untersuchungen wurden dennoch beide Verfahren international routinemäßig für *H. parasuis* angewandt (Zimmerman et al. 2012).

Für *H. parasuis* sind verschiedene Resistenzmuster und -raten mit deutlichen, regionalen Unterschieden beschrieben. So waren in einer Arbeit von Martín de la Fuente et al. (2007) alle Isolate aus Großbritannien sensibel auf die getesteten Antibiotika, während sich in Spanien hohe Resistenzraten zeigten und die Isolate nur gegenüber Florfenicol sensibel waren. Auch im Vergleich zwischen Untersuchungen aus Dänemark von Aarestrup et al. 2004 und Norddeutschland von Tegeler 2013 zeigten sich Unterschiede in den Ergebnissen zur Resistenz (Aarestrup et al. 2004; Tegeler 2013). Allerdings ist der zeitliche Abstand zwischen diesen beiden Untersuchungen zu beachten. Gerade im Zeitraum der letzten 15 Jahre wurde viel über Antibiotikaresistenzen diskutiert und die internationale und nationale Gesetzgebung angepasst (Europäisches Parlament 2003; Bundestierärztekammer 2015). Tegeler konnte außerdem Schwankungen in der Pansensibilität der Stämme von *H. parasuis* zwischen 2005 mit 27 % und 2010 mit 32,5 % feststellen. Den niedrigsten Wert erreichten die Stämme im Jahr 2009 mit nur 13,8 % (Tegeler 2013). Im Vergleich zu diesen Ergebnissen hat sich die Resistenzsituation bei den Isolaten der vorliegenden Arbeit mit nur noch 20 % pansensiblen Stämmen bereits deutlich verschlechtert. Allerdings konnten in dieser Arbeit auch mehr Antibiotika nachgewiesen werden, gegenüber denen keine Resistenzentwicklung bestand: Enrofloxacin und Marbofloxacin, die Cephalosporine Cephalothin, Ceftiofur und Cefquinom, sowie Florfenicol, Spectinomycin, Tiamulin, und Tulathromycin. Moderate Resistenzraten bis zu 25 % zeigten sich für die Wirkstoffe Amoxicillin, Amoxicillin mit Clavulansäure, Apramycin, Clindamycin, Erythromycin, Tetracyclin und Tilmicosin. Gegen Ampicillin, Gentamicin, Neomycin, Oxacillin und Penicillin waren zwischen 25 und 50 % der untersuchten Isolate resistent. Nur gegen Lincomycin und die Trimethoprim-potenzierten Sulfonamide zeigten sich über 50 % der Isolate resistent. Diese Ergebnisse decken sich in etwa mit denen von Tegeler aus 2013.

Gegen Tylosin zeigten sich alle in dieser Arbeit untersuchten Isolate resistent. Als ursächlich für diese verheerende Resistenzlage gegenüber Tylosin gilt, dass dieser Wirkstoff bis 1999 als Leistungsförderer eingesetzt wurde. Dieser Einsatz wurde verboten (Europäische Kommission 1998). In der Verordnung (EG) Nr. 1831/2003 des europäischen Parlaments und des Rates sind mittlerweile Antibiotika als Mastbeschleuniger komplett von der EU verboten worden. Das Gesetz gilt seit 01. Januar 2006 (Europäisches Parlament 2003).

Die schlechtere Resistenzlage im Einzugsgebiet von Bakum gegenüber Penicillin und Gentamicin sowie tendenziell gegenüber Amoxicillin und Trimethoprim-potenzierten Sulfonamiden bestätigen die Ergebnisse von Tegeler (Tegeler 2013) und Martín de la Fuente (2007). Dieses Phänomen dürfte mit der höheren Schweinedichte (Statistisches Bundesamt 2016) und einem

damit einhergehenden vermehrten Einsatz von Antibiotika (Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit et al. 2014) erklärbar sein. Gleichzeitig zeigte sich eine Tendenz für höhere Resistenzraten bei Absetzern; diese Altersgruppe ist durch den Wegfall maternalen Antikörper und die Vermischung von Würfen doppelt von Infektionserregern bedroht und deshalb besonders häufig Ziel antibiotischer Behandlung (Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit 2017).

Im Gesamtkontext ist die Resistenzlage von *H. parasuis* dennoch weitgehend als eher günstig zu bewerten, obwohl die „klassischen“ veterinärmedizinischen Wirkstoffe bereits mit Vorsicht zu verwenden sind. Immerhin zeigten sich in dieser Arbeit 35,6 % der Isolate nur gegen höchstens eins der untersuchten Antibiotika resistent. In ihrer Arbeit stellte Tegeler fest, dass *H. parasuis* von allen der von ihr untersuchten Lungenpathogene (*A. pleuropneumoniae*, *B. bronchiseptica*, *H. parasuis*, *P. multocida* und *S. suis*) derjenige mit der ungünstigsten Resistenzentwicklung ist (Tegeler 2013). Eine Erklärung dafür wäre dessen ubiquitäres Vorkommen (Blanco et al. 2004). Denn bei jeder systemischen antibiotischen Behandlung muss sich *H. parasuis* mit dem eingesetzten Antibiotikum auseinandersetzen. Zum Wohl der Tiere muss aber bei akuten Ausbrüchen weiterhin antibiotisch behandelt werden. Auf langfristige Sicht sind aber Prophylaxe-Maßnahmen wie besseres Betriebsmanagement bei Umstallung der Tiere und der Hygiene im Bestand, sowie eine Impfung der Tiere zu bevorzugen.

Aussagen zur Virulenz von *H. parasuis* basierten bislang praktisch ausschließlich auf dem Nachweis des Serotypen (Kielstein und Rapp-Gabrielson 1992; Zimmerman et al. 2012). Untersuchungen zeigen, dass zwar in einzelnen Ländern bzw. Regionen unterschiedliche Serotypen vorherrschen, diese aber kaum mit der Virulenz oder dem klinischen Bild korrelieren (Aragón et al. 2010b). Damit lassen sich aus dem Serotypen keine belastbaren Zusammenhänge mit dem zu erwartenden klinischen Bild, bzw. einer Beteiligung von *H. parasuis* am Krankheitsgeschehen ableiten (Zhang et al. 2014c; Zhang et al. 2014d).

In der vorliegenden Arbeit wurden bis auf die Serotypen 8 und 14 alle Serotypen im Untersuchungsgut nachgewiesen; teilweise auch als Mehrfachnachweis aus einem Isolat. Dabei zeigten sich in beiden Untersuchungsgebieten zwar hoch variable Muster, aber kein vorherrschender Serotyp. Auch vermutete Zusammenhänge zwischen Serotypen, Resistenz, Virulenz und Krankheitsbildern konnten in vorliegender Arbeit nicht bestätigt werden, was jedoch teilweise in der hohen Zahl an Varianten und Kombinationen begründet lag. Anzahlen von Isolaten, die notwendig gewesen wären, um auch bezüglich aller vorkommenden Kombinationen aus Serotypen und Resistenzen bzw. Serotypen und Virulenzfaktoren statistisch relevante Aussagen zu

erlauben, konnten in der vorliegenden Arbeit nicht realisiert werden und entsprachen auch nicht dem Ziel.

Aufgrund der hohen Bedeutung der Impfprophylaxe in der Bekämpfung von *H. parasuis* spielt die Kenntnis des Serotyps dennoch nach wie vor eine große Rolle; denn für Deutschland stehen derzeit lediglich zwei kommerzielle Impfstoffe mit Wirkung gegen die Serotypen 4 und 5 zur Verfügung, bei nur geringer Kreuzreaktivität mit den übrigen Serotypen (Bak und Rijsing 2002; Paul-Ehrlich-Institut).

Die Zeit, in der die meisten Erkrankungsfälle unter Mitbeteiligung von *H. parasuis* auftreten, wird auf zwei bis vier Wochen nach dem Absetzen bzw. dem Umställen in die Mast terminiert (Oliveira und Pijoan 2002). Der in dieser Arbeit nachgewiesene hoch signifikante Zusammenhang zwischen der Altersklasse der Tiere und der Krankheitskategorie bestätigt diese Aussage. Nur 12,6 % der Saugferkel waren in den Krankheitskategorien 2 und 3 zu finden; für die Aufzuchtferkel betrug dieser Anteil 74,1 %, für die Mast 64,6 %. Zusätzlich wurden in der vorliegenden Arbeit eine katarrhalisch-eitrige Bronchopneumonie, Retraktion, Arthritis, sowie fibroplastische Pleuritis und Perikarditis signifikant häufiger in der Altersgruppe Aufzucht nachgewiesen. Die Erregerbelastung durch *H. parasuis* im unteren Respirationstrakt dieser Altersgruppe war ebenfalls hoch signifikant. Dies bestätigt vorangegangene Veröffentlichungen, die einen Antikörper-abhängigen Krankheitsverlauf bei *H. parasuis* feststellten und das Auftreten von Erkrankungen vor allem für den Aufzuchtstall beschrieben (Fittipaldi et al. 2012; Macedo et al. 2016). Saugferkel, die sich bei der Sau infizieren, sind durch die maternalen Antikörper vor dem Ausbruch der Krankheit geschützt. Der Fokus der Krankheitsausbrüche durch *H. parasuis* und damit auch die Nachweishäufigkeit in den Organen durch den Erreger liegt daher bei den Schweinen im Alter von zwei bis vier Wochen nach dem Absetzen bzw. Umställen in eine neue Gruppe – begründet durch die hier entstehende immunologische Lücke (Oliveira et al. 2003a). Auch dieser Zusammenhang konnte in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. Hier konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Nachweis von *H. parasuis* in den untersuchten Organen und der Krankheitskategorie erbracht werden. Nur für den oberen Respirationstrakt ergaben sich keine signifikanten Zusammenhänge, was mit dem ubiquitären Vorkommen (Blanco et al. 2004) des Erregers zu erklären sein dürfte.

Fazit

In der vorliegenden Arbeit konnten alle zehn untersuchten Virulenzfaktoren bei *H. parasuis*-Stämmen aus Deutschland nachgewiesen werden. Dies ist der erste gemeinsame Nachweis dieser Virulenzfaktoren von Isolaten aus Deutschland.

Bei der Diagnostik in Verdachtsfällen von *H. parasuis* sollte auch weiterhin auf eine Kombination von klinischer und pathologisch-anatomischer Untersuchung einerseits und dem Erregernachweis aus betroffenem Gewebe andererseits zurückgegriffen werden.

Hierbei sollten die Virulenzfaktoren in Zukunft aber viel stärker bei der Beurteilung der Pathogenität des Erregers und der daran orientierten Behandlung der erkrankten Schweine mit einbezogen werden. Eine PCR der fünf vorgestellten Virulenzfaktoren von Abstrichen der oberen Atemwege kann bereits Aufschluss über die Bedeutung von *H. parasuis* als Problem im Bestand und damit dessen Behandlungsbedürftigkeit und Präventionswürdigkeit geben.

Im Resistenzverhalten von *H. parasuis* gibt es regional stark schwankende Unterschiede, die unter anderem auch auf das jeweils angewendete Testverfahren, auf das wir keinen Einfluss hatten, zurück zu führen sind. Es wird bereits international (CSLI) und national (*Arbeitskreis Antibiotikaresistenz* der DVG) an der Etablierung eines einheitlichen Verfahrens zur Resistenzbestimmung von *H. parasuis* gearbeitet, damit es in Zukunft weniger Varianz in den Untersuchungsergebnissen der Empfindlichkeitstestung gibt.

Aufgrund der vielen Ausprägungen von Serotypen und der begrenzten Probenanzahl war es nicht möglich, einen Zusammenhang zwischen Serotyp und Virulenz zu bestätigen. Aber tendenziell sagen die Serotypen weder über die Virulenz, noch über Antibiotikaresistenzen oder epidemiologische Sachverhalte etwas aus. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen somit vorangegangene Forschungsergebnisse.

6 Zusammenfassung

Die Beteiligung von *H. parasuis* am Krankheitsgeschehen in Schweinebeständen wird seit Jahren immer wieder diskutiert. Der Erreger kann als Kommensale, aber auch als fakultativer Krankheitserreger das Schwein besiedeln. Dabei ist zwischen einer fibrinösen Pneumonie und der systemischen Erkrankung, der sogenannten Glässer'schen Krankheit zu unterscheiden. Das Hauptproblem ist, dass es verschiedene Stämme des Erregers gibt, die sich in der klinischen Ausprägung a- bis hochvirulent zeigen können. Hieraus ergeben sich erhebliche Probleme in der Diagnostik, der Therapie und bei der Wirksamkeit der Impfstoffe. Außerdem zeigt *H. parasuis* außerhalb des Wirtes eine geringe Tenazität, was zu Schwierigkeiten im Nachweis durch bakterielle Kultur und Folgeverfahren wie Resistenztests und Serotypisierung führt.

Ziel der Arbeit war es, molekulare Ursachen für die Ausprägung der Virulenz von *H. parasuis* zu finden. In der vorliegenden Arbeit wurden 138 Isolate von *H. parasuis* aus deutschen Betrieben auf das Vorhandensein von 10 ausgewählten möglichen Virulenzfaktoren untersucht. Durch die pathologisch-anatomischen Befunde und anamnestischen Parameter lag für die jeweiligen Isolate ein umfassendes Arsenal an Metadaten vor. Die in der vorliegenden Arbeit entwickelte Einteilung in vier Krankheitskategorien von 0 – 3 (0 „o. b. B.“ bis 3 „hochgradig *H. parasuis*-spezifische Befunde“) erlaubte eine Abschätzung der Virulenz des jeweils untersuchten Isolates. Es wurden mittels χ^2 -Test nach Pearson Assoziationen zwischen Serotypen, Resistenzverhalten, Virulenzfaktoren, Organnachweisen, Tierkategorien und der Krankheitskategorie untersucht.

Alle 10 Virulenzfaktoren konnten in allen beprobten Organen und Altersstufen nachgewiesen werden. Es bestanden signifikante Zusammenhänge zwischen dem Nachweis der Virulenzfaktoren, den pathologisch-anatomischen Befunden, der Krankheitskategorie und dem Alter. Zusammenhänge zum Resistenzverhalten bzw. zum Serotyp konnten nicht hergestellt werden.

Eine PCR, die die 5 am engsten assoziierten Virulenzfaktoren (extrazelluläre Serin-ähnliche Protease P2, äußeres Membranprotein P2 und die Virulenz-assoziierten trimerischen Autotransporter der Gruppen 1 bis 3) detektiert, kann zur Aufklärung beitragen, ob der Erreger am Krankheitsgeschehen im Bestand beteiligt ist oder nur als Kommensale eine Rolle spielt.

Die gewonnenen Erkenntnisse ermöglichen die bessere Beurteilung des Erregers in Bezug auf seine klinische Relevanz und Behandlungsmöglichkeiten und können in Zukunft praktisch eingesetzt werden.

7 Summary

The role of *Haemophilus parasuis* (*H. parasuis*) as a factor in diseases in pig farms has been frequently discussed over the last decades. The agent can be a commensal in the upper respiratory tract or it can colonize the pig as a facultative infectious agent. Fibrinous inflammation in pigs, called Glässer's disease, has to be distinguished from catarrhal purulent bronchopneumonia. A central issue is the range of different strains of the agent: They range from avirulent to highly virulent. This causes massive problems in diagnostics, therapy and vaccination. Furthermore, *H. parasuis* shows weak tenacity outside the host. This leads to difficulties in cultivation, antimicrobial susceptibility testing and serotyping.

The aim of the present survey was to identify molecular markers of *H. parasuis* in association with virulence of field isolates. 138 strains of *H. parasuis* were collected from swine herds in Germany (Lower Saxony and Hesse). *H. parasuis* was cultured, serotyped and screened by PCR regarding 10 putative and potential virulence genes.

The severity of disease levels within herds varied from definite cases of commensalism to cases with specific, high degree clinical and pathological symptoms. Individual pigs were dissected and sampled. In this study classification from degree 0 to 3 (0 "without symptoms" to 3 "high-grade of *H. parasuis* specific findings") led to an assessment of the virulence of the examined strain. Associations between serotypes, resistance, virulence factors, evidence in the organs, category of the age of the pigs and category of illness were examined via Pearson's χ^2 test.

All 10 virulence factors were verified in all organs and all categories of age. There was a significant association between virulence factors and pathologic examination as well as category of disease and age. There was no association with serotypes or resistance to antibiotics.

Development of a PCR which can detect the five most highly associated virulence factors (extracellular serine protease-like Protein 2, Outer Membrane Protein P2 and virulence-associated trimeric autotransporter of groups 1-3), can lead to information, if the strain is the causative agent of the disease or just acting as a commensal.

These new findings allow a better assessment of *H. parasuis* in regard to its clinical outcome and options of therapy. Thus, they can be used practically in the future.

8 Anhang

Tabelle 24: Bereits bekannte Sequenzen

Isolat-Bezeichnung	Serotyp	Autor
SH0165	5	Yue et al. 2009
29755	5	Mullins et al. 2011
ZJ0906	12	Li et al. 2012; Li et al. 2013b
Gx033	4	Li et al. 2013b
12939	1, 4	Kuehn et al. 2013
SW140	2	
MN-H (19851)	13	
84-15995	15	
SW114	3	
H465	11	
D74	9	
174	7	
SC1401	11	

Tabelle 25: *H. parasuis*-Isolate aus dem Institut für Mikrobiologie Bakum [n=46]

Proben-ID	Proben-ID-Institut	Jahr der Isolation	Ort der Isolation
B1	2133	2010	Bronchus
B2	2195	2010	Bronchus
B3	2202	2010	Bronchus
B4	2203	2010	Bronchus
B5	2232	2010	Bronchus
B6	2454	2010	Bronchus
B7	2487	2010	Bronchus

Proben-ID	Proben-ID-Institut	Jahr der Isolation	Ort der Isolation
B8	2574	2010	Bronchus
B9	2582	2010	Bronchus
B10	2756	2010	Bronchus
B11	2849	2010	Bronchus
B12	2925	2010	Bronchus
B13	2941	2010	Bronchus
B14	2969	2010	Bronchus
B15	2971	2010	Bronchus
B16	3026	2010	Bronchus
B17	3070	2010	Bronchus
B18	3103	2010	Bronchus
B19	3117	2010	Bronchus
B20	3118	2010	Bronchus
B21	2529	2010	Bronchus
B22	2641	2010	Bronchus
B23	2204	2010	Bronchus
B24	2362	2010	Bronchus
B25	2476	2010	Bronchus
B26	2927	2010	Bronchus
B27	2147	2010	Bronchus
B28	190/11 BRO	2011	Bronchus
B29	190/11 BRU	2011	Pleura
B30	190/11 HB	2011	Perikard
B31	310/11 LU	2011	Lunge
B32	310/11 BH	2011	Peritoneum

Proben-ID	Proben-ID-Institut	Jahr der Isolation	Ort der Isolation
B33	439/11 BRO	2011	Bronchus
B34	439/11 LU	2011	Lunge
B35	440/11 BRO	2011	Bronchus
B36	440/11 HB	2011	Perikard
B37	440/11 BH	2011	Peritoneum
B38	440/11 GE	2011	Gelenkspalt
B39	440/11 ZNS	2011	ZNS
B40	446/11 BRU	2011	Pleura
B41	446/11 ZNS	2011	ZNS
B42	2929/11 BH	2011	Peritoneum
B43	3023/11 BRU	2011	Pleura
B44	3058/11 HB	2011	Perikard
B45	2847/11 ZNS	2011	ZNS
B46	3014/11 GE	2011	Gelenkspalt

ZNS: Zentrales Nervensystem

Tabelle 26: *H. parasuis* -Isolate aus der KWS-S (Gießen) [n=93]

Proben-ID	Proben-ID-KWS-S	Jahr der Isolation	Ort der Isolation
G001	09/0159T	2009	Tonsille
G002	09/0160T	2009	Tonsille
G003	14/0901	2014	Tonsille
G004	09/0255T	2009	Tonsille
G005	09/0591T	2009	Tonsille
G006	09/0592T	2009	Tonsille

Proben-ID	Proben-ID-KWS-S	Jahr der Isolation	Ort der Isolation
G007	09/0593T	2009	Tonsille
G008	09/0685T	2009	Tonsille
G009	09/1006T	2009	Tonsille
G010	11/0326	2011	Tonsille
G011	11/0328	2011	Tonsille
G012	11/1099	2011	BALF
G013	11/1124	2011	BALF
G014	11/1155	2011	BALF
G015	12/0074	2012	BALF
G016	12/0171	2012	BALF
G017	12/0270	2012	Lunge
G018	12/0465	2012	BALF
G019	12/0473	2012	BALF
G020	12/0648	2012	BALF
G021	12/0668	2012	BALF
G022	12/0871	2012	BALF
G023	12/1045	2012	BALF
G024	12/1220To	2012	Tonsille
G025	13/2387To	2013	Tonsille
G026	10/1421T	2010	Tonsille
G027	10/1422T	2010	Tonsille
G028	09/0136 Lu	2009	Lunge
G029	09/0136 T	2009	Tonsille
G030	09/0172 Lu	2009	Lunge
G031	09/0172 T	2009	Tonsille

Proben-ID	Proben-ID-KWS-S	Jahr der Isolation	Ort der Isolation
G032	09/0210 Lu	2009	Lunge
G033	09/0210 T	2009	Tonsille
G034	09/0214 Lu	2009	Lunge
G035	09/0214 T	2009	Tonsille
G036	09/0234 Lu	2009	Lunge
G037	09/0234 T	2009	Tonsille
G038	09/0328 Lu	2009	Lunge
G039	09/0328 T	2009	Tonsille
G040	09/0330 Lu	2009	Lunge
G041	09/0330 T	2009	Tonsille
G042	09/0368 Lu	2009	Lunge
G043	09/0368 T	2009	Tonsille
G046	09/0370 Lu	2009	Lunge
G047	09/0370 T	2009	Tonsille
G048	09/0371 Lu	2009	Lunge
G049	09/0371 T	2009	Tonsille
G050	09/0372 Lu	2009	Lunge
G051	09/0372 T	2009	Tonsille
G052	09/0373 Lu	2009	Lunge
G053	09/0373 T	2009	Tonsille
G054	09/0506 Lu	2009	Lunge
G055	09/0506 T	2009	Tonsille
G056	09/0590 Lu	2009	Lunge
G057	09/0590 T	2009	Tonsille
G058	09/0684 Lu	2009	Lunge

Proben-ID	Proben-ID-KWS-S	Jahr der Isolation	Ort der Isolation
G059	09/0684 T	2009	Tonsille
G060	09/0777 Lu	2009	Lunge
G061	09/0777 T	2009	Tonsille
G062	09/0840 Lu	2009	Lunge
G063	09/0840 T	2009	Tonsille
G064	09/0961 Lu	2009	Lunge
G065	09/0961 T	2009	Tonsille
G066	09/1380 Lu	2009	Lunge
G067	09/1380 T	2009	Tonsille
G068	09/1399 Lu	2009	Lunge
G069	09/1399 T	2009	Tonsille
G070	12/0432	2012	BALF
G071	12/0434	2012	Lunge
G072	12/0481	2012	BALF
G073	12/0484	2012	Lunge
G074	12/0488	2012	BALF
G075	12/0489	2012	Lunge
G076	12/0772	2012	BALF
G077	12/0773	2012	Lunge
G078	12/0933	2012	Lunge
G079	12/0269	2012	Lunge
G080	3737/1/14	2014	Bronchus
G081	4844/1/14	2014	Perikard
G082	1699/15	2015	Nasentupfer
G083	1007/13	2013	BALF

Proben-ID	Proben-ID-KWS-S	Jahr der Isolation	Ort der Isolation
G084	1008/13	2013	BALF
G085	3378/14/1	2014	ZNS
G086	3378/14/2	2014	ZNS
G087	412/13	2013	BALF
G088	744/13	2013	BALF
G089	13/0568	2013	Gelenkspalt
G090	1840/1/15	2015	Gelenkspalt
G091	1840/2/15	2015	Gelenkspalt
G092	162/13	2013	ZNS
G093	2836/12	2012	BALF
G094	2837/12	2012	BALF
G095	2838/12	2012	BALF

BALF: Bronchio-Alveoläre-Lavage-Flüssigkeit; ZNS: Zentrales Nervensystem

Tabelle 27: Auftreten der Virulenzfaktoren in Abhängigkeit vom Serotypen

ST →	1	2	3	4	5	6	7	9	10	11	12	13	15	nt
ges. [n]	3	5	1	3	2	3	3	5	1	2	3	6	3	5
VF ↓														
Kapsel	1/3	1/5	0/1	1/3	0/5	0/3	1/3	2/5	1/1	1/2	2/3	2/6	0/3	4/5
CDT	3/3	4/5	1/1	3/3	2/5	2/3	3/3	5/5	1/1	2/2	3/3	6/6	3/3	4/5
ESPP2	3/3	5/5	1/1	3/3	2/5	3/3	3/3	5/5	1/1	2/2	3/3	6/6	3/3	5/5
GP36	3/3	3/5	1/1	2/3	2/5	0/3	3/3	3/5	0/1	2/2	3/3	3/6	1/3	4/5
PILF	3/3	5/5	1/1	3/3	2/5	3/3	3/3	5/5	1/1	2/2	3/3	6/6	3/3	5/5
OMPP2	3/3	5/5	1/1	3/3	2/5	3/3	3/3	5/5	1/1	2/2	3/3	6/6	3/3	4/5

ST →	1	2	3	4	5	6	7	9	10	11	12	13	15	nt
OMPP5	3/3	5/5	1/1	3/3	2/5	3/3	3/3	4/5	1/1	2/2	3/3	6/6	3/3	5/5
VTAA1	3/3	5/5	1/1	3/3	2/5	3/3	3/3	5/5	1/1	2/2	3/3	6/6	3/3	5/5
VTAA2	3/3	5/5	1/1	3/3	2/5	3/3	3/3	4/5	1/1	2/2	3/3	6/6	3/3	4/5
VTAA3	3/3	5/5	1/1	3/3	2/5	3/3	3/3	5/5	1/1	2/2	3/3	6/6	3/3	5/5

CDT: Cytolethal Distending Toxin; ESPP2: extrazelluläre Serin-ähnliche Protease P2; ges.: gesamt; GP36: Bakteriophagen-Gen; nt: nicht typisierbar; OMPP: äußeres Membranprotein P; PILF: Fimbriengen F; ST: Serotyp; VF: Virulenzfaktor; VTAA: Virulenz-assoziiertes trimerischer Autotransporter; angegeben sind die Gesamtfallzahlen (n) der untersuchten Serotypen und die Anzahl positiver Virulenzgennachweise innerhalb des jeweiligen Serotyps

Tabelle 28: Vorkommen von Resistenzen gegenüber den überprüften Antibiotika verteilt auf die einzeln nachgewiesenen Serotypen

ST→	1	2	3	4	5	6	7	9	11	12	13	15	nt
Bakum [n]	2	2	1	1	2	0	3	1	1	3	3	0	1
Gießen [n]	0	1	0	1	0	2	0	2	0	0	1	1	4
AB↓													
in beiden Herkunftsorten durchgeführte Resistenztests													
Pen	1/2	0/3	1/1	1/2	1/2	0/2	0/3	1/3	0/1	1/3	0/4	0/1	1/5
AMX	0/1	0/3	-	-	0/1	0/1	0/3	0/2	0/1	0/1	0/4	0/1	1/4
AMC	0/1	0/1	0/1	0/2	0/1	0/2	-	0/3	-	0/2	0/4	0/1	0/4
Cefq	0/1	0/1	0/1	0/2	0/1	0/2	-	0/3	-	0/2	0/1	0/1	0/4
Ceft	0/2	0/3	0/1	0/2	0/2	0/2	0/3	0/3	0/1	0/3	0/4	0/1	0/5
TrimSulf	0/2	2/3	0/1	1/2	1/2	1/2	0/3	1/3	0/1	1/3	2/4	0/1	3/5
Flor	0/1	0/1	0/1	0/2	0/1	0/2	-	0/3	-	0/2	0/1	0/1	0/4
Enro	0/2	0/3	0/1	0/2	0/2	0/2	0/3	0/3	0/1	0/3	0/4	0/1	0/5

ST→	1	2	3	4	5	6	7	9	11	12	13	15	nt
Genta	0/2	2/3	0/1	0/2	0/2	0/2	2/3	1/3	1/1	0/3	¼	0/1	1/5
Ery	0/2	0/3	0/1	1/2	0/2	1/2	0/3	1/3	0/1	0/3	0/4	0/1	1/5
Tetra	0/2	0/3	0/1	0/2	0/2	0/2	0/3	1/3	0/1	0/3	0/4	0/1	1/5
nur in Bakum durchgeführte Resistenztests													
Tilm	0/1	-	0/1	0/1	0/1	-	-	0/1	-	0/2	-	-	-
Tiam	0/1	-	0/1	0/1	0/1	-	-	0/1	-	0/2	-	-	-
Tylo	1/1	2/2	-	-	1/1	-	3/3	-	1/1	1/1	3/3	-	1/1
Amp	1/2	0/2	0/1	0/1	0/2	-	0/3	1/1	0/1	0/3	0/3	-	0/1
Oxa	0/1	0/2	-	-	0/1	-	0/3	-	0/1	0/1	0/3	-	0/1
Ceph	0/1	-	0/1	0/1	0/1	-	-	0/1	-	0/2	-	-	-
Apra	0/2	0/2	0/1	0/1	0/2	-	2/3	0/1	0/1	1/3	1/3	-	0/1
Neo	0/2	2/2	0/1	0/1	0/2	-	2/3	1/1	1/1	1/3	0/3	-	1/1
Spect	0/2	0/2	0/1	0/1	0/2	-	0/3	0/1	0/1	1/3	0/3	-	0/1
Clind	0/1	-	0/1	0/1	0/1	-	-	0/1	-	0/2	-	-	-
Linc	0/1	2/2	-	-	1/1	-	0/3	-	1/1	0/1	3/3	-	1/1
nur in Gießen durchgeführte Resistenztests													
Marbo	-	0/1	-	0/1	-	0/1	-	0/2	-	-	0/1	0/1	0/3
Tula	-	0/1	-	0/1	-	0/1	-	0/2	-	-	0/1	0/1	0/3

AB: Antibiotikum; AMC: Amoxicillin-Clavulansäure; AMX: Amoxicillin; Amp: Ampicillin; Apra: Apramycin; Cefq: Cefquinom; Ceft: Ceftiofur; Ceph: Cephalothin; Clind: Clindamycin; Enro: Enrofloxacin; Ery: Erythromycin; Flor: Florfenicol; Genta: Gentamicin; Linc: Lincomycin; Marbo: Marbofloxacin; Neo: Neomycin; nt: non typeable; Oxa: Oxacillin; Pen: Penicillin; Spect: Spectinomycin; ST: Serotyp; Tetra: Tetracyclin; Tiam: Tiamulin; Tilm: Tilmicosin; TrimSulf: Trimethoprim-potenzierte Sulfonamide; Tula: Tulathromycin; Tylo: Tylosin; -: Test wurde nicht durchgeführt;

Tabelle 29: Resistenzen gegen die untersuchten Antibiotika bei Isolaten aus den verschiedenen Tierkategorien

Antibiotikum	Saugferkel [n = 3]	Flatdeck [n = 36]	Mast [n = 5]	p
Penicillin	0	38,9	10	n. s.
Amoxicillin	0	14,3	25	n. s.
AMC	0	7,7	0	n. s.
Cefquinom	0	0	0	-
Ceftiofur	0	0	0	-
TrimSulf	0	63,9	40	0,072
Florfenicol	0	0	0	-
Enrofloxacin	0	0	0	-
Gentamicin	0	30,6	20	n. s.
Erythromycin	0	16,7	0	n. s.
Tetracyclin	33,3	11,1	0	n. s.
Tilmicosin	-	16,7	0	n. s.
Tiamulin	-	0	0	-
Tylosin	-	100	100	-
Ampicillin	-	26,9	50	n. s.
Oxacillin	-	35,7	100	n. s.
Cephalothin	0	0	0	-
Apramycin	-	26,9	0	n. s.
Neomycin	42,3	50	42,9	n. s.
Spectinomycin	0	0	0	-
Clindamycin	-	8,3	0	n. s.
Lincomycin	-	92,9	100	n. s.
Marbofloxacin	0	0	0	-

Antibiotikum	Saugferkel [n = 3]	Flatdeck [n = 36]	Mast [n = 5]	p
Tulathromycin	0	0	0	-

AMC: Amoxicillin-Clavulansäure; n. s.: nicht signifikant; TrimSulf: Trimethoprim-potenzierte Sulfonamide; -: Test wurde nicht durchgeführt; angegeben sind die relativen Anteile (%) der Nachweise; die jeweiligen Signifikanzwerte (p) wurden mittels χ^2 -Test nach Pearson berechnet; Unterschiede an der Signifikanzgrenze wurden mit angegeben

Tabelle 30: Vorkommen von Antibiotikaresistenzen und den Virulenzfaktoren Kapsel, GP36 und VTAA2

Virulenzfaktor	Antibiotikum	p	VF nicht vorhanden	VF vorhanden
Kapsel	Penicillin [n = 44]	n. s.	34,5	40
	Amoxicillin [n = 28]	n. s.	5,6	30
	AMC [n = 28]	n. s.	0	18,2
	TrimSulf [n = 44]	n. s.	48,3	73,3
	Gentamicin [n = 45]	n. s.	24,1	37,5
	Erythromycin [n = 45]	n. s.	13,8	18,8
	Tetracyclin [n = 45]	n. s.	13,8	12,5
	Tilmicosin [n = 14]	n. s.	22,2	0
	Ampicillin [n = 28]	0,077	16,7	50
	Oxacillin [n = 15]	n. s.	33,3	50
	Apramycin [n = 29]	n. s.	27,8	18,2
	Neomycin [n = 29]	n. s.	33,3	63,6
	Clindamycin [n = 14]	n. s.	11,1	0
	Lincomycin [n = 15]	n. s.	100	83,3
GP36	Penicillin [n = 44]	n. s.	16,7	43,8

Virulenzfaktor	Antibiotikum	p	VF nicht vorhanden	VF vorhanden
	Amoxicillin [n = 28]	n. s.	18,2	11,8
	AMC [n = 28]	n. s.	16,7	0
	TrimSulf [n = 44]	0,057	33,3	65,6
	Gentamicin [n = 45]	n. s.	16,7	33,3
	Erythromycin [n = 45]	n. s.	8,3	18,2
	Tetracyclin [n = 45]	n. s.	8,3	15,2
	Tilmicosin [n = 14]	-	0	14,3
	Ampicillin [n = 28]	0,074	100	23,1
	Oxacillin [n = 15]	n. s.	100	30,8
	Apramycin [n = 29]	n. s.	0	25,9
	Neomycin [n = 29]	n. s.	100	40,7
	Clindamycin [n = 14]	-	0	7,1
	Lincomycin [n = 15]	n. s.	100	92,3
VTAA2	Penicillin [n = 44]	n. s.	0	40
	Amoxicillin [n = 28]	n. s.	0	28,6
	AMC [n = 28]	n. s.	0	6,9
	TrimSulf [n = 44]	n. s.	25	60
	Gentamicin [n = 45]	n. s.	0	31,7
	Erythromycin [n = 45]	n. s.	0	17,1
	Tetracyclin [n = 45]	n. s.	25	12,2
	Tilmicosin [n = 14]	-	0	14,3
	Ampicillin [n = 28]	-	0	28,6
	Oxacillin [n = 15]	-	0	40
	Apramycin [n = 29]	-	0	24,1

Virulenzfaktor	Antibiotikum	p	VF nicht vorhanden	VF vorhanden
	Neomycin [n = 29]	-	0	44,8
	Clindamycin [n = 14]	-	0	7,1
	Lincomycin [n = 15]	-	0	93,3

AMC: Amoxicillin-Clavulansäure; GP36: Bakteriophagen-Gen; n. s.: nicht signifikant; Trim-Sulf: Trimetoprim-potenzierte Sulfonamide; VF: Virulenzfaktor; VTAA: Virulenz-assoziiertes trimerischer Autotransporter; -: Test wurde nicht durchgeführt; angegeben sind die relativen Anteile (%) der Nachweise; die jeweiligen Signifikanzwerte (p) wurden mittels χ^2 -Test nach Pearson berechnet; Unterschiede an der Signifikanzgrenze wurden mit angegeben

Tabelle 31: Positive Erreger-Nachweise in den Organen verteilt auf die Krankheitskategorie bei *H. parasuis*-positiven Tieren

Positiver Erreger-NW im Organ	ges. [n]	ges. [%]	KKat 0 [%]	KKat 1 [%]	KKat 2 [%]	KKat 3 [%]	p
Tonsille							
<i>A. pleuropneumoniae</i>	11	21,2	0	20	36,4	0	0,069
<i>P. multocida</i>	3	23,1	0	28,6	33,3	0	n. s.
<i>M. hyopneumoniae</i>	3	5,9	0	6,7	9,5	0	n. s.
Lunge							
<i>A. pleuropneumoniae</i>	3	2,3	0	3,7	3,8	0	n. s.
<i>P. multocida</i>	23	17,6	0	11,1	22,6	25	0,072
<i>B. bronchiseptica</i>	19	14,5	5,3	14,8	22,6	6,3	n. s.
<i>S. suis</i>	22	16,8	0	29,6	18,9	12,5	0,055
α -häm. S.	46	35,1	57,9	59,3	22,6	21,9	0,001
β -häm. S.	9	6,9	0	7,4	13,2	0	0,069
γ -häm. S.	12	9,2	21,1	7,4	3,8	12,5	n. s.

Positiver Erreger- NW im Organ	ges. [n]	ges. [%]	KKat 0 [%]	KKat 1 [%]	KKat 2 [%]	KKat 3 [%]	p
<i>T. pyogenes</i>	3	2,3	0	0	5,7	0	n. s.
<i>P. aeruginosa</i>	14	10,7	15,8	25,9	5,7	3,1	0,015
<i>Proteus</i> sp.	8	6,1	10,5	0	9,4	3,1	n. s.
Sonstige	24	18,3	47,4	33,3	9,4	3,1	< 0,001
SIV	10	10,2	0	19	15	0	0,072
PRRSV EU	27	23,7	33,3	12,5	22,5	31,6	n. s.
PRRSV US	18	15,8	5,6	25	15,1	15,8	n. s.
PCV2	29	26,1	16,7	54,2	24	5,3	0,002
<i>M. hyopneumoniae</i>	15	13,2	5,6	8	20	9,5	n. s.
<i>M. hyorhinis</i>	20	37	28,6	12,5	47,8	37,5	n. s.
<i>Chlamydia</i> sp.	1	9,1	0	0	11,1	0	n. s.
Serosen							
<i>S. suis</i>	6	15,4	0	100	26,7	4,3	0,010
α -häm. S.	1	2,5	0	0	0	4,3	n. s.
β -häm. S.	1	2,6	0	0	6,7	0	n. s.
γ -häm. S.	0	0	0	0	0	0	-
Sonstige	2	5,1	0	0	0	8,7	n. s.
ZNS							
<i>S. suis</i>	7	13	0	50	9,5	0	0,001
α -häm. S.	6	11,1	0	30	30	0	n. s.
β -häm. S.	5	9,3	0	0	14,3	10,5	n. s.
γ -häm. S.	6	11,1	0	0	19	10,5	n. s.
<i>T. pyogenes</i>	2	3,7	50	0	0	0	< 0,001
<i>P. aeruginosa</i>	3	5,6	25	0	9,5	0	n. s.

Positiver Erreger- NW im Organ	ges. [n]	ges. [%]	KKat 0 [%]	KKat 1 [%]	KKat 2 [%]	KKat 3 [%]	p
<i>Proteus</i> sp.	5	7,4	0	0	19	0	n. s.
Sonstige	20	37,1	75	70	23,8	31,6	n. s.
Gelenk							
<i>M. hyosynoviae</i>	4	100	-	100	100	-	-
<i>M. hyorhinae</i>	1	20	-	0	25	-	0,8
<i>S. suis</i>	5	11,4	0	40	0	5,6	0,013
α -häm. S.	7	15,9	100	30	14,3	0	0,001
β -häm. S.	1	2,3	0	10	0	0	n. s.
γ -häm. S.	0	0	0	0	0	0	-
<i>T. pyogenes</i>	0	0	0	0	0	0	-
<i>P. aeruginosa</i>	4	9,1	100	0	14,3	0	< 0,001
<i>Proteus</i> sp.	2,3	0	1	0	0	0	n. s.
Sonstige	18	40,9	100	70	14,3	38,9	0,015

A.: *Actinobacillus*; B: *Bordetella*; KKat 0: keine Organbefunde; KKat 1: Organbefunde und Co-Erreger; keine *H. parasuis*-Organbefunde; KKat 2: leichte *H. parasuis*-Organbefunde; KKat 3: hochgradig *H. parasuis*-spezifische Organbefunde; M.: *Mycoplasma*; n. s.: nicht signifikant; NW: Nachweis; P.: *Pasteurella*; PCV2: Porcine Circovirus Typ 2; PRRSV: Porzines Reproduktives und Respiratorisches Syndrom Virus; S. *Streptococcus*; SIV: Schweine-Influenza Virus; sp.: Spezies; T: *Trueperella*; ZNS: Zentrales Nervensystem; α -häm. S.: α -hämolyisierende Streptokokken; β -häm. S.: β -hämolyisierende Streptokokken; γ -häm. S.: γ -hämolyisierende Streptokokken; -: Test wurde nicht durchgeführt; angegeben sind die relativen Anteile (%) der Nachweise; die jeweiligen Signifikanzwerte (p) wurden mittels χ^2 -Test nach Pearson berechnet; Unterschiede an der Signifikanzgrenze wurden mit angegeben

Tabelle 32: Positive Erreger-Nachweise in den Organen verteilt auf die Tierkategorie

Positiver Erreger-NW im Organ	ges. [n]	ges. [%]	Saugferkel [%]	Flatdeck [%]	Mast [%]	p
Tonsille						
<i>A. pleuropneumoniae</i>	11	21,2	0	8,7	50	0,001
<i>P. multocida</i>	3	23,1	30	0	23,1	n. s.
<i>M. hyopneumoniae</i>	3	5,9	0	0	16,7	0,054
Lunge						
<i>A. pleuropneumoniae</i>	3	2,3	0	1,1	7,1	n. s.
<i>P. multocida</i>	23	17,6	0	17,2	28,6	0,056
<i>B. bronchiseptica</i>	19	14,5	6,3	18,4	7,1	n. s.
<i>S. suis</i>	22	16,8	12,5	16,1	21,4	n. s.
α -häm. S.	46	35,1	56,3	32,2	32,1	n. s.
β -häm. S.	9	6,9	0	5,7	14,3	n. s.
γ -häm. S.	12	9,2	12,5	6,9	14,3	n. s.
<i>T. pyogenes</i>	3	2,3	0	3,4	0	n. s.
<i>P. aeruginosa</i>	14	10,7	25	10,3	3,6	n. s.
<i>Proteus</i> sp.	8	6,1	0	5,7	10,7	n. s.
Sonstige	24	18,3	56,3	11,5	17,9	< 0,001
SIV	10	10,2	0	15,6	0	0,052
PRRSV EU	27	23,7	33,3	27,8	10	n. s.
PRRSV US	18	15,8	0	20,8	10	n. s.
PCV2	29	26,1	36,4	23,9	27,6	n. s.
<i>M. hyopneumoniae</i>	15	13,2	0	9,6	27,6	0,019
<i>M. hyorhinis</i>	20	37	0	43,5	0	0,063
<i>Chlamydia</i> sp.	1	9,1	-	0	14,3	n. s.

Positiver Erreger- NW im Organ	ges. [n]	ges. [%]	Saugferkel [%]	Flatdeck [%]	Mast [%]	p
Serosen						
<i>S. suis</i>	6	15,4	-	13,5	50	n. s.
α -häm. S.	1	2,5	-	2,7	0	n. s.
β -häm. S.	1	2,6	-	2,7	0	n. s.
γ -häm. S.	0	0	-	0	0	-
Sonstige	2	5,1	-	5,4	0	n. s.
ZNS						
<i>S. suis</i>	7	13	28,6	10,5	11,1	n. s.
α -häm. S.	6	11,1	57,1	0	22,2	< 0,001
β -häm. S.	5	9,3	0	7,9	22,2	n. s.
γ -häm. S.	6	11,1	0	5,3	44,4	0,002
<i>T. pyogenes</i>	2	3,7	0	5,3	0	n. s.
<i>P. aeruginosa</i>	3	5,6	0	2,6	22,2	0,055
<i>Proteus</i> sp.	5	7,4	0	10,5	0	n. s.
Sonstige	20	37,1	57,1	39,5	11,1	n. s.
Gelenk						
<i>M. hyosynoviae</i>	4	100	100	100	-	-
<i>M. hyorhinis</i>	1	20	50	0	-	n. s.
<i>S. suis</i>	5	11,4	28,6	5,9	33,3	n. s.
α -häm. S.	7	15,9	42,9	11,8	0	n. s.
β -häm. S.	1	2,3	14,3	0	0	n. s.
γ -häm. S.	0	0	0	0	0	-
<i>T. pyogenes</i>	0	0	0	0	0	-
<i>P. aeruginosa</i>	4	9,1	26,4	5,9	0	n. s.

Positiver Erreger- NW im Organ	ges. [n]	ges. [%]	Saugferkel [%]	Flatdeck [%]	Mast [%]	p
<i>Proteus</i> sp.	2,3	0	0	2,9	0	n. s.
Sonstige	18	40,9	85,7	35,3	0	0,016

A.: *Actinobacillus*; B: *Bordetella*; NW: Nachweis; ges: gesamt; M.: *Mycoplasma*; n. s.: nicht signifikant; P.: *Pasteurella*; PCV2: Porcine Circovirus Typ 2; PRRSV: Porzines Reproduktives und Respiratorisches Syndrom Virus; S. *Streptococcus*; SIV: Schweine-Influenza Virus; T: *Trueperella*; α -häm. S.: α -hämolysierende Streptokokken; β -häm. S.: β -hämolysierende Streptokokken; γ -häm. S.: γ -hämolysierende Streptokokken; -: Test wurde nicht durchgeführt; angegeben sind die relativen Anteile (%) der Nachweise; die jeweiligen Signifikanzwerte (p) wurden mittels χ^2 -Test nach Pearson berechnet; Unterschiede an der Signifikanzgrenze wurden mit angegeben

Tabelle 33: Verteilung der Virulenzfaktoren auf das pathologisch-anatomische Bild

Virulenzfaktor	pathologisch-anatomischer Befund	p	VF nicht vorhanden	VF vor- handen
Kapsel	Retraktion	0,099	23	35,9
	katarrhalisch-eitrige BP	0,398	40,2	35,9
	fibrinöse Pneumonie	0,295	8	12,8
	nekrotisierende Pneumonie	0,325	2,4	0
	sonstige Pneumonie	0,525	1,1	2,8
	Herzbeutel gefüllt	0,198	17,2	25,5
	fibrinöse Pleuritis	0,525	1,1	1,1
	fibroplastische Pleuritis	0,03	18,4	35,9
	fibrinöse Perikarditis	0,373	4,6	7,7
	fibroplastische Perikarditis	0,075	19,5	33,3
fibrinöse Peritonitis	0,493	3,4	5,1	

Virulenzfaktor	pathologisch-anatomischer Befund	p	VF nicht vorhanden	VF vorhanden
	fibroplastische Peritonitis	0,008	9,2	28,2
	Polyserositis	0,068	14,9	28,2
	Leptomeningitis	0,062	6,9	17,9
	Arthritis	0,58	23	23,1
CDT	Retraktion	0,156	16,7	29,4
	katarrhalisch-eitrige BP	0,465	41,7	38,2
	fibrinöse Pneumonie	0,069	0	11,8
	nekrotisierende Pneumonie	0,527	0	2,9
	sonstige Pneumonie	0,654	0	2
	Herzbeutel gefüllt	0,023	4,2	23,5
	fibrinöse Pleuritis	0,654	0	2
	fibroplastische Pleuritis	0,036	8,3	27,5
	fibrinöse Perikarditis	0,601	4,2	5,9
	fibroplastische Perikarditis	0,001	0	29,4
	fibrinöse Peritonitis	0,659	4,2	3,9
	fibroplastische Peritonitis	0,013	0	18,6
	Polyserositis	0,003	0	23,5
	Leptomeningitis	0,055	0	12,7
Arthritis	0,044	8,3	26,5	
ESPP2	Retraktion	0,102	13,6	29,4
	katarrhalisch-eitrige BP	0,316	31,8	40,2
	fibrinöse Pneumonie	0,331	4,5	10,8
	nekrotisierende Pneumonie	0,554	0	2,9
	sonstige Pneumonie	0,675	0	2

Virulenzfaktor	pathologisch-anatomischer Befund	p	VF nicht vorhanden	VF vorhanden
	Herzbeutel gefüllt	0,147	9,1	21,8
	fibrinöse Pleuritis	0,675	0	2
	fibroplastische Pleuritis	0,182	13,6	25,5
	fibrinöse Perikarditis	0,245	0	6,9
	fibroplastische Perikarditis	0,014	4,5	27,5
	fibrinöse Peritonitis	0,37	0	4,9
	fibroplastische Peritonitis	0,022	0	17,6
	Polyserositis	0,04	4,5	22,5
	Leptomeningitis	0,382	4,5	9,8
	Arthritis	0,022	4,5	25,5
	GP36	Retraktion	<0,001	6,5
katarrhalisch-eitrige BP		0,147	31,9	43
fibrinöse Pneumonie		0,104	4,3	2,7
nekrotisierende Pneumonie		0,243	0	3,8
sonstige Pneumonie		0,391	0	2,5
Herzbeutel gefüllt		0,201	14,9	22,8
fibrinöse Pleuritis		0,609	2,1	1,3
fibroplastische Pleuritis		0,053	14,9	29,1
fibrinöse Perikarditis		0,478	4,3	6,3
fibroplastische Perikarditis		0,019	12,8	30,4
fibrinöse Peritonitis		0,269	6,4	2,5
fibroplastische Peritonitis		0,001	2,1	22,5
Polyserositis		0,25	14,9	21,5
Leptomeningitis	0,016	2,1	15,2	

Virulenzfaktor	pathologisch-anatomischer Befund	p	VF nicht vorhanden	VF vorhanden
	Arthritis	0,027	12,8	29,1
PILF	Retraktion	0,051	6,7	29,4
	katarrhalisch-eitrige BP	0,562	40	38,5
	fibrinöse Pneumonie	0,197	0	11
	nekrotisierende Pneumonie	0,677	0	2,8
	sonstige Pneumonie	0,772	0	1,8
	Herzbeutel gefüllt	0,165	6,7	21,1
	fibrinöse Pleuritis	0,772	0	1,8
	fibroplastische Pleuritis	0,088	6,7	25,7
	fibrinöse Perikarditis	0,396	0	6,4
	fibroplastische Perikarditis	0,014	0	26,6
	fibrinöse Peritonitis	0,519	0	4,6
	fibroplastische Peritonitis	0,081	0	16,5
	Polyserositis	0,032	0	22
	Leptomeningitis	0,227	0	10,1
Arthritis	0,114	6,7	23,9	
OMPP2	Retraktion	0,095	13,6	29,8
	katarrhalisch-eitrige BP	0,494	36,4	39,4
	fibrinöse Pneumonie	0,089	0	11,5
	nekrotisierende Pneumonie	0,559	0	2,9
	sonstige Pneumonie	0,68	0	1,9
	Herzbeutel gefüllt	0,036	4,5	23,1
	fibrinöse Pleuritis	0,68	0	1,9
	fibroplastische Pleuritis	0,059	9,1	26,9

Virulenzfaktor	pathologisch-anatomischer Befund	p	VF nicht vorhanden	VF vorhanden
	fibrinöse Perikarditis	0,252	0	6,7
	fibroplastische Perikarditis	0,001	0	28,8
	fibrinöse Peritonitis	0,377	0	4,8
	fibroplastische Peritonitis	0,019	0	18,3
	Polyserositis	0,006	0	23,1
	Leptomeningitis	0,072	0	12,5
	Arthritis	0,07	9,1	26
OMPP5	Retraktion	0,146	12,5	28,4
	katarrhalisch-eitrige BP	0,341	31,3	40,4
	fibrinöse Pneumonie	0,526	6,3	10,1
	nekrotisierende Pneumonie	0,661	0	2,8
	sonstige Pneumonie	0,759	0	1,8
	Herzbeutel gefüllt	0,123	6,3	22
	fibrinöse Pleuritis	0,759	0	1,8
	fibroplastische Pleuritis	0,464	18,8	23,9
	fibrinöse Perikarditis	0,374	0	6,4
	fibroplastische Perikarditis	0,071	6,3	25,7
	fibrinöse Peritonitis	0,498	0	4,6
	fibroplastische Peritonitis	0,07	0	16,5
	Polyserositis	0,14	6,3	21,1
	Leptomeningitis	0,176	0	11
Arthritis	0,011	0	26,6	
VTAA1	Retraktion	0,011	10	32,3
	katarrhalisch-eitrige BP	0,086	26,7	42,7

Virulenzfaktor	pathologisch-anatomischer Befund	p	VF nicht vorhanden	VF vorhanden
	fibrinöse Pneumonie	0,168	3,3	11,5
	nekrotisierende Pneumonie	0,439	0	3,1
	sonstige Pneumonie	0,579	0	2,1
	Herzbeutel gefüllt	0,005	3,3	25
	fibrinöse Pleuritis	0,579	0	2,1
	fibroplastische Pleuritis	0,007	6,7	29,2
	fibrinöse Perikarditis	0,471	3,3	6,3
	fibroplastische Perikarditis	0,001	3,3	30,2
	fibrinöse Peritonitis	0,342	6,7	3,1
	fibroplastische Peritonitis	0,004	0	19,8
	Polyserositis	0,007	3,3	24
	Leptomeningitis	0,024	0	13,5
	Arthritis	0,002	3,3	29,2
VTAA2	Retraktion	0,029	15	32,6
	katarrhalisch-eitrige BP	0,054	27,5	44,2
	fibrinöse Pneumonie	0,2	5	11,6
	nekrotisierende Pneumonie	0,314	0	3,5
	sonstige Pneumonie	0,464	0	2,3
	Herzbeutel gefüllt	0,12	12,5	23,3
	fibrinöse Pleuritis	0,464	0	2,3
	fibroplastische Pleuritis	0,032	12,5	29,1
	fibrinöse Perikarditis	0,286	2,5	7
	fibroplastische Perikarditis	0,002	7,5	31,4
fibrinöse Peritonitis	0,49	2,5	4,7	

Virulenzfaktor	pathologisch-anatomischer Befund	p	VF nicht vorhanden	VF vorhanden
	fibroplastische Peritonitis	0,004	2,5	20,9
	Polyserositis	0,004	5	25,6
	Leptomeningitis	0,358	7,5	11,6
	Arthritis	0,042	12,5	27,9
VTAA3	Retraktion	0,189	17,4	29,1
	katarrhalisch-eitrige BP	0,421	34,8	39,8
	fibrinöse Pneumonie	0,314	4,3	10,7
	nekrotisierende Pneumonie	0,543	0	2,9
	sonstige Pneumonie	0,667	0	1,9
	Herzbeutel gefüllt	0,029	4,3	23,3
	fibrinöse Pleuritis	0,667	0	1,9
	fibroplastische Pleuritis	0,01	4,3	28,2
	fibrinöse Perikarditis	0,624	4,3	5,8
	fibroplastische Perikarditis	0,001	0	29,1
	fibrinöse Peritonitis	0,642	4,3	3,9
	fibroplastische Peritonitis	0,015	0	18,4
	Polyserositis	0,004	0	23,3
	Leptomeningitis	0,063	0	12,6
Arthritis	0,012	4,3	27,2	

BP: Bronchopneumonie; CDT: Cytolethal Distending Toxin; ESPP2: extrazelluläre Serin-ähnliche Protease P2; GP36: Bakteriophagen-Gen; OMP: äußeres Membranprotein; PILF: Fimbriengen F; VF; Virulenzfaktor; VTAA: Virulenz-assoziiertes trimerisches Autotransporter; angegeben sind die relativen Anteile (%) der Nachweise; die jeweiligen Signifikanzwerte (p) wurden mittels χ^2 -Test nach Pearson berechnet; Unterschiede an der Signifikanzgrenze wurden mit angegeben

8.1.1 Chemikalien

- 2x Multiplex Mastermix Kit: Qiagen (Hilden, GER)
- EDTA: Carl Roth GmbH (Karlsruhe, GER)
- Essigsäure: Carl Roth GmbH (Karlsruhe, GER)
- Instant Virus RNA Kit: Analytik Jena (Hilden, GER)
- Längenstandard, 100bp Marker: Life Technologies (Carlsbad, USA)
- Midori Green Advance: Biozym (Hessisch Oldendorf, GER)
- Primer: Biolegio (Nijmegen, NL)
- RNase freies Wasser: Analytik Jena (Jena, GER)
- Saccharose: Carl Roth GmbH (Karlsruhe, GER)
- SeaKem® LE Agarose: Biozym (Hessisch Oldendorf, GER)
- Tris: Carl Roth GmbH (Karlsruhe, GER)

8.1.2 Lösungen und Puffer

- 2xMM: HotStar Taq® DNA Polymerase
Multiplex PCR Buffer
dNTP Mix
- Binding Solution RBS Instant Virus RNA Kit®; Analytic Jena (Jena, GER)
- Lysis Solution RL Instant Virus RNA Kit®; Analytic Jena (Jena, GER)
- Washing Solution (HS) Instant Virus RNA Kit®; Analytic Jena (Jena, GER)
- Washing Solution (LS) Instant Virus RNA Kit®; Analytic Jena (Jena, GER)
- **1,5 %iges Agarosegel**
 - Agarose 3 g
 - 1xTAE 200 ml
 - Midori-Green 10 µl
- **Auftragspuffer**
 - Orange G 0,03 g
 - Saccharose 2,5 g
 - ad 10 ml mit Aq. bidest.
- **1x TAE**
 - Tris 40 mM
 - Essigsäure 20 mM
 - EDTA 1 mM
- **1x TE**
 - Tris 10 mM
 - EDTA 1 mM

8.1.3 Geräte

- Digitale Geldokumentation: BioDocAnalyze Ti5; Biometra (Göttingen, GER)
- Fotokamera: Canon G2 Power Shot; Cannon Inc (Tokio, JPN)
- Elektrophoresekammer: Horizon®58; Life Technologies™ (Carlsbad, USA)
- Gradientencycler: Tgradient; Biometra (Göttingen, GER)
- Kugelmühle: MM300; Retsch GmbH (Haan, GER)
- Mikrowelle: HF1210; Siemens AG (München, GER)

- Photometer: NanoDrop 1000; Peqlab (Erlangen, GER)
Ultraspec 1100pro; Biochrom (Camebridge, UK)
NanoDrop 2000c; Thermo Fisher Scientific (Wilmington, USA)
- Spannungsversorgung: Whatman PS 304; Biometra (Göttingen, GER)
- Thermocycler: Tpersonal; Biometra (Göttingen, GER)
- Vortexer: Vortex Genie 2; VWR, (Radnor, USA)
- Zentrifuge: Biofuge® fresco; Heraeus (Hanau, GER)
- Zentrifuge: Micro Centrifuge, SD 220; Roth (Karlsruhe, GER)

8.1.4 Datenbanken und Computerprogramme

- Gensequenzrecherche: NCBI-Datenbank; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- Gelbildbearbeitung und -auswertung: GIMP 2.8; <https://www.gimp.org>
- Primerdesign: OLIGO 4.0; Molecular Biology Insights (Vondelpark, USA)
- graphische Darstellung der Ergebnisse: Microsoft Excel 2013; Microsoft Corporation (Redford, USA)
- Statistische Auswertung: IBM SPSS IBM Statistics; IBM Deutschland GmbH (Ehningen, GER)
- Textbearbeitung: Microsoft Word 2013; Microsoft Corporation (Redford, USA)

Literaturverzeichnis

Aarestrup, Frank M.; Oliver Duran, C.; Burch, D. G. S. (2008): Antimicrobial resistance in swine production. In: *Animal health research reviews* 9 (2), S. 135–148. DOI: 10.1017/S1466252308001503.

Aarestrup, Frank M.; Seyfarth, A. M.; Angen, Øystein (2004): Antimicrobial susceptibility of *Haemophilus parasuis* and *Histophilus somni* from pigs and cattle in Denmark. In: *Veterinary Microbiology* 101 (2), S. 143–146. DOI: 10.1016/j.vetmic.2004.02.012.

Amano, H.; Shibata, M.; Kajio, N.; Morozumi, T. (1994): Pathologic Observations of Pigs Intranasally Inoculated with Serovar 1, 4 and 5 of *Haemophilus parasuis* Using Immunoperoxidase Method. In: *Journal of Veterinary Med. Sci.* 56 (4), S. 639–644. DOI: 10.1292/jvms.56.639.

Angen, Øystein; Oliveira, Simone Rodrigues; Ahrens, Peter; Svensmark, Birgitta; Leser, Thomas D. (2007): Development of an improved species specific PCR test for detection of *Haemophilus parasuis*. In: *Veterinary Microbiology* 119 (2-4), S. 266–276. DOI: 10.1016/j.vetmic.2006.10.008.

Angen, Øystein; Svensmark, Birgitta; Mittal, K. R. (2004): Serological characterization of Danish *Haemophilus parasuis* isolates. In: *Veterinary Microbiology* 103 (3-4), S. 255–258. DOI: 10.1016/j.vetmic.2004.07.013.

Aragón, Virginia (2013): Exposing serum susceptibility in *Haemophilus parasuis*. In: *The Veterinary Journal* 196 (1), S. 10–11. DOI: 10.1016/j.tvjl.2012.10.032.

Aragón, Virginia; Bouchet, Bénédicte; Gottschalk, Marcelo (2010a): Invasion of endothelial cells by systemic and nasal strains of *Haemophilus parasuis*. In: *The Veterinary Journal* 186 (2), S. 264–267. DOI: 10.1016/j.tvjl.2009.08.013.

Aragón, Virginia; Cerdà-Cuéllar, Marta; Fraile, Lorenzo; Mombarg, Mark; Nofrarías, Miquel; Olvera, Alexandre et al. (2010b): Correlation between clinico-pathological outcome and typing of *Haemophilus parasuis* field strains. In: *Veterinary Microbiology* 142 (3-4), S. 387–393. DOI: 10.1016/j.vetmic.2009.10.025.

Assavacheep, P.; Assavacheep, A.; Turni, Conny (2012): Detection of a putative hemolysin operon, hhdBA, of *Haemophilus parasuis* from pigs with Glasser disease. In: *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 24 (2), S. 339–343. DOI: 10.1177/1040638711435805.

- Bak, H.; Rijnsing, H.-J. (2002): Protection of vaccinated pigs against experimental infections with homologous and heterologous *Haemophilus parasuis*. In: *The Veterinary Record* (151), S. 502–505. DOI: 10.1136/vr.151.17.502.
- Banholzer, Elisabeth; Boehmer, M.; Koehrmann, A.; Goldstein, D.; Strutzberg-Minder, Katrin (2014): Frequency distribution of *H. parasuis* serotypes from clinically suspicious cases. In: Proceedings of the 23rd IPVS Congress, Cancun, Mexico. International Pig Veterinary Society Congress. Cancun, 8-11.06. IPVS, S. 19.
- Baumgärtner, W.; Gruber, A. (2015): *Spezielle Pathologie für die Tiermedizin*. 6. Aufl. Stuttgart: Enke.
- Bello-Orti, Bernardo; Deslandes, V.; Tremblay, Y. DN.; Labrie, J.; Howell, Kate J.; Tucker, Alexander W. et al. (2014): Biofilm formation by virulent and non-virulent strains of *Haemophilus parasuis*. In: *Veterinary Research* 45, S. 104–128. DOI: 10.1186/s13567-014-0104-9.
- Bello-Orti, Bernardo; Howell, Kate J.; Tucker, Alexander W.; Maskell, Duncan J.; Aragón, Virginia (2015): Metatranscriptomics reveals metabolic adaptation and induction of virulence factors by *Haemophilus parasuis* during lung infection. In: *Veterinary Research* 46, S. 102. DOI: 10.1186/s13567-015-0225-9.
- Biberstein, E. L. (1969): A proposal for the establishment of two new *Haemophilus* species. In: *Journal of Medical Microbiology* (2), S. 75–77.
- Bigas, Anna; Garrido, M. Elena; Rozas, Ana M. Pérez de; Badiola, Ignacio; Barbé, Jordi; Llagostera, Montserrat (2005): Development of a genetic manipulation system for *Haemophilus parasuis*. In: *Veterinary Microbiology* 105 (3-4), S. 223–228. DOI: 10.1016/j.vet-mic.2004.10.015.
- Blackall, Patrick J.; Rapp-Gabrielson, V. J.; Hampson, D. J. (1996): Serological characterisation of *Haemophilus parasuis* isolates from Australian pigs. In: *Australian Veterinary Journal* 73 (3), S. 93–95. DOI: 10.1111/j.1751-0813.1996.tb09984.x.
- Blackall, Patrick J.; Trott, D. J.; Rapp-Gabrielson, V. J.; Hampson, D. J. (1997): Analysis of *Haemophilus parasuis* by multilocus enzyme electrophoresis. In: *Veterinary Microbiology* 56 (1-2), S. 125–134. DOI: 10.1016/S0378-1135(96)01342-9.
- Blackall, Patrick J.; Turni, Conny (2013): Understanding the virulence of *Haemophilus parasuis*. In: *The Veterinary Journal* 198 (3), S. 549–550. DOI: 10.1016/j.tvjl.2013.09.070.

- Blanco, I.; Galina-Pantoja, Lucina; Oliveira, Simone Rodrigues; Pijoan, Carlos; Sánchez, C.; Canals, A. (2004): Comparison between *Haemophilus parasuis* infection in colostrums-deprived and sow-reared piglets. In: *Veterinary Microbiology* 103 (1-2), S. 21–27. DOI: 10.1016/j.vetmic.2004.06.011.
- Boerlin, Patrick; Poljak, Zvonimir; Gallant, Jackie; Chalmers, Gabhan; Nicholson, Vivian; Soltes, Glenn A.; MacInnes, Janet I. (2013): Genetic diversity of *Haemophilus parasuis* from sick and healthy pigs. In: *Veterinary Microbiology* 167 (3-4), S. 459–467. DOI: 10.1016/j.vetmic.2013.07.028.
- Bonn, Marie-Luise (2010): Strukturelle Polymorphismen von *espP*-Genen in Shiga Toxin-produzierenden *Escherichia coli*. Dissertation. Wilhelms-Universität, Münster.
- Bouchet, Bénédicte; Vanier, Ghyslaine; Jacques, Mario; Gottschalk, Marcelo (2008): Interactions of *Haemophilus parasuis* and its LOS with porcine brain microvascular endothelial cells. In: *Veterinary Research* 39 (5), S. 42. DOI: 10.1051/vetres:2008019.
- Brockmeier, Susan L.; Halbur, P.; Thacker, E. L. (2002): Porcine Respiratory Disease Complex. In: Kim A. Brodgen und Janet Guthmiller (Hg.): *Polymicrobial Diseases*. Washington (DC): ASM Press, S. 231–258.
- Brockmeier, Susan L.; Loving, Crystal L.; Mullins, Michael Andrew; Register, Karen B.; Nicholson, Tracy L.; Wiseman, B. S. et al. (2013): Virulence, Transmission, and Heterologous Protection of Four Isolates of *Haemophilus parasuis*. In: *Clinical and Vaccine Immunology* 20 (9), S. 1466–1472. DOI: 10.1128/CVI.00168-13.
- Brockmeier, Susan L.; Register, Karen B.; Kuehn, Joanna S.; Nicholson, Tracy L.; Loving, Crystal L.; Bayles, Darrell O. et al. (2014): Virulence and Draft Genome Sequence Overview of Multiple Strains of the Swine Pathogen *Haemophilus parasuis*. In: *PLoS ONE* 9 (8), e103787. DOI: 10.1371/journal.pone.0103787.
- Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (2017): Bekanntmachung des Medians und des dritten Quartils der vom 1. Januar 2017 bis 30. Juni 2017 erfassten bundesweiten betrieblichen Therapiehäufigkeiten für Mastrinder, Mastschweine, Masthühner und Mastputen nach § 58c Absatz 4 des Arzneimittelgesetzes.
- Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit; Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie e. V.; Infektiologie Freiburg (Hg.) (2014): GERMAP 2012 Antibiotika-

Resistenz und -Verbrauch. Bericht über den Antibiotikaverbrauch und die Verbreitung von Antibiotikaresistenzen in der Human- und Veterinärmedizin in Deutschland.

Bundesministerium der Justiz und für Verbraucherschutz (2016): Gesetz zur Vorbeugung vor und Bekämpfung von Tierseuchen (Tiergesundheitsgesetz - TierGesG). TierGesG.

Bundestierärztekammer (Hg.) (2015): Leitlinien für den sorgfältigen Umgang mit antibakteriell wirksamen Tierarzneimitteln. - mit Erläuterungen -. *Deutsches Tierärzteblatt* (3). Hannover: schlütersche Verlagsgesellschaft mbH & Co. KG.

Cai, Xuwang; Chen, Huanchun; Blackall, Patrick J.; Yin, Zhengyan; Wang, Lei; Liu, Zhengfei; Jin, Meilin (2005): Serological characterization of *Haemophilus parasuis* isolates from China. In: *Veterinary Microbiology* 111 (3-4), S. 231–236. DOI: 10.1016/j.vetmic.2005.07.007.

Castilla, Karina Salvagni; de Gobbi, Débora Dirani Sena; Moreno, Luisa Zanolli; Paixão, Renata; Coutinho, Tania Alen; dos Santos, José Lúcio; Moreno, Andrea Micke (2012): Characterization of *Haemophilus parasuis* isolated from Brazilian swine through serotyping, AFLP and PFGE. In: *Research in Veterinary Science* 92 (3), S. 366–371. DOI: 10.1016/j.rvsc.2011.04.006.

Cerdà-Cuéllar, Marta; Naranjo, J. F.; Verge, A.; Nofrarías, Miquel; Cortey, M.; Olvera, Alexandre et al. (2010): Sow vaccination modulates the colonization of piglets by *Haemophilus parasuis*. In: *Veterinary Microbiology* 145 (3-4), S. 315–320. DOI: 10.1016/j.vetmic.2010.04.002.

Chen, Pin; Liu, Y.; Wang, Y.; Li, W.; Bi, D.; He, Q. (2012): Plasmid Mediated Streptomycin and Sulfonamide Resistance in *Haemophilus parasuis*. In: *Journal of Animal and Veterinary Advances* 11 (8), S. 1106–1109. DOI: 10.3923/javaa.2012.1106.1109.

Clinical and Laboratory Standards Institute (2008): Performance Standards for Antimicrobial Disk Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals; Approved Standard - Third Edition. Hg. v. Clinical and Laboratory Standards Institute. Clinical and Laboratory Standards Institute. Wayne, PA (8).

Clinical and Laboratory Standards Institute (2017): Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria Isolated From Animals, 1st Edition. CLSI Supplement. Hg. v. Clinical and Laboratory Standards Institute. Clinical and Laboratory Standards Institute (VET, 06).

- Correa-Fiz, Florencia; Galofré-Milà, Nuria; Costa-Hurtado, Mar; Aragón, Virginia (2017): Identification of a surface epitope specific of virulent strains of *Haemophilus parasuis*. In: *Veterinary Microbiology* 198, S. 116–120. DOI: 10.1016/j.vetmic.2016.12.015.
- Costa-Hurtado, Mar (2012): Insights in the interaction between *Haemophilus parasuis* and alveolar macrophages. PhD-Thesis. Universitat Autònoma, Barcelona.
- Costa-Hurtado, Mar; Aragón, Virginia (2013): Advances in the quest for virulence factors of *Haemophilus parasuis*. In: *The Veterinary Journal* 198 (3), S. 571–576. DOI: 10.1016/j.tvjl.2013.08.027.
- Costa-Hurtado, Mar; Olvera, Alexandre; Martínez-Moliner, Verónica; Galofré-Milà, Nuria; Martínez, Paloma; Dominguez, Javier; Aragón, Virginia (2013): Changes in macrophage phenotype after infection of pigs with *Haemophilus parasuis* strains with different levels of virulence. In: *Infection and Immunity* 81 (7), S. 2327–2333. DOI: 10.1128/IAI.00056-13.
- Cotter, S. E.; Surana, N. K.; St Geme, Joseph W. 3rd (2005): Trimeric autotransporters: a distinct subfamily of autotransporter proteins. In: *Trends in Microbiology* 13 (5), S. 199–205. DOI: 10.1016/j.tim.2005.03.004.
- Dai, Ke; Jin, Jin; Wen, Yiping; Wen, Xintian; He, Lvqin; Cao, Sanjie et al. (2016): Complete Genome Sequence of Highly Virulent *Haemophilus parasuis* Serotype 11 Strain SC1401. In: *Genome Announcements* 4 (4), e00628-16. DOI: 10.1128/genomeA.00628-16.
- Davis, S. D. (1974): Dissociation Between Results of In Vitro and In Vivo Antibiotic Susceptibility Tests for Some Strains of *Pseudomonas aeruginosa*. In: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 5 (3), S. 281–288. DOI: 10.1128/AAC.5.3.281.
- Dayao, Denise Ann E.; Kienzle, Marco; Gibson, Justine S.; Blackall, Patrick J.; Turni, Conny (2014): Use of a proposed antimicrobial susceptibility testing method for *Haemophilus parasuis*. In: *Veterinary Microbiology* 172 (3-4), S. 586–589. DOI: 10.1016/j.vetmic.2014.06.010.
- Decker, John L.; Barden, Jerri A. (1971): *Mycoplasma hyorhinis* swine arthritis. In: *Arthritis & Rheumatism* 14 (6), S. 781. DOI: 10.1002/art.1780140617.
- Devriese, L. A.; Dutta, G. N. (1981): Antibiotic sensitivity testing: Correlations between in vitro tests and in vivo situations. In: *Annales de Recherches Vétérinaires* 12 (1), S. 41–46.
- Dijkman, Remco; Wellenberg, Gerard J.; Heijden, Harold M..J. F. van der; Peerboom, Refke; Olvera, Alexandre; Rothkamp, Anja et al. (2012): Analyses of Dutch *Haemophilus parasuis* isolates by serotyping, genotyping by ERIC-PCR and Hsp60 sequences and the presence of the

virulence associated trimeric autotransporters marker. In: *Research in Veterinary Science* 93 (2), S. 589–595. DOI: 10.1016/j.rvsc.2011.10.013.

Docic, M.; Bilkei, G. (2004): Prevalence of *Haemophilus parasuis* serotypes in large outdoor and indoor pig units in Hungary/Romania/Serbia. In: *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift* 117 (07/08), S. 271–273.

Europäische Kommission (1998): Pressemitteilung 98/1085 in Deutsch.

Europäisches Parlament (2003): Verordnung (EG) Nr. 1831/2003 des europäischen Parlaments und des Rates vom 22. September 2003 über Zusatzstoffe zur Verwendung in der Tierernährung. (Text von Bedeutung für den EWR).

Fallert-Müller, A. (1999): Serinproteasen. In: A. Fallert-Müller (Hg.): *Lexikon der Biochemie*. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.

Fei (2012): Isolation and Identification of *Haemophilus parasuis* and Establishment of its Detection Method of Indirect ELISA. In: *Journal of Animal and Veterinary Advances* 14 (11), S. 2384–2391. DOI: 10.3923/javaa.2012.2384.2391.

Feng, Sai-xiang; Xu, Lina; Xu, Cheng-gang; Fan, Hui-ying; Liao, Ming; Ren, Tao (2014): Role of *acrAB* in antibiotic resistance of *Haemophilus parasuis* serovar 4. In: *The Veterinary Journal* 202 (1), S. 191–194. DOI: 10.1016/j.tvjl.2014.05.045.

Ferri, E. Rodríguez F.; Martínez, S.; Frandoloso, Rafael; Yubero, S.; Gutiérrez-Martín, César B. (2010): Comparative efficacy of several disinfectants in suspension and carrier tests against *Haemophilus parasuis* serovars 1 and 5. In: *Research in Veterinary Science* 88 (3), S. 385–389. DOI: 10.1016/j.rvsc.2009.12.001.

Fittipaldi, Nahuel; Segura, Mariela; Grenier, Daniel; Gottschalk, Marcelo (2012): Virulence factors involved in the pathogenesis of the infection caused by the swine pathogen and zoonotic agent *Streptococcus suis*. In: *Future Microbiology* 7 (2), S. 259–279. DOI: 10.2217/fmb.11.149.

Frandoloso, Rafael; Martínez, S.; Rodríguez-Ferri, Elías F.; García-Iglesias, María Jose; Pérez Martínez, Claudia; Martínez-Fernández, B.; Gutiérrez-Martín, César B. (2011): Development and Characterization of Protective *Haemophilus parasuis* Subunit Vaccines Based on Native Proteins with Affinity to Porcine Transferrin and Comparison with Other Subunit and Commercial Vaccines. In: *Clinical and Vaccine Immunology* 18 (1), S. 50–58. DOI: 10.1128/CVI.00314-10.

- Glässer, K. (1910): Untersuchungen über die Schweineseuche mit besonderer Berücksichtigung ihrer Aetiologie und Pathologie. In: *Deutsche tierärztliche Wochenschrift* 18 (49), S. 729–733.
- Gomes, Neto J. C.; Gauger P. C.; Strait E. L.; et al (2012): *Mycoplasma*-associated arthritis: Critical points for diagnosis. In: *Journal of Swine Health and Production* 20 (2), S. 82–86.
- Haedke, Kristina (2008): Untersuchungen zur Diagnostik des Polyserositis-Komplexes beim Schwein. Dissertation. Ludwig-Maximilians-Universität, München. Klinik für Schweine.
- Hiery, E. (2013): Molekularbiologische und biochemische Charakterisierung von *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Dissertation. Friedrich-Alexander-Universität, Erlangen-Nürnberg.
- Hoelzel, C. (2006): Antibiotikaresistente Bakterien und Resistenzgene in Schweinegülle. Dissertation. Ludwig-Maximilians-Universität, München.
- Howell, Kate J. (2014): The Use of genome wide association methods to investigate pathogenicity, population structure and serovar in *Haemophilus parasuis*. In: *BMC Genomics* 15, S. 1179. DOI: 10.1186/1471-2164-15-1179.
- Howell, Kate J.; Peters, Sarah E.; Wang, Jinhong; Hernandez-Garcia, Juan; Weinert, Lucy A.; Luan, Shi-Lu et al. (2015): Development of a Multiplex PCR Assay for Rapid Molecular Serotyping of *Haemophilus parasuis*. In: *Journal of Clinical Microbiology* 53 (12), S. 3812–3821. DOI: 10.1128/JCM.01991-15.
- Intervet Deutschland GmbH (2009): Porcilis Glässer - Fachinformation.
- Jin, Hui; Zhou, Rui; Kang, Mingsong; Luo, Rui; Cai, Xuwang; Chen, Huanchun (2006): Biofilm formation by field isolates and reference strains of *Haemophilus parasuis*. In: *Veterinary Microbiology* 118 (1-2), S. 117–123. DOI: 10.1016/j.vetmic.2006.07.009.
- Jinadasa, R. N.; Bloom, S. E.; Weiss, R. S.; Duhamel, G. E. (2011): Cytolethal distending toxin: a conserved bacterial genotoxin that blocks cell cycle progression, leading to apoptosis of a broad range of mammalian cell lineages. In: *Microbiology* 157 (7), S. 1851–1875. DOI: 10.1099/mic.0.049536-0.
- Kielstein, P.; Rapp-Gabrielson, V. J. (1992): Designation of 15 Serovars of *Haemophilus parasuis* on the Basis of Immunodiffusion Using Heat-Stable Antigen Extracts. In: *Journal of Clinical Microbiology* 30 (4), S. 862–865.

- Kilian, M. (1976): A taxonomic study of the genus *Haemophilus*, with the proposal of a new species. In: *Journal of General Microbiology* 93 (1), S. 9–62. DOI: 10.1099/00221287-93-1-9.
- Kim, Kelly H.; Aulakh, Suraaj; Paetzel, Mark (2012): The bacterial outer membrane β -barrel assembly machinery. In: *Protein Science* 21 (6), S. 751–768. DOI: 10.1002/pro.2069.
- Koebnik, R.; Locher, K. P.; Gelder, P. van (2000): Structure and function of bacterial outer membrane proteins: barrels in a nutshell. In: *Molecular Microbiology* 37 (2), S. 239–253. DOI: 10.1046/j.1365-2958.2000.01983.x.
- Kolb, Anna-Katharina (2009): Verlauf der mittleren Antikörperkonzentration von *Haemophilus parasuis*, *Mycoplasma hyorhinis*, PRRSV und PCV2. Dissertation. Ludwig-Maximilians-Universität, München. Klinik für Schweine.
- Koo, Jason; Tammam, Stephanie; Ku, Shao-Yang; Sampaleanu, Liliana M.; Burrows, Lori L.; Howell, P. Lynne (2008): PilF is an outer membrane lipoprotein required for multimerization and localization of the *Pseudomonas aeruginosa* Type IV pilus secretin. In: *Journal of Bacteriology* 190 (21), S. 6961–6969. DOI: 10.1128/JB.00996-08.
- Kuehn, Joanna S.; Register, Karen B.; Phillips, Gregory J. (2013): Draft Genome Sequences for 10 Isolates of the Swine Pathogen *Haemophilus parasuis*. In: *Genome Announcements* 1 (5), e00739-13. DOI: 10.1128/genomeA.00739-13.
- Lahrman, K. H.; Plonait, H. (2004): Gliedmaßen und Skeletterkrankungen. In: Karl-Heinz Waldmann und M. Wendt (Hg.): *Lehrbuch Schweinekrankheiten*. 4. Aufl. 1 Band. Stuttgart: Parey, S. 2016–2305.
- Lancashire, J. F.; Terry T. D.; Blackall, Patrick J. (2005): Plasmid-Encoded Tet B Tetracycline Resistance in *Haemophilus parasuis*. In: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, S. 1927–1931. DOI: 10.1128/AAC.49.5.1927–1931.2005.
- Lappe, F. (2011): *Haemophilus parasuis* - Erreger der Glässer'schen Krankheit als Primärerreger im Atemwegskomplex (Porcine Respiratory Disease Complex, PRDC) bei Ferkeln. In: *Tierärztliche Umschau* 66 (2), S. 59–64.
- Lara-Tejero, M.; Galan, J. E. (2001): CdtA, CdtB, and CdtC form a tripartite complex that is required for cytolethal distending toxin activity. In: *Infection and Immunity* 69 (7), S. 4358–4365. DOI: 10.1128/IAI.69.7.4358-4365.2001.

- Li, Gang; Niu, Hui; Zhang, Yanhe; Li, Yanling; Xie, Fang; Langford, Paul R. et al. (2017): Haemophilus parasuis cytolethal distending toxin induces cell cycle arrest and p53-dependent apoptosis. In: *PLoS ONE* 12 (5), e0177199. DOI: 10.1371/journal.pone.0177199.
- Li, J.; Peng, H.; Xu, L.-g.; Xie, Y.-z.; Xuan, X.-b.; Ma, C.-x. et al. (2013a): Draft Genome Sequence of Haemophilus parasuis gx033, a Serotype 4 Strain Isolated from the Swine Lower Respiratory Tract. In: *Genome Announcements* 1 (3), e00224-13. DOI: 10.1128/genomeA.00224-13.
- Li, Peng; Bai, Juan; Li, Jun-xing; Zhang, Guo-long; Song, Yan-hua; Li, Yu-feng et al. (2012): Molecular cloning, sequencing, and expression of the outer membrane protein P2 gene of Haemophilus parasuis. In: *Research in Veterinary Science* 93 (2), S. 736–742. DOI: 10.1016/j.rvsc.2011.08.019.
- Li, Yu-feng; Kwok, Amy H. Y.; Jiang, Jingwei; Zou, Yao; Zheng, Fangyuan; Chen, Pan et al. (2013b): Complete genome analysis of a Haemophilus parasuis serovar 12 strain from China. In: *PLoS ONE* 8 (9), e68350. DOI: 10.1371/journal.pone.0068350.
- Lichtenwald, M.; Weiss, A.; Brockmeier, J. (2013): Interaktion der Serinprotease EspP aus enterohämorrhagischen Escherichia coli (EHEC) mit humanen Endothel- und Epithelzellen. In: *Lebensmittelchemie* 67 (5), S. 140.
- Linke, D.; Riess, T.; Autenrieth, I. B.; Lupas, A.; Kempf, V. A. J. (2006): Trimeric autotransporter adhesins: variable structure, common function. In: *Trends in Microbiology* 14 (6), S. 264–270. DOI: 10.1016/j.tim.2006.04.005.
- Loera-Muro, Abraham; Ramírez-Castillo, Flor Y. (2015): Porcine Respiratory Disease Complex and Biofilms. In: *Journal of Bacteriology & Parasitology* 06 (06), S. 247. DOI: 10.4172/2155-9597.1000247.
- Luber, P.; Bartelt, E.; Genschow, E.; Wagner, J.; Hahn, H. (2003): Comparison of Broth Microdilution, E Test, and Agar Dilution Methods for Antibiotic Susceptibility Testing of Campylobacter jejuni and Campylobacter coli. In: *Journal of Clinical Microbiology* 41 (3), S. 1062–1068. DOI: 10.1128/JCM.41.3.1062-1068.2003.
- Luppi, A.; Bonilauri, P.; Dottori, M.; Iodice, G.; Gherpelli, Y.; Merialdi, G. et al. (2013): Haemophilus parasuis Serovars Isolated from Pathological Samples in Northern Italy. In: *Transboundary and Emerging Diseases* 60 (2), S. 140–142. DOI: 10.1111/j.1865-1682.2012.01326.x.

- Macedo, Núbia Resende; Macedo, Nubia; Oliveira, Simone; Torremorell, Montserrat; Rovira, Albert (2016): Role of Oligopeptide Permease A (OPPA) Protein in humoral Immune Response to *Haemophilus parasuis* in pigs // Immune response to oligopeptide permease A (OppA) protein in pigs naturally and experimentally infected with *Haemophilus parasuis*. In: *Research in Veterinary Science* 107, S. 62–67. DOI: 10.1016/j.rvsc.2016.05.006.
- MacInnes, Janet I.; Desrosiers, R. (1999): Agents of the "Suis-ide Diseases" of Swine: *Actinobacillus suis*, *Haemophilus parasuis*, and *Streptococcus suis*. In: *The Canadian Journal of Veterinary Research* 63, S. 83–89.
- MacInnes, Janet I.; Gottschalk, Marcelo; Lone, A., G.; Metcalf, D. S.; Ojha S.; Rosendal, T. et al. (2008): Prevalence of *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Actinobacillus suis*, *Haemophilus parasuis*, *Pasteurella multocida*, and *Streptococcus suis* in representative Ontario swine herds. In: *The Canadian Journal of Veterinary Research* (72), S. 242–248.
- Martin, J.; Günther, H.; Janetschke, P.; Schönherr, W.; Kielstein, P. (1977): Beitrag zur experimentellen *Haemophilus*-Infektion (*Haemophilus parahaemolyticus*, *Haemophilus parasuis*) bei SPF-Ferkeln. In: *Arch. exper. Vet. med.* 31 (3), S. 347–357.
- Martín de la Fuente, A. J.; Gutiérrez-Martín, César B.; Pérez Martínez, Claudia; García Iglesias, M. J.; Tejerina, F.; Rodríguez-Ferri, Elías F. (2009a): Effect of Different Vaccine Formulations on the Development of Glässer's Disease Induced in Pigs by Experimental *Haemophilus parasuis* Infection. In: *Journal of Comparative Pathology* 140 (2-3), S. 169–176. DOI: 10.1016/j.jcpa.2008.10.007.
- Martín de la Fuente, A. J.; Gutiérrez-Martín, César B.; Rodríguez-Barbosa, José I.; Martínez-Martínez, Sonia; Frandoloso, Rafael; Tejerina, F.; Rodríguez-Ferri, Elías F. (2009b): Blood cellular immune response in pigs immunized and challenged with *Haemophilus parasuis*. In: *Research in Veterinary Science* 86 (2), S. 230–234. DOI: 10.1016/j.rvsc.2008.07.010.
- Martín de la Fuente, A. J.; Tucker, Alexander W.; Navas, Jesús; Blanco, M.; Morris, S. J.; Gutiérrez-Martín, César B. (2007): Antimicrobial susceptibility patterns of *Haemophilus parasuis* from pigs in the United Kingdom and Spain. In: *Veterinary Microbiology* 120 (1-2), S. 184–191. DOI: 10.1016/j.vetmic.2006.10.014.
- Matuschek, E. (2017): Evaluation of five commercial MIC methods for colistin antimicrobial susceptibility testing for Gram-negative bacteria. Hg. v. European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing.

- Mayrhofer, Sigrid; Domig, Konrad J.; Mair, Christiane; Zitz, Ulrike; Huys, Geert; Kneifel, Wolfgang (2008): Comparison of broth microdilution, Etest, and agar disk diffusion methods for antimicrobial susceptibility testing of *Lactobacillus acidophilus* group members. In: *Applied and Environmental Microbiology* 74 (12), S. 3745–3748. DOI: 10.1128/AEM.02849-07.
- Melles, Damian C.; Leeuwen, Willem B. van; Snijders, Susan V.; Horst-Kreft, Deborah; Peeters, Justine K.; Verbrugh, Henri A.; Belkum, Alex van (2007): Comparison of multilocus sequence typing (MLST), pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), and amplified fragment length polymorphism (AFLP) for genetic typing of *Staphylococcus aureus*. In: *Journal of Microbiological Methods* 69 (2), S. 371–375. DOI: 10.1016/j.mimet.2007.01.013.
- Melnikow, Elena; Dornan, Saffron; Sargent, Carole A.; Duszenko, Michael; Evans, Gary; Gunkel, Nikolas et al. (2005): Microarray analysis of *Haemophilus parasuis* gene expression under in vitro growth conditions mimicking the in vivo environment. In: *Veterinary Microbiology* 110 (3-4), S. 255–263. DOI: 10.1016/j.vetmic.2005.08.007.
- Meng, Guoyu; St Geme, Joseph W. 3rd; Waksman, Gabriel (2008): Repetitive architecture of the *Haemophilus influenzae* Hia trimeric autotransporter. In: *Journal of Molecular Biology* 384 (4), S. 824–836. DOI: 10.1016/j.jmb.2008.09.085.
- Morgan, G. J.; Hatfull, G. F.; Casjens, S.; Hendrix, R. W. (2002): Bacteriophage Mu Genome Sequence: Analysis and Comparison with Mu-like Prophages in *Haemophilus*, *Neisseria* and *Deinococcus*. In: *Journal of Molecular Biology* (317), S. 337–359. DOI: 10.1006/jmbi.2002.5437.
- Morozumi, T.; Hiramune, T. (1982): Effect of temperature on the survival of *Haemophilus parasuis* in physiological saline. In: *Nati Inst Anim Health Q* 22 (2), S. 90–91.
- Morozumi, T.; Nicolet, J. (1986): Morphological Variations of *Haemophilus parasuis* Strains. In: *Journal of Clinical Microbiology* 23 (1), S. 138–142.
- Mullins, Michael Andrew (2010): Investigations into *Haemophilus parasuis* virulence: pre-, post-, and pan-genomic perspectives. PhD-Thesis. Iowa State University, Ames.
- Mullins, Michael Andrew; Register, Karen B.; Bayles, Darrell O.; Dyer, David W.; Kuehn, Joanna S.; Phillips, Gregory J. (2011): Genome sequence of *Haemophilus parasuis* strain 29755. In: *Standards in genomic sciences* 5 (1), S. 61–68. DOI: 10.4056/sigs.2245029.
- Mullins, Michael Andrew; Register, Karen B.; Bayles, Darrell O.; Loving, Crystal L.; Nicholson, Tracy L.; Brockmeier, Susan L. et al. (2009): Characterization and Comparative Analysis

of the Genes Encoding Haemophilus parasuis Outer Membrane Proteins P2 and P5. In: *Journal of Bacteriology* 191 (19), S. 5988–6002. DOI: 10.1128/JB.00469-09.

Mullins, Michael Andrew; Register, Karen B.; Brunelle, Brian W.; Aragón, Virginia; Galofré-Milà, Nuria; Bayles, Darrell O.; Jolley, Keith A. (2013): A curated public database for multi-locus sequence typing (MLST) and analysis of Haemophilus parasuis based on an optimized typing scheme. In: *Veterinary Microbiology* 162 (2-4), S. 899–906. DOI: 10.1016/j.vet-mic.2012.11.019.

Münch, S.; Grund, S.; Krüger, M. (1992): Fimbriae and Membranes on Haemophilus parasuis. In: *Journal of Veterinary Medicine* 39 (1), S. 59–64. DOI: 10.1111/j.1439-0450.1992.tb01138.x.

Nedbalcová, Kateřina; Kučerová, Zdenka (2013): Antimicrobial susceptibility of Pasteurella multocida and Haemophilus parasuis isolates associated with porcine pneumonia. In: *Acta Veterinaria Brno* 82 (1), S. 3–7. DOI: 10.2754/avb201382010003.

Nedbalcová, Kateřina; Satran, P.; Jaglic, Z.; Ondriasova, R.; Kučerová, Zdenka (2006): Haemophilus parasuis and Glässer's disease in pigs: a review. In: *Veterinari Medicina* 51 (5), S. 168–179.

Nicolet, J.; Paroz, Ph.; Krawinkler, M. (1980): Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Whole-Cell Porcine Strains of Haemophilus. In: *International Journal of Systematic Bacteriology* 30 (1), S. 69–76. DOI: 10.1099/00207713-30-1-69.

Nizet, V. (2002): Streptococcal β -hemolysins: genetics and role in disease pathogenesis. In: *Trends in Microbiology* (12), S. 575–580. DOI: 10.1016/S0966-842X(02)02473-3.

Olive, Michael D.; Bean, Pamela (1999): Minireview. Principles and Applications of Methods for DNA-Based Typing of Microbial Organisms. In: *Journal of Clinical Microbiology* 37 (6), S. 1661–1669.

Oliveira, Simone Rodrigues (2007): Haemophilus parasuis diagnostics. In: *Journal of Swine Health and Production* 15 (2), S. 99–103.

Oliveira, Simone Rodrigues (2015): Haemophilus Parasuis in Swine. In: *extension*, S. 1–5. Online verfügbar unter <http://articles.extension.org:80/pages/27270/haemophilus-parasuis>.

Oliveira, Simone Rodrigues; Blackall, Patrick J.; Pijoan, Carlos (2003a): Characterization of the diversity of Haemophilus parasuis field isolates by use of serotyping and genotyping. In: *American Journal of Veterinary Research* 64 (4), S. 435–442.

Oliveira, Simone Rodrigues; Galina-Pantoja, Lucina; Pijoan, Carlos (2001): Development of a PCR test to diagnose *Haemophilus parasuis* infections. In: *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 13, S. 495–501. DOI: 10.1177/104063870101300607.

Oliveira, Simone Rodrigues; Pijoan, Carlos (2002): Diagnosis of *Haemophilus parasuis* in affected herds and use of epidemiological data to control disease. In: *Journal of Swine Health and Production* 10 (5), S. 221–225.

Oliveira, Simone Rodrigues; Pijoan, Carlos (2004): *Haemophilus parasuis*: new trends on diagnosis, epidemiology and control. In: *Veterinary Microbiology* 99 (1), S. 1–12. DOI: 10.1016/j.vetmic.2003.12.001.

Oliveira, Simone Rodrigues; Pijoan, Carlos; Morrison, R. (2002): The role of *Haemophilus parasuis* in nursery mortality. In: Allen D. Leman Swine Conference. Minnesota, S. 111–113.

Oliveira, Simone Rodrigues; Pijoan, Carlos; Morrison, R. (2003b): Evaluation of *Haemophilus parasuis* control in the nursery using vaccination and controlled exposure. In: *Journal of Swine Health and Production* 12 (3), S. 123–128.

Olvera, Alexandre; Ballester, Maria; Nofrarías, Miquel; Sibila, Marina; Aragón, Virginia (2009): Differences in phagocytosis susceptibility in *Haemophilus parasuis* strains. In: *Veterinary Research* 40 (3), S. 24. DOI: 10.1051/vetres/2009007.

Olvera, Alexandre; Cerdà-Cuéllar, Marta; Aragón, Virginia (2006): Study of the population structure of *Haemophilus parasuis* by multilocus sequence typing. In: *Microbiology* 152 (12), S. 3683–3690. DOI: 10.1099/mic.0.29254-0.

Olvera, Alexandre; Cerdà-Cuéllar, Marta; Mentaberre, G.; Casas-Díaz, E.; Lavin, S.; Marco, I.; Aragón, Virginia (2007a): First isolation of *Haemophilus parasuis* and other NAD-dependent Pasteurellaceae of swine from European wild boars. In: *Veterinary Microbiology* 125 (1-2), S. 182–186. DOI: 10.1016/j.vetmic.2007.05.003.

Olvera, Alexandre; Martínez-Moliner, Verónica; Pina-Pedrero, Sonia; Pérez-Simó, Marta; Galofré-Milà, Nuria; Costa-Hurtado, Mar et al. (2013): Serum cross-reaction among virulence-associated trimeric autotransporters (VtaA) of *Haemophilus parasuis*. In: *Veterinary Microbiology* 164 (3-4), S. 387–391. DOI: 10.1016/j.vetmic.2013.02.022.

Olvera, Alexandre; Pina-Pedrero, Sonia; Macedo, Núbia Resende; Oliveira, Simone Rodrigues; Aragón, Virginia; Bensaid, Albert (2012): Identification of potentially virulent strains of

Haemophilus parasuis using a multiplex PCR for virulence-associated autotransporters (vtaA). In: *The Veterinary Journal* 191 (2), S. 213–218. DOI: 10.1016/j.tvjl.2010.12.014.

Olvera, Alexandre; Pina-Pedrero, Sonia; Pérez-Simó, Marta; Aragón, Virginia; Segalés, Joaquim; Bensaid, Albert (2011): Immunogenicity and protection against Haemophilus parasuis infection after vaccination with recombinant virulence associated trimeric autotransporters (VtaA). In: *Vaccine* 29 (15), S. 2797–2802. DOI: 10.1016/j.vaccine.2011.01.105.

Olvera, Alexandre; Pina-Pedrero, Sonia; Pérez-Simó, Marta; Oliveira, Simone Rodrigues; Bensaid, Albert (2010): Virulence-associated trimeric autotransporters of Haemophilus parasuis are antigenic proteins expressed in vivo. In: *Veterinary Research* 41 (3), S. 26. DOI: 10.1051/vetres/2009074.

Olvera, Alexandre; Segalés, Joaquim; Aragón, Virginia (2007b): Update on the diagnosis of Haemophilus parasuis infection in pigs and novel genotyping methods. In: *The Veterinary Journal* 174 (3), S. 522–529. DOI: 10.1016/j.tvjl.2006.10.017.

Palzer, Andreas; Eddicks, Matthias; Zoels, Susanne; Stark, Jasmin; Reese, Sven; Strutzberg-Minder, Katrin et al. (2015a): Field evaluation of the efficacy, compatibility and serologic profiling of a combined vaccine against porcine reproductive and respiratory syndrome and Haemophilus parasuis in nursery pigs. In: *Preventive Veterinary Medicine* 119 (3-4), S. 134–140. DOI: 10.1016/j.prevetmed.2015.03.005.

Palzer, Andreas; Haedke, Kristina; Heinritzi, K.; Zoels, Susanne; Ladinig, Andrea; Ritzmann, Mathias (2015b): Associations among Haemophilus parasuis, Mycoplasma hyorhinis, and porcine reproductive and respiratory syndrome virus infections in pigs with polyserositis. In: *The Canadian Journal of Veterinary Research* 56, S. 285–287.

Palzer, Andreas; Kolb, Anna-Katharina; Strutzberg-Minder, Katrin; Zoels, Susanne; Eddicks, Matthias; Heinritzi, K.; Ritzmann, Mathias (2015c): Serologische Verlaufsuntersuchungen auf Haemophilus parasuis und Mycoplasma hyorhinis in drei schweine-haltenden Betrieben. In: *Schweizer Archiv für Tierheilkunde* 157 (2), S. 97–103. DOI: 10.17236/sat00008.

Paul-Ehrlich-Institut: Liste zugelassener Impfstoffe für Schweine - Schweineimpfstoffe. Online verfügbar unter [hp://www.pei.de/DE/arzneimiel/impfstoff-impfstoffe-fuerere/schweine/schweine-alle-table.html](http://www.pei.de/DE/arzneimiel/impfstoff-impfstoffe-fuerere/schweine/schweine-alle-table.html), zuletzt geprüft am 26.11.2017.

Pina, S.; Olvera, Alexandre; Barcelo, A.; Bensaid, Albert (2009): Trimeric Autotransporters of Haemophilus parasuis: Generation of an Extensive Passenger Domain Repertoire Specific for

Pathogenic Strains. In: *Journal of Bacteriology* 191 (2), S. 576–587. DOI: 10.1128/JB.00703-08.

Pina-Pedrero, Sonia; Olvera, Alexandre; Pérez-Simó, Marta; Bensaïd, Albert (2012): Genomic and antigenic characterization of monomeric autotransporters of *Haemophilus parasuis*: an ongoing process of reductive evolution. In: *Microbiology* 158 (2), S. 436–447. DOI: 10.1099/mic.0.052399-0.

Pomorska-Mól, Małgorzata; Markowska-Daniel, Iwona; Rachubik, Jarosław; Pejsak, Zygmunt (2011): Effect of maternal antibodies and pig age on the antibody response after vaccination against Glässers disease. In: *Veterinary Research Communications* 35 (6), S. 337–343. DOI: 10.1007/s11259-011-9478-6.

Prüller, Sandra (2016): Empfindlichkeitstestung von *Bordetella bronchiseptica* und *Haemophilus parasuis* im Bouillon-Mikrodilutionsverfahren. Dissertation. Tierärztliche Hochschule Hannover, Hannover. Institut für Lebensmittelqualität und -sicherheit.

Prüller, Sandra; Turni, Conny; Blackall, Patrick J.; Beyerbach, Martin; Klein, Gunter; Kreienbrock, Lothar et al. (2017): Towards a Standardized Method for Broth Microdilution Susceptibility Testing of *Haemophilus parasuis*. In: *Journal of Clinical Microbiology* 55 (1), S. 264–273. DOI: 10.1128/JCM.01403-16.

Quinn, P. J.; Markey, B. K.; Leonard, F. C.; FitzPatrick, E. S.; Fanning, S.; Hartigan, P. J. (2011): *Veterinary Microbiology and Microbial Disease*. 2. Aufl.: Blackwell Publishing Ltd.

Rademacher, Chris J. (2001): Diagnostic Approaches to Swine Central Nervous System Disorders. In: *Journal of Swine Health and Production* 9 (1), S. 31–33.

Raßbach, A. (1992): *Haemophilus parasuis*. Arbeitskreis Veterinärmedizinische Infektionsdiagnostik.

Reams, R. Y.; Glickman, L. T.; Harrington, D. D.; Thacker, H. L.; Bowerstock, T. L. (1994): *Streptococcus suis* infection in swine: a retrospective study of 256 cases. Part II. Clinical signs, gross and microscopic lesions, and coexisting microorganisms. In: *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 6, S. 326–334.

Reid, Gregor; Busscher, Henk J. (1992): Importance of surface properties in bacterial adhesion to biomaterials, with particular reference to the urinary tract. In: *International Biodeterioration & Biodegradation* 30 (2-3), S. 105–122. DOI: 10.1016/0964-8305(92)90057-U.

Reiner, Gerald (2015): *Krankes Schwein - Kranker Bestand*. 1 Band. Stuttgart: Eugen Ulmer KG.

Reiner, Gerald; Fresen, Christina; Bronnert, Sebastian; Haack, Ingo; Willems, Hermann (2010): Prevalence of *Haemophilus parasuis* infection in hunted wild boars (*Sus scrofa*) in Germany. In: *Eur J Wildl Res* 56 (5), S. 815–818. DOI: 10.1007/s10344-010-0409-6.

Rossiter, A. E.; Leyton, D. L.; Tveen-Jensen, K.; Browning, D. F.; Sevastyanovich, Y.; Knowles, T. J. et al. (2011): The Essential -Barrel Assembly Machinery Complex Components BamD and BamA Are Required for Autotransporter Biogenesis. In: *Journal of Bacteriology* 193 (16), S. 4250–4253. DOI: 10.1128/JB.00192-11.

Rúbies, X.; Kielstein, P.; Costa, Ll; Riera, P.; Artigas, C.; Espuña, E. (1999): Prevalence of *Haemophilus parasuis* serovars isolated in Spain from 1993 to 1997. In: *Veterinary Microbiology* 66 (3), S. 245–248. DOI: 10.1016/S0378-1135(99)00007-3.

Sack, Meike (2008): Identifizierung neuer virulenzassoziierter Faktoren von *Haemophilus parasuis* und Entwicklung einer Multiplex-PCR. Dissertation. Tierärztliche Hochschule Hannover, Hannover. Institut für Mikrobiologie.

Sack, Meike; Baltes, Nina (2009): Identification of novel potential virulence-associated factors in *Haemophilus parasuis*. In: *Veterinary Microbiology* 136 (3-4), S. 382–386. DOI: 10.1016/j.vetmic.2008.11.008.

San Millan, A.; Garcia-Cobos, S.; Escudero, J. A.; Hidalgo, L.; Gutiérrez-Martín, César B.; Carrilero, L. et al. (2010): *Haemophilus influenzae* Clinical Isolates with Plasmid pB1000 Bearing bla_{ROB-1}: Fitness Cost and Interspecies Dissemination. In: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 54 (4), S. 1506–1511. DOI: 10.1128/AAC.01489-09.

Schwarz, S.; Böttner, A.; Hafez, M.; Kehrenberg, Corinna; Kietzmann, M.; Klarmann, D. et al. (2003): Empfindlichkeitsprüfung bakterieller Infektionserreger von Tieren gegenüber antimikrobiellen Wirkstoffen: Methoden zur in-vitro Empfindlichkeitsprüfung und deren Eignung in Hinblick auf die Erarbeitung therapeutisch nutzbarer Ergebnisse. In: *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift* 116 (9), S. 353–361.

Segalés, Joaquim; Domingo, Mariano; Solano, Gloria I.; Pijoan, Carlos (1999): Porcine reproductive and respiratory syndrome virus and *Haemophilus parasuis* antigen distribution in dually infected pigs. In: *Veterinary Microbiology* 64 (4), S. 287–297. DOI: 10.1016/S0378-1135(98)00260-0.

Siegrist, C.-A. (2003): Mechanisms by which maternal antibodies influence infant vaccine responses. Review of hypotheses and definition of main determinants. In: *Vaccine* 21 (24), S. 3406–3412. DOI: 10.1016/S0264-410X(03)00342-6.

Solano, Gloria I.; Bautista E.; Molitor, Thomas W.; Segalés, Joaquim; Pijoan, Carlos (1998): Effect of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Infection on the Clearance of *Haemophilus parasuis* by Porcine Alveolar Macrophages. In: *The Canadian Journal of Veterinary Research* 62, S. 251–256.

Solano, Gloria I.; Segalés, Joaquim; Collins, James E.; Molitor, Thomas W.; Pijoan, Carlos (1997): Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSv) interaction with *Haemophilus parasuis*. In: *Veterinary Microbiology* 55 (1-4), S. 247–257. DOI: 10.1016/S0378-1135(96)01325-9.

Spahich, Nicole (2011): Structure and function of the *Haemophilus influenzae* autotransporters. In: *Frontiers in cellular and infection microbiology* 1 (5). DOI: 10.3389/fcimb.2011.00005.

Statistisches Bundesamt (2016): Viehhaltung der Betriebe Agrarstrukturerhebung - Fachserie 3 Reihe 2.1.3 - 2016.

Tadjine, M. (2004): Development of a New Serological Test for Serotyping *Haemophilus parasuis* Isolates and Determination of Their Prevalence in North America. In: *Journal of Clinical Microbiology* 24, S. 839–840. DOI: 10.1128/JCM.42.2.839–840.2004.

Tegeler, Regina (2013): Epidemiologische Analyse des Auftretens und der Dynamik antimikrobieller Resistenzen ausgewählter bakterieller Krankheitserreger aus Schweineherden Nordwestdeutschlands von 2005 bis 2010. Dissertation. Tierärztliche Hochschule Hannover, Hannover. Institut für Biometrie, Epidemiologie und Informationsverarbeitung.

Turni, Conny; Blackall, Patrick J. (2005): Comparison of the indirect haemagglutination and gel diffusion test for serotyping *Haemophilus parasuis*. In: *Veterinary Microbiology* 106 (1-2), S. 145–151. DOI: 10.1016/j.vetmic.2004.12.019.

Turni, Conny; Blackall, Patrick J. (2010): Serovar profiling of *Haemophilus parasuis* on Australian farms by sampling live pigs. In: *Australian Veterinary Journal* 88 (7), S. 255–259. DOI: 10.1111/j.1751-0813.2010.00592.x.

Turni, Conny; Pyke, M.; Blackall, Patrick J. (2010): Validation of a real-time PCR for *Haemophilus parasuis*. In: *Journal of Applied Microbiology* 108 (4), S. 1323–1331. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2009.04526.x.

- Vahle, J. L. (1996): Pathogenesis of *Haemophilus parasuis* infection in swine. PhD-Thesis. Iowa State University, Ames. Veterinary Pathology.
- Vahle, J. L.; Haynes J. S.; Andrews J. J. (1995): Experimental reproduction of *Haemophilus parasuis* infection in swine: clinical, bacteriologic, and morphologic findings. In: *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* (7), S. 476–480.
- Vahle, J. L.; Haynes J. S.; Andrews J. J. (1997): Interaction of *Haemophilus parasuis* with Nasal and Tracheal Mucosa Following Intranasal Inoculation of Cesarean Derived Colostrum Deprived (CDCD) Swine. In: *The Canadian Journal of Veterinary Research* 61 (3), S. 200–206.
- Vandenesch, Francois; Lina, G.; Henry, Thomas (2012): Staphylococcus aureus hemolysins, bi-component leukocidins, and cytolytic peptides: a redundant arsenal of membrane-damaging virulence factors? In: *Frontiers in cellular and infection microbiology* 2, S. 12. DOI: 10.3389/fcimb.2012.00012.
- Vengust, G.; Valencak, Z.; Bidovec, A. (2006): A serological survey of selected pathogens in wild boar in Slovenia. In: *Journal of Veterinary Medicine* 53 (1), S. 24–27. DOI: 10.1111/j.1439-0450.2006.00899.x.
- Viehmann, M.; Postiasi, S.; Balka, Gyula; Spergser, J.; Palzer, Andreas; Henning-Pauka, Isabella et al. (2013): Wirksamkeitsbeurteilung einer Kombinationstherapie aus Antibiose und NSAID nach experimenteller *Haemophilus-parasuis*-Infektion bei Absetzferkeln. In: *Tierärztl Prax (G)* 41 (4), S. 225–232.
- Waldmann, Karl-Heinz; Wendt, M. (Hg.) (2004): Lehrbuch Schweinekrankheiten. 4. Aufl. 1 Band. Stuttgart: Parey.
- Wang, Xiangru; Xu, Xiaojuan; Wu, Yucong; Li, Lanying; Cao, Ruijuan; Cai, Xuwang; Chen, Huanchun (2013): Polysaccharide biosynthesis protein CapD is a novel pathogenicity-associated determinant of *Haemophilus parasuis* involved in serum-resistance ability. In: *Veterinary Microbiology* 164 (1-2), S. 184–189. DOI: 10.1016/j.vetmic.2013.01.037.
- Wang, Zhenghao; Zhao, Qin; Wei, Hailin; Wen, Xintian; Cao, Sanjie; Huang, Xiaobo et al. (2017): Prevalence and seroepidemiology of *Haemophilus parasuis* in Sichuan province, China. In: *PeerJ*, e3379. DOI: 10.7287/PEERJ.PREPRINTS.2805V1.
- Wei, Xingliang; Cao, Sanjie; Zhang, Luhua; Wen, Xintian; Wen, Yiping; Wu, Rui et al. (2014): Comparative proteome analysis of the extracellular proteins of two *Haemophilus parasuis*

strains Nagasaki and SW114. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 446 (4), S. 997–1001. DOI: 10.1016/j.bbrc.2014.03.049.

Weinbauer, Markus G.; Rassoulzadegan, Fereidoun (2004): Are viruses driving microbial diversification and diversity? In: *Environmental Microbiology* 6 (1), S. 1–11. DOI: 10.1046/j.1462-2920.2003.00539.x.

Wilkinson, Jamie M.; Sargent, Carole A.; Galina-Pantoja, Lucina; Tucker, Alexander W. (2010): Gene expression profiling in the lungs of pigs with different susceptibilities to Glässer's disease. In: *BMC Genomics* 11, S. 455. DOI: 10.1186/1471-2164-11-455.

Xu, Zhuofei; Yue, Min; Zhou, Rui; Jin, Qi; Fan, Yang; Bei, Weicheng et al. (2011): Genomic Characterization of *Haemophilus parasuis* SH0165, a Highly Virulent Strain of Serovar 5 Prevalent in China. In: *PLoS ONE* 6 (5), e19631. DOI: 10.1371/journal.pone.0019631.

Yang, S.-S.; Sun, J.; Liao, X.-P.; Liu, B.-T.; Li, L.-L.; Li, L. et al. (2013): Co-location of the *erm(T)* gene and *blaROB-1* gene on a small plasmid in *Haemophilus parasuis* of pig origin. In: *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 68 (8), S. 1930–1932. DOI: 10.1093/jac/dkt112.

Yue, Min; Yang, F.; Yang, J.; Bei, Weicheng; Cai, Xuwang; Chen, Lei et al. (2009): Complete Genome Sequence of *Haemophilus parasuis* SH0165. In: *Journal of Bacteriology* 191 (4), S. 1359–1360. DOI: 10.1128/JB.01682-08.

Zaiß, N. H. (2010): Molekulare Epidemiologie und Populationsbiologie von *Clostridium difficile*. Dissertation. Technische Universität Carolo-Wilhelmina, Braunschweig.

Zehr, Emilie S.; Tabatabai, Louisa B. (2011): Detection of a bacteriophage gene encoding a Mu-like portal protein in *Haemophilus parasuis* reference strains and field isolates by nested polymerase chain reaction. In: *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 23 (3), S. 538–542. DOI: 10.1177/1040638711404143.

Zehr, Emilie S.; Tabatabai, Louisa B.; Bayles, Darrell O. (2012): Genomic and proteomic characterization of SuMu, a Mu-like bacteriophage infecting *Haemophilus parasuis*. In: *BMC Genomics* 13.

Zentralstelle der Länder für Gesundheitsschutz bei Arzneimitteln und Medizinprodukten (Hg.) (2015): Frage-Antwort-Papier zur Überwachung der Herstellung von bestandsspezifischen Impfstoffen. Online verfügbar unter

https://www.zlg.de/index.php?eID=tx_nawsecuredl&u=0&file=fileadmin/downloads/AM/EFG/EFG16/2015_08_31_F_A_Pa-pier_BI.pdf&hash=fe61b9099328f03708a7a17d06d1138ee30f95b9, zuletzt geprüft am 05.04.2018.

Zhang, Bin; Feng, Sai-xiang; Xu, Cheng-gang; Zhou, Suming; He, Yanbing; Zhang, Lingyun et al. (2012a): Serum resistance in *Haemophilus parasuis* SC096 strain requires outer membrane protein P2 expression. In: *FEMS Microbiology Letters* 326 (2), S. 109–115. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2011.02433.x.

Zhang, Bin; He, Yanbing; Xu, Cheng-gang; Xu, Lina; Feng, Sai-xiang; Liao, Ming; Ren, Tao (2012b): Cytolethal distending toxin (CDT) of the *Haemophilus parasuis* SC096 strain contributes to serum resistance and adherence to and invasion of PK-15 and PUVeC cells. In: *Veterinary Microbiology* 157 (1-2), S. 237–242. DOI: 10.1016/j.vetmic.2011.12.002.

Zhang, Bin; Tang, Cheng; Liao, Ming; Yue, Hua (2014a): Update on the pathogenesis of *Haemophilus parasuis* infection and virulence factors. In: *Veterinary Microbiology* 168 (1), S. 1–7. DOI: 10.1016/j.vetmic.2013.07.027.

Zhang, Bin; Yu, Yuandi; Zeng, Ze; Ren, Yupeng; Yue, Hua (2014b): Deletion of the *rfaE* gene in *Haemophilus parasuis* SC096 strain attenuates serum resistance, adhesion and invasion. In: *Microbial Pathogenesis* 74, S. 33–37. DOI: 10.1016/j.micpath.2014.07.006.

Zhang, Jian-min; Xu, Cheng-gang; Shen, Haiyan; Li, Jing-yi; Guo, Li-li; Cao, Guojie et al. (2014c): Biofilm formation in *Haemophilus parasuis*: relationship with antibiotic resistance, serotype and genetic typing. In: *Research in Veterinary Science* 97 (2), S. 171–175. DOI: 10.1016/j.rvsc.2014.04.014.

Zhang, Nian-Zhang; Chu, Y. F.; Gao, P. C.; Zhao, P.; Lu, Z. X. (2012c): Immunological Identification and Characterization of Extracellular Serine Protease-Like Protein Encoded in a Putative *espP2* Gene of *Haemophilus parasuis*. In: *Journal of Veterinary Med. Sci.* 74 (8), S. 983–987. DOI: 10.1292/jvms.11-0260.

Zhang, Nian-Zhang; Zhou, Dong-Hui; Huang, Si-Yang; Wang, Meng; Shi, Xin-Chun; Ciren, Danba; Zhu, Xing-Quan (2014d): Seroprevalence and risk factors associated with *Haemophilus parasuis* infection in Tibetan pigs in Tibet. In: *Acta Tropica* 132, S. 94–97. DOI: 10.1016/j.actatropica.2013.12.021.

- Zhang, Yaning; Li, Yu-feng; Yuan, Wentao; Xia, Yuting; Shen, Yijuan (2016): Autophagy Is Associated with Pathogenesis of *Haemophilus parasuis*. In: *Frontiers in microbiology* 7, S. 1423. DOI: 10.3389/fmicb.2016.01423.
- Zheng, Nan; Chai, Zheng; Fu, Fang; Jiang, Fucheng; Wang, Xiangling; Zhang, Xueyun et al. (2014): Identification of a Novel *Haemophilus parasuis*-Specific B Cell Epitope Using Monoclonal Antibody against the OppA Protein. In: *PLoS ONE* 9 (1), e84516. DOI: 10.1371/journal.pone.0084516.
- Zhou, Hongzhuan; Yang, Bing; Xu, Fuzhou; Chen, Xiaoling; Wang, Jinluo; Blackall, Patrick J. et al. (2010a): Identification of putative virulence-associated genes of *Haemophilus parasuis* through suppression subtractive hybridization. In: *Veterinary Microbiology* 144 (3-4), S. 377–383. DOI: 10.1016/j.vetmic.2010.01.023.
- Zhou, Mingguang; Guo, Yi; Zhao, Jianping; Hu, Qiaoyun; Hu, Yong; Zhang, Anding et al. (2009): Identification and characterization of novel immunogenic outer membrane proteins of *Haemophilus parasuis* serovar 5. In: *Vaccine* 27 (38), S. 5271–5277. DOI: 10.1016/j.vaccine.2009.06.051.
- Zhou, Mingguang; Zhang, Qiang; Zhao, Jianping; Jin, Meilin; Permyakov, Eugene A. (2012): *Haemophilus parasuis* Encodes Two Functional Cytolethal Distending Toxins: CdtC Contains an Atypical Cholesterol Recognition/Interaction Region. In: *PLoS ONE* 7 (3), e32580. DOI: 10.1371/journal.pone.0032580.
- Zhou, Qi; Feng, Sai-xiang; Zhang, Jian-min; Jia, Aiqing; Yang, Kaijie; Xing, Kaixiang et al. (2016): Two Glycosyltransferase Genes of *Haemophilus parasuis* SC096 Implicated in Lipooligosaccharide Biosynthesis, Serum Resistance, Adherence, and Invasion. In: *Frontiers in cellular and infection microbiology* 6, S. 100. DOI: 10.3389/fcimb.2016.00100.
- Zhou, Xueli; Xu, Xiaojuan; Zhao, Yaxin; Chen, Pin; Zhang, Xuan; Chen, Huanchun; Cai, Xu-wang (2010b): Distribution of antimicrobial resistance among different serovars of *Haemophilus parasuis* isolates. In: *Veterinary Microbiology* 141 (1-2), S. 168–173. DOI: 10.1016/j.vetmic.2009.05.012.
- Zimmerman, J.; Karriker, L.; Ramirez, A.; Schwartz, K.; Stevenson, Gordon (2012): Diseases of swine, 10th Edition. Unter Mitarbeit von Virginia Aragón, Joaquim Segalés und Simone Rodrigues Oliveira. 10. Aufl.: Wiley-Blackwell.
- Zoetis Deutschland GmbH (2015): Fachinformation Suvaxyn-M-Hyo-Parasuis.

Zou, Yi; Feng, Sai-xiang; Xu, Cheng-gang; Zhang, Bin; Zhou, Suming; Zhang, Lingyun et al. (2013): The role of galU and galE of *Haemophilus parasuis* SC096 in serum resistance and biofilm formation. In: *Veterinary Microbiology* 162 (1), S. 278–284. DOI: 10.1016/j.vet-mic.2012.08.006.

9 Danksagung

Ich möchte denjenigen danken, die maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Mein aufrichtiger und herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dr. habil. Gerald Reiner für die Beratung bei der Wahl dieses interessanten Themas, für die Rücksichtnahme und immer wieder kurzfristige Hilfe während meiner Schwangerschaft, in der ich diese Arbeit zu Ende geschrieben habe. Der ständige Austausch und die Diskussionen waren immens wichtig für das Fortkommen dieser Arbeit. Außerdem möchte ich mich für das in mich gesetzte Vertrauen im Rahmen meiner Tätigkeit an der Klinik für Schweine bedanken.

Frau Prof. Dr. Christa Ewers und Herrn Prof. Dr. Eberhard Burkhardt gilt mein herzlicher Dank für die ausführliche Durchsicht dieser Arbeit und ihre konstruktive Kritik.

Weiterhin danke ich dem Laborleiter der Klinik für Schweine, Prof. Dr. Hermann Willems für sein stets offenes Ohr sowie Bettina Hopf, Sylvia Willems und Ute Stoll für die Unterstützung beim molekularbiologischen Teil dieser Arbeit.

Ich möchte des Weiteren Frau Dr. Regina Tegeler vom Institut für Mikrobiologie der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover und Frau Dr. Ellen Prenger-Berninghof vom Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere der Justus-Liebig-Universität Gießen für die Bereitstellung der Stämme sowie die Ratschläge bei der Interpretation der Befunde danken.

Den Mitarbeitenden der Klinik für Schweine gilt mein Dank für die Unterstützung und positive Atmosphäre während meiner Arbeit dort: Dr. Sabrina Becker, Alexandra Coors, Corinna Lambert und Frederik Langbein. Besonders Danken möchte ich Franziska Mandler, Josef Kühling und Sabine Baloditis: Franzi, für Deine stille Art mit der Du im Hintergrund alles richtest und zusammen hältst; Josef, nicht nur unendlich lange Fahrten bis ans Ende der Bundesrepublik haben mir gezeigt, was für ein wertvoller Mensch Du bist. Sabine, Deine Spiritualität und altruistische Lebensart sind mir ein Vorbild.

Auch außerhalb der Klinik habe ich viel Zuspruch erhalten. Ich danke Martin Sahn, für seine geschenkte Zeit, die immer ein Gewinn für mich war; den Gießener ‚Kraftfreaks‘ Franziska Hirschhäuser, Uschi Leidner, Silke und Uli Nopper, die den sportlichen Ehrgeiz und so viele Stunden mit mir geteilt haben. Des Weiteren danke ich Sabine Schindele, auf deren Offenheit

und Ehrlichkeit ich immer zählen kann sowie Tina Hoscheit, Andrea Königs und Viktoria Tabbert, die mir gezeigt haben, dass man am besten seinen eigenen Weg geht. Kim Nguyen danke ich für ihr allzeit positives Wesen und ihre Herzlichkeit, mit der sie mir immer begegnet ist.

Zum Schluss möchte ich meiner Familie danken für ihre stetige liebevolle Unterstützung, die aufmunternden Worte und den Zusammenhalt, der alles andere als selbstverständlich ist.

Mein besonderer Dank gilt meinem Ehemann Fabian, dem wichtigsten Menschen in meinem Leben, der aus jedem schlechten Tag einen Guten machen kann. Ohne Deine Liebe und Deinen Rückhalt hätte ich längst aufgegeben.

Ich erkläre:

Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Lara Maria Nike Stein



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6680-2

