

Aus dem Institut für Infektionsmedizin  
(Direktor: Prof. Dr. med. Helmut Fickenscher)  
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel,  
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**ETABLIERUNG EINER BEOBACHTUNGSSTUDIE ZUM  
NACHWEIS ZONOTISCHER INFEKTIONEN DER  
ATEMWEGE BEI MENSCH UND SCHWEIN**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

**Ann Christin Oeser**

aus Heide

Kiel 2020

1. Berichterstatter: PD Dr. med. Andi Krumbholz  
Institut für Infektionsmedizin  
Labor Dr. Krause und Kollegen MVZ GmbH

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Timm C. Harder  
Institut für Infektionsmedizin  
Friedrich-Loeffler-Institut

Tag der mündlichen Prüfung: 19.04.2021

Zum Druck genehmigt: Kiel, den 30.11.2020

gez. Prof. Dr. Franziska Theilig  
(Vorsitzende der Prüfungskommission)

<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>III</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Zoonosen	1
1.2 DNA-Viren	2
1.2.1 Adenoviren	2
1.2.2 Porzines Cytomegalovirus	2
1.2.3 Bocaviren	3
1.2.4 Porzines Circovirus Typ 2	4
1.3 RNA-Viren	4
1.3.1 Influenzaviren	4
1.3.2 Parainfluenzaviren	6
1.3.3 Pneumoviren	6
1.3.4 Picornaviren	8
1.3.5 Coronaviren	9
1.3.6 <i>Porcine reproductive and respiratory syndrome virus</i>	11
1.4 Bakterien	12
1.4.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	12
1.4.2 <i>Streptococcus pneumoniae</i>	14
1.4.3 <i>Haemophilus species</i>	15
1.4.4 <i>Mycoplasma species</i>	16
1.4.5 <i>Chlamydia pneumoniae</i>	18
1.5 Zielsetzung	20
<b>2 Methoden</b>	<b>21</b>
2.1 Materialien	21
2.1.1 Oligonukleotide	21
2.1.2 Isolierung und Amplifikation von Nukleinsäuren	21
2.1.3 Chemikalien, Enzyme und Kulturmedien	22
2.1.4 Geräte und Software	23
2.2 Materialgewinnung	23
2.3 Probenaufarbeitung	24
2.3.1 Nasenabstriche	24
2.3.2 Rüsseltupfer	24
2.3.3 Nukleinsäureextraktion	24
2.3.4 Synthese der komplementären DNA	25
2.4 Echtzeit-Polymerasekettenreaktion	25
2.4.1 TaqMan-Sonden	26
2.4.2 Nachweis zellulärer genomischer DNA	26
2.4.3 Nachweis der RNA des Influenza-C-Virus	27
2.4.4 Kommerzielle Multiplex-Polymerase-Kettenreaktion	27
2.5 Qualitative Polymerase-Kettenreaktion	28
2.5.1 Multiplex-Polymerase-Kettenreaktion	28
2.5.2 Kolonie-Polymerase-Kettenreaktion	30

2.6	Gentechnische Methoden	30
2.6.1	Klonierung von Amplifikaten	30
2.6.2	Transformation kompetenter Bakterien	31
2.7	Sanger-Sequenzierung	32
2.8	Bakterienkulturen	32
2.8.1	Identifizierung der Bakterienspezies	32
2.8.2	<i>Staphylococcus aureus</i>	33
2.9	Abgrenzung verwandter Dissertationen	34
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>35</b>
3.1	Probengewinnung	35
3.2	Qualitätskontrolle	36
3.3	RNA-Nachweis der Influenza-C-Viren	38
3.4	Multiplex-Polymerase-Kettenreaktion	40
3.4.1	Nachweis tierpathogener respiratorischer Erreger	40
3.4.2	Multiplex-Nachweis humaner respiratorischer Pathogene	41
3.5	Kultureller Nachweis von <i>Staphylococcus aureus</i>	45
3.6	Übersicht über die Erregernachweise	47
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>48</b>
4.1	Studiendesign und Probengewinnung	48
4.2	Qualitätskontrollen	50
4.3	Besonders wichtige Pathogene	51
4.3.1	<i>Staphylococcus aureus</i>	51
4.3.2	Coronaviren	52
4.3.3	Rhinoviren	53
4.3.4	<i>Haemophilus parasuis</i>	54
4.3.5	Influenza-C-Viren	55
4.4	Relevanz des Nachweises porziner Erreger für die Xenotransplantation	55
4.5	Ansätze der <i>One-Health</i> -Initiative	56
4.6	Ausblick	57
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>58</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>60</b>
<b>7</b>	<b>Anhang</b>	<b>74</b>
	<b>Danksagung</b>	<b>77</b>

**Abkürzungsverzeichnis**

cDNA	<i>complementary DNA</i>
CoV	Coronavirus
C <sub>P</sub>	<i>crossing point</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EV	Enterovirus
<i>fow</i>	<i>forward</i>
HCoV	Humanes Coronavirus
<i>H. influenzae</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>
HMPV	Humanes Metapneumovirus
HRV	Humanes Rhinovirus
kb	Kilobasenpaare = 1.000 Basenpaare
MRSA	Methicillin-resistenter Stamm des <i>Staphylococcus-aureus</i>
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. pneumoniae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
PBP2a	Penicillin-bindendes-Protein 2a
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PCMV	Porzines Cytomegalovirus
PCR	Polymerasekettenreaktion
PCV-2	Porzines Circovirus Typ 2
PHEV	Porzines Hämagglutinierendes Encephalomyelitis Virus
PRCV	Porzines Respiratorisches Coronavirus
PRRSV	<i>Porcine reproductive and respiratory syndrome virus</i>
<i>rev</i>	<i>reverse</i>
RSV	Respiratorisches Synzytialvirus
Taq-Polymerase	hitze stabile DNA-Polymerase des Bakteriums <i>Thermus aquaticus</i>
T <sub>m</sub>	<i>melting temperature</i> , Schmelztemperatur

# 1 Einleitung

## 1.1 Zoonosen

Unter den Infektionskrankheiten des Menschen spielen zoonotische Infektionen eine herausragende Rolle. Die stetigen Veränderungen der Lebensbedingungen, der Landwirtschaft und der industriellen Lebensmittelproduktion können schwerwiegende Auswirkungen auf die Ausbreitung dieser Erkrankungen haben (Paige et al., 2015). Bei Zoonosen handelt es sich um Infektionskrankheiten, die durch ein Tierreservoir, bestimmte Übertragungsmodi und Erkrankungen definiert sind, die sie beim Menschen auslösen (Cutler et al., 2010). Die Übertragung erfolgt auf natürlichem Weg vom Tier auf den Menschen, entweder direkt durch z.B. Inhalation, Haut- oder Schleimhautkontakt oder indirekt z.B. durch den Verzehr von Tierprodukten (Schulze-Röbbecke, 2015). Einige Erreger haben das Potenzial, auch von Mensch zu Mensch übertragen zu werden. Je nach Pathogen ist das Tier ebenfalls symptomatisch oder asymptomatisch infiziert. Veränderte Bedingungen der Lebensmittelproduktion (insbesondere die Massentierhaltung) und der Ernährung fördern ebenfalls die Verbreitung zoonotischer Erreger (Cutler et al., 2010). Die Schweinehaltung und deren Produkte nehmen eine zentrale Rolle auf dem Lebensmittelmarkt fast der ganzen Welt ein. In den letzten 30 Jahren kam es so zu einer global rasch ansteigenden und intensivierten Produktion, allerdings nicht bedingt durch eine Zunahme der Zahl der landwirtschaftlichen Betriebe, sondern durch eine starke Vergrößerung der Tierbestände (Referenz: [http://www.umweltdaten.landsh.de/agrar/bericht/ar\\_tm\\_tabelle.php?ntabid=1181&Ref=GSB](http://www.umweltdaten.landsh.de/agrar/bericht/ar_tm_tabelle.php?ntabid=1181&Ref=GSB)). Dies führte unweigerlich zu einer Zunahme der Übertragungshäufigkeit dieser Pathogene innerhalb der Herden, aber auch von Schweinen auf ihre Halter (Thapaliya et al., 2015).

Schweine sind beispielsweise hervorragende Wirte für Infektionen mit verschiedenen Influenzavirusstämmen und ermöglichen dadurch die Entwicklung neuer Virus-Linien mit pandemischen Potential, die im Rahmen des modernen Flugreiseverkehrs rasch weltweit verbreitet werden können (Cutler et al., 2010). Eine potenzielle Gefährdung des Menschen durch tierische Erreger ergibt sich auch bei medizinischen Anwendungen, wie dem Einsatz tierischen Gewebes und tierischer Organe im Rahmen der Xenotransplantation (Thapaliya et al., 2015).

In dieser Studie sollte untersucht werden, ob es zu gegenseitigen Übertragungen respiratorischer Pathogene zwischen Schweinen und Landwirten kommt. Im Folgenden werden die für diese Arbeit relevanten Viren und Bakterien vorgestellt.

## 1.2 DNA-Viren

### 1.2.1 Adenoviren

Adenoviren sind umweltresistente, unbehüllte Viren, deren Genom aus einer linearen Doppelstrang-DNA besteht und der Familie der *Adenoviridae* angehören. Für den Menschen sind Vertreter des Genus Mastadenovirus pathogen. Dieses Genus wird nach phylogenetischen Kriterien in die Spezies A bis G unterteilt, die mehr als 54 Serotypen beinhalten. Die Typen 1–8 und 40–41 decken 90 % aller menschlicher Isolate ab (Robinson et al., 2013). Die Ansteckung von Mensch zu Mensch erfolgt vor allem über Tröpfchen, aber auch Schmierinfektionen sind möglich. Als Infektionsquelle kommen überwiegend akut Erkrankte in Frage, die das Virus in großen Mengen ausscheiden (Lion, 2014). Als Eintrittspforte dient der Nasen-Rachen-Raum, wo das Virus sich auf den Schleimhäuten der Luftwege repliziert. Aber auch über die Konjunktiven und den Gastrointestinaltrakt können die Viren in den Körper gelangen. Adenoviren sind ein häufiger Verursacher respiratorischer Infektionen, von einer Pharyngitis bis hin zu einer schweren Pneumonie, aber auch für diverse andere Erkrankungen, wie z.B. folliculäre Konjunktivitis, intestinale Infektionen und akut-hämorrhagische Zystitis (Wold & Horwitz, 2015). Die Inkubationszeit beträgt im Mittel zehn Tage. Die Viren können über Monate persistieren, ohne eine klinische Symptomatik hervorzurufen. Die Durchseuchung beginnt im Säuglingsalter. Die Infektionen werden in allen Altersgruppen beobachtet, wobei respiratorische Erkrankungen vorwiegend im Säuglings- und Kindesalter auftreten. Schwere Verläufe gibt es bei Immunsupprimierten. Derzeit kann in Einzelfällen eine präventive oder therapeutische Behandlung mit Cidofovir durchgeführt werden (Mynarek et al., 2014). In den USA steht eine Impfung zur Verfügung, die bei Militärangehörigen akute Atemwegsinfektionen verhindern soll (Greber et al., 2013).

Porzine Adenoviren sind ebenfalls weltweit verbreitet. Die Infektion hat häufig einen asymptomatischen Verlauf, kann aber auch zu milden Diarrhoen und zu Pneumonien der infizierten Tiere führen (Kumthip et al., 2019). Da diese Virus-Erkrankungen in der Regel nicht schwer verlaufen, bedarf es keiner Therapie oder Impfung (Kumthip et al., 2019).

### 1.2.2 Porzines Cytomegalovirus

Das Porzine Cytomegalovirus (PCMV) gehört zur Subfamilie der  $\beta$ -Herpesviren, die ein Doppelstrang-DNA-Genom besitzen (Morozov et al., 2016). Diese Viren zeigen eine hohe Wirtsspezifität und aktive Infektionen konnten bisher ausschließlich bei Schweinen nachgewiesen werden. Im Rahmen von Versuchen zur Xenotransplantation wurden Abstoßungsreaktionen

bei Pavianen beobachtet (Yamada et al., 2014). Das Virus vermehrt sich in der Rüsselschleimhaut und wird mit dem Rüsselsekret ausgeschieden. Die Übertragung erfolgt aerogen, jedoch sind auch intrauterine Infektionen möglich. Dabei kommt es zur Vergrößerung der befallenen Zellen mit histologisch nachweisbaren intranukleären Einschlusskörperchen. Bei Ferkeln kann es zu der Einschlusskörperchen-Rhinitis kommen (Gu et al., 2014). Bei neugeborenen Tieren, die intrauterin oder bei kolostrumfreier Aufzucht in den ersten Tagen infiziert wurden, kommt es zu einer generalisierten Infektion, die meist letal endet (Liu et al., 2013b). Die Viren vermehren sich in den Zellen des retikuloendothelialen-Systems. Kommt es erst später zu einem Kontakt mit dem Virus, so entwickelt sich ab der zweiten Lebenswoche eine natürliche Resistenz. Das Virus vermehrt sich dann hauptsächlich in den Drüsenzellen der Rüsselschleimhaut und den Lungenmakrophagen und es kann dabei zu vorübergehenden Rhinitissymptomen kommen (Fryer et al., 2001). Im Serum rekonvaleszenter Tiere sind Virus-spezifische Antikörper vorhanden. Das Virus ist auch noch mehrere Wochen nach der Infektion in den Lungenmakrophagen nachweisbar und man geht davon aus, dass das PCMV wie andere Herpesviren lebenslang latent in den Zellen verbleibt (Yoon & Edington, 2006). Eine Therapie ist für PCMV-Infektionen nicht bekannt (Waldmann et al., 2004).

### 1.2.3 Bocaviren

Das Humane Bocavirus gehört zur Familie der *Parvoviridae* und ist ein Einzelstrang-DNA-Virus. Bei Menschen jeder Altersgruppe kann es zu Infektionen der oberen und unteren Atemwege kommen. Bei Kindern wurde es auch im Zusammenhang mit Gastroenteritiden im Stuhl nachgewiesen. Die Übertragung erfolgt aerogen und fäkal-oral (Gurda et al., 2010). Besonders gefährdet für eine Infektion sind Immunsupprimierte. Eine spezifische antivirale Therapie existiert bisher nicht (Proença-Modena et al., 2011).

Im Jahre 2010 wurde erstmals auch beim Schwein ein Bocavirus entdeckt, das Porzine Bocavirus. Dieses Virus wird zusammen mit anderen Viren (z.B. Porzines Circovirus Typ 2 und *Porcine reproductive and respiratory syndrome virus*) als ein Faktor für die Entstehung des sogenannten *post-weaning-multisystemic wasting syndrome* der Ferkel diskutiert. Hierbei kommt es zu Fieber und Dyspnoe, aber auch zu Aborten bei Sauen und einer hohen Sterblichkeit der erkrankten Ferkel (Zhai et al., 2010). Genetisch besteht eine enge Verwandtschaft zu dem humanen Bocavirus (Cheng et al., 2010).



#### 1.2.4 Porzines Circovirus Typ 2

Das Porzine Circovirus 2 (PCV-2) gehört zur Familie der *Circoviridae* und kommt – soweit bekannt – ausschließlich bei Schweinen vor. Die Infektion mit diesem Einzelstrang-DNA-Virus führt zu einem Abfall der Lymphozytenzahl und begünstigt damit Sekundärinfektionen mit anderen Pathogenen (Opriessnig et al., 2011). Der genaue Pathomechanismus ist noch ungeklärt; es wird aber vermutet, dass das Virus in Zellen die Apoptose induziert, somit die Lymphozytenproduktion im Knochenmark reduziert oder die Lymphozytenproliferation im sekundären lymphatischen Gewebe inhibiert (Chae, 2004; Finsterbusch & Mankertz, 2009). PCV-2 wird über Kot, Urin und Sperma ausgeschieden und direkt übertragen. Das Virus verursacht das bereits oben erwähnte *post-weaning-multisystemic wasting syndrome* (Alarcon et al., 2013). Hiervon sind am häufigsten Schweine im Alter von 6-18 Wochen betroffen. Diese zeigen massiven Gewichtsverlust, eine chronische Pneumonie, vergrößerte Lymphknoten und eine Dermatitis mit petechialen Blutungen (Segalés, 2012). Ein Impfstoff steht zur Verfügung (Dvorak et al., 2016).

Bisher wurde davon ausgegangen, dass der Mensch durch PCV-2 nicht infiziert werden kann (Burbelo et al., 2013). PCV-2 wurde aber in zwei Studien in humanen Stuhlproben nachgewiesen, ohne dass es zu einer Erkrankung durch das Virus gekommen wäre (Dennis et al., 2018; Esona et al., 2014).

### 1.3 RNA-Viren

#### 1.3.1 Influenzaviren

Influenzaviren besitzen ein segmentiertes Negativstrang-RNA-Genom, gehören zur Familie der *Orthomyxoviridae* und werden in drei humanmedizinisch relevante Genera (Influenzaviren Typen A, B und C) unterschieden. Speziell das Influenza-A-Virus, dessen natürliches Reservoir Wasservogel sind, hat eine hohe genetische Variabilität (Wright et al., 2015). So begünstigt die hohe Fehlerrate der viruseigenen RNA-abhängigen RNA-Polymerase während der Replikation die Entstehung zahlreicher Mutationen. Dies führt durch Veränderungen der antigenen Determinanten zum *Antigendrift* und ist mit dem jährlich auftretenden saisonalen Influenza-Geschehen beim Menschen verbunden (Wright et al., 2015). Andererseits hat das Virus durch sein segmentiertes Genom die Möglichkeit zum Austausch von Genomsegmenten, was als *Antigenshift* bezeichnet wird (Wright et al., 2015). Durch das genetische Reassortment verschiedener Influenza-A-Stämme tierischen und menschlichen Ursprungs kann ein neues, hochvirulentes und von Mensch-zu-Mensch übertragbares Virus

entstehen. Auf diese Art sind die Pandemiestämme von 1918, 1957, 1968 und zuletzt 2009 entstanden (Saunders-Hastings & Krewski, 2016). Die durch Reassortierung entstehenden Viren können somit die Eigenschaften humaner, porciner und aviärer Influenzaviren vereinen (Neumann et al., 2009). Das Schwein eignet sich besonders gut als Wirt für derartige Mischinfektionen, da die Tiere sowohl mit den aviären wie auch den humanen Influenzaviren infiziert werden können (Zhou et al., 1999).

Die Übertragung der Viren beim Menschen erfolgt über größere Tröpfchen, wie beim Niesen, aber auch durch den Kontakt mit kontaminierten Oberflächen und die anschließende Verschleppung in den Mund- und Nasenbereich (Zhu et al., 2013). Die Inkubationszeit beträgt ein bis vier Tage und die Symptomatik setzt abrupt mit schwerem Krankheitsgefühl, hohem Fieber, Kopf- und Gliederschmerzen und Reizhusten ein. Bei Kindern sind auch gastrointestinale Symptome möglich. Als Komplikation können zusätzlich eine primäre (virale) oder sekundäre (bakterielle) Pneumonie, eine kardiale Beteiligung und neurologische Erkrankungen, wie z.B. Enzephalopathie, Enzephalitis und das Reye-Syndrom auftreten (Panning, 2013; Wright et al., 2015). Die Infektion wird in der Regel symptomatisch behandelt. Bei schweren Krankheitsbildern und bei Risikopatienten können Neuraminidasehemmer eingesetzt werden. Die Neuraminidasehemmer verhindern die Freisetzung neu gebildeter Viruspartikel (Krumholz, 2014). Der Einsatz von RNA-Polymerase-Inhibitoren befindet sich derzeit in der Testphase (Zhou et al., 2018). Die wirksamste Maßnahme zum Schutz vor der Influenza besteht in der jährlichen Impfung vor Beginn der Saison (Schaberg & Burger, 2010).

Influenzaviren sind bei Schweinen die zweithäufigste respiratorische Infektionsursache (Opriessnig et al., 2011). Die Symptome bei infizierten Tieren sind vielfältig und reichen von respiratorischen Infekten bis hin zu fieberbedingten Aborten, die sehr selten auch zum Tod der Zuchtsauen führen können (Zhou et al., 1999).

Eine Infektion mit dem Influenza-C Virus findet bereits häufig im Kindesalter statt (90 % seropositiv für Influenza-C) (Sederdahl & Williams, 2020). Die Krankheitsanzeichen sind im Vergleich zur saisonalen Influenza eher als milde, respiratorische Symptome beschrieben, wobei es zu einer Zunahme von Fällen hospitalisierter Kinder mit schweren Infekten der unteren Atemwege kommt (Fritsch et al., 2019). Das Virus kann auf verschiedene Tiere, z.B. Schweine, Hunde oder auch Rinder übertragen werden und ebenfalls einen respiratorischen Infekt verursachen (Bailey et al., 2018; Zhang, Hwei et al., 2018). Eine horizontale Ansteckung

ist lediglich beim Schwein nachgewiesen (Yuanji et al., 1983). Eine bessere Überwachung des Virus in Tierbeständen soll etabliert werden (Bailey et al., 2018).

### 1.3.2 Parainfluenzaviren

Bei den Humanen Parainfluenzaviren unterscheidet man vier Serotypen, die der Familie der *Paramyxoviridae* angehören und ein nicht-segmentiertes Negativ-Strang-RNA-Genom besitzen (Karron und Collins, 2015). Innerhalb der ersten sechs Lebensmonate erfahren die meisten Kinder eine Infektion mit dem Typ 3, bis zum Alter von fünf Jahren sind in der Regel Infektionen mit allen Serotypen durchgemacht worden. Da die Immunität nach überstandener Erkrankung nur kurzzeitig anhält, kommt es lebenslang zu Reinfektionen, die dann aber milder ablaufen (Henrickson, 2003). Eine Tröpfchenübertragung oder der Kontakt mit Nasensekret sind die hauptsächlichen Infektionswege. Eintrittspforte ist der Nasen-Rachen-Raum, wo sich das Virus im Flimmerepithel der oberen und unteren Atemwege vermehrt (Branche & Falsey, 2016). Bei Erwachsenen kommt es nun zu einer katarrhalischen Entzündung, wohingegen es bei Kleinkindern, besonders bei Erstaufreten, zu einem Ausbreiten der Infektion in die tiefen Bronchien mit Entstehung peribronchiolärer Infiltrate und Ödeme kommen kann. Die Inkubationszeit beträgt etwa zwei bis vier Tage. Ca. 15 % der Erkrankungen manifestieren sich in den unteren Atemwegen, am häufigsten mit einer Bronchiolitis (Typ 2 und 3) oder mit Pseudokrupp (Typ 1) (Marx et al., 1997). Interstitielle Pneumonien, aber auch disseminierte Erkrankungen mit Beteiligung von Leber, Herz und Meningen können als schwere Verläufe bei Patienten mit Immundefekten auftreten (Liu et al., 2013a). Die Therapie erfolgt symptomatisch (Branche & Falsey, 2016).

Im Jahr 2013 wurden erstmals Porzine Parainfluenzaviren vom Serotyp 1 bei Schweinen nachgewiesen. Dieses Virus hat eine enge genetische Verwandtschaft zu den humanen Virusstämmen (Lau et al. 2013). Weitere Versuche zeigten, dass die Infektion durch dieses Virus beim Schwein wahrscheinlich asymptomatisch bleibt (Palinski et al., 2016).

### 1.3.3 Pneumoviren

Das **Respiratorische Synzytialvirus** (RSV) hat ein nicht segmentiertes Negativ-Strang-RNA-Genom (Walsh, 2012) und zählt zu dem Genus der *Orthopneumoviridae*. Zwei Subtypen existieren, die mit dem Buchstaben A und B bezeichnet werden (Collins & Crowe Jr., 2015). Das Virus kommt ubiquitär vor und ist die häufigste Ursache für schwere Atemwegserkrankungen im Kleinkindalter, wobei Frühgeborene und Kinder mit angeborenen Herzfehlern und bronchiopulmonaler Dysplasie besonders gefährdet sind. Diese Gruppe erkrankt häufig an

Pneumonien und Bronchiolitiden und hat mit bis zu 2 % eine hohe Letalität. Auch bei Immunsupprimierten kann es zur Exazerbation der Infektion kommen (Mori et al., 2014).

Die Übertragung erfolgt über Tröpfchen oder Kontakt mit Nasen-Rachen-Sekret. bzw. damit kontaminierte Gegenstände. Das hochinfektiöse Virus wird noch bis zu drei Wochen nach der Infektion ausgeschieden (Hogan et al., 2016). RSV dringt über die Konjunktiven oder die Nasenschleimhäute in den Körper ein und breitet sich dann unter Synzytienbildung in die tiefen Atemwege aus, wobei es in den Bronchien und Bronchiolen zu einer Entzündung mit interstitiellen Infiltraten und ausgeprägten Ödemen kommt. Diese führen bei Säuglingen durch Verengung der Atemwege und einer Zunahme des Atemwiderstandes zu Atemnot. Für erkrankte Kinder besteht zusätzlich ein erhöhtes Risiko, an allergischer Bronchitis, Asthma oder chronisch-obstruktiver-Lungenkrankheit zu erkranken (Gomez et al., 2014). Erwachsene und Immunsupprimierte können ebenfalls durch RSV infiziert werden. Bei letztgenanntem Patientenkollektiv kann diese Infektion schwer oder gar tödlich verlaufen (Falsey et al., 2005; Panuska et al., 1992). Eine RSV-Infektion beginnt nach einer Inkubationszeit von ca. zwei bis acht Tagen. Eine wirksame kausale Behandlung ist nur bedingt verfügbar; so kann bei einer nachgewiesenen RSV-Infektion bei Risikopatienten, z.B. nach Lungentransplantation, eine inhalative Ribavirin-Therapie in Erwägung gezogen werden (Pelaez et al., 2009). Weiterhin besteht die Möglichkeit der prophylaktischen Gabe der monoklonalen Antikörper Palivizumab oder Motavizumab bei besonders gefährdeten Personen (Drick & Welte, 2016; Raghunandan et al., 2014). In der Literatur findet sich derzeit kein Hinweis, dass dieses Virus eine Infektion bei Schweinen verursachen würde.

Das **Humane Metapneumovirus** (HMPV) ist eng mit RSV verwandt und gehört ebenso zur Familie der *Pneumoviridae* (Collins & Crowe Jr., 2015). Das Virus kommt weltweit vor und vorwiegend Kinder bis zum fünften Lebensjahr erkranken. Die Durchseuchungsrate beträgt in dieser Altersgruppe über 90 %. Kleinkinder unter zwei Jahren sind besonders gefährdet, an einer schweren, tiefen Atemwegsinfektion zu erkranken (Adams et al., 2015). Verglichen mit RSV verläuft die HMPV-Infektion bei Kleinkindern milder und seltener letal. Bei älteren Menschen und Patienten mit einem Immundefekt oder hämatologischen Grunderkrankungen sind jedoch schwere, potenziell tödliche Verläufe möglich (Principi & Esposito, 2014).

Die Übertragung erfolgt über Tröpfchen und die Inkubationszeit beträgt vier bis fünf Tage. Ähnlich wie bei RSV kommt es zu den Symptomen einer klassischen Erkältungskrankheit, die durch eine Mittelohrentzündung kompliziert werden kann (van den Hoogen et al., 2001). Eine

spezifische Therapie steht nicht zur Verfügung (Drick & Welte, 2016). In der Literatur ist derzeit kein Hinweis darauf zu finden, dass dieses Virus eine Infektion bei Schweinen auslösen könnte.

#### 1.3.4 Picornaviren

Die Familie der *Picornaviridae* ist eine heterogene Gruppe von Viren, die bei Menschen und Tieren zu finden sind. Alle Vertreter haben ein einzelsträngiges Positiv-RNA-Genom (Zell et al., 2017). Die für diese Arbeit relevanten Vertreter der Picornaviren werden vorgestellt.

Bei den **Humanen Enteroviren** existieren die vier Spezies der Typen A–D. Diese Viren sind weltweit verbreitet und haben in Kindern ihr wichtigstes Reservoir (Pallansch & Roos, 2015). Die Enteroviren werden noch monatelang nach einer Infektion mit dem Stuhl ausgeschieden. Daher findet die Übertragung direkt fäkal-oral oder bei Infektionen der oberen Atemwege durch Tröpfchen statt (Huzly, 2014). Je nach Übertragungsweg sind der Nasen-Rachen-Raum oder der Dünndarm die Eintrittspforten für die menschliche Infektion (Schöffel et al., 2018). Viele Enteroviren erzeugen einen banalen Schnupfen oder eine fieberhafte Pharyngitis mit allenfalls milden Gastroenteritiden, auch Sommergrippe genannt. Das Virus kann bei der Hand-Fuß-Mund-Krankheit auch ein Exanthem verursachen. Besonders bei Kleinkindern können Enteroviren eine aseptische Meningitis hervorrufen. Diese Erkrankung hat fast immer einen benignen Verlauf mit einer Ausheilung nach wenigen Tagen. Eine Myokarditis geht vor allem bei Neugeborenen und Säuglingen mit einer hohen Letalität einher (Säuglingsmyokarditis). Weiter wird vermutet, dass es bei der Infektion des fetalen Myokards zu Aborten kommen kann (Chang et al., 2004). Die Erkrankungen treten akut auf und sind normalerweise selbstlimitierend. Die Enterovirusinfektion kann aber auch zur Entstehung einer chronischen Myokarditis oder einer dilatativen Kardiomyopathie beitragen (Graaf et al., 2016). Die Inkubationszeit beträgt im Mittel etwa sechs bis zwölf Tage. Die Therapie erfolgt symptomatisch, da die Erkrankung in den meisten Fällen selbstlimitierend ist. Eine Schutzimpfung befindet sich in der Entwicklung (Chung et al., 2008).

**Porzine Enteroviren** haben, insbesondere bei Ferkeln, eine sehr hohe Durchseuchungsrate. Man geht davon aus, dass die Sauen das Virus über die Milch an die Ferkel übertragen (Vilar et al., 2016). Infektionen mit Porzinen Enteroviren verlaufen asymptomatisch (Anbalagan et al., 2014).

**Humane Rhinoviren** sind für die meisten respiratorischen Infektionen beim Menschen verantwortlich (Turner & Couch, 2015). Die Rhinoviren sind genetisch eng mit den Enteroviren

verwandt und werden daher einem gemeinsamen Genus zugeordnet (Royston & Tapparel, 2016). Im Gegensatz zu letzteren sind sie aber instabil gegenüber Magensäure und infizieren daher vorwiegend die Schleimhäute des Nasen-Rachen-Raums (Andréoletti et al., 2000). Eine Schmierinfektion durch kontaminierte Hände oder Gegenstände ist der bevorzugte Übertragungsweg, weniger häufig auch eine Tröpfcheninfektion (van Kempen et al., 1999). Nach ein bis drei Tagen Inkubationszeit treten die typischen Erkältungs-Symptome auf, schwerere Verläufe, wie z.B. eine Pneumonie, können bei den Risikogruppen der immunsupprimierten und älteren Menschen vorkommen (Hayden, 2004). Nach einer überstandenen Infektion besteht auf Grund der gering ausgeprägten Antigenität und hohen Variabilität der Rhinoviren keine dauerhafte Immunität (Blomqvist et al., 2002). Die Therapie erfolgt symptomatisch und die beste Prävention besteht in der Befolgung allgemeiner Hygieneregeln mit häufigem und gründlichem Händewaschen. Ein Impfstoff existiert nicht (Glanville & Johnston, 2015). Eine Infektion von Schweinen durch Humane Rhinoviren ist nach derzeitigem Literaturstand nicht beschrieben.

**Parechoviren** ähneln den Enteroviren in ihrer klinischen Manifestation (Benschop et al., 2006). Hauptsächlich kommt es zu Diarrhoen und Erkältungskrankheiten, selten auch zu zentralnervösen Manifestationen (Fischer et al., 2014). Parechoviren können Schweine asymptomatisch infizieren (Yu et al., 2013).

### 1.3.5 Coronaviren

Die **Humanen Coronaviren** (HCoV) gehören wie auch die Porzinen Coronaviren zu der Familie *Coronaviridae*. Dabei werden verschiedene humanpathogene Virustypen unterschieden (229E, 63, OC43, HKU1, SARS und MERS). Diese Viren besitzen ein lineares Positiv-Strang-RNA-Genom von 27–31 kb (Lai et al., 2015). Beim Menschen führen HCoV-Infektionen vor allem in den Wintermonaten zu akuten respiratorischen Erkrankungen, sowohl der oberen als auch der unteren Atemwege. Häufig werden Koinfektionen zusammen mit anderen respiratorischen Viren beobachtet. Mehrfachinfektionen sind mit einem schwereren Krankheitsbild vergesellschaftet (Kim et al., 2017).

Die Übertragung erfolgt sehr leicht von Mensch zu Mensch über Aerosole oder Tröpfchen. Nur durch konsequente Hygienemaßnahmen lässt sich eine Ansteckung verhindern (Guery et al., 2013). Die Viren dringen über den Nasen-Rachen-Raum ein und vermehren sich dort. In den meisten Fällen verläuft die Erkrankung wie eine banale Erkältung (Vabret et al., 2009). Die

Therapie erfolgt symptomatisch und bakterielle Superinfektionen bedürfen einer gezielten Behandlung (Rose, 2014).

Infektionen unterschiedlicher Tierspezies durch Coronaviren sind bekannt und haben einen ökonomischen Stellenwert in der Nutztierhaltung. Bei Ferkeln kommt es durch die Infektion zur Diarrhoe, bei Hühnern zu einer Erkrankung der Nieren und der oberen Atemwege (Perlman & Netland, 2009).

In den Jahren 2002-2003 kam es nach Übertragung eines Coronavirus aus dem tierischen Reservoir (Himalaya-Fleckenmusang, Fledermäuse, Marderhunde, chinesische Sonnendachse) auf den Menschen zur Entstehung einer humanen Epidemie mit 8.096 Erkrankungs- und 774 Todesfällen (Drexler et al., 2014; Li et al., 2005). Dieses sogenannte *severe acute respiratory syndrome* (SARS)-CoV breitete sich begünstigt durch den modernen Flugverkehr weltweit aus. Das Virus konnte nicht nur aus dem Sputum, sondern auch aus Stuhl und Urin isoliert werden, so dass die Symptome neben einer Infektion der unteren Atemwege im Sinne einer viralen Pneumonie auch wässrige Durchfälle waren. Eine Immunsuppression mit fallenden T-Zell-Zahlen wurde ebenfalls beobachtet. Glücklicherweise konnte das Virus rasch identifiziert und in seiner Verbreitung eingedämmt werden (Peiris et al., 2004), so dass es heutzutage offenbar nicht mehr zirkuliert.

Seit 2012 kommt es zu neuen zoonotischen Infektionen mit einem anderen zoonotischen Coronavirus, dem sogenannten *Middle East respiratory syndrome* (MERS)-CoV. Als tierisches Reservoir werden Kamele und Fledermäuse angesehen (Chu et al., 2014; Gong & Bao, 2018). Ähnlich zu SARS-CoV verursacht auch MERS-CoV eine schwere Schädigung des Lungengewebes (Becher et al., 2015). Bei engem Kontakt mit infizierten Kamelen kann es zu einer Übertragung des MERS-CoV auf Menschen kommen (Azhar et al., 2014), aber auch eine effiziente nosokomiale Verbreitung wurde beobachtet.

Im Dezember 2019 wurden in Wuhan, einer zentralchinesischen Millionenmetropole, vermehrt Lungenentzündungen bei Besuchern eines Fisch- und Lebendtiermarktes beobachtet. Als Verursacher dieser Pneumonien wurde kurze Zeit später ein neues Coronavirus 2019-nCoV identifiziert (Hui et al., 2020). Dieses Virus ist eng mit dem SARS-Virus verwandt und breitet sich bisher vor allem in Wuhan und der Provinz Hubei aus. So berichtet die Weltgesundheitsorganisation dort von aktuell 33.366 Fällen, darunter 1.068 tödliche Verläufe. Mittlerweile sind auch andere chinesische Provinzen betroffen, ebenso Länder rund um den Globus, so dass bisher insgesamt 45.171 Infektionen zur Meldung kamen,

darunter auch 1.115 Todesfälle (Welt-Gesundheits-Organisation, [https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situation-reports/20200212-sitrep-23-ncov.pdf?sfvrsn=41e9fb78\\_2](https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situation-reports/20200212-sitrep-23-ncov.pdf?sfvrsn=41e9fb78_2), Stand 12.02.2020).

Anhand des Vergleichs verschiedener Coronavirussequenzen wird angenommen, dass 2019-nCoV wie schon SARS-CoV und MERS-CoV aus Fledermäusen stammt und über einen Zwischenwirt seinen Weg zum Menschen fand (Lu et al., 2020). Das Virus ist direkt von Mensch zu Mensch übertragbar und verursacht neben schweren viralen Pneumonien häufige nur milde respiratorische Symptome (Rothe et al., 2020).

Das **Porzine Respiratorische Coronavirus** (PRCV) verursacht, wenn überhaupt, eine milde respiratorische Infektion, die soweit bekannt nur Schweine betrifft (Boniotti et al., 2016). Das Virus ist eine Variante des schon lange bekannten enteralen CoV des Schweines, dem Erreger der Transmissiblen Gastroenteritis (Rasschaert et al., 1990). PRCV wird über Aerosole übertragen und gelangt so in den nasalen Raum. Nach einer Virämie vermehrt sich das Virus in den Bronchial- und Mesenteriallymphknoten (Laude et al., 1993). Die klinische Bedeutung ist noch nicht gänzlich geklärt, es wird aber diskutiert, dass dieses Virus als Wegbereiter für andere Infektionen ist, wie z.B. PRRSV oder bakterielle Superinfektionen. In den meisten Fällen verläuft die Erkrankung subklinisch (van Reeth et al., 1996). Da praktisch keine klinischen Symptome auftreten, ist eine Behandlung nicht nötig. Nach überstandener PRCV-Infektion entsteht keine Kreuzimmunität gegen den Erreger der Transmissiblen Gastroenteritis. Eine Impfung existiert nicht (Mack et al., 2015).

Das *Porcine hemagglutinating encephalomyelitis virus* (PHEV) ist ein weiteres CoV des Schweins. Nach einer Infektion mit diesem Virus kommt es bei Ferkeln zu Erbrechen oder einer Encephalomyelitis, jedoch eher seltener zu einer respiratorischen Beteiligung. PHEV ist bisher beim Menschen noch nicht nachgewiesen worden (Lorbach et al., 2017).

### 1.3.6 **Porcine reproductive and respiratory syndrome virus**

Das *Porcine reproductive and respiratory syndrome virus* (PRRSV) gehört zu der Familie der *Arteriviridae* und hat ein Positiv-RNA-Genom. Das Virus wird bisher nur mit Infektionen bei Schweinen in Verbindung gebracht (Cho & Dee, 2006).

Tiere, die als symptomlose Virusausscheider zugekauft worden sind, sorgen dafür, dass sich das Virus in einem bis dahin gesunden Bestand ausbreiten kann. Nach der nasalen Aufnahme eines Aerosols vermehren sich die Viren in den Epithelzellen der Atemwege (Frydas & Nauwynck, 2016).



PRRSV wird mit allen Körpersekreten bereits am zweiten Tag nach der Infektion ausgeschieden und bei günstigen atmosphärischen Bedingungen kann die aerogene Verbreitung bis zu drei Kilometer betragen. Die Übertragung kann direkt und indirekt, sowie horizontal und vertikal erfolgen (Cho & Dee, 2006). Die Inkubationszeit beträgt etwa zwei bis sechs Tage. Im Anschluss an die Vermehrung in den Atemwegen mit Schädigung der Lungenmakrophagen, der bronchialen Zilien und der Typ-II-Pneumozyten kommt es zu einer Infektion der regionalen Lymphknoten, einer Virämie und schließlich zu einer systemischen Ausbreitung in Monozyten und Makrophagen verschiedener Gewebe (Lunney et al., 2016).

Unterschiedliche Krankheitszeichen werden beobachtet. So kommen grippeartige Symptome, begleitet durch Fieber, Fressunlust und teils hämorrhagischen Veränderungen der Extremitäten vor. Intrauterine Infektionen bemerkt man erst später, da es dann zu Aborten, Totgeburten und Frühgeburten kommen kann (Allan et al., 2000). Nach dem Überwinden der Infektion entwickelt sich eine nur kurz anhaltende Immunität. Die Virusausscheidung kann bis zu 23 Wochen anhalten (Chen et al. 2016). Eine Impfung für Absatzferkel steht zur Verfügung. Ihr Stellenwert ist aber umstritten, da sie die Infektion selbst nicht verhütet, sondern nur die Virämiedauer, die Schwere der Organläsionen und die Virusausscheidung verringert (Suradhat et al., 2015). Die Therapie erfolgt symptomatisch. Das Virus besitzt allerdings eine geringe Tenazität und Desinfektionsmittel mit Detergentien-Eigenschaften sind gut wirksam (Ackermann, 2013; Du et al., 2017).

## 1.4 Bakterien

### 1.4.1 *Staphylococcus aureus*

Bei der Gattung *Staphylococcus* handelt es sich um Gram-positive, nicht sporenbildende Kugelbakterien. Alle Vertreter dieser Gattung sind sehr widerstandsfähig gegenüber Hitze, Austrocknung, UV-Licht, pH-Veränderungen und einer hohen Salzkonzentration. Die Übertragung kann durch direkten Kontakt bzw. Tröpfcheninfektion oder indirekt über Staub erfolgen (Tong et al., 2015). Die wenig bis apathogenen Staphylokokken exprimieren keine Plasmakoagulase und werden daher unter dem Begriff der Koagulase-negative Staphylokokken (KNS) zusammengefasst. Hierbei handelt es sich um Mikroorganismen der physiologischen Haut-/Schleimhautflora des Menschen (Reichel et al., 2011).

Die wichtigste pathogene Art der Staphylokokken ist *S. aureus*, der durch seine Koagulase-Bildung gekennzeichnet ist. Dieses Bakterium verfügt über ein großes Repertoire an Enzymen (z.B. Hyaluronidase, DNase, Plasmakoagulase, Exfoliatine) und Toxinen (Otto, 2014). Die aus-

gelösten Infektionen lassen sich hinsichtlich ihrer Pathogenese in die folgenden drei Gruppen aufteilen (Tong et al. 2015).

Bei den invasiven Infektionen entstehen nach dem Eindringen über die Haut oder Schleimhaut lokal begrenzte, mit Eiterbildung einhergehende Infektionen. Beispiele hierfür sind Wundinfektionen, Otitis media, Pneumonie oder Endokarditis. Fremdkörper oder Prothesen können ebenfalls mit einem Biofilm überzogen werden und so eine Sepsis auslösen.

Bei den Toxikosen kommt es nach der Einnahme von hitzestabilen Enterotoxin mit kontaminierten Speisen nach wenigen Stunden zu einer Lebensmittelintoxikation mit Übelkeit, Erbrechen und Diarrhoe. Auch unbehandelt sistieren die Symptome meist nach etwa 24 Stunden.

Bei den Mischformen können Exfoliative-produzierende Stämme, die oberflächlich die Haut infizieren, die Dermatitis exfoliativa (*staphylococcal scaled skin syndrom*), den Pemphigus neonatorum oder die Impetigo bullosa auslösen. Superantigen-exprimierende Stämme können das toxische Schock-Syndrom hervorrufen, zu invasiven Infektionen bis zum lebensbedrohlichen Schock oder auch nur zur Schleimhautbesiedelung führen (Dayan et al. 2016).

Bei der Lebensmittelintoxikation steht die symptomatische Therapie im Vordergrund. Abgegrenzte Infektionen bedürfen meist chirurgischer Maßnahmen, wie z.B. der Spaltung und Drainage von Abszessen. Weiterhin gibt es die Möglichkeit einer antibiotischen Therapie mit einem penicillinasefesten Penicillin-Derivat. Ebenfalls müssen Resistenzen gegen Oxacillin und Aminoglykoside berücksichtigt werden. Die Therapie sollte möglichst antibiogramm-gerecht erfolgen (Tong et al., 2015).

**Methicillin-resistente *Staphylococcus-aureus*-Stämme (MRSA)** stellen ein besonderes nosokomiales Problem dar (Kallen et al., 2010). Etliche Patienten werden durch einen Aufenthalt im Krankenhaus mit MRSA besiedelt oder infiziert (*hospital aquired MRSA*), aber die Zahl der in der Öffentlichkeit und beim Sport übertragenen MRSA (*community aquired MRSA*) nimmt stetig zu (Huggins et al., 2018). Hohe Trägerraten finden sich bei dem Krankenhauspersonal, wo vor allem die Schleimhaut des vorderen Nasenbereiches besiedelt ist (Klevens et al., 2007). Die MRSA-Besiedelungsrate bei medizinischem Personal beträgt in manchen Regionen 25,5 % (El Aila et al., 2017).

Alle MRSA sind durch die Bildung eines veränderten Penicillin-Binde-Proteins (PBP-2a) gekennzeichnet, das gegenüber  $\beta$ -Lactam-Antibiotika unempfindlich ist (Lim & Strynadka, 2002; Sewell & Brown, 2014). Häufig findet sich auch ein erweitertes Resistenzprofil, das auch Resistenzen gegen Fluorchinolone, Erythromycin und Clindamycin einschließt (Kresken et al., 2010).

Schweinebestände haben in der Regel eine hohe Besiedlungsrate mit *S. aureus*, hierbei insbesondere mit MRSA (Herden-Prävalenz 97 %, Einzeltier-Prävalenz 77 %) (Kinross et al., 2017). Derzeit nimmt man an, dass die besiedelten Tiere und die Stallumgebung durch Reinfektionen für die hohe Trägerrate unter den Beständen verantwortlich sind und die Landwirte, die engen und häufigen Kontakt zu der Herde haben, auch mit diesen Stämmen infiziert werden (Bos et al., 2016). Die Schweine selbst sind nicht als permanent besiedelt zu betrachten, sondern durch das ubiquitäre Vorkommen der Bakterien im Stall kommt es ständig zur Neubesiedelung der Rüssel einiger Tiere und in Folge dessen zur Verbreitung in der Herde (Verstappen et al., 2017). In Analogie zu den *hospital acquired* und *community acquired* MRSA bezeichnet man diese Stämme als *livestock-associated* MRSA (Meemken et al., 2010).

#### 1.4.2 *Streptococcus pneumoniae*

*Streptococcus (S.) pneumoniae*, die auch als Pneumokokken bezeichnet werden, sind ovale bis lanzettförmige Diplokokken, die von einer Polysaccharidkapsel umgeben werden. Diese Kapsel ist der wichtigste Virulenzfaktor und verhindert die Phagozytose des Bakteriums. Antigenvariationen der Kapsel erlauben die Unterscheidung von 91 Serovaren (Hathaway et al., 2016). Die Pneumokokken haben eine charakteristische Kultur-Morphologie und weisen auf Blutagar eine  $\alpha$ -Hämolyse auf. Die Anwesenheit von CO<sub>2</sub> begünstigt das Wachstum in der Kultur (Allegrucci & Sauer, 2007; Bogaert et al., 2004b).

Eine Infektion mit dem Bakterium entsteht fast immer endogen, da 40–70 % aller Menschen symptomlose Träger des Erregers im Oropharynx sind und der Mensch als natürliches Erregereservoir gilt. Die wichtigste Pneumokokken-Infektion ist die Lobärpneumonie. Daneben sind die Bakterien für Entzündungen des Mittelohrs und der Nasennebenhöhlen sowie für das Ulcus corneae verantwortlich. Als sekundäre Infektion kann es durch hämatogene Streuung zu einer Meningitis kommen (Tettelin et al., 2001). Zu den prädisponierenden Faktoren zählt vor allem die Asplenie. Durch das Fehlen der Milz kommt es zu einer erhöhten Anfälligkeit gegenüber bekapselten Bakterien, insbesondere den Pneumokokken, und es kann sich eine fulminante Sepsis entwickeln. Weitere Risikofaktoren für eine schwere Erkrankung sind

chronische Herz- oder Lungenleiden, Diabetes mellitus, Leberzirrhose oder Erkrankungen der Niere und der blutbildenden Organe (Bogaert et al., 2004a). Zur Therapie stehen die Basispenicilline, alternativ Erythromycin oder ein Cephalosporin der III. Generation zur Verfügung (Appelbaum, 1992). Den Senioren ab dem 60. Lebensjahr und Kindern wird eine Schutzimpfung gegen Pneumokokken empfohlen (van der Poll & Opal, 2009).

Das zoonotische Potential von *S. pneumoniae* ist bisher nur wenig untersucht. In einer aktuellen Studie konnte man jedoch Pneumokokken bei unterschiedlichen Haustieren nachweisen, darunter sogar humanpathogene Stämme bei Hunden und Ratten (Ginders et al., 2017).

### 1.4.3 *Haemophilus species*

*Haemophilus* wird zur Familie der *Pasteurellaceae* zugeordnet. Dabei handelt es sich um ein kleines, zartes, unbewegliches, oftmals bekapseltes, Gram-negatives Stäbchen. Für die Anzucht einiger *Haemophilus*-Typen benötigt der Erreger bestimmte Wachstumsfaktoren aus Erythrozyten (NAD und Hämin). Die Anzucht gelingt auf Kochblutagar oder auf Blutagar mit *S. aureus* als Amme (Whitman et al., 2015).

*Haemophilus (H.) influenzae* wird aufgrund seiner Kapsel-Antigene in die Serotypen A-F klassifiziert. Das Bakterium hat zwei wesentliche Pathogenitätsfaktoren. Zum einen verhindert die Kapsel, dass der Erreger phagozytiert wird und zum anderen bildet der *H. influenzae* eine IgA-Protease, welche die lokale Immunabwehr auf der Schleimhaut schwächt und so die Invasion in das Gewebe erleichtert (Rosadini et al., 2014). Unbekapselte Stämme gehören zur Normalflora des Menschen. Da Raucher eine gestörte Epithelbarriere haben, können auch solche unbekapselten Stämme zu einer chronischen Bronchitis, dem sogenannten Raucherhusten führen (Cosio et al., 2015). Bekapselte Stämme hingegen werden von kranken und gesunden Trägern durch Tröpfchen übertragen. Speziell Kinder im Alter zwischen sechs Monaten und dem vierten Lebensjahr sind betroffen. Hier kann es entweder zu einer Meningitis mit hoher Letalität und schweren neurologischen Folgeschäden oder zu einer akuten Epiglottitis mit hohem Fieber und fulminantem Verlauf kommen. Weitere Erkrankungen können eine Sinusitis, Otitis media, Osteomyelitis und Perikarditis sein. Ähnlich wie die Pneumokokken können auch die bekapselten *H.-influenzae*-Stämme eine fulminante Sepsis nach Splenektomie verursachen. Als Sekundärinfektion kann sich im Gefolge einer Influenza eine Bronchopneumonie entwickeln oder eine chronische Bronchitis akut exazerbieren (Tan et al., 2016; Wong et al., 2013). Als Therapie der Wahl steht Ampicillin bzw. Amoxicillin zur Verfügung, wobei die Therapie so früh wie möglich begonnen werden muss. Alternativen sind ein

Cephalosporin der II. Generation, Chinolone oder Makrolide, wie z.B. Clarithromycin (Finney et al., 2014). Weiterhin besteht die Möglichkeit, Träger zu sanieren und Risikopatienten, z.B. nach Milz-Exstirpation, wird empfohlen sich mit einer aktiven Schutzimpfung zu immunisieren. Für Kinder besteht eine allgemeine Impfempfehlung (Campos et al., 2004; Robert Koch-Institut, 2019).

*H. parasuis* ist der Erreger der Polyserositis oder „Glässer’schen Krankheit“ bei Schweinen (Macedo et al., 2015). In den Rüsseln ist dieses Bakterium in den meisten Fällen nachweisbar. Der Erreger ist weltweit verbreitet. Die Übertragung erfolgt aerogen. Besonders zuvor erregerfrei aufgewachsene Tiere, die in die konventionelle Schweinehaltung kommen, können nach einer Woche Symptome zeigen und schwer erkranken. Hohes Fieber, Peritonitis, Pleuritis und Arthritis sind einige der Krankheitszeichen (Brockmeier et al., 2013). Als Therapie empfiehlt sich der frühzeitige Einsatz von Penicillin oder Trimethoprim/Sulfamethoxazol ergänzt durch symptomatische Maßnahmen. Resistenzmindernde Stresssituationen sollten grundsätzlich vermieden werden (Macedo et al., 2015). Falls wiederholt Krankheitsfälle auftreten, besteht die Möglichkeit der Impfung (Cerde-Cuellar et al., 2010).

#### 1.4.4 *Mycoplasma species*

Die zur Klasse der *Mollicutes* gehörende Familie der *Mycoplasmataceae* umfasst die Gattung der Mykoplasmen und Ureaplasmen. Die *Mycoplasmataceae* sind zellwandlose Prokaryonten. Zahlreiche human- und tierpathogene Spezies existieren. Sie werden aerogen oder durch Tröpfchen, selten durch Schmierinfektion übertragen. Der kulturelle Nachweis von Mykoplasmen ist aufwändig. Neben der Kultur besteht die Möglichkeit, den Erreger mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) direkt nachzuweisen (Tully et al., 1993).

*Mycoplasma (M.) pneumoniae* ist hoch kontagiös, was die familiäre Häufung der Erkrankungen erklärt. Das Virus ist stark an den Menschen adaptiert und fähig sich in den Atemwegsepithelien zu replizieren (Jacobs et al., 2015). Es gibt jedoch den Nachweis einer Übertragung durch einen infizierten Goldhamster, der als Reserviertier die Quelle kindlicher Infektionen darstellte (Mikola et al., 1997).

Die Bakterien heften sich an die Flimmerepithelien der Trachea, Bronchien und Bronchiolen und zerstören diese durch Bildung von Wasserstoffperoxid und andere bisher unbekannte Mechanismen. Ein weiterer Pathomechanismus ist die Produktion von Antigenen, die gezielt das Immunsystem stören. Diese Antigene sind mit körpereigenen Strukturen verwandt und führen über Kreuzreaktionen zu Autoimmunphänomenen, wie z.B. zu der Bildung von

Kälteagglutininen (Waites & Talkington, 2004). Nach einer ca. dreiwöchigen Inkubationszeit kommt es zu einer schweren Erkältungskrankheit mit Husten. Bei bis zu 25 % der Erkrankten kann es zu einer atypischen Pneumonie kommen. In seltenen Fällen kommt es zu Folgeerkrankungen, wie einer Meningitis, anderen Erkrankungen des zentralen Nervensystems, einer Otitis media, Pankreatitis oder einem Erythema nodosum. Die Prognose der Infektion ist aber im Allgemeinen gut (Himmelreich et al., 1996). Diese zellwandlosen Bakterien sind unempfindlich gegenüber  $\beta$ -Laktam-Antibiotika, wie z.B. Penicillinen und Cephalosporinen. Somit muss auf andere Antibiotikagruppen, wie z.B. Tetrazykline oder Makrolide, zurückgegriffen werden (Tully et al., 1993).

*M. hyopneumoniae* findet sich in der Regel nur in den Atemwegen der Schweine und nur in Ausnahmefällen kann sich der Erreger septikämisch ausbreiten. Das Bakterium ist Erreger der Enzootischen Pneumonie bei Schweinen (Felde et al., 2018). Zur Übertragung auf eine bis dahin gesunde Herde kommt es durch den Zukauf infizierter Tiere. Unter besonderen klimatischen Bedingungen kann der Erreger kilometerweit verbreitet werden. Die Inkubationszeit beträgt etwa 10–16 Tage. *M. hyopneumoniae* heftet sich an das respiratorische Flimmerepithel, verhindert dadurch den Zilienschlag, so dass das infizierte respiratorische Epithel zu Grunde geht. Dieser Mechanismus begünstigt Superinfektionen mit anderen Bakterien (Zhang et al., 1995). Das charakteristische Symptom ist chronischer, nicht-produzierender Husten. Diese Verlaufsform der Infektion kann durch Antibiotikatherapie nicht entscheidend beeinflusst werden. Die zur Verfügung stehenden Chemotherapeutika dienen lediglich dazu, die Ansiedlung und Verbreitung der Erreger im respiratorischen Gewebe zu verzögern. Als unterstützende Therapie gibt man Bronchosekretolytika und Kortikosteroide (Maes et al., 2008). Ein Impfstoff gegen die enzootische Pneumonie ist verfügbar, allerdings wird dadurch nicht die Infektion verhindert, sondern nur der klinische Verlauf und der wirtschaftliche Schaden gemildert (Maes et al., 2008).

*M. hyorhinis* hat eine Inkubationszeit von drei bis zehn Tagen und vor allem Schweine im Alter zwischen drei bis zehn Wochen sind betroffen (Martinson et al., 2019). Der Erreger ist ein Kommensale der Mukosa der oberen Atemwege und der Tonsillen. Kommt es zu einer systemischen Infektion mit *M. hyorhinis* durch Eindringen in die Blutbahn, befällt das Bakterium die Serosa der großen Körperhöhlen sowie die Synovialis (Luehrs et al., 2017). So entwickelt sich eine mild verlaufende Serositis und Synovitis, die Mykoplasmen-Polyserositis. In einzelnen Fällen kann der Erreger bei gnotobiotischen Ferkeln eine Pneumonie auslösen. Die Symptome der Peritonitis und Pleuritis vergehen etwa nach zwei Wochen, wobei die

Anzeichen der Arthritis zwei Monate und länger durch Lahmheit und mangelhafte Gewichtsentwicklung bestehen bleiben (Maes et al., 2008). Die Polyserositis kann antibiotisch behandelt werden und eine Impfung befindet sich in der Entwicklung (Martinson et al., 2018).

#### 1.4.5 *Chlamydia pneumoniae*

Chlamydien unterscheiden sich von allen anderen Bakterien durch ihren obligaten Zellparasitismus. Sie sind nicht in der Lage, eigenes Adenosintriphosphat zu bilden und damit abhängig von der Energiezufuhr durch die Wirtszelle (Kramer et al., 2015). *Chlamydia (C.) pneumoniae*, die nur für den Menschen pathogen sind, werden als sogenannte Elementarkörperchen durch Tröpfcheninfektion übertragen. Diese heften sich an die Wirtszelle und werden von dieser phagozytiert und vermehren sich als Initialkörperchen durch Teilung in intrazellulären Vakuolen. Zwei bis drei Tage nach der Infektion der Wirtszelle geht diese zugrunde und setzt infektiöse Chlamydien als Elementarkörperchen frei (Wang et al., 2015).

Der kulturelle Nachweis ist äußerst schwierig und gelingt selten. Daher sind molekulargenetische Nachweisverfahren zuverlässiger (Kumar et al., 2016). Nach dem Kontakt zu *C. pneumoniae* und einer Inkubationszeit von ein bis vier Wochen kommt es zu meist mild verlaufenden Infektionen der Atemwege, wie z.B. influenzaähnlichen Symptomen, Sinusitiden, Bronchitiden oder atypischer Pneumonie (Choroszy-Krol et al., 2014). Die Infektion kann durch die Gabe von Makroliden oder Tetrazyklinen gut behandelt werden (Mandell et al., 2007).

Tab. 1.1: Tabellarische Zusammenfassung der in dieser Arbeit untersuchten viralen Pathogene

Viren	Krankheitsbilder	Übertragungswege
<b>DNA-Viren</b>		
Adenoviren	Pharyngitis, Pneumonie, folliculäre Konjunktivitis, intestinale Infektionen	Tröpfchen- und Schmierinfektion
Porzines Cytomegalovirus	Einschlusskörperchen-Rhinitis	aerogen, intrauterin
Humanes Bocavirus	Infektionen der oberen und unteren Atemwege, bei Kindern Gastroenteritis	aerogen, fäkal-oral
Porzines Circovirus Typ 2	<i>post-weaning multisystemic wasting syndrome</i>	fäkal-oral, genital
<b>RNA-Viren</b>		
Influenzaviren Typen A-C	Grippe, letale Verläufe	aerogen, Schmierinfektion
Parainfluenzaviren Typen 1-4	Katarrh, Bronchitis, Pseudokrapp, schwere Verläufe bei Immunsupprimierten	aerogen
Respiratorische Synzytial-Viren, Typen A und B	schwere Atemwegserkrankungen insbesondere im Kleinkindalter	aerogen, Schmierinfektion
Humanes Metapneumovirus	Kleinkinder: schwere, tiefe Atemwegsinfektion; bei Immunsupprimierten schwere, letale Verläufe	aerogen
Enteroviren	banaler Schnupfen, fieberhafte Pharyngitis, milde Gastroenteritis, Hand-Fuß-Mund-Krankheit, aseptische Meningitis, Myokarditis	aerogen, fäkal-oral
Humane Rhinoviren	Banaler Schnupfen, schwere Verläufe bei Immunsupprimierten möglich	Schmierinfektion, selten aerogen
Parechoviren	Diarrhoe, Erkältungskrankheiten, selten ZNS-Manifestationen, Sepsis bei Neugeborenen	aerogen, fäkal-oral
Humane Coronaviren 229E, 63, OC43, HKU1	Erkrankungen der oberen und unteren Atemwege	aerogen
Porzine respiratorische Coronaviren	grippeartige Symptome, Aborte, Tot- oder Frühgeburt	aerogen, fäkal-oral, diaplazentar, perinatal

Tab. 1.2: Tabellarische Zusammenfassung der in dieser Arbeit untersuchten bakteriellen Pathogene

Bakterien	Krankheitsbilder	Übertragungswege
<i>Staphylococcus aureus</i>	invasive Infektionen wie Wundinfektion (lokal begrenzt, mit Eiterbildung), Otitis media, Pneumonie, Endokarditis; Toxikosen wie Lebensmittelintoxikation; Mischformen wie Dermatitis exfoliativa und <i>toxic shock syndrome</i>	direkter Kontakt, aerogen, indirekt durch Staub, Schmierinfektion
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Lobärpneumnie, Otitis media, Sinusitis	meist endogen
<i>Haemophilus influenzae</i> Typ B und andere	akute Epiglottitis, Meningitis, Sinusitis, Otitis media, bei Zustand nach Splenektomie fulminante Sepsis möglich	aerogen
<i>Haemophilus parasuis</i>	Polyserositis, Glässer'sche-Krankheit	aerogen
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	schwere Erkältungskrankheit mit Husten, atypische Pneumonie, selten Meningitis, Otitis media	aerogen, selten Schmierinfektion
<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	enzootische Pneumonie	aerogen
<i>Mycoplasma hyorhinis</i>	Mykoplasmen-Polyserositis	aerogen
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	Influenza-ähnliche Infektion, Sinusitis, Bronchitis, atypische Pneumonie	aerogen



## 1.5 Zielsetzung

Die vorgelegte Arbeit sollte das zoonotische Potential verschiedener respiratorischer Viren (Adenoviren, Porzines Cytomegalovirus, Humanes Bocavirus, Porzines Circovirus Typ 2, Influenzaviren der Typen A, B und C, Parainfluenzaviren der Typen 1, 2, 3 und 4, Respiratorische Synzytialviren, Humanes Metapneumovirus, Enteroviren, humane Rhinoviren, Parvoviren, Coronaviren der Typen 229E, 63, OC43 und HKU1, PRCV, Tab. 1.1) und Bakterien einordnen (*S. aureus*, *S. pneumoniae*, *H. influenza*, *H. parasuis*, *M. pneumoniae*, *M. hyopneumoniae*, *M. hyorhinis* und *C. pneumoniae*, Tab. 1.2).

Dafür sollte in Abstimmung mit dem Bauernverband Schleswig-Holstein e.V. eine Beobachtungsstudie geplant werden, in der wechselseitige Infektionen zwischen Schweinen und Menschen mit engem, beruflichem Kontakt zu diesen Tieren sowie deren Familienangehörige untersucht werden.

Bei dem Auftreten einer akuten respiratorischen Symptomatik bei einem Landwirt bzw. bei dessen Beschäftigten oder Familienangehörigen sollten Nasenabstriche entnommen werden. Parallel dazu sollten auch jeweils zehn Rüsseltupfer im entsprechenden Schweinebestand gewonnen werden. Die Tupfer sollten mit konventionellen und molekularbiologischen Methoden auf die Anwesenheit der oben genannten respiratorischen Viren und Bakterien untersucht werden. Für die Untersuchung der Tupfer auf Influenzavirus Typ C sollte eine Echtzeit-PCR etabliert werden.

## 2 Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Oligonukleotide

Der Nachweis eines Teils der Erreger erfolgte durch zwei Multiplex-PCRs, deren Protokolle uns von Herrn Dr. Hübert vom Landeslabor Schleswig-Holstein in Neumünster freundlicherweise zur Verfügung gestellt wurden. Die Sequenzen der Oligonukleotide sind daher vertraulich und können hier nicht veröffentlicht werden. Die damit nachweisbaren Pathogene waren: PRCV, PCMV, PRRSV, PCV-2, Influenzavirus A, *M. hyopneumoniae*, *M. hyorhinitis* und *H. parasuis*. In Tab. 2.1 sind die Sequenzen und Referenzen der Oligonukleotide zum Nachweis des humanen  $\beta$ -Aktins, des porcinen Cytochrom B und des Influenza-C-Virus sowie für die Klonierung aufgeführt. Die Oligonukleotide wurden nach vorliegenden Sequenzen durch die Firma Biomers (Ulm) hergestellt.

**Tab. 2.1: Oligonukleotide und Sonden zur Qualitätskontrolle und zum Nachweis des Influenza-C-Virus**

Oligonukleotid	Sequenz (5'-3')	Referenz
Humanes $\beta$ -Actin fow	CCA ACC GCG AGA AGA TGA CC	Takacova et al., 2009
Humanes $\beta$ -Actin rev	GAT CTT CAT GAG GTA GTC AGT	
Swine Cytochrom B fow	CAT TGG AGT AGT CCT ACT ATT TAC CG	Blusch et al., 2002
Swine Cytochrom B rev	GTA GGA TTA GTA TTA TAA ATA AGG CTC CT	
Influenzavirus C fow	GCR TGC TTT GGR CTT GCT TAT G	Matsuzaki et al., 2012
Influenzavirus C rev	ART TTC CTA TTT TCA TTC TGT TTC TCA AC	
Influenzavirus C Sonde	FAM-TTT GGT YTC TGC YAT GGT YAG CCA YCC TCT-BMN-Q535	
pJET fow	CGA CTC ACT ATA GGG AGA GCG GC	ThermoFisher-Scientific, Dreieich
pJET rev	AAG AAC ATC GAT TTT CCA TGG CAG	

#### 2.1.2 Isolierung und Amplifikation von Nukleinsäuren

**Tab. 2.2: Reagenzien und Testsysteme für Arbeiten mit Nukleinsäuren**

Produkt	Anwendung	Hersteller
AgPath-ID™ One-step reverse-transcriptase PCR Kit	Umschreibung von RNA in cDNA und DNA-Amplifikation	Applied Biosystems, Foster City (USA)
CloneJET PCR Cloning Kit	Klonierung von PCR-Produkten	ThermoFisher-Scientific
Dream Taq PCR Master Mix	DNA-Amplifikation	ThermoFisher-Scientific
FTD Respiratory pathogens 21 plus Kit	Nachweis Humanpathogene	Fast-track Diagnostics, Junglinster (Luxemburg)
GeneJET Plasmid MiniPrep Kit	Plasmid-Isolierung	ThermoFisher-Scientific
Maxima SYBR-Green qPCR Master Mix	DNA-Amplifikation	ThermoFisher-Scientific
Multiplex Mastermix	DNA-Amplifikation	Qiagen, Hilden

**Tab. 2.2: Reagenzien und Testsysteme für Arbeiten mit Nukleinsäuren: Fortsetzung**

Produkt	Anwendung	Hersteller
NucleoSpin Gel and PCR Clean up	Extraktion und Reinigung von PCR-Fragmenten	Macherey Nagel GmbH & Co KG, Düren
O'GeneRuler 100bp Plus DNA Ladder	Größenmarker Gelelektrophorese	ThermoFisher-Scientific
QIAGEN Viral RNA Mini Kit	DNA- und RNA-Isolierung	Qiagen
RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit	cDNA- Synthese	ThermoFisher-Scientific
TaqMan Universal Master Mix II	DNA-Amplifikation	Applied Biosystems

### 2.1.3 Chemikalien und Kulturmedien

**Tab. 2.3: Chemikalien**

Reagenz	Hersteller
Ameisensäure	Carl Roth GmbH und Co, Karlsruhe
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Ethanol, absolut	Merck KGaA, Darmstadt
Ethidiumbromid-Lösung	Carl Roth GmbH & Co
Glycerin 99,5%	Gerbu Biotechnik GmbH, Gaiberg
Isopropanol, absolut	Carl Roth GmbH & Co
Phosphate-buffered Saline (PBS-Puffer)	Biochrom GmbH, Berlin
Tupfer	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht

**Tab. 2.4: Nährmedien und Arbeiten mit prokaryonten Zellen**

Produkt	Hersteller
Agarosepulver	Invitrogen life technologies GmbH, Darmstadt
PBP2a Culture Colony Test	Alere, Sarborough, Maine (USA)
Blutagar	ThermoFisher-Scientific
Chromagar MRSA	Mast Diagnostica, Reinfeld
Matrix MALDI-ToF	Bruker, Bilerica (USA)
One Shot MAX Efficiency DH5 $\alpha$ -T1R Competent Cells	Invitrogen life technologies GmbH

### 2.1.4 Geräte und Software

Tab. 2.5: Geräte

Laborgerät	Name	Hersteller
ABI7500	Echtzeit-PCR System	ThermoFisher-Scientific
Brutschrank 37 °C		Memmert GmbH und Co KG, Schwabach
Gelelektrophorese Stromquelle	EPS Power Supplies	GE Healthcare, Solingen
Gelelektrophorese Kammer	Eigenbau	Universität Erlangen
Geldokumentation UV-System	UV-System	Intas, Göttingen
Intas GDS	Agarose Gel Dokumentation	Intas
Bakterien Charakterisierung	MALDI-ToF	Bruker
	Vitek 2	Biomerieux, Nürtingen
Mikrowelle	ME76V-BB/XEG	Samsung, Schwalbach/Taunus
NanoDrop 2000	DNA-Konzentration	ThermoFisher-Scientific
PCR-Block	Thermocycler T3000	Biometra, Göttingen
	Light Cycler II	Roche Diagnostik, Mannheim
	7500 Fast RT PCR	ThermoFisher-Scientific
Pipettierhilfe	Pipetboy acu 2	Integra Biosciences, Konstanz
Sicherheitswerkbank	HeraSafe KS	ThermoFisher-Scientific
Vortexer	Vortex genius	IKA, Staufen
Zentrifuge	Biofuge fresco 17	ThermoFisher-Scientific
	Heraeus Multifuge 4KR	ThermoFisher-Scientific

Tab. 2.6: Software

Software	Anwendung	Hersteller
Intas GDS	Agarosegel Dokumentation	Intas
Light Cycler Software 3.5.3	Echtzeit PCR	Roche Diagnostik
MEGA 6.0	DNA-Annotation, Phylogenetik	The Biodesign Institute, Tempe (USA)
NanoDrop 2000	DNA-Konzentration	ThermoFisher-Scientific
7500 Software	Echtzeit PCR	Applied Biosystems

## 2.2 Materialgewinnung

Die Beobachtungsstudie wurde in Abstimmung mit dem Bauernverband Schleswig-Holstein geplant und durch die Ethikkommission der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel genehmigt (AZ A156/12). Die Landwirte in Schleswig-Holstein wurden durch eine Veröffentlichung im Bauernblatt (Ass. jur. Ulrich Goullon. 2012), sowie durch direkte Vermittlung des Bauernverbandes über die Studie informiert. Interessierte Landwirte wurden auf dem Postweg mit einem Aufklärungsbogen, einer Anleitung, einem Fragebogen (siehe Anhang) und mit Abstrichtupfern versorgt. Drei Abstrichtupfer waren für Nasenabstriche und zehn Tupfer für die Rüssel-Abstriche vorgesehen. Sobald entsprechende Symptome beim Landwirt, bei

dessen Mitarbeitern oder Angehörigen bestanden, sollten die Proben entnommen und zusammen mit dem unterschriebenen Aufklärungs- und Fragebogen an das Institut für Infektionsmedizin geschickt werden. Der Probeneingang wurde dort dokumentiert und die Tupfer wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 2.3 Probenaufarbeitung

Die tiefgefrorenen Abstrichtupfer wurden unter einer Sicherheitswerkbank auf Raumtemperatur gebracht. Menschliche Proben wurden getrennt von den Rüsseltupfern bearbeitet. Aus den Tupfern wurde das genetische Material extrahiert und diente als Ausgangsmaterial für die Amplifikation erregerspezifischer Nukleinsäuren mit PCR.

#### 2.3.1 Nasenabstriche

Zu dem Abstrichtupfer wurden  $300\ \mu\text{l}$  steriles PBS pipettiert. Anschließend wurde der Tupfer für  $30\ \text{s}$  in dieser Lösung geknetet und diese Flüssigkeit dann in ein steriles Gefäß überführt. Je  $140\ \mu\text{l}$  der Tupfer-Proben wurden für die RNA-/DNA-Extraktion eingesetzt und der Rest wurde bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

#### 2.3.2 Rüsseltupfer

Bei den Schweineproben wurden jeweils zehn Tupfer eines Hofes und eines Einsendetages gepoolt. Dazu wurden  $1000\ \mu\text{l}$  steriles PBS dem ersten Tupfer hinzugegeben. Der Tupfer wurde wie oben beschrieben in der Lösung geknetet. Danach wurde die Lösung in den nächsten Tupfer überführt, bis alle Proben abgearbeitet waren. Je  $140\ \mu\text{l}$  der Tupfer-Proben wurden für die RNA-/DNA-Extraktion eingesetzt und der Rest wurde bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

#### 2.3.3 Nukleinsäureextraktion

Die RNA-/DNA-Extraktion erfolgte mit dem QIAGEN® Viral RNA Mini Kit nach dem Protokoll des Herstellers. Zu den  $560\ \mu\text{l}$  Puffer AVL wurden  $5,6\ \mu\text{l}$  RNA carrier AVE und  $4\ \mu\text{l}$  interne Kontrolle aus dem später zu verwendeten FTD-Kit in ein  $1,5\ \text{ml}$  Mikrozentrifugen-Röhrchen pipettiert. Zu diesem Gemisch wurden dann  $140\ \mu\text{l}$  der vorher gewonnenen Tupfer-PBS-Portionen hinzugefügt. Dann wurde alles für ca.  $15\ \text{s}$  durch heftiges Schütteln (Vortex) vermischt, kurz abzentrifugiert und dann für  $10\ \text{min}$  bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden  $560\ \mu\text{l}$  Ethanol hinzupipettiert, gründlich vermischt und der Ansatz erneut abzentrifugiert. Von dieser Lösung wurden jetzt  $630\ \mu\text{l}$  auf die QIAamp Mini Säule gegeben und diese wurde bei  $6.200 \times g$  für  $1\ \text{min}$  zentrifugiert. Die QIAamp Mini Säule wurde auf ein sauberes  $2\text{-ml}$ -Sammelröhrchen gesetzt und das andere Sammelröhrchen mit dem Durchfluss verworfen.

Der vorherige Schritt wurde so lange wiederholt, bis das Material der kompletten Probe auf der Säule geladen war. Im Anschluss wurde die Säule mit 500 µl AW1-Puffer gewaschen und bei 6.200 x g für 1 min zentrifugiert. Das Sammelröhrchen mit dem Durchfluss wurde wieder verworfen und die mit 500 µl AW2-Puffer beladene Säule wurde auf ein neues Röhrchen gesetzt und bei 16.000 x g für 3 min zentrifugiert. Die Mini-Säule wurde nun ein letztes Mal auf ein neues Sammelröhrchen gesetzt und für 10 min bei nochmals 16.000 x g zentrifugiert, um die überschüssigen Ethanol-Reste zu entfernen. Als letzter Schritt wurde die Mini-Säule auf ein vorbereitetes und beschriftetes 1,5 ml Reaktions-Gefäß gesetzt und 100 µl AVE-Puffer hinzupipettiert, für 1 min bei Raumtemperatur inkubiert und schließlich für 1 min bei 6.200 x g zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde die Säule verworfen. In dem Mikrozentrifugen-Röhrchen war dann das RNA-/DNA-Eluat enthalten, das bei -80 °C eingefroren wurde. Dieses Eluat war das Ausgangsmaterial für weitere Arbeitsschritte.

#### 2.3.4 Synthese der komplementären DNA

Die Synthese der *complementary*-DNA (cDNA) wurde mit Hilfe des RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kits (ThermoFisher-Scientific) aus extrahierter Nukleinsäure nach den Herstellervorgaben durchgeführt. Die gewonnene cDNA wurde für die qualitativen Multiplex-PCRs sowie für den Nachweis von Influenza-C-Virus-Genomäquivalenten verwendet. Die Reagenzien des Kits wurden während der kompletten Bearbeitungszeit auf Eis gelagert. Aus dem Nukleinsäureextrakt wurden 11 µl mit 1 µl random-hexamer-Primer in ein steriles, nukleasefreies Gefäß gegeben. Das Gemisch wurde für 5 min bei 65 °C inkubiert, dann auf Eis schnell heruntergekühlt. Im nächsten Schritt wurden 4 µl 5 x Reaction Buffer, 1 µl RiboLock RNase-Inhibitor (20 U/µl), 2 µl 10 mM Desoxyribonukleotid-Mix und 1 µl RevertAid M-MuLV Reverse Transkriptase (200 U/µl) hinzupipettiert. Der gesamte Ansatz wurde nun vorsichtig gemischt, kurz abzentrifugiert und für 5 min bei 25 °C inkubiert, gefolgt von einer Inkubation über 60 min bei 42 °C. Zum Stopp der Reaktion wurde das Gefäß für 5 min auf 70 °C erhitzt und danach sofort auf Eis wieder heruntergekühlt. Die so entstandene cDNA konnte direkt für eine PCR benutzt werden oder wurde bei -80 °C eingefroren.

#### 2.4 Echtzeit-Polymerasekettenreaktion

Bei der Echtzeit-PCR kann man während des Ablaufs der PCR deren Fortschritt überwachen, da während des gesamten Prozesses die quantitative Vervielfältigung der Nukleinsäuren erfasst wird. Im Reaktionsansatz befindet sich neben den Oligonukleotiden auch ein Fluoreszenzfarbstoff. Hierbei kann es sich unter anderem um einen interkalierenden Farbstoff (z.B.

SYBR-Green) oder um eine Sonde (z.B. TaqMan-Sonde) handeln (Nygard et al., 2007). Beide Systeme wurden im Rahmen dieser Arbeit verwendet.

Im Verlauf der positiven Reaktion kommt es zu einem kontinuierlichen Anstieg der Fluoreszenzintensität, die proportional zur Menge des vorhandenen PCR-Produktes ist (Karsai et al., 2002). Die exponentielle Phase der Amplifikation wird für die Auswertung genutzt. Das erste detektierbare Signal in einem Zyklus, bei dem sich das Fluoreszenzsignal deutlich von der Hintergrundfluoreszenz abhebt, bezeichnet man als Schwellenwertzyklus. Der  $C_p$ -Wert (*Crossing point*, Kreuzungspunkt) beschreibt den Anfang der exponentiellen Phase (Mülhardt, 2013). Analysiert man parallel zur Probe einen Standard bekannter Konzentration, ist eine quantitative Aussage möglich.

Der verwendete Farbstoff SYBR-Green I ist in dem gebrauchsfertigen Mastermix (Maxima SYBR-Green qPCR Master Mix; ThermoFisher-Scientific) zusammen mit der Taq-DNA-Polymerase enthalten. Der Farbstoff interkaliert nur mit doppelsträngiger DNA und liefert einen unspezifischen Nachweis für die Anwesenheit von doppelsträngiger DNA. Mittels einer Schmelzkurvenanalyse nach Beendigung der PCR muss daher die Spezifität der erzeugten Amplifikate geprüft werden. Bei steigender Temperatur von 50 °C auf 90 °C wird kontinuierlich das Fluoreszenzsignal registriert. Wenn die Temperatur den Schmelzpunkt des Amplifikats überschreitet, trennt sich der Doppelstrang auf und die DNA liegt einzelsträngig vor. Der Farbstoff SYBR-Green I kann in einzelsträngige DNA nicht interkalieren und die Intensität des Fluoreszenzsignals fällt entsprechend ab.

#### 2.4.1 TaqMan-Sonden

Eine Schmelzkurvenanalyse ist bei dem TaqMan-Verfahren nicht notwendig, da die Sonde für die nachgewiesene DNA spezifisch ist. Die Sonde enthält an einem Ende einen Donator (*Reporter*), der durch eine Lichtquelle zur Fluoreszenz angeregt werden kann. Diese Fluoreszenz wird zunächst durch den Akzeptor (*Quencher*), der ebenfalls Teil der Sonde ist, unterdrückt. Wird die Sonde durch die Taq-Polymerase bei der Vermehrung der DNA abgebaut, werden *Quencher* und *Reporter* freigesetzt und das Fluoreszenzsignal wird nicht mehr unterdrückt und kann detektiert werden (Marras et al., 2002).

#### 2.4.2 Nachweis zellulärer genomischer DNA

Die SYBR-Green-PCR wurde zum Nachweis der DNA des humanen  $\beta$ -Aktins bzw. des porzinen Cytochroms B verwendet. Somit diente dies als Qualitätskontrolle zur Überprüfung der

Abstrichentnahme und der Nukleinsäureextraktion. Tab. 2.7 zeigt den Reaktionsansatz und die Reaktionsbedingungen. Die Analyse fand im Echtzeit-Gerät LightCycler II statt.

**Tab. 2.7: Ansatz und Reaktionsbedingungen** (Maxima Hot Start Taq-Polymerase)

Ansatz	Reaktionsbedingungen	
12,5 µl Maxima SYBR-Green Master Mix	95 °C	10 min
0,5 µl <i>Forward</i> -Oligonukleotid (10 pmol/µl)	95 °C	15 s
0,5 µl <i>Reverse</i> -Oligonukleotid (10 pmol/µl)	60 °C	30 s
ad 23 µl nukleasefreies Wasser	60 °C	60 s x40
2 µl DNA	50-90 °C	10 min

#### 2.4.3 Nachweis der RNA des Influenza-C-Virus

Für den Nachweis der RNA des Influenza-C-Virus wurde im Rahmen der vorgelegten Arbeit eine sondenbasierte Echtzeit-PCR (AmpliTaq Gold® DNA Polymerase) in Anlehnung an Literaturvorgaben etabliert (Matsuzaki et al., 2012). Die Reaktionen fanden im Echtzeit-PCR-Gerät ABI 7500 statt. Die Reaktionsbedingungen und das Ansatzschema werden in Tab. 2.8 gezeigt. Als Positivkontrolle diente ein selbst etablierter Standard (Abschnitt 3.3.1).

**Tab. 2.8: Ansatz und Reaktionsbedingungen für den RNA-Nachweis des Influenza-C-Virus**

Ansatz	Reaktionsbedingungen	
10 µl TaqMan® Universal Master Mix II	50 °C	2 min
2 µl Oligonukleotid fow (10 pmol)	95 °C	10 min
2 µl Oligonukleotid rev (10 pmol)	95 °C	15 s
2 µl Sonde (5 pmol)	60 °C	1 min x 45
2 µl nukleasefreies Wasser	50 - 90 °C	10 min
2 µl cDNA		

#### 2.4.4 Kommerzielle Multiplex-Polymerase-Kettenreaktion

Mit dem FTD *Respiratory pathogens 21 plus* Kit (<http://www.fast-trackdiagnostics.com/human-line/products/ftlyo-respiratory-pathogens-21-plus/>) wurden insgesamt 23 verschiedene Viren und Bakterien mit einer Echtzeit-Multiplex-PCR (AmpliTaq Gold® DNA Polymerase) nachgewiesen. Im Einzelnen handelte es sich um Influenzaviren Typen A und B, Parainfluenzaviren Typen 1-4, Rhinoviren, Coronavirus Typen 229E, 63, OC43 und HKU1, RSV A und B, Humanes Metapneumovirus, Adenoviren, Humanes Bocavirus, Enteroviren, Parechoviren, *M. pneumoniae*, *C. pneumoniae*, *H. influenzae B*, *S. aureus* und *S. pneumoniae*.



Als Ausgangsmaterial wurde der Nukleinsäureextrakt verwendet, da im Reaktionsansatz des Herstellers eine reverse Transkriptase integriert ist (sogenanntes one-step Verfahren). Das PCR-Protokoll wurde nach Herstelleranweisung auf einem ABI 7500 Cyler durchgeführt. Die Analyse erfolgte in einer 96-Vertiefungsplatte. In jeder Vertiefung können vier unterschiedliche Wellenlängen (grün 520 nm, gelb 550 nm, orange 610 nm, rot 670 nm) detektiert werden, die jeweils einem Erreger bzw. der internen Kontrolle zugeordnet werden können. Zum Nachweis des o.g. Erregerspektrums waren pro Probe sechs Vertiefungen notwendig. Tab. 2.9 zeigt den Reaktionsansatz und die Reaktionsbedingungen.

**Tab. 2.9: Ansatz und Reaktionsbedingungen des FTD Respiratory pathogens 21 plus Kits**

Ansatz	Reaktionsbedingungen	
1,5 µl Oligonukleotid und Probe Mix	50 °C	15 min
1 µl Enzym	95 °C	10 min
12,5 µl RT-Puffer	95 °C	8 s
10 µl Nukleinsäureextrakt	60 °C	34 s x 40
	50 - 90 °C	10 min

## 2.5 Qualitative Polymerase-Kettenreaktion

Bei der klassischen PCR ist ein qualitativer Nachweis von DNA möglich. Im Anschluss an die eigentliche PCR wird der Ansatz mit Hilfe der Agarosegel-Elektrophorese analysiert und anhand der Bandengröße ausgewertet. Dieses Verfahren wurde für die Multiplex-PCR des Landeslabors Schleswig-Holstein und im Rahmen der Qualitätskontrolle vor DNA-Sequenzierung eingesetzt.

### 2.5.1 Multiplex-Polymerase-Kettenreaktion

Bei der Multiplex-PCR handelt es sich um eine konventionelle PCR, die einen qualitativen DNA-Nachweis liefert. Mit dieser Variante ist eine simultane Amplifikation von verschiedenen DNA-Abschnitten in einem Reaktionsansatz möglich. Dies wird durch die Verwendung von mehr als einem Oligonukleotid-Paar ermöglicht. Die Reaktion fand im T3000 Thermocycler statt. Anschließend wurden die Reaktionsprodukte elektrophoretisch aufgetrennt und anhand der Bandengröße analysiert. Als Ausgangsmaterial diente die aus den Proben generierte cDNA (Abschnitt 2.3.4). Das Protokoll und die Oligonukleotidsequenzen wurden vom Landeslabor Schleswig-Holstein zur Verfügung gestellt.

In der **Triplex-PCR** (Hot Start Taq Polymerase) erfolgte der Nachweis von *M. hyopneumoniae*, *H. parasuis* und *M. hyorhinis*. Tab. 2.10 zeigt den Reaktionsansatz und die Reaktionsbedingungen.

**Tab. 2.10: Ansatz und Reaktionsbedingungen der Triplex-PCR**

Ansatz	Reaktionsbedingungen	
25 µl Multiplex-Mastermix	95 °C	15 min
0,15 µl Hyopneu fow	94 °C	30 s
0,15 µl Hyopneu rev	63 °C	30 s
0,15 µl Hyorhin fow	72 °C	1 min x 7
0,15 µl Hyorhin rev	94 °C	30 s
0,10 µl HPS fow	57 °C	30 s
0,10 µl HPS rev	72 °C	1 min x 30
22,2 µl nukleasefreies Wasser	72 °C	10 min
2 µl cDNA		

In der **Heptaplex-PCR** (Hot Start Taq Polymerase) erfolgte der Nachweis von PCV-2, PCMV, Influenza-A-Virus, PRRSV (Genotypen aus Europa und USA abgedeckt) sowie PRCV. Zusätzlich wurde ein porcines Transkript als interne Extraktions- und Amplifikationskontrolle nachgewiesen. Tab. 2.11 zeigt Reaktionsansatz und Reaktionsbedingungen.

**Tab. 2.11: Ansatz und Reaktionsbedingungen der Heptaplex-PCR**

Ansatz	Reaktionsbedingungen	
25 µl Multiplex-Mastermix	95 °C	15 min
0,15 µl PCV-2 fow	94 °C	30 s
0,15 µl PCV-2 rev	63 °C	30 s
0,20 µl PCMV fow	72 °C	1 min x 7
0,20 µl PCMV rev	94 °C	30 s
0,20 µl Flu fow	57 °C	30 s
0,20 µl Flu rev	72 °C	1 min x 30
0,15 µl PRRS- EU fow	72 °C	10 min
0,15 µl PRRS- US fow		
0,20 µl PRRS EU/US rev		
0,15 µl PRCV fow		
0,15 µl PRCV rev		
0,05 µl ppk98 fow		
0,05 µl ppk98 rev		
20,6 µl nukleasefreies Wasser		
2 µl cDNA		

### 2.5.2 Kolonie-Polymerase-Kettenreaktion

Als Ausgangsmaterial wurden gereinigte pJET-Klone bzw. frische Bakterienkolonien verwendet (Abschnitt 2.6.1 und 2.6.2). Zur Amplifikation wurden die Plasmid-spezifischen Oligonukleotide des Herstellers verwendet. Das Amplifikat wurde in einem weiteren Schritt für die DNA-Sequenzierung eingesetzt. Tab. 2.12 zeigt Reaktionsansatz und Reaktionsbedingungen.

**Tab. 2.12: Ansatz und Reaktionsbedingungen mittels DreamTaq-Polymerase.** Als Ausgangsmaterial wurde 1 µl gereinigte DNA oder eine Bakterienkolonie verwendet.

Ansatz	Reaktionsbedingungen	
25 µl DreamTaq PCR Master Mix	95 °C	3 min
1 µl pJET-fow Oligonukleotid (20 pmol/µl)	95 °C	30 s
1 µl pJET-fow Oligonukleotid (20 pmol/µl)	55 °C	30 s
Ad 49 µl/50 µl nukleasefreies Wasser	72 °C	1 min x 40
1 µl DNA (100–200 ng) /Bakterienkolonie	72 °C	10 min

Nach der Amplifikation wurden je 10 µl des PCR-Produkts über ein 2 % Agarose-Gel, versetzt mit 1 µg/ml Ethidiumbromid, in 1x TRIS-Borat-Ethylendiamin-Tetraessigsäure-Puffer elektrophoretisch aufgetrennt, unter UV-Licht ausgewertet und photographisch dokumentiert (analytisches Gel). Das entstandene Bandenmuster wurde mit den Größenangaben des Landeslabors verglichen.

Wenn eine Bande nicht eindeutig zu identifizieren war, so wurden die verbliebenen 40 µl des PCR-Amplifikats elektrophoretisch aufgetrennt (präparatives Gel). Die entsprechende Bande wurde anschließend unter UV-Licht ausgeschnitten, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und gewogen. Die Durchführung der DNA-Extraktion erfolgte mit Hilfe eines kommerziellen Extraktionskits nach Herstellerangaben (NucleoSpin® Gel and PCR Clean up, Macherey Nagel). Die Konzentration und Reinheit des Eluats wurden durch UV-Spektrophotometrie (NanoDrop 2000) bestimmt.

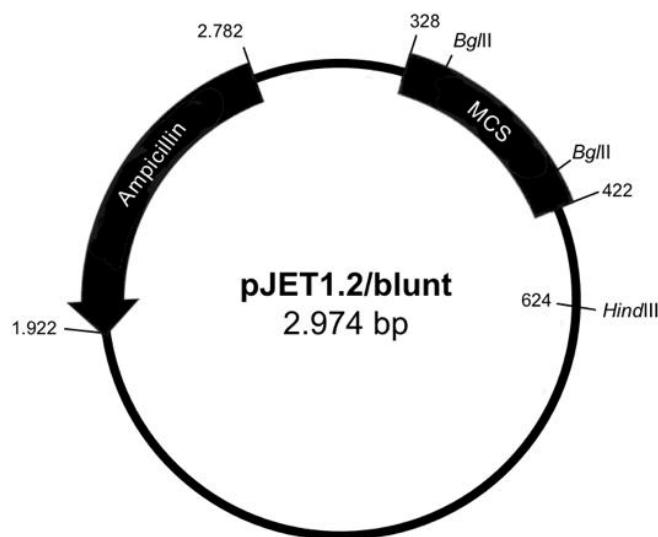
## 2.6 Gentechnische Methoden

### 2.6.1 Klonierung von Amplifikaten

Für die Herstellung von Standards war die Klonierung von PCR-Produkten erforderlich. Dafür wurde auf den kommerziellen pJET1.2/blunt-Cloning-Vektor zurückgegriffen. Dieser Vektor ist Bestandteil des CloneJet PCR Cloning Kits. Die Ligation wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Da nicht absolut sicher ist, ob die eingesetzten Amplifikate mit

TA-Überhang stumpf oder glatt geschnitten waren, wurde generell das sogenannte *blunting*-Protokoll verwendet. Zum Verknüpfen der Enden ist das Enzym T4-Ligase notwendig.

Der pJET1.2/blunt-Cloning Vector umfasst 2.974 bp und enthält unter anderem eine multiple Klonierungsstelle (MCS = *multiple cloning site*), in welche das PCR-Produkt eingebracht wird (Abb. 2.1). Der Vektor verfügt über eine Resistenzkassette für Ampicillin, die es dem *E. coli* mit dem eingebrachten Plasmid ermöglicht, auf einem Nährmedium mit zugesetztem Ampicillin anzuwachsen.



**Abb. 2.1:** Vektorkarte des pJET1.2/blunt-Cloning Vektor. Dargestellt ist die Lage der MCS, welche die Insertionsstelle für glatt geschnittene DNA-Amplifikate enthält, die Lage des Ampicillin-Gens sowie die Enzymschnittstellen (verändert in Anlehnung an den Hersteller ThermoFisher).

### 2.6.2 Transformation kompetenter Bakterien

Aus dem Ligationsansatz wurden nun 5 µl zu den chemisch kompetenten *E. coli*-Bakterien gegeben (One Shot MAX Efficiency DH5α-T1R Competent Cells, Invitrogen life Technologies) und der Ansatz wurde auf Eis heruntergekühlt. Nach 30 s im 42 °C warmen Wasserbad wurde der Ansatz erneut auf Eis gekühlt. Anschließend wurden 200 µl SOC-Medium hinzugefügt und nach einer einstündigen Inkubation bei 37 °C wurden die transformierten Zellen ausplattiert. Da diese Bakterien keine Resistenz gegenüber Ampicillin aufweisen, können nur Bakterien mit aufgenommenem Plasmid auf dem Nährboden mit 100 µg/ml Ampicillin-Zusatz wachsen. Alle gentechnischen Arbeiten fanden im S2-Bereich des Instituts für Infektionsmedizin statt. Die transformierten Bakterien wurden nicht gelagert, sondern nach Extraktion des Plasmids bzw. nach der Kolonie-PCR (DreamTaq) umgehend durch Autoklavieren vernichtet.

## 2.7 Sanger-Sequenzierung

Der Ansatz für die Sanger-Sequenzierung wurde mit dem BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) nach Anleitung des Herstellers angefertigt. In diesem Kit sind fluoreszenzmarkierte Nukleotide und die Polymerase enthalten. Die optimale Menge der zu sequenzierenden DNA liegt zwischen 20 und 60 ng. Als Ausgangsmaterial wurde die gereinigte DNA nach DreamTaq-Amplifikation (Abschnitt 2.5.2) verwendet und die PCR erfolgte im T3000-Thermocycler nach folgendem Protokoll (Tab. 2.12).

**Tab. 2.12:** Reaktionsansatz und Bedingungen für die Sanger-Sequenzierung

Ansatz	Reaktionsbedingungen	
10 µl BigDye Ready Reaction Mix	96 °C	1 min
0,5 µl 5x Sequencing Buffer	96 °C	10 s
1 µl Oligonukleotid (5 pmol/µL)	52 °C	5 s
1 µl DNA (20–60 ng)	60 °C	4 min x 25
ad 10 µl nukleasefreies Wasser	96 °C	1 min

Die Sequenzanalyse wurde mit Hilfe eines Kapillar-Sequenzierautomaten (DNA-Analyzer 3700, Applied Biosystems) im Institut für Klinische Molekularbiologie im Zentrum für Molekulare Biowissenschaften auf dem Campus der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel durchgeführt. Das durch die Sequenzierung erhaltene Elektropherogramm wurde mit der MEGA-Software 6.0 (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*, The Biodesign Institute) analysiert. Mit dem Online-Programm *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) erfolgte eine Suche in den Sequenz-Datenbanken des *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) nach Übereinstimmungen zu bereits bekannten Sequenzen.

## 2.8 Bakterienkulturen

Circa 20 µl der bei -80 °C gelagerten Tupfer-PBS-Portionen (Abschnitte 2.3.1 und 2.3.2) wurden auf eine Blutagar-Platte (ThermoFisher-Scientific) im Dreiösenaustrich aufgetragen. Anschließend wurden die beimpften Platten für ca. 24 h bei 37 °C bebrütet. Danach wurden die Platten visuell auf Bakterienwachstum geprüft. Die Bakterienkolonien wurden anhand festgelegter morphologischer Kriterien differenziert und ggf. durch Überimpfung auf neue Platten vereinzelte.

### 2.8.1 Identifizierung der Bakterienspezies

Die nun in Reinkultur vorliegenden Bakterien konnten durch Massenspektrometrie differenziert werden. Dafür wurden Einzelkolonien eines Bakteriums mit einer sterilen Pipettenspitze

auf den Probenträger, das sogenannte *Target*, übertragen. Die Position wurde auf der dafür vorgesehenen Schema-Zeichnung des *Targets* mit der Herkunft des Bakteriums notiert. Die Differenzierung erfolgte grundsätzlich im Doppelansatz. Auf die einzelnen Felder des *Targets* wurden 1 µl Ameisensäure dazupipettiert und nach Trocknung noch 1 µl Matrix-Lösung. Erneut wurde die Trocknung abgewartet und das so beimpfte *Target* in den MALDI Biolyser (Bruker) geladen. Das Gerät ermittelt mit Hilfe der *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight* (MALDI-TOF) -Technologie das Massenspektrum bakterieller ribosomaler Proteine und gleicht diese mit einer Datenbank ab.

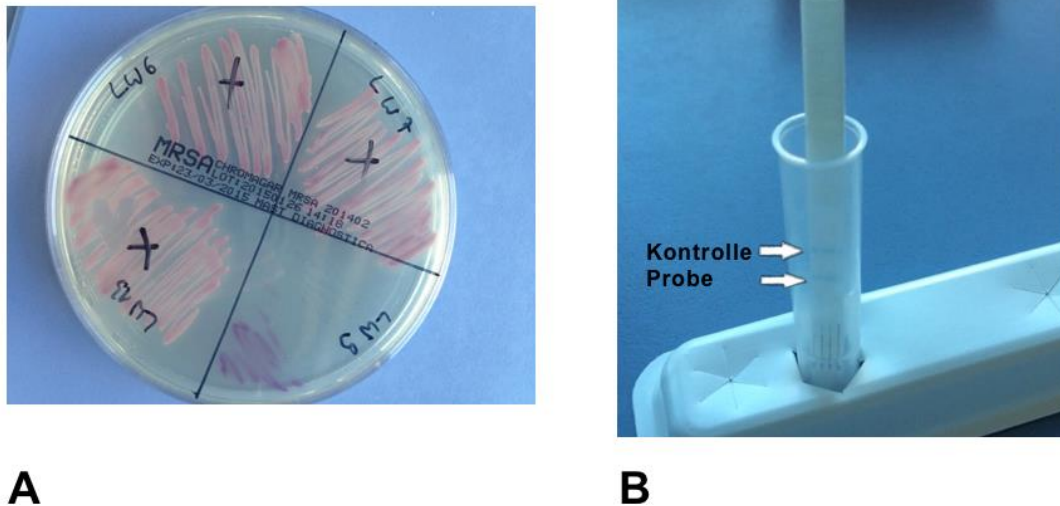
Falls Bakterien nicht eindeutig zu identifizieren waren, wurde eine biochemische Identifizierung mit Hilfe des Vitek-2-Systems angestrebt (Biomérieux Deutschland GmbH). Dazu wurde eine Bakteriensuspension des McFarland-Standards 0,5 in isotonischer Kochsalzlösung erstellt und die entsprechende Diagnostikkassette des Vitek-Gerätes (Biomérieux Deutschland GmbH) beimpft und in das Gerät geladen.

Kulturell konnten neben *S. aureus* vor allem Gram-negative Erreger wie *Proteus spp.*, *Klebsiella spp.*, *Acinetobacter spp.*, *E. coli* und *Pantoea spp.* nachgewiesen werden.

### 2.8.2 *Staphylococcus aureus*

*S. aureus*-positive Proben wurden zudem auf einen Farbindikator-Agar subkultiviert (MRSA Chromagar, MAST Diagnostica), der nach eintägiger Bebrütung bei 37 °C die Anwesenheit Methicillin-resistenter Stämme durch ein leuchtend pinkes Kolonie-Wachstum anzeigt (siehe Abb 2.2).

Das Vorhandensein des für MRSA typischen Penicillin-bindenden-Proteins 2a wurde immunchromatographisch durch ein kommerziell verfügbares Testkit geprüft (PBP2a Culture Colony, Alere; Abb. 2.2). Nach erfolgter Identifizierung bzw. Bearbeitung wurden die Bakterien-Stämme in eine Glycerin-Kulturbouillon überimpft. Diese Bakteriensuspension wurde gründlich gemischt, beschriftet und anschließend bei -20 °C eingefroren.



**Abb. 2.2: MRSA-Nachweis: A Anzucht von Bakterien auf Chromagarplatte, typisches Farbmuster bei Nachweis der Tupfer von Landwirt 6, 7 und 13. B Immunchromatographischer Nachweis des PBP2a.** Die Pfeile zeigen die Banden an, obere Bande entspricht der internen Test-Kontrolle, die untere Bande dem PBP2a-Nachweis.

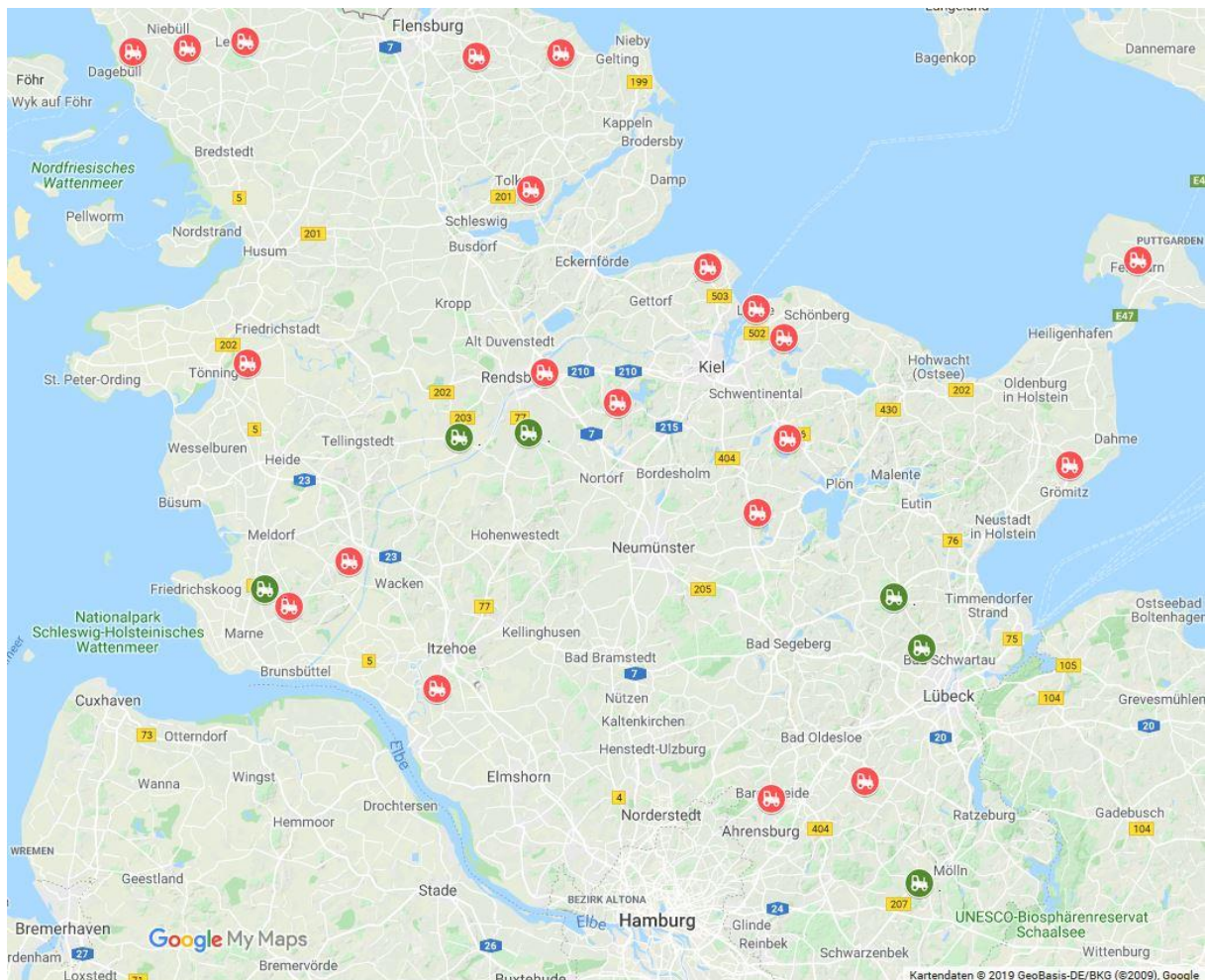
## 2.9 Abgrenzung verwandter Dissertationen

Andere Promotionsprojekte hatten im Rahmen derselben Beobachtungsstudie unterschiedliche Fragestellungen im Fokus. Die genauere Differenzierung der in der kommerziellen PCR nachgewiesenen Coronaviren war Gegenstand der weiterführenden Dissertation von Frau Kerstin Receveur, ebenso wie die Differenzierung der verschiedenen MRSA-Stämme in SCCmec Typen I-IV mit einer Duplex-PCR und eine detaillierte Untersuchung der kulturell nachgewiesenen Gram-negativen Bakterien inklusive deren Resistenzprofil. Eine phylogenetische Analyse der Enteroviren durch Sequenzierung des für VP1 kodierenden Bereichs war u.a. Teil der Dissertation von Jennifer Bunke.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Probengewinnung

Im Untersuchungszeitraum Dezember 2012 bis März 2014 wurden von 27 Schweinezucht- oder Schweinemast-Betrieben respiratorische Proben eingesandt. Darunter fanden sich sechs Mehrfacheinsendungen (63 menschliche Proben und 360 Schweineproben, zu je 36 Zehnerpools). Die Abb. 3.1 zeigt eine mit Google Maps erstellte Übersichtskarte Schleswig-Holsteins mit der Lage der einsendenden Betriebe.



**Abb. 3.1: Übersichtskarte der Einsender aus Schleswig-Holstein.** Die mit Hilfe von Google Maps erstellte Karte zeigt die Lage der landwirtschaftlichen Betriebe, die Proben einsandten. Die roten Symbole markieren Einsender, die einmalig Material einsandten, die grünen Standorte waren Mehrfacheinsender.

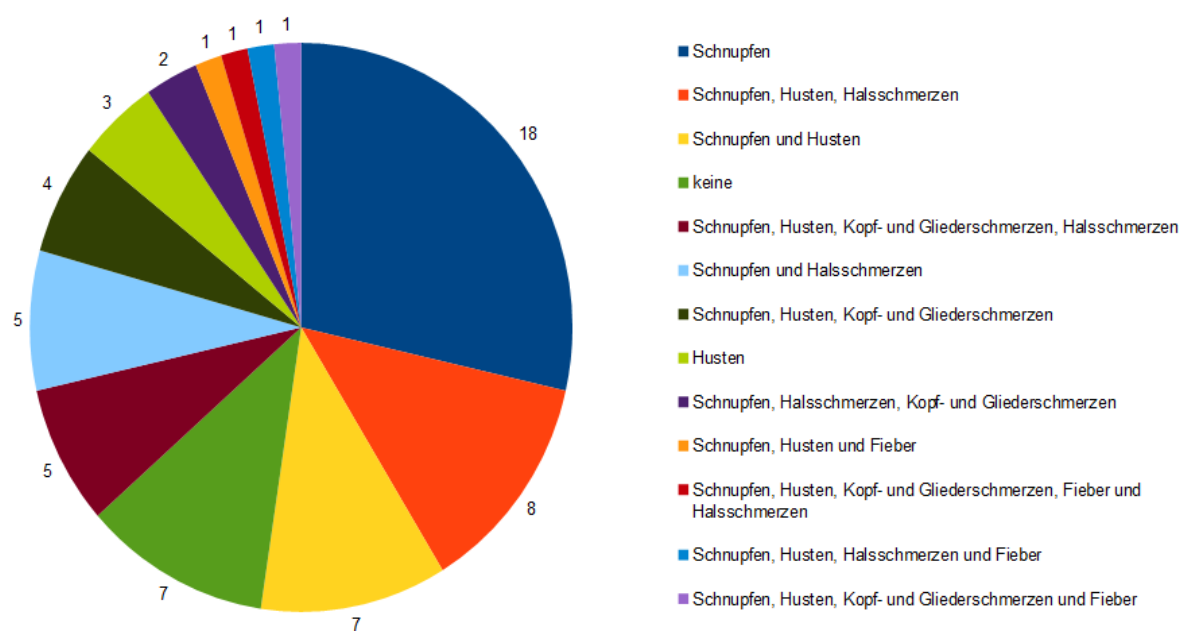
Die Proben wurden fortlaufend nummeriert, die Einsendedaten wurden gemeinsam mit der Probennummer und den im Fragebogen definierten Angaben (siehe Anhang) in einer Tabelle erfasst. Auf dem den Abstrichtupfern beiliegendem Einsendeschein konnten die Landwirte Angaben über die Art ihrer Erkältungs-Symptome machen (Tab. 3.1, Abb. 3.2). Von den einge-



sandten Schweineproben waren 42 Bestände (66,7 %) klinisch unauffällig, während bei 21 Schweinebeständen (33,3 %) Symptome angegeben wurden.

**Tab. 3.1: Angaben über die Symptom-Kombinationen der Landwirte**

Angegebene Symptomkombinationen	Anzahl
Schnupfen	18
Schnupfen, Husten, Halsschmerzen	8
Schnupfen und Husten	7
keine	7
Schnupfen, Husten, Kopf- und Gliederschmerzen, Halsschmerzen	5
Schnupfen und Halsschmerzen	5
Schnupfen, Husten, Kopf- und Gliederschmerzen	4
Husten	3
Schnupfen, Halsschmerzen, Kopf- und Gliederschmerzen	2
Schnupfen, Husten und Fieber	1
Schnupfen, Husten, Kopf- und Gliederschmerzen, Fieber und Halsschmerzen	1
Schnupfen, Husten, Halsschmerzen und Fieber	1
Schnupfen, Husten, Kopf- und Gliederschmerzen und Fieber	1

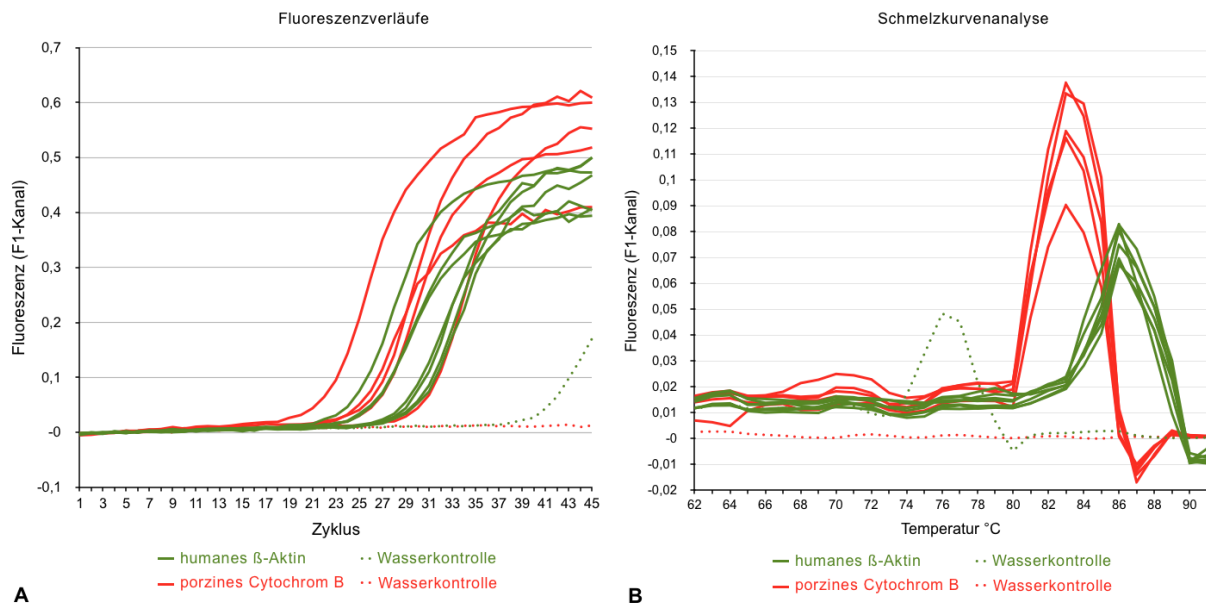


**Abb. 3.2. Graphische Verteilung der angegebenen Symptome bei den Landwirten.**

### 3.2 Qualitätskontrolle

Zur Überprüfung der Spezieszugehörigkeit der Abstriche wurden alle Nukleinsäureextrakte auf das Vorliegen humanen bzw. porcinen genetischen Materials untersucht. Durch Echtzeit-

PCR (Abschnitt 2.4.1) konnte in allen Abstrichen der Landwirte humanes  $\beta$ -Aktin und in den Schweineabstrichen porcines Cytochrom B nachgewiesen werden. Für die Etablierung der Methode wurden die Amplifikate zunächst im Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt, die DNA gereinigt und die Nukleotidsequenz durch Sanger-Sequenzierung bestimmt. Nachdem die Korrektheit des entstandenen Produkts auf diese Weise bestätigt wurde, erfolgte die Auswertung der in der Echtzeit-PCR bereits ermittelten Schmelzpunkte. In Abb. 3.3. wird exemplarisch der Fluoreszenzverlauf eines Experiments sowie die Schmelzkurve gezeigt.



**Abb. 3.3.** Qualitätskontrolle.

Nachweis von humanem Beta-Aktin in Nasenabstrichen und porcinem Cytochrom B in Rüsselabstrichen im Rahmen der Qualitätskontrolle mittels SYBR-Green-PCR. Beispielhafte Darstellung eines Experiments.

**A:** Fluoreszenzverläufe von sieben humanen Proben (LW 27, LW 31, LW 32, LW 33, LW 34, LW37, LW 38) und der Wasserkontrolle (gepunktete Linie) sowie fünf Schweineproben (SB 27, SB 31, SB 32, SB 37, SB 38) und der Wasserkontrolle (gepunktete Linie). **B:** Fluoreszenzverlauf der Schmelzkurven. Das Maximum findet sich bei den humanen Proben bei ca 86 °C, der Rüsseltupfer bei ca 83 °C. Die Wasserkontrolle der PCR für den Nachweis von humanem  $\beta$ -Aktin hat ein Schmelzkurvenmaximum bei ca. 76 °C. Für die Schmelzkurve der PCR zum Nachweis von porcinem Cytochrom B ist kein Maximum erkennbar.

Die Mittelwerte der Schmelzpunkte finden sich in Tab. 3.2, die Einzelmesswerte sind im Anhang aufgeführt (Tab. 7.1, 7.2). In allen eingesandten Abstrichen konnte der Nachweis genetischen Materials der erwarteten Spezies (Mensch oder Schwein) erbracht werden.

**Tab. 3.2: Crossing points (C<sub>P</sub>) und Schmelzpunkte der Echtzeit-PCR zum Nachweis humanen  $\beta$ -Aktins sowie porcinen Cytochroms B**

Probe	Zielsequenz	C <sub>P</sub> - Wert $\pm$ SD	Schmelzpunkt [°C] $\pm$ SD
Landwirte	Humanes $\beta$ -Aktin	29,59 $\pm$ 3,64	85,81 $\pm$ 0,33
Schweine	Porzines Cytochrom B	25,3 $\pm$ 3,72	82,41 $\pm$ 0,60

SD = *standard deviation*; Standardabweichung

### 3.3 RNA-Nachweis der Influenza-C-Viren

Für den RNA-Nachweis von Influenza-C-Viren musste zunächst eine spezifische PCR etabliert werden. Als Vorlage dienten das Protokoll und die Oligonukleotidsequenzen aus der Veröffentlichung von Matsuzaki et al., 2012. Als Positivkontrolle wurde RNA verwendet, die aus einer Influenza-C-Virus-positiven Zellkultur extrahiert wurde. Diese RNA wurde durch Prof. Roland Zell und Dr. Jeannette Lange aus dem Institut für Virologie und Antivirale Therapie des Universitätsklinikums Jena freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Im Rahmen der vorgelegten Arbeit wurde ein Referenzkonstrukt (cDNA Influenza-C-Virus in pJET 1.2) hergestellt und in *E. coli* transformiert. Aus den Bakterien wurde das Referenzkonstrukt mittels kommerziellem Extraktionssystem (GeneJET Plasmid Miniprep Kit, ThermoFisher) extrahiert, gereinigt und die DNA wurde photometrisch vermessen. Die Menge der DNA (ng) wurde mit folgender Formel in die Konzentration (Kopien/ $\mu$ l) umgerechnet.

$$\text{Kopien}/\mu\text{l} = \frac{6 \times 10^{23} \text{ Kopien/mol} \times \text{Konzentration [ng}/\mu\text{l}] \times 1 \times 10^{-9}}{\text{Länge der DNA [bp]} \times 660 \text{ g/mol}}$$

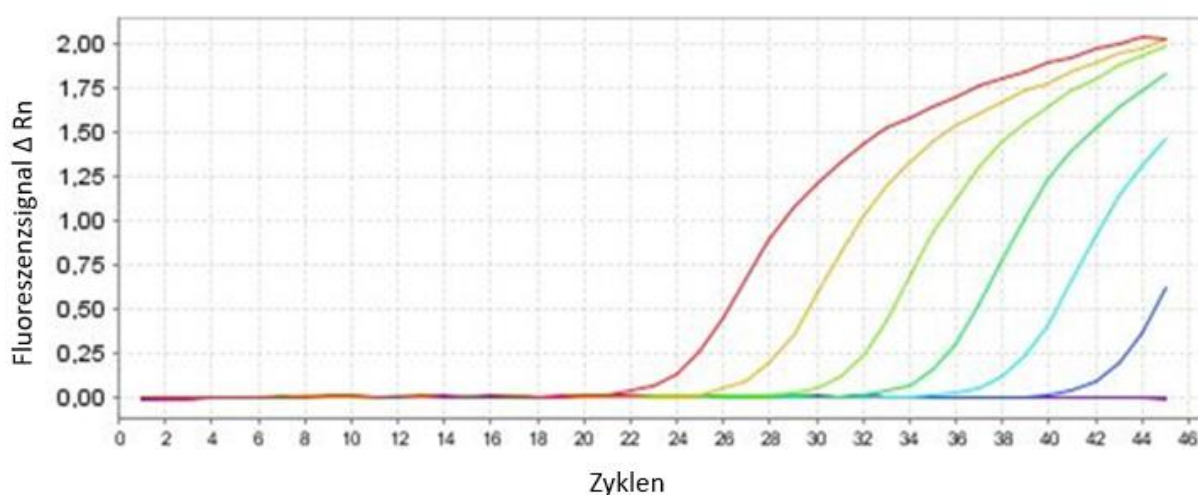
Anschließend wurden die Kontrolle auf  $10^{10}$  Kopien/ $\mu$ l eingestellt, seriell um den Faktor 10 verdünnt und die Konzentrationen  $10^7/\mu$ l bis  $10^2/\mu$ l wurden eingesetzt. Die durch Matsuzaki et al., 2012 angegebene Verhältnis von Oligonukleotid zu Sonde wurde überprüft und übernommen. Dieses betrug 10 pmol Oligonukleotid und 5 pmol Sonde.

Zur Ermittlung der Sensitivität und Überprüfung der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse wurde die Zielsequenz aus jeder Verdünnungsstufe sechsmal amplifiziert. Die ermittelten *Crossing Points* sind in Tab. 3.3 aufgeführt. In Abb. 3.4 wird exemplarisch der Fluoreszenzverlauf der Referenzkonstrukte dargestellt. Als positiv wurden C<sub>P</sub> gewertet, die kleiner als 40 waren, und die Nachweisgrenze lag somit bei ca  $10^3$  Kopien/ $\mu$ l.

**Tab. 3.3: Crossing Points der Referenzkonstrukte.** Die Referenzkonstrukte wurden um den Faktor 10 seriell verdünnt und aus jeder Verdünnungsstufe die Zielsequenz sechsmal analysiert. Je drei verschiedenen Ansätzen wurden an einem Tag analysiert (Intraassayreproduzierbarkeit, Lauf 1-3) sowie jeweils ein Ansatz an drei verschiedenen Tagen (Interassayreproduzierbarkeit, Lauf 4-6).

Kopien/ $\mu$ l	Ansatz					
	# 1	# 2	# 3	#4	#5	#6
$10^7$	22,7	22,73	22,75	23,47	22,84	22,7
$10^6$	26,68	26,81	26,77	26,94	26,03	26,68
$10^5$	30,38	30,56	30,43	30,68	29,75	30,38
$10^4$	33,68	33,44	33,7	34,31	32,9	33,68
$10^3$	38,2	39,26	38,23	37,71	36,99	38,2
$10^2$	> 40	> 40	> 40	> 40	40	> 40

\*



**Abb. 3.4: Fluoreszenzverlauf des Referenzkonstruktes für den Influenza-C-Virus-Nachweis.** Beispielhafte Darstellung der Fluoreszenzkurve von Ansatz #1. Abgebildet ist die Intensität des Fluoreszenzsignals gegen die Anzahl der Zyklen. Die Analyse fand sondenbasiert im ABI 7500 Cycler statt, die Einzelmesswerte finden sich in Tab. 3.3. Farblegende: rot =  $10^7$  Kopien/ $\mu$ l, gelb =  $10^6$  Kopien/ $\mu$ l, hellgrün =  $10^5$  Kopien/ $\mu$ l, dunkelgrün =  $10^4$  Kopien/ $\mu$ l, türkis =  $10^3$  Kopien/ $\mu$ l, blau =  $10^2$  Kopien/ $\mu$ l.

Mit dieser neu etablierten, spezifischen PCR wurden die zahlreichen Proben von Landwirten oder Schweinen untersucht. Allerdings konnten in keinem einzigen Fall Genomäquivalente des Influenza-C-Virus nachgewiesen werden.

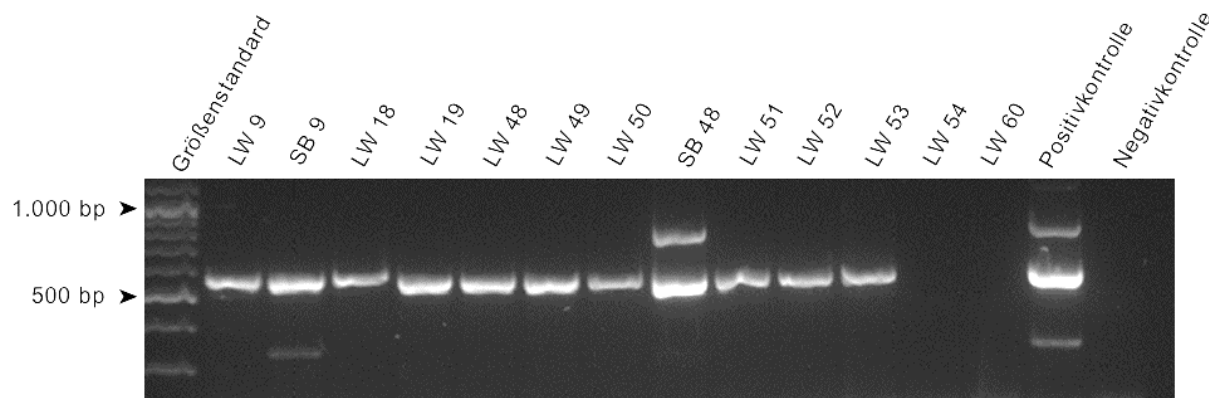
### 3.4 Multiplex-Polymerase-Kettenreaktion

#### 3.4.1 Nachweis tierpathogener respiratorischer Erreger

In den nach den Angaben des Landeslabors Schleswig-Holstein etablierten Multiplex-PCRs wurde die cDNA von Landwirten und ihren Schweinen auf das Vorhandensein von Genomäquivalenten der folgenden Erreger getestet: *M. hyopneumoniae*, *M. hyorhinis*, *H. parasuis*, PCV-2, PCMV, Influenza-A-Virus, PRRSV (europäische und nordamerikanische Genotypen) und PRCV.

Hierbei ergab sich bei den menschlichen Proben in einem einzigen Fall der Nachweis von *H. parasuis* (2 %). Da dieser nicht bestätigt werden konnte, wurde dieser im Nachhinein am ehesten als Ausdruck einer Kontamination gewertet und nicht in die Endauswertung einbezogen. Alle anderen 62 Proben (98 %) waren für die oben angegebenen Erreger negativ.

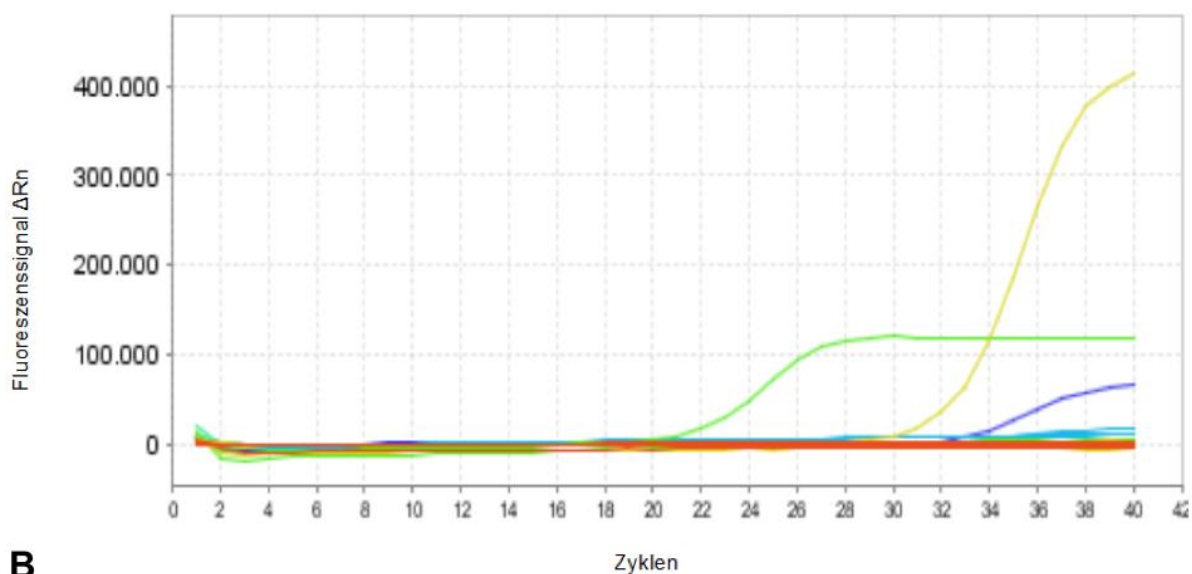
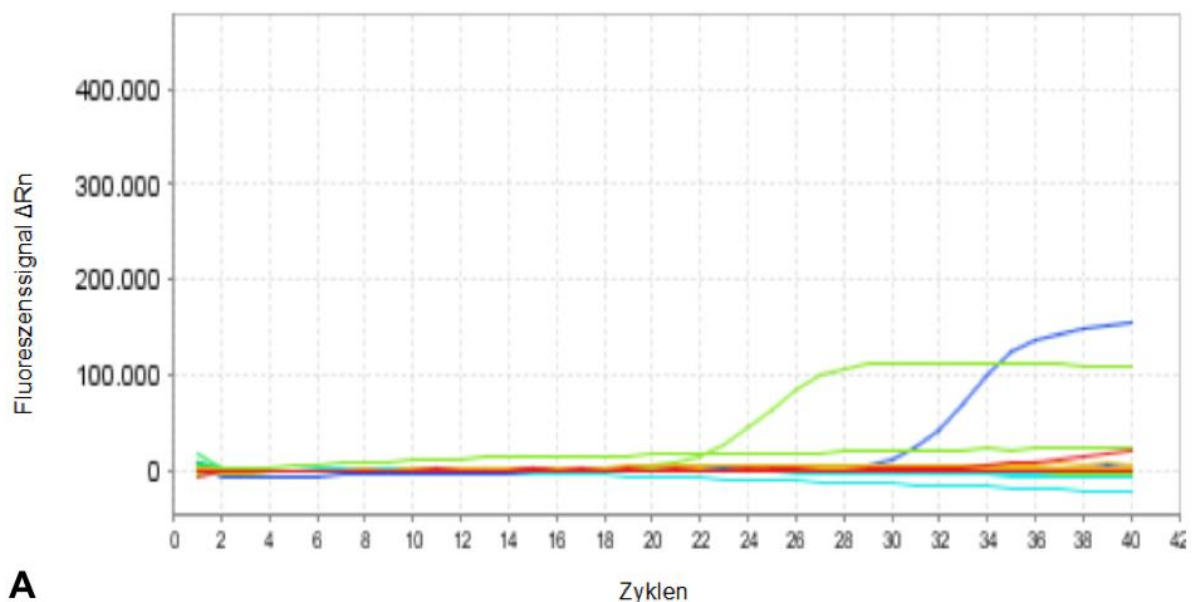
In der oben genannten Multiplex-PCR für die Schweinebestände waren 35 (97 %) der 36 getesteten Pools positiv für *H. parasuis*. Weitere vier (11%) Pools waren positiv für *M. hyopneumoniae*. In drei Pools (8 %) ließen sich Genomäquivalente von PCMV nachweisen. Beispielhaft ist ein Agarosegel zum Nachweis der PCR-Produkte in Abbildung 3.5 dargestellt. Am häufigsten ließen sich *H. parasuis* (36 %) nachweisen, gefolgt von *M. hyopneumoniae* (4 %) und PCMV (3 %).



**Abb. 3.5: Beispielhafte Darstellung eines Agarosegels mit der Multiplex-PCR.** In der Abbildung sieht man einen Nachweis von *M. hyopneumoniae* im Schweinebestand des Landwirtes Nr. 9 und einen Nachweis von *H. parasuis* im Schweinebestand des Landwirtes Nr. 48. Die interne Kontrolle des kommerziellen Kits erzeugte eine Bande auf Höhe von ca. 600 bp. Die Analysen der Proben der Landwirte 54 und 60 wurden wiederholt. In dieser Analyse wurde bei der Aufarbeitung der Proben LW 54 und 60 die interne Kontrolle nicht hinzugefügt. LW = Landwirt, SB = Schweinebestand.

### 3.4.2 Multiplex-Nachweis humaner respiratorischer Pathogene

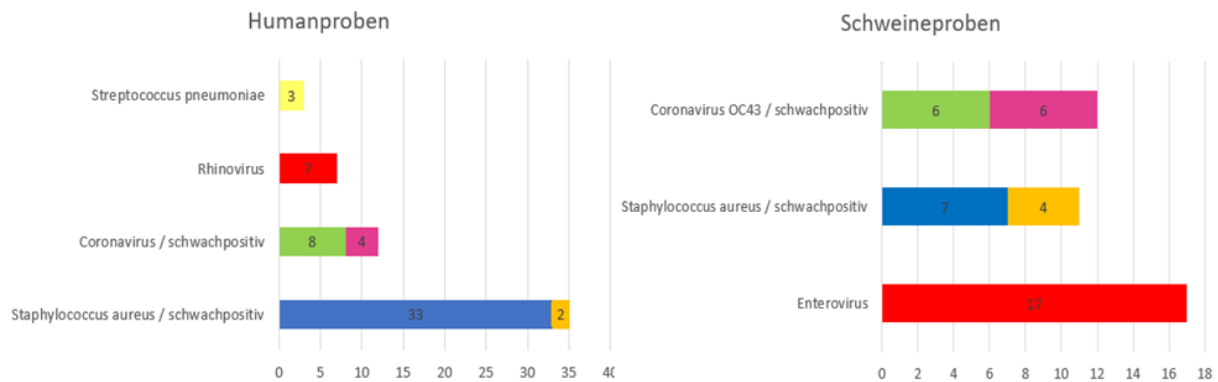
In der kommerziellen Echtzeit-PCR (FTD Respiratory pathogens 21 Plus) wurden die extrahierten Nukleinsäuren direkt auf das Vorhandensein von 18 viralen und 5 bakteriellen Pathogenen untersucht. Beispielhaft ist das Ergebnis eines Testlaufs in Abb. 3.6 gezeigt.



**Abb. 3.6: Beispielhafte Darstellung der kommerziellen Echtzeit-PCR mit dem FTD-Kit.** Dargestellt ist beispielhaft der Fluoreszenzverlauf zweier Probenanalysen. **A** Landwirt 31 **Farblegende:** grün= interne Kontrolle, blau = *S. aureus*; **B** Schweinebestand 32, **Farblegende:** grün = interne Kontrolle, gelb = HCoV OC43, blau = *S. aureus*.

Bei jeder Probe ließ sich die interne Kontrolle ( $C_P$ -Wert =  $23 \pm 0,96$  Standardabweichung) nachweisen. Nach Herstellerangaben sind Signale mit  $C_P > 33$  als negativ zu werten. Abweichend davon wurden in der vorgelegten Arbeit Proben mit  $C_P > 33$  als "schwach positiv" klassifiziert, wenn ein sigmoidaler Kurvenverlauf erkennbar war. Alle Abstriche

wurden analysiert und entsprechend der oben genannten Kriterien als positiv, schwach positiv oder negativ für die genannten Erreger bewertet. Von 23 möglichen Erregern konnten 10 Pathogene nachgewiesen werden. In der kommerziellen PCR (FTD Kit) zum Nachweis humaner respiratorischer Viren und Bakterien erwies sich *S. aureus* als häufigster Erreger, gefolgt von HCoV 229E und HRV (Abb. 3.7). Bei den entsprechenden Schweinebeständen wurden am häufigsten Enteroviren, gefolgt von *S. aureus* und HCoV OC43 nachgewiesen (Abb. 3.6).



**Abb. 3.7: Häufigste nachgewiesene Pathogene in den Human- und Schweineproben mit der FTD-PCR.** Graphisch dargestellt ist der häufige Nachweis von *S. aureus*, HCoV, Humanen Rhinoviren und *S. pneumoniae* bei den humanen Proben, und Enteroviren, *S. aureus* und HCoV OC43 bei den Schweinebeständen. Angegeben sind sowohl positive als auch schwach positive Ergebnisse, die in die Auswertung mit einfließen.

Die Gesamtergebnisse der Untersuchungen der Proben der Landwirte und Schweine für die konventionelle Multiplex-PCR des Landeslabors Schleswig-Holstein sowie für die kommerzielle FTD-PCR werden in Tab. 3.4 anhand der Zugehörigkeit zu ihren Höfen dargestellt. Unter allen Nachweisen ergaben sich die folgenden relativen Häufigkeiten:

**Humane Proben:** *S. aureus* 52 %, HCoV 13 %, Humane Rhinoviren 11 %, *S. pneumoniae* 5 %, HMPV 2 %, Influenza A 2 %; **schwachpositiv:** HCoV 6 %, *S. aureus* 3 %.

**Schweineproben:** Enteroviren 47 %, *S. aureus* 19 %, HCoV 17 %; **schwachpositiv:** HCoV 17 %, *S. aureus* 11 %.

Wiederholt zeigten sich mehr als ein einziger Erregernachweis pro Probe. Die entsprechenden Erregerkombinationen werden in Tab. 3.5 gezeigt.

**Tab. 3.4: Gesamtergebnisse der Landwirte und Schweine für die konventionelle Multiplex-PCR des Landeslabors Schleswig-Holsteins sowie für die kommerzielle FTD-PCR**

Hof	Landwirt	FTD	Multiplex	Schw.Best.	FTD	Multiplex
Hof 1	Lw 1	negativ	negativ	SB 1	<i>S. aureus</i>	<i>H. parasuis</i>
	Lw 2	negativ	negativ			
Hof 2	Lw 3	negativ	negativ	SB 3	negativ	<i>H. parasuis</i>
Hof 3	Lw 4	negativ	negativ	SB 4	negativ	<i>H. parasuis</i> <i>M. hyopneumoniae</i>
	Lw 5	negativ	negativ			
	Lw 6	<i>S. aureus</i> *	negativ			
Hof 4	Lw 7	<i>S. aureus</i>	negativ	SB 7	HCoV OC43*	<i>H. parasuis</i>
Hof 5 <sup>1</sup>	Lw 8	<i>S. aureus</i>	negativ	SB 8	Enteroviren HCoV OC43*	<i>H. parasuis</i> PCMV
Hof 6	Lw 9	<i>S. aureus</i>	negativ	SB 9	Enteroviren	<i>M. hyopneumoniae</i>
Hof 7	Lw 10	negativ	negativ	SB 10	<i>S. aureus</i>	<i>H. parasuis</i> <i>M. hyopneumoniae</i>
	Lw 11	negativ	negativ			
Hof 8 <sup>2</sup>	Lw 11	<i>S. aureus</i> HCoV 229E	negativ	SB 11	negativ	<i>H. parasuis</i>
	Lw 12	negativ	negativ			
	Lw 13	<i>S. aureus</i>	negativ			
Hof 9	Lw 14	<i>S. aureus</i>	negativ	SB 14	<i>S. aureus</i> HCoV OC43*	<i>H. parasuis</i>
	Lw 15	<i>S. aureus</i> *	negativ			
	Lw 16	<i>S. aureus</i>	negativ			
Hof 10	Lw 17	Humane Rhinoviren	negativ	SB 17	negativ	<i>H. parasuis</i> PCMV
	Lw 18	<i>S. aureus</i>	negativ			
	Lw 19	<i>S. pneumoniae</i>	negativ			
Hof 11 <sup>3</sup>	Lw 20	<i>S. aureus</i>	negativ	SB 20	Enteroviren	<i>H. parasuis</i>
Hof 12	Lw 21	HCoV 229E HCoV OC43*	negativ	SB 21	HCoV OC43*	<i>H. parasuis</i>
	Lw 22	HCoV OC43 <i>S. aureus</i>	negativ			
Hof 13 <sup>4</sup>	Lw 23	<i>S. aureus</i> HCoV 229E	negativ	SB 23	HCoV OC43*	<i>H. parasuis</i>
Hof 8 <sup>2</sup>	Lw 24	negativ	negativ	SB 25	Enteroviren	<i>H. parasuis</i>
	Lw 25	HCoV 229E* <i>S. aureus</i>	negativ			
Hof 14	Lw 26	<i>S. aureus</i> Influenza-A-Virus	negativ	SB 26	Enteroviren <i>S. aureus</i>	<i>H. parasuis</i>
Hof 15	Lw 27	HCoV OC43 <i>S. aureus</i>	negativ	SB 27	negativ	<i>H. parasuis</i>
Hof 16	Lw 28	<i>S. aureus</i>	negativ	SB 28	<i>S. aureus</i> *	<i>H. parasuis</i>
	Lw 29	<i>S. aureus</i>	negativ			
	Lw 30	<i>S. aureus</i> HCoV 229E	negativ			
Hof 17	Lw 31	<i>S. aureus</i>	negativ	SB 31	HCoV OC43 <i>S. aureus</i>	<i>H. parasuis</i>
Hof 18	Lw 32	HCoV 229E	negativ	SB 32	HCoV OC43 Enteroviren <i>S. aureus</i> *	<i>H. parasuis</i>
	Lw 33	Negativ	negativ			



**Tab. 3.4: Gesamtergebnisse der Landwirte und Schweine für die konventionelle Multiplex-PCR des Landeslabors Schleswig-Holsteins sowie für die kommerzielle FTD-PCR, Fortsetzung**

Hof	Landwirt	FTD	Multiplex	Schw.Best.	FTD	Multiplex
	Lw 34	HMPV <i>S. pneumoniae</i>	negativ			
Hof 19	Lw 35	HCoV OC43*	negativ	SB 35	HCoV OC43	<i>H. parasuis</i>
	Lw 36	<i>S. aureus</i>	negativ			
Hof 20 <sup>6</sup>	Lw 37	<i>S. aureus</i>	negativ	SB 37	Enteroviren	<i>H. parasuis</i>
Hof 11 <sup>3</sup>	Lw 38	<i>S. aureus</i>	negativ	SB 38	HCoV OC43* Enteroviren <i>S. aureus</i> *	<i>H. parasuis</i>
Hof 13 <sup>4</sup>	Lw 39	<i>S. aureus</i>	negativ	SB 39	negativ	<i>H. parasuis</i>
Hof 21 <sup>5</sup>	Lw 40	HCoV 229E	negativ	SB 40	Enteroviren	<i>H. parasuis</i>
	Lw 41	negativ	negativ			
	Lw 42	negativ	negativ			
Hof 22	Lw 43	<i>S. aureus</i>	negativ	SB 43	HCoV OC43 Enteroviren <i>S. aureus</i>	<i>H. parasuis</i>
Hof 23	Lw 44	<i>S. aureus</i> HCoV OC43*	negativ	SB 44	negativ	<i>H. parasuis</i>
Hof 13 <sup>4</sup>	Lw 45	<i>S. aureus</i>	negativ	SB 45	Enteroviren HCoV OC43	<i>H. parasuis</i> <i>H. parasuis</i>
	Lw 46	<i>S. aureus</i>	negativ			
	Lw 47	negativ	negativ			
Hof 24	Lw 48	negativ	negativ	SB 48	Enteroviren	<i>H. parasuis</i>
Hof 24	Lw 49	negativ	negativ			
	Lw 50	<i>S. aureus</i>	negativ			
Hof 25	Lw 51	<i>S. aureus</i> Parainfluenza 4*	negativ	SB 51	Enteroviren <i>S. aureus</i>	<i>H. parasuis</i>
	Lw 52	<i>S. aureus</i>	negativ			
	Lw 53	negativ	negativ			
Hof 11 <sup>3</sup>	Lw 54	Humane Rhinoviren <i>S. aureus</i>	negativ	SB 54	Enteroviren	<i>H. parasuis</i>
Hof 13 <sup>4</sup>	Lw 55	<i>S. aureus</i>	negativ	SB 55	Enteroviren	<i>H. parasuis</i>
	Lw 56	negativ	negativ			
Hof 26	Lw 57	negativ	negativ	SB 57	Enteroviren HCoV OC43	<i>H. parasuis</i>
Hof 27	Lw 58	<i>S. aureus</i>	negativ	SB 58	<i>S. aureus</i> * Enteroviren	<i>H. parasuis</i> PCMV
Hof 5 <sup>1</sup>	Lw 59	Humane Rhinoviren <i>S. aureus</i>	negativ	SB 59	negativ	<i>H. parasuis</i> <i>M. hyopneumoniae</i>
Hof 20 <sup>6</sup>	Lw 60	Humane Rhinoviren	negativ	SB 60	negativ	<i>H. parasuis</i>
Hof 21 <sup>5</sup>	Lw 61	Humane Rhinoviren <i>S. aureus</i> <i>S. pneumoniae</i>	negativ	SB 61	negativ	<i>H. parasuis</i> <i>M. hyopneumoniae</i>
	Lw 62	Humane Rhinoviren	negativ			
	Lw 63	Humane Rhinoviren	negativ			

\*schwach positiver Nachweis; Lw = Landwirt; SB = Schweinebestand; Mehrfacheinsendungen: 1: Einsendung 01/2013 und 12/2013; 2: Einsendung 01/2013 und 02/2013; 3: Einsendung 02/2013, 04/2013 und 12/2013; 4: Einsendung 02/2013, 04/2013, 10/2013 und 11/2013; 5: Einsendung 04/2013 und 02/03 2014; 6: Einsendungen 04/2013 und 02/2014.

Tab. 3.5: Mehrfachnachweise in den Menschen und Schweineproben

Humane Proben (gesamt 63)	Anzahl	Schweineproben (gesamt 36)	Anzahl
HCoV 229E, <i>S. aureus</i>	4	Enteroviren, HCoV OC43	3
HCoV OC43, <i>S. aureus</i>	3	Enteroviren, <i>S. aureus</i>	3
Humane Rhinoviren, <i>S. aureus</i>	2	HCoV OC43, <i>S. aureus</i>	2
HMPV, <i>S. pneumoniae</i>	1	HCoV OC43, <i>S. aureus</i> , Enteroviren	3
HCoV 229E, HCoV OC43	1		
Influenza-A-Virus, <i>S. aureus</i>	1		
Parainfluenzavirus Typ 4, <i>S. aureus</i>	1		
Hum. Rhinoviren, <i>S. aureus</i> , <i>S. pneumoniae</i>	1		

### 3.5 Kultureller Nachweis von *Staphylococcus aureus*

Durch Anzucht auf Nährböden ließ sich bei 24 der 35 humanen Proben (69 %), die in der FTD-PCR ein *S.-aureus*-Signal aufwiesen, der Erreger auch kulturell nachweisen (Abschnitt 2.9 und Abb. 2.2). Der kulturelle Nachweis gelang nur bei einer der sieben gepoolten Schweineproben mit einem entsprechenden PCR-Nachweis. Bei zwei Landwirten, die in der PCR negativ für *S.-aureus*-DNA waren, wurde das Bakterium angezüchtet und in einem Fall als MRSA klassifiziert. Das den MRSA-Stämmen zugrundeliegende PBP2a ließ sich immunchromatographisch in allen elf Proben mit charakteristischem Wachstum auf dem Chromagar nachweisen. Die Erreger-Nachweise der Landwirte finden sich in Tab. 3.6, die Erreger-Nachweise der Schweinebestände werden in Tab. 3.7 aufgeführt. Bei einem Schweinebestand gelang sowohl der Nachweis mit der PCR als auch die kulturelle Anzucht.

**Tab. 3.6: Nachweis von *S. aureus* in menschlichen Proben.** Nur die Proben der Landwirte sind aufgeführt, die einen Nachweis für *S. aureus* ergaben. Bei zwei Landwirten konnte das Bakterium kulturell angezüchtet werden, während die PCR (FTD) keinen Nachweis erbrachte.

Landwirt	Nukleinsäurenachweis		Kulturelle Verfahren		
	FTD PCR	C <sub>P</sub>	Blutagar	MRSA-Chromagar	PBP2a
Lw 6	∅		Wachstum	rosa gefärbte Kolonien	positiv
Lw 7	nachgewiesen	32	Wachstum	rosa gefärbte Kolonien	positiv
Lw 8	nachgewiesen	30	Wachstum	rosa gefärbte Kolonien	positiv
Lw 9	nachgewiesen	22	Wachstum	∅	∅
Lw 11	nachgewiesen	23	Wachstum	rosa gefärbte Kolonien	positiv
Lw 13	nachgewiesen	29	Wachstum	rosa gefärbte Kolonien	positiv
Lw 14	nachgewiesen	24	Wachstum	∅	∅
Lw 16	nachgewiesen	32	Wachstum	∅	∅
Lw 18	nachgewiesen	27	Wachstum	∅	∅
Lw 20	nachgewiesen	22	Wachstum	∅	∅
Lw 22	nachgewiesen	31	Wachstum	rosa gefärbte Kolonien	positiv

Tab. 3.6: Nachweis von *S. aureus* in menschlichen Proben: Fortsetzung

Landwirt	Nukleinsäurenachweis		Kulturelle Verfahren		
	FTD PCR	C <sub>P</sub>	Blutagar	MRSA-Chromagar	PBP2a
Lw 23	nachgewiesen	24	∅	nicht durchgeführt	nicht durchgeführt
Lw 24	∅		Wachstum	∅	∅
Lw 25	nachgewiesen	26	Wachstum	rosa gefärbte Kolonien	positiv
Lw 26	nachgewiesen	31	Wachstum	∅	∅
Lw 27	nachgewiesen	16	Wachstum	∅	∅
Lw 28	nachgewiesen	28	∅	nicht durchgeführt	nicht durchgeführt
Lw 29	nachgewiesen	32	∅	nicht durchgeführt	nicht durchgeführt
Lw 30	nachgewiesen	26	Wachstum	rosa gefärbte Kolonien	positiv
Lw 31	nachgewiesen	28	∅	nicht durchgeführt	nicht durchgeführt
Lw 36	nachgewiesen	31	Wachstum	rosa gefärbte Kolonien	positiv
Lw 37	nachgewiesen	33	Wachstum	∅	∅
Lw 38	nachgewiesen	30	∅	nicht durchgeführt	nicht durchgeführt
Lw 39	nachgewiesen	31	Wachstum	∅	∅
Lw 43	nachgewiesen	31	Wachstum	rosa gefärbte Kolonien	positiv
Lw 44	nachgewiesen	32	∅	nicht durchgeführt	nicht durchgeführt
Lw 46	nachgewiesen	26	Wachstum	∅	∅
Lw 50	nachgewiesen	26	Wachstum	∅	∅
Lw 51	nachgewiesen	23	∅	nicht durchgeführt	nicht durchgeführt
Lw 52	nachgewiesen	30	∅	nicht durchgeführt	nicht durchgeführt
Lw 54	nachgewiesen	29	Wachstum	rosa gefärbte Kolonien	positiv
Lw 55	nachgewiesen	27	∅	nicht durchgeführt	nicht durchgeführt
Lw 58	nachgewiesen	24	Wachstum	∅	∅
Lw 59	nachgewiesen	30	∅	nicht durchgeführt	nicht durchgeführt
Lw 61	nachgewiesen	31	∅	nicht durchgeführt	nicht durchgeführt

∅ = negativ;

Tab. 3.7: Nachweis von *S. aureus* in Schweinproben. Nur die Schweinebestände sind aufgeführt, die einen Nachweis für *S. aureus* ergeben haben. Die kulturelle Anzucht gelang nur bei einem Bestand.

SB	Nukleinsäurenachweis		Kulturelle Verfahren		
	FTD PCR	C <sub>P</sub>	Blutagar	MRSA-Chromagar	PBP2a
SB 1	nachgewiesen	26	∅	nicht durchgeführt	nicht durchgeführt
SB 10	nachgewiesen	32	Wachstum	rosa gefärbte Kolonien	Positiv
SB 14	nachgewiesen	32	∅	nicht durchgeführt	nicht durchgeführt
SB 26	nachgewiesen	32	∅	nicht durchgeführt	nicht durchgeführt
SB 31	nachgewiesen	33	∅	nicht durchgeführt	nicht durchgeführt
SB 43	nachgewiesen	32	∅	nicht durchgeführt	nicht durchgeführt
SB 51	nachgewiesen	30	∅	nicht durchgeführt	nicht durchgeführt

∅ = negativ; SB = Schweinebestand

### 3.6 Übersicht über die Erregernachweise

Von 63 menschlichen Proben konnten bei 46 Abstrichen virale und bakterielle Erreger identifiziert werden. Der häufigste nachgewiesene Erreger war *S. aureus*. Bei 24 Proben war eine kulturelle Anzucht möglich, in elf Fällen konnte ein MRSA nachgewiesen werden. Für die Schweinebestände wurde in jeder Poolprobe ein Erreger identifiziert. Bei den Rüsselabstrichen war *H. parasuis* der häufigste Erreger. Tab. 3.8 gibt die absolute und relative Häufigkeit der einzelnen positiven Erregernachweise an.

**Tab. 3.8: Übersicht über die Häufigkeiten der nachgewiesenen Erreger.** Gezeigt werden die Verteilung und Häufigkeit des Erregernachweises der Landwirte und Schweinebestände. In 46 von 63 humanen Proben konnten virale und bakterielle Erreger identifiziert werden. Von 61 gepoolten Rüsselabstrichen lieferten 36 einen Nachweis.

Erreger	Landwirte (63)		Schweinebestände (36)	
	absolut	relativ [%]	absolut	relativ [%]
<i>S. aureus</i> (PCR)				
- positiv	33	52	7	19
- schwach positiv	2	3	4	11
<i>S. aureus</i> (Kultur)	24	38	1	3
- davon MRSA	11	32	1	3
CoV				
- positiv	8	13	6	17
- schwach positiv	4	6	6	17
Enteroviren			17	47
Rhinoviren	7	11	0	0
<i>S. pneumoniae</i>	3	5	0	0
HMPV	1	2	0	0
Influenza-A-Virus	1	2	0	0
<i>H. parasuis</i>	0	0	35	97
Parainfluenzavirus Typ 4 (schwach positiv)	1	2	0	0
<i>M. hyopneumoniae</i>	0	0	4	11
PCMV	0	0	3	8
negativ	17	27	0	0

## 4 Diskussion

Die vorgelegte Arbeit sollte am Beispiel respiratorischer Infektionen untersuchen, inwieweit es zu wechselseitigen Übertragungen von Viren und Bakterien zwischen Schweinen und Menschen mit direktem Kontakt zu diesen Nutztieren kommt. So legt der enge berufliche Kontakt mit den Tieren die Vermutung nahe, dass es auch beim Menschen zu einer Infektion durch virale oder bakterielle Pathogene des Schweins kommen kann. Dieses konnte beispielhaft für das Hepatitis-E-Virus gezeigt werden, das bei Schweinen weit verbreitet ist (Caruso et al., 2017). Menschen mit beruflicher Exposition zum Schwein haben vermehrt Antikörper gegen das Hepatitis-E-Virus, so dass angenommen wird, dass nicht nur der Verzehr von rohem Schweinefleisch, sondern auch der direkte Kontakt zu Schweinen einen Risikofaktor für eine Infektion darstellt (Krumbholz et al., 2012, 2014; Sommerkorn et al., 2017).

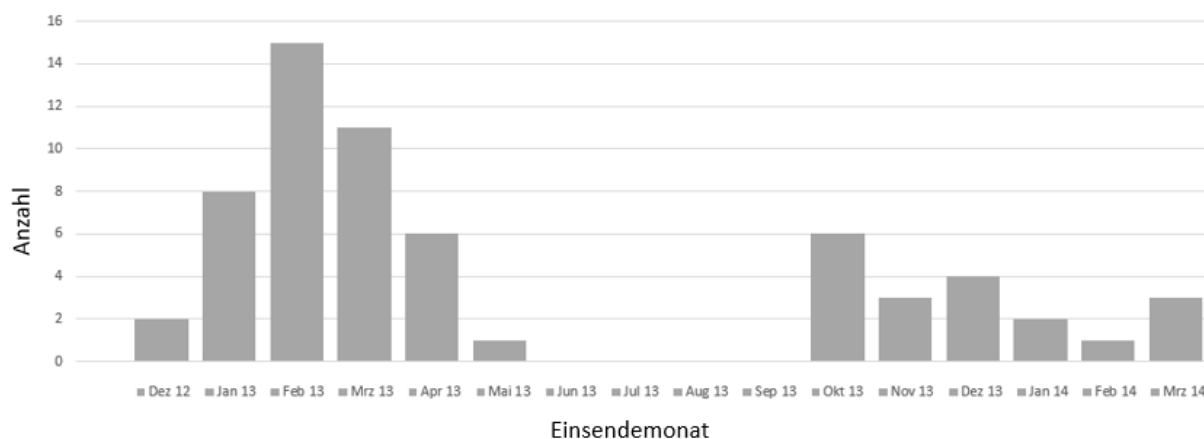
Speziesübergreifende Infektionen sind vor allem bei Influenzaviren bekannt. Neben den bekannten Subtypen des Schweine-Influenzavirus (H1N1, H3N2, H1N2; Kuntz-Simon & Madec, 2009) zirkulieren in den Schweinepopulationen auch das pandemische Influenza-A-Virus von 2009 (H1N1pdm09) und davon abgeleitete Reassortanten (Henningson et al., 2015). Das pandemische Virus H1N1pdm09 wurde 2009 erstmals beim Menschen nachgewiesen (Vaillant et al., 2009) und trägt als Mehrfachreassortante die genetische Information von Influenzaviren des Schweins, des Menschen und von Geflügel (Vijaykrishna et al., 2010). Im Rahmen der Pandemie von 2009 hat sich aber auch gezeigt, dass eine Übertragung des Influenza-A-Virus vom Menschen zurück zum Schwein stattgefunden hat (Nelson & Vincent, 2015). In der hier vorgelegten Arbeit sollte eine Beobachtungsstudie geplant und durchgeführt werden, damit wechselseitige Infektionen zwischen Schweinen und Menschen mit direktem Kontakt zu diesen Nutztieren nachgewiesen werden konnten.

### 4.1 Studiendesign und Probengewinnung

Die Landwirte aus Schleswig-Holstein, die ihre Bereitschaft zur Teilnahme an der geplanten Beobachtungsstudie geäußert hatten, wurden mit Abstrichtupfern für die Entnahme von Nasen- und Rüsseltupfern versorgt. Ebenso wurden die vorherrschenden klinischen Symptome mit Hilfe eines standardisierten Anamnesebogens erhoben (Anhang, Abb. 7.1). Eine vergleichbare Studie unter Berücksichtigung dieses breiten Pathogenspektrums ist unseres Wissens nach bisher nicht durchgeführt worden. Für einzelne Erreger, wie zum Beispiel MRSA-Stämme, gibt es etliche Arbeiten (Broens et al., 2011; Broens et al., 2012; Kinross et al., 2017), ebenso über das zoonotische Potential gastrointestinaler Viren bei Schlachttieren (Machnow-

ska et al., 2014). Insgesamt gibt es 14.123 Bauernhöfe in Schleswig-Holstein, darunter 1.742 Schweinemast- und Zuchtbetriebe. Im Bundesland werden ca. 1,5 Millionen Tiere gehalten und im Durchschnitt hat ein Betrieb eine Bestandsgröße von ca. 930 Schweinen. Die Gesamtzahl der Tiere beinhaltet 717.000 Ferkel und Jungschweine, 685.000 Mastschweine und 103.000 Zuchttiere (Statistisches Amt für Hamburg und Schleswig-Holstein 2016a, 2016b). Damit liegt Schleswig-Holstein im deutschen Mittelfeld.

Im Zeitraum von Dezember 2012 bis März 2014 wurden Proben von 27 landwirtschaftlichen Betrieben eingesandt (Abb. 4.1). Darunter fanden sich auch sechs Höfe, die mehrmals Proben einsandten. Diese 27 Höfe repräsentieren 1,5 % der Betriebe mit Schweinezucht und Schweinemast in Schleswig-Holstein. In den Monaten Februar und März wurden die meisten Proben gewonnen.



**Abb. 4.1: Übersicht über den zeitlichen Verlauf der Probeneinsendungen.**

Die vermehrten Einsendezahlen in den Monaten Februar und März entsprechen der für Erkältungskrankheiten zu erwartenden Saisonalität (Paynter et al., 2015). Die von den Landwirten geäußerten Symptome (Schnupfen, Husten, Kopf-, Hals- und/oder Gliederschmerzen und Fieber) decken sich weitestgehend mit dem klinischen Bild eines Atemwegsinfekts (Nichol et al., 2005). Insofern kann davon ausgegangen werden, dass die Landwirte dann Proben von sich bzw. ihren Tieren einsandten, wenn sie einen respiratorischen Infekt hatten. Zur Gewährleistung der Genomstabilität der potenziellen Erreger wurden die Proben bis zur Aufarbeitung bei -80 °C gelagert (Shin et al., 2018). Zur Vermeidung von Kontaminationen fand die Aufarbeitung der humanen und porzinen Proben zu unterschiedlichen Zeitpunkten statt.

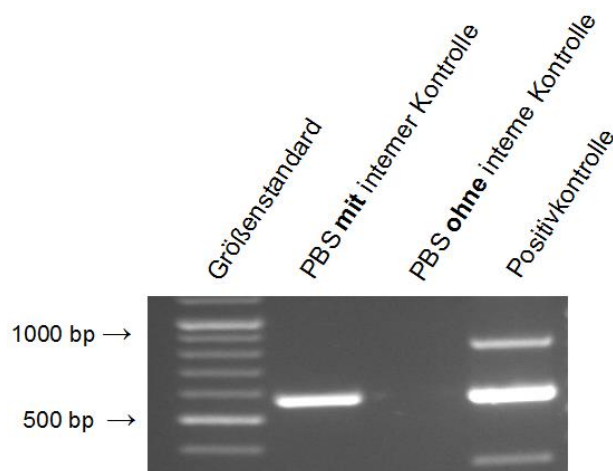
## 4.2 Qualitätskontrollen

Für die humanen Proben wurde jeder Tupfer einzeln analysiert. Bei den zugehörigen Schweinebeständen wurden jeweils zehn Rüsselabstriche zusammengeführt und als eine Probe untersucht. Somit lässt sich nicht auflösen, ob es sich um eine Infektion eines Tieres handelt, oder die Erreger von verschiedenen Tieren des Pools stammen.

Die erfolgreiche Extraktion der Nukleinsäuren wurde in jedem Fall durch den Nachweis eines Spezies-spezifischen Haushalts-Gens dokumentiert. Bei den menschlichen Proben wurde ein Bereich des  $\beta$ -Aktin-Gens in einer SYBR-Green basierten Echtzeit-PCR amplifiziert. Die dafür eingesetzten Oligonukleotide wurden nach Literaturangaben ausgesucht (Perrin & Ervasti, 2010). Alle Rüsselstümpfe wurden mit dem gleichen Verfahren auf das Vorhandensein porziner Cytochrom-B-spezifischer Genomäquivalente getestet (Blusch et al., 2002). Die anschließende Schmelzpunktanalyse ermöglichte eine klare Unterscheidung von humaner und porziner DNA. So lag der mittlere Schmelzpunkt des humanen  $\beta$ -Aktin-Amplifikats bei 85,81 °C, der des porzinen Cytochrom B bei 82,41 °C. Die mitgeführte Wasserkontrolle der humanen Proben wurde ab Zyklus 41 positiv, so dass diese Amplifikation als unspezifisch gewertet wurde. Der Schmelzpunkt der Wasserkontrolle lag ca. bei 76 °C. Dadurch ist eine deutliche Trennung zu den spezifischen Nachweisen möglich gewesen (siehe Abb. 3.3). Dieser speziesspezifische Nukleinsäurenachweis machte eine Falschabnahme, Probenverwechslung oder spätere Kreuzkontamination unwahrscheinlich. Erst nach Abschluss dieser Eingangsuntersuchungen wurden die Proben den weiteren Testungen zugeführt.

Die Auswertung der Multiplex-PCR nach dem Protokoll des Landeslabors Schleswig-Holstein erfolgte nach Elektrophorese im Agarosegel. Hier zeigte sich bei allen Proben eine Bande in der erwarteten Produktgröße für *M. hyorhinae*. Für die Probenanalyse mit dem kommerziell bezogenen FTD-Kit wurde bei der Nukleinsäureextraktion aus den Tupfern eine interne Kontrolle hinzugefügt. Da dieser Extrakt für alle Probenanalysen eingesetzt wurde, enthielt jede Probe diese interne Kontrolle. Zur Überprüfung erfolgte eine Analyse mit und ohne Zugabe der internen Kontrolle in PBS. Nach Auftrennung im Agarosegel zeigten die Amplifikat-Banden, dass die interne Kontrolle des kommerziellen Kits ca. auf der Höhe von 600 bp nachweisbar war (Abb. 4.2). Das mit dieser PCR nachweisbare Pathogen *M. hyorhinae* lieferte ein Amplifikat von 593 bp. Da eine Abgrenzung zwischen der internen Kontrolle und dem Pathogen optisch nicht gewährleistet werden konnte, wurde in der Gesamtauswertung auf dieses Ergebnis verzichtet, zumal eine derartige Häufigkeit außerdem nicht plausibel erschien. Im Nachhinein stellte sich heraus, dass es sich hierbei am ehesten um eine Kontamination handelte, da

bei einer neu hergestellten Positivkontrolle diese häufigen Signale nicht mehr vorhanden waren (Kerstin Receveur, persönliche Mitteilung).



**Abb. 4.2: Nachweis von *M. hyorhinis* durch Auftrennung der PCR-Produkte im Agarosegel.** Verglichen wurden die Amplifikate zweier Probenaufarbeitungen mit PBS, jeweils einmal mit hinzugefügter interner Kontrolle des FTD-Kits und einmal ohne die interne Kontrolle. Die Positivkontrolle der Multiplex-PCR des Landeslabors Schleswig-Holstein zeigt deutlich die angegebene Bande für *M. hyorhinis* auf Höhe der internen Kontrolle.

### 4.3 Besonders wichtige Pathogene

#### 4.3.1 *Staphylococcus aureus*

Die insgesamt hohe Nachweisrate von *S. aureus* sowohl bei Landwirten (52 % positiv, 3 % schwach positiv) als auch den Schweinebeständen (19 % positiv, 11 % schwach positiv) steht im Einklang mit der Literatur. So wurden zuvor bei Landwirten Besiedlungsraten von 30 % berichtet (Kinross et al., 2017); bei Schweinen sogar Einzeltier-Prävalenzen von 77 % und Herden-Prävalenzen von 97 % (Sun et al., 2015; van Cleef et al., 2014).

Da einige Landwirte mehrfach Proben über einen längeren Zeitraum einsandten, konnten Rückschlüsse über die Besiedlungsdauer gezogen werden. So war *S. aureus* über einen längeren Zeitraum, in einem Beispiel im Februar und wieder im Dezember, bei den Bauern und zum Teil bei den Schweinebeständen nachweisbar. Das kann beim Menschen als Beleg für die dauerhafte Besiedelung des Nasen-Rachenraums gewertet werden (Cuny et al., 2009; Kock et al., 2012). Prinzipiell ist es auch möglich, dass die Schweine durch Stämme humanen Ursprungs infiziert werden (Cuny et al., 2009). Für Deutschland wurden in 43–70 % der Schweinebestände *livestock-associated* MRSA-Besiedelungen ermittelt. Entsprechend dazu wiesen 86 % der Landwirte, die direkten Tierkontakt hatten und 4 % der Familienangehörigen eine Besiedelung durch *livestock-associated* MRSA auf (Kock et al., 2011). Die Mehrzahl der Schweine ist asymptomatisch besiedelt (Meemken et al. 2010). Innerhalb der Schweinepopulation



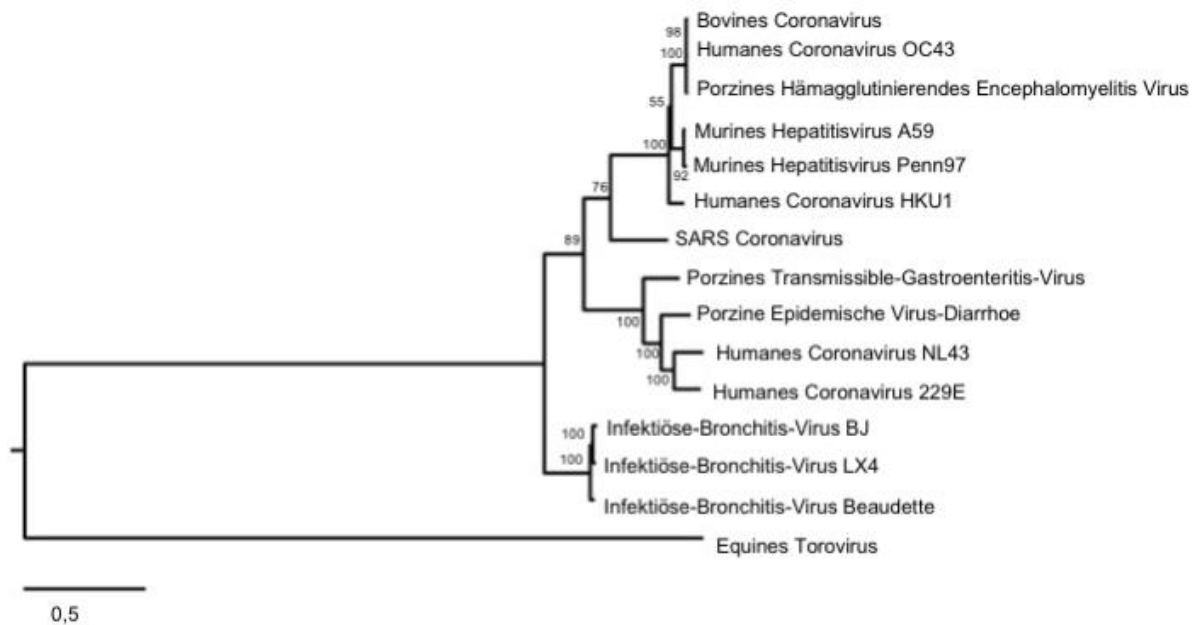
wird die vertikale Übertragung des MRSA angenommen (Broens et al., 2012). Das Bakterium kann auch über neue MRSA-besiedelte Tiere in den Bestand gelangen (van Duijkeren et al., 2007), durch aerogene Übertragung (Gibbs et al., 2006) bzw. durch kontaminierte Oberflächen im Stall (Schmitthausen et al., 2018). Als Konsequenz der hohen Durchseuchungsrate der Schweinebestände sollten Landwirte und Veterinärmediziner mit regelmäßigem Tierkontakt bei stationärer Aufnahme in ein Krankenhaus regelhaft auf MRSA-Besiedelung getestet werden.

#### 4.3.2 Coronaviren

Der Nachweis von HCoV OC43-RNA ist mit einer Infektion der menschlichen Atemwege vereinbar (Lai et al., 2015). Für den einmalig geführten Doppelnachweis von HCoV 229E und HCoV OC43 bei einem Landwirt findet sich in der Literatur keine Entsprechung. Vergleicht man die *Crossing points* der Kurven von HCoV 229E ( $C_P = 28$ ) und HCoV OC43 ( $C_P = 32$ ) bei diesem Probanden, so ist zu vermuten, dass von letztgenannter Spezies nur wenige Kopien in der Probe vorhanden waren. Um diesen Doppelnachweis sicher zu beweisen, benötigt man jedoch zeitnah entnommene Folgeproben, die aber nicht zur Verfügung standen. Es ist allerdings bekannt, dass Coronaviren häufig in Kombination mit anderen Viren auftreten (Zhang, Tuo et al., 2018).

Bei Schweinen ist bisher bei den CoV nur PRCV als Ursache für eine respiratorische Infektion bekannt (Laude et al., 1993). In der Literatur wird über die hohe Prävalenz von Antikörpern gegen HCoV OC43 bei asymptomatischen Tieren berichtet. Insofern wurde eine wechselseitige Übertragung des Erregers vermutet (Hirano et al., 1999). Eine andere Ursache für den auch in dieser Arbeit geführten, häufigen Nachweis von HCoV OC43 beim Schwein sowie für die aus der Literatur bekannten Antikörperprävalenzen könnte in der engen Verwandtschaft dieses Virus zum *Porcine hemagglutinating encephalomyelitis virus* (PHEV) liegen. Die phylogenetische Untersuchung durch Vijgen et al. (2006) konnte die enge Verwandtschaftsbeziehung bestätigen (Abb. 4.3). Daher liegt die Vermutung nahe, dass es sich

vielmehr um möglicherweise asymptomatische Infektionen mit PHEV handelt, die in der FTD-PCR bei Schweinen fälschlicherweise als Humanes CoV OC43 ausgewiesen wurden.



**Abb. 4.3 Stammbaum der Coronaviren** (verändert nach Vijgen et al., 2006). Der phylogenetische Baum zeigt die Verwandtschaftsbeziehungen innerhalb der Familie der Coronaviren. Für den gewählten Genomabschnitt (PHEV-VW572) sind HCoV OC43, PHEV und Bovine Coronaviren nicht voneinander zu unterscheiden.

#### 4.3.3 Rhinoviren

Beim Menschen sind obere Atemwegsinfektionen am häufigsten durch HRV bedingt. Die meisten Nachweise im Rahmen dieser Arbeit wurden in den Monaten Februar und März geführt. Aus den Arbeiten des Netzwerkes für respiratorische Virusinfektionen (Respvir) weiß man, dass HRV zwar ganzjährig nachweisbar sind, am häufigsten aber im Spätsommer und Herbst vorkommen (Abb. 4.4).



**Abb. 4.4: Saisonale Aktivität der menschlichen Rhinovirus-Infektionen über den Zeitraum der Studie.** HRV-Infektionen sind ganzjährig nachweisbar, mit einer Spitze im Monat Oktober 2013. Die Abbildung basiert auf den Daten des respiratorischen Viren-Netzwerks Respvir (<https://clinical-virology.net/de/charts/chart/ctype/activity/network/resp/section/viruses/virus/rhinopos?from=12%2F2012&to=03%2F2014>). Im relevanten Zeitraum sind insgesamt 3273 HRV-Nachweise dargestellt.

Der Zeitraum der Probeneinsendungen erstreckte sich von Dezember 2012 bis März 2014. In den Monaten Juni 2013 bis September 2013 wurden keine Abstriche eingesandt, so dass sich der zeitliche Verlauf über das gesamte Jahr in dieser Studie nicht abbilden lässt. Die Vermutung liegt nahe, dass in diesem Zeitraum Atemwegsinfektionen nicht vorkamen, obwohl sie bei deutlich niedrigerer Frequenz statistisch zu erwarten gewesen wären. Trotz der engen Verwandtschaft zwischen den Porzinen Enteroviren und HRV ist von einer Kreuzimmunität nicht auszugehen, da diese schon innerhalb der HRV nicht gegeben ist (Galanti et al., 2019).

#### 4.3.4 *Haemophilus parasuis*

In der Multiplex-PCR zum Nachweis ausgewählter Viren und Bakterien des Schweins, deren Protokoll vom Landeslabor Schleswig-Holstein übernommen wurde, war bei den menschlichen Proben nur ein einziger Nasentupfer auffällig. Bei diesem Tupfer konnte DNA von *H. parasuis* nachgewiesen werden. Für den Nachweis von *H. parasuis* beim Menschen findet sich in der Literatur keine Entsprechung. Am ehesten kann daher von einer Kontamination dieser menschlichen Probe ausgegangen werden. Diese könnte bereits bei der Probenentnahme im Bestand passiert sein, zumal praktisch alle Schweineproben positiv für *H. parasuis* getestet wurden. In diesem Fall waren Folgeproben leider nicht verfügbar. Für einen belegten Nachweis von *H. parasuis* beim Menschen wäre zu fordern, dass dieser aus mehreren, unabhängigen Probenaufbereitungen gelingt. Dieses Bakterium wurde bei Wildschweinen mit dem Auftreten schwerer Lungeninfektionen assoziiert (Cuesta Gerveno et al., 2013). Andererseits spricht einiges dafür, dass *H. parasuis* ein Kommensale in den oberen

Atemwegen von Schweinen ist und daher auch bei klinisch gesunden Tieren nachgewiesen werden kann (Moller & Kilian, 1990).

Bei den porzinen Proben war DNA von *H. parasuis* am häufigsten nachweisbar, gefolgt von *M. hyopneumoniae* und PCMV. Die hohe Nachweisrate bei *H. parasuis* steht im Einklang mit der Literatur (Palzer et al., 2015). Bei gehäuftem Auftreten der sogenannten Glässer'schen Krankheit wird eine antibiotische Therapie, ggf. auch eine Impfung der noch nicht infizierten Tiere empfohlen (Macedo et al., 2015).

#### 4.3.5 Influenza-C-Viren

Im Rahmen dieser Arbeit konnten Influenza-C-Viren in humanen oder porzinen Proben in keinem einzigen Fall nachgewiesen werden. In der Literatur finden sich Hinweise für anthro-pozoonotische Infektionen (Ma et al., 2008; Widdowson et al., 2017). Der fehlende Nachweis in unseren Proben könnte dem relativ geringen Studienumfang geschuldet sein. Generell ist es sinnvoll, bei Verdachtsfällen nicht nur einen allgemeinen Nachweis von Influenza-Viren zu führen, sondern auch eine Typisierung und sogar eine Sequenzierung des gesamten Genoms anzustreben. Nur so lassen sich Reassortanten und Stämme mit pandemischem Potential rasch identifizieren.

#### 4.4 Relevanz des Nachweises porziner Erreger für die Xenotransplantation

Die Übertragung porziner Erreger auf den Menschen ist nicht nur für zoonotische Infektionen bedeutsam. Das Überwinden von Speziesbarrieren und die Möglichkeit, tierische Organe bzw. Gewebe auf den Menschen zu übertragen (Xenotransplantation), ist insbesondere vor dem Hintergrund der rückläufigen Spendebereitschaft der Bevölkerung eine interessante Alternative (Plotzki et al., 2016). Neben der Schwierigkeit der Beherrschung von Abstoßungsreaktionen ist noch nicht abschließend geklärt, inwieweit dabei tierische Pathogene auf den Menschen übertragen werden könnten. Somit stellen mögliche Infektionen ein Risiko der Xenotransplantation dar (Fishman, 2014; Niemann & Petersen, 2016).

Schweine gelten als Spendertiere für Menschen als am Besten geeignet (Dooldeniya & Warrens, 2003). Für die Einschätzung des Risikos der Übertragung von Pathogenen des Schweins auf den Menschen bedarf es auch der Entwicklung sensitiver und spezifischer Testverfahren. Zudem gibt es Bemühungen, Virus-freie Tiere zu züchten, indem die Muttertiere z.B. Virustatika erhalten sowie geimpft werden und die Ferkel per Kaiserschnitt geboren werden (Denner, 2017).

Porzine endogene Retroviren, die bei allen Schweinen in das Genom integriert vorliegen, wird man so aber nicht eliminieren können. Dieses Retrovirus ist in der Lage, auch humane Zellen zu infizieren und es kann nicht ausgeschlossen werden, dass dieses Virus möglicherweise auch zur Tumorentstehung oder Immundefizienz führt (Denner & Tönjes, 2012). Mit einer Zink-Finger-Nuklease könnten derartige, spezifische Gensequenzen ausgeschaltet werden, was aber bisher noch nicht erfolgreich war (Semaan et al., 2015).

PCMV könnte im Rahmen der Xenotransplantation ebenfalls ein Problem darstellen. Viele Tierbestände haben eine hohe Durchseuchungsrate. Derzeit besteht noch keine verlässliche Möglichkeit, dass Virus sicher nachzuweisen (Denner & Mankertz, 2017). In dieser Studie gelang bei drei Tierbeständen (8 %) der Nachweis von PCMV. Abschließend ist auch noch nicht geklärt, ob dieses  $\beta$ -Herpesvirus eine humane Infektion verursachen kann. In unserer Studie gab es bei den PCMV-positiven Schweinepools keinen Nachweis bei den zugehörigen Landwirten. Jedoch wurde eine Kreuzreaktivität mit dem Humanen Herpesvirus Typ 6 postuliert. Ob damit auch eine Kreuzimmunität zum Humanen Cytomegalovirus vermittelt werden kann, ist nicht geklärt (Fiebig et al., 2017).

Bei Typ-1-Diabetikern wurden porzine Pankreas-Inselzellen bereits erfolgreich transplantiert. Dabei kam es weder zu Abstoßungsreaktionen noch zu Übertragungen porziner Erreger. Die Organfunktion entwickelte sich jedoch noch nicht in zufriedenstellender Weise (Cooper et al., 2016; Matsumoto et al., 2014).

#### **4.5 Ansätze der *One-Health-Initiative***

Generell sollte darüber nachgedacht werden, Landwirte und andere Berufsgruppen mit direktem Kontakt zu Schweinen auf zoonotische Erreger zu testen und auch gezielt über mögliche Infektionsgefahren zu unterrichten (Myers et al., 2007). Aber auch die Überwachung und die ggf. Behandlung der Tierbestände sollte dem aktuellen Stand der Wissenschaft entsprechen. Nach einer Studie haben Landwirte auf der einen Seite einen enorm hohen Kostendruck und nehmen daher eventuell benötigte medizinische Behandlung nicht in Anspruch. Zum anderen bemängeln Landwirte, dass sie nicht oder nur schlecht über neue wissenschaftliche Erkenntnisse informiert werden (Alarcon et al., 2014).

Mit dem Ziel eines verbesserten Schutzes vor Zoonosen und effektiverer und schnellerer, Fach- und Länder-übergreifender Reaktionen wurde die *One-Health-Initiative* durch die Weltgesundheitsorganisation ins Leben gerufen (Zinsstag et al., 2011). Die Initiative soll be-

sonders die Kommunikation zwischen dem humanmedizinischen und dem veterinärmedizinischen Sektor verbessern (Sikkema & Koopmans, 2016).

#### **4.6 Ausblick**

Die Xenotransplantation, insbesondere die Übertragung von Organen, Geweben und Zellen porcinen Ursprungs, hat das Potential, den Engpass humaner Organe für Schwerstkranke zu mindern. Dazu gibt es vielfältige Forschungsinitiativen. Jedoch müssen die Risikofaktoren immer wieder neu beurteilt werden. Hierzu zählt vor allem auch das Potential der Übertragung porciner Pathogene auf den Menschen. Diese birgt die Gefahr der Entstehung neuer, bisher nicht beherrschbarer Infektionskrankheiten des Menschen. Daher wird an der Identifizierung porciner Erreger geforscht. Das beinhaltet auch die Entwicklung möglicher Prophylaxe- und Therapie-Formen. Diese Arbeiten kommen auch der Nutztierhaltung zu Gute, denn sie könnten zur Eindämmung oder sogar Elimination wichtiger Infektionskrankheiten der Tiere führen. Zur besseren Vermeidung zoonotischer Krankheitsausbrüche weltweiten Ausmaßes müssen Humanmediziner, Mikrobiologen, Virologen und Veterinärmediziner im Sinn der *One-Health* Initiative der Weltgesundheitsorganisation zusammenarbeiten.

## 5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit sollte das zoonotische Potential respiratorischer Viren und Bakterien im Hinblick auf wechselseitige Übertragungen zwischen Landwirten und ihren Schweinen in Schleswig-Holstein im Rahmen einer Beobachtungsstudie eingeordnet werden. Jede eingesandte Probe wurde zuerst im Rahmen der Qualitätskontrolle auf die Wirtsspezies auf DNA-Ebene überprüft, dann auf Influenza-C-Virus-Genomäquivalente untersucht und das kulturelle Verfahren zur Isolierung von *Staphylococcus aureus* wurde verwendet, sowie mehrere Multiplex-PCR-Verfahren wurden eingesetzt, die ein breites Spektrum human- und Schweinepathogener, bakterieller und viraler Erreger abdecken.

Bei den 63 humanen Proben wurden durch Nukleinsäure-Amplifikationsverfahren *Staphylococcus aureus* (35), Coronaviren (12), Rhinoviren (7), *Streptococcus pneumoniae* (3), Humanes Metapneumovirus (1), Influenza-A-Virus (1) und Parainfluenzavirus Typ 4 (1) nachgewiesen. Bei den 36 entsprechenden Schweinebeständen waren *Haemophilus parasuis* (35), Enteroviren (17), Coronaviren (12), *Staphylococcus aureus* (11), *Mycoplasma hyopneumoniae* (4) und Porzines Cytomegalovirus (3) nachweisbar. Im Rahmen der Influenza-A-Virus-Testung gelang kein Beleg einer zoonotischen Übertragung und Influenza-C-Viren waren nicht nachweisbar.

Die Anzucht von *Staphylococcus aureus* gelang bei 24 der humanen Proben und einer aus einem Schweinebestand. Zwölf der *Staphylococcus-aureus*-Stämme konnten als Methicillin-resistent klassifiziert werden. Dies entspricht den erwarteten Prävalenzen. Für *Staphylococcus aureus* ergaben sich Hinweise für eine Übertragung zwischen Menschen und Schwein.

Porzines Cytomegalovirus und Humane Metapneumoviren stellten sich als wirtsspezifisch dar. *Haemophilus parasuis*, *Mycoplasma hyopneumoniae* und *Mycoplasma hyorhinis* zeigten sich hier ohne zoonotisches Potential. *Streptococcus pneumoniae* konnte nur in humanen Proben nachgewiesen werden. Aus humanen Proben waren die Humanen Coronavirus-Typen 229E und OC43 nachweisbar und aus porzinen Proben nur der Typ OC43, der aber von einem verwandten porzinen Coronavirus nicht unterscheidbar war. Für Enteroviren bestand eine hohe Prävalenz innerhalb der Schweinebestände.

Die Identifikation und Beurteilung des zoonotischen Potentials porziner Pathogene bildet eine Grundlage der Forschung zur Xenotransplantation und trägt zum globalen *One-Health*-Konzept der Weltgesundheitsorganisation bei.

## Summary

In this project, the zoonotic potential of respiratory viruses and bacteria should be classified regarding mutual transmissions between farmers and their swine live stocks in Schleswig-Holstein within an observational study. Each sent-in sample was analysed first for the host species on DNA level for quality control and for influenza-C-virus genome equivalents; the cultural procedure for the isolation of *Staphylococcus aureus* was used as well as several multiplex assays which cover a broad spectrum of human- and swine-pathogenic, bacterial and viral pathogens.

In the 63 human samples, *Staphylococcus aureus* (35), coronaviruses (12), rhinoviruses (7), *Streptococcus pneumoniae* (3), human metapneumovirus (1), influenza-A-virus (1) and parainfluenzavirus type 4 (1) were detected by nucleic-acid amplification assays. In the 36 corresponding live stocks, *Haemophilus parasuis* (35), enteroviruses (17), coronaviruses (12), *Staphylococcus aureus* (11), *Mycoplasma hyopneumoniae* (4), and porcine cytomegalovirus (3) were detectable. Upon influenza-A-virus testing, zoonotic transmission could not be demonstrated and influenza-C-viruses were not detectable.

The cultivation of *Staphylococcus aureus* was successful in 24 of the human samples and in one of the live stocks. Twelve of the *Staphylococcus aureus* isolates were classified as resistant to methicillin. This meets with expected prevalences. In the case of *Staphylococcus aureus*, there were indications for transmissions between man and swine.

Porcine cytomegalovirus und human metapneumoviruses showed host specificity. *Haemophilus parasuis*, *Mycoplasma hyopneumoniae*, and *Mycoplasma hyorhinis* did not show zoonotic potential. *Streptococcus pneumoniae* was detected in human samples, only. In human samples, the human coronavirus types 229E and OC43 were detectable, and in porcine samples only type OC43, which could not be discriminated from a related porcine coronavirus. Enteroviruses showed high prevalence in the live stocks.

The identification and interpretation of the zoonotic potential of porcine pathogens forms a basis for research in xenotransplantation and contributes to the global One-Health concept of the World Health Organization.



## 6 Literaturverzeichnis

- Ackermann M (2013) *Virus-Handbuch für Veterinärmediziner*. Stuttgart, Bern: UTB
- Adams O, Weis J, Jasinska K, Vogel M, Tenenbaum T (2015) Comparison of human metapneumovirus, respiratory syncytial virus and rhinovirus respiratory tract infections in young children admitted to hospital. *J Med Virol* 87: 275–280
- Alarcon P, Rushton J, Wieland B (2013) Cost of post-weaning multi-systemic wasting syndrome and porcine circovirus type-2 subclinical infection in England - an economic disease model. *Prev Vet Med* 110: 88–102
- Alarcon P, Wieland B, Mateus ALP, Dewberry C (2014) Pig farmers' perceptions, attitudes, influences and management of information in the decision-making process for disease control. *Prev Vet Med* 116: 223–242
- Allan GM, McNeilly F, Ellis J, Krakowka S, Meehan B, McNair I, Walker I, Kennedy S (2000) Experimental infection of colostrum deprived piglets with porcine circovirus 2 (PCV2) and porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) potentiates PCV2 replication. *Arch Virol* 145: 2421–2429
- Allegrucci M, Sauer K (2007) Characterization of colony morphology variants isolated from *Streptococcus pneumoniae* biofilms. *J Bacteriol* 189: 2030–2038
- Anbalagan S, Hesse RA, Hause BM (2014) First identification and characterization of porcine enterovirus G in the United States. *PLoS ONE* 9: e97517
- Andréoletti L, Lesay M, Deschildre A, Lambert V, Dewilde A, Wattré P (2000) Differential detection of rhinoviruses and enteroviruses RNA sequences associated with classical immunofluorescence assay detection of respiratory virus antigens in nasopharyngeal swabs from infants with bronchiolitis. *J Med Virol* 61: 341–346
- Appelbaum PC (1992) Antimicrobial resistance in *Streptococcus pneumoniae*: an overview. *Clin Infect Dis* 15: 77–83
- Azhar EI, El-Kafrawy SA, Farraj SA, Hassan AM, Al-Saeed MS, Hashem AM, Madani TA (2014) Evidence for camel-to-human transmission of MERS coronavirus. *N Engl J Med* 370: 2499–2505
- Bailey, E. S., Choi, J. Y., Fieldhouse, J. K., Borkenhagen, L. K., Zemke, J., Zhang, D., & Gray, G. C. (2018). The continual threat of influenza virus infections at the human-animal interface: What is new from a one health perspective?. *Evolution, medicine, and public health*, 2018(1), 192-198.
- Becher A, Recum JV, Schierhorn K, Wolff T, Tönnies M, Neudecker J, Rückert J, Schneider P, Gruber AD, Suttorp N, Hippenstiel S, Hocke AC (2015) Massive Infektion und alveolare Schädigung der humanen Lunge durch das Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV). *Pneumologie* 69(04), A2.
- Benschop KSM, Schinkel J, Minnaar RP, Pajkrt D, Spanjerberg L, Kraakman HC, Berkhout B, Zaaijer HL, Beld, MGHM, Wolthers KC (2006) Human parechovirus infections in Dutch children and the association between serotype and disease severity. *Clin Infect Dis* 42: 204–210
- Blomqvist S, Roivainen M, Puhakka T, Kleemola M, Hovi T (2002) Virological and serological analysis of rhinovirus infections during the first two years of life in a cohort of children. *J Med Virol* 66: 263–268

- Blusch JH, Patience C, Martin U (2002) Pig endogenous retroviruses and xenotransplantation. *Xenotransplantation* 9: 242–251
- Bogaert D, de Groot R, Hermans PWM (2004a) Streptococcus pneumoniae colonisation: the key to pneumococcal disease. *Lancet Infect Dis* 4: 144–154
- Bogaert D, van Belkum A, Sluijter M, Luijendijk A, Groot R de, Rümke HC, Verbrugh HA, Hermans PWM (2004b). Colonisation by Streptococcus pneumoniae and Staphylococcus aureus in healthy children. *Lancet* 363: 1871–1872
- Boniotti MB, Papetti A, Lavazza A, Alborali G, Sozzi E, Chiapponi C, Faccini S, Bonilauri P, Cordioli P, Marthaler D (2016) Porcine epidemic diarrhea virus and discovery of a recombinant swine enteric Coronavirus, Italy. *Emerg Infect Dis* 22: 83–87
- Bos MEH, Verstappen KM, van Cleef, Brigitte AGL, Dohmen W, Dorado-García A, Graveland H, Duim B, Wagenaar JA, Kluytmans, Jan AJW, Heederik DJJ (2016) Transmission through air as a possible route of exposure for MRSA. *J Expo Sci Environ Epidemiol* 26: 263–269
- Branche AR, Falsey AR (2016) Parainfluenza virus infection. *Semin Respir Crit Care Med* 37: 538–554
- Brockmeier SL, Loving CL, Mullins MA, Register KB, Nicholson TL, Wiseman BS, Baker RB, Kehrl ME (2013) Virulence, transmission, and heterologous protection of four isolates of Haemophilus parasuis. *Clin Vaccine Immunol* 20: 1466–1472
- Broens EM, Espinosa-Gongora C, Graat EAM, Vendrig N, van Der Wolf PJ, Guardabassi L, Butaye P, Nielsen JP, De Jong, Mart C M, van De Giessen, Arjen W (2012) Longitudinal study on transmission of MRSA CC398 within pig herds. *BMC Vet Res* 8: 58
- Broens EM, Graat EAM, van der Wolf PJ, van de Giessen AW, de Jong MCM (2011) Prevalence and risk factor analysis of livestock associated MRSA-positive pig herds in The Netherlands. *Prev Vet Med* 102: 41–49
- Burbelo PD, Ragheb JA, Kapoor A, Zhang Y (2013) The serological evidence in humans supports a negligible risk of zoonotic infection from porcine circovirus type 2. *Biologicals* 41: 430–434
- Campos J, Hernando M, Roman F, Perez-Vazquez M, Aracil B, Oteo J, Lazaro E, de Abajo F (2004) Analysis of invasive Haemophilus influenzae infections after extensive vaccination against H. influenzae type b. *J Clin Microbiol* 42: 524–529
- Caruso C, Peletto S, Rosamilia A, Modesto P, Chiavacci L, Sona B, Balsamelli F, Ghisetti V, Acutis PL, Pezzoni G, Brocchi E, Vitale N, Masoero L (2017) Hepatitis E virus: a cross-sectional serological and virological study in pigs and humans at zoonotic risk within a high-density pig farming area. *Transbound Emerg Dis* 64: 1443–1453
- Cerda-Cuellar M, Naranjo JF, Verge A, Nofrarias M, Cortey M, Olvera A, Segales J, Aragon V (2010) Sow vaccination modulates the colonization of piglets by Haemophilus parasuis. *Vet Microbiol* 145: 315–320
- Chae C (2004) Postweaning multisystemic wasting syndrome: A review of aetiology, diagnosis and pathology. *Vet J* 168: 41–49
- Chang LY, Tsao KC, Hsia SH, Shih SR, Huang CG, Chan WK, Hsu KH, Fang TY, Huang YC, Lin TY (2004). Transmission and clinical features of enterovirus 71 infections in household contacts in Taiwan. *J Amer Med Assoc* 291: 222–227

- Chen N, Tribble BR, Kerrigan MA, Tian K, Rowland RRR (2016) ORF5 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) is a target of diversifying selection as infection progresses from acute infection to virus rebound. *Infect Genet Evol* 40: 167-175
- Cheng WX, Li JS, Huang CP, Yao DP, Liu N, Cui SX, Jin Y, Duan ZJ (2010) Identification and nearly full-length genome characterization of novel porcine bocaviruses. *PLoS ONE* 5: e13583
- Cho JG, Dee SA (2006) Porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Theriogenology* 66: 655-662
- Choroszy-Krol I, Frej-Madrzak M, Hober M, Sarowska J, Jama-Kmiecik A (2014) Infections caused by *Chlamydophila pneumoniae*. *Adv Clin Exp Med* 23: 123-126
- Chu DKW, Poon LLM, Gomaa MM, Shehata MM, Perera, Ranawaka A P M, Abu Zeid D, El Rifay AS, Siu LY, Guan Y, Webby RJ, Ali MA, Peiris M, Kayali G (2014) MERS coronaviruses in dromedary camels, Egypt. *Emerging Infect Dis* 20: 1049-1053
- Chung YC, Ho MS, Wu JC, Chen WJ, Huang JH, Chou ST, Hu YC (2008) Immunization with virus-like particles of enterovirus 71 elicits potent immune responses and protects mice against lethal challenge. *Vaccine* 26: 1855-1862
- Collins PL, Crowe Jr. JE (2015) Respiratory syncytial virus and metapneumovirus. *In: Knipe DM, Howley P (editors) Fields Virology*. Philadelphia: Wolters Kluwer; S. 1602-1646
- Cooper DKC, Matsumoto S, Abalovich A, Itoh T, Mourad NI, Gianello PR, Wolf E, Cozzi E (2016) Progress in clinical encapsulated islet xenotransplantation. *Transplantation* 100: 2301-2308
- Cosio BG, Jahn A, Iglesias A, Shafiek H, Busquets X, Agusti A (2015) Haemophilus influenzae induces steroid-resistant inflammatory responses in COPD. *BMC Pulm Med* 15: 157
- Cuesta Gerveno JM, Risco Perez D, Goncalves Blanco P, Garcia Jimenez WL, Gil Molino M, Fernandez-Llario P, Hermoso de Mendoza Salcedo J, Gomez Gordo LJ (2013) Fatal infection due to *Haemophilus parasuis* in a young wild boar (*Sus scrofa*). *J Vet Diagn Invest* 25: 297-300
- Cuny C, Nathaus R, Layer F, Strommenger B, Altmann D, Witte W (2009). Nasal colonization of humans with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) CC398 with and without exposure to pigs. *PLoS ONE* 4: e6800
- Cutler SJ, Fooks AR, van der Poel, WHM (2010) Public health threat of new, reemerging, and neglected zoonoses in the industrialized world. *Emerging Infect Dis* 16: 1-7
- Dayan G, Naglaa M, Scully I, Cooper D, Begier E, Eiden J, Jansen K, Gurtman A, Anderson A (2016) *Staphylococcus aureus*: the current state of disease, pathophysiology and strategies for prevention. *Expert Rev Vaccines* 15(11), 1373-1392.
- Denner J (2017) Xenotransplantation: today and tomorrow, *Infektionskrankheiten/Erreger*. urn:nbn:de:0257-10053188
- Denner J, Mankertz A (2017) Porcine Circoviruses and Xenotransplantation. *Viruses* 9 (4), 83.
- Denner J, Tönjes RR (2012) Infection barriers to successful xenotransplantation focusing on porcine endogenous retroviruses. *Clin Microbiol Rev* 25: 318-343
- Dennis TPW, Flynn PJ, Marciel de Souza W, Singer JB, Moreau CS, Wilson SJ, Gifford RJ (2018) Insights into circovirus host range from the genomic fossil record. *J Virol* 92(16), e00145-18.
- Dooldeniya MD, Warrens AN (2003). Xenotransplantation: where are we today? *J R Soc Med* 96: 111-117

- Drexler JF, Corman VM, Drosten C (2014) Ecology, evolution and classification of bat coronaviruses in the aftermath of SARS. *Antiviral Res* 101: 45–56
- Drick N, Welte T (2016) Intensivpflichtige Virusinfektionen der unteren Atemwege. *Intensiv-med.up2date* 12: 159–174
- Du T, Nan Y, Xiao S, Zhao Q, Zhou E-M (2017) Antiviral strategies against PRRSV infection. *Trends Microbiol* 25: 968–979
- Dvorak CMT, Yang Y, Haley C, Sharma N, Murtaugh MP (2016) National reduction in porcine circovirus type 2 prevalence following introduction of vaccination. *Vet Microbiol* 189: 86–90
- El Aila NA, Al Laham NA, Ayesh BM (2017) Nasal carriage of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* among health care workers at Al Shifa hospital in Gaza Strip. *BMC Infect Dis* 17: 28
- Esona MD, Mijatovic-Rustempasic S, Yen C, Parashar UD, Gentsch JR, Bowen MD, LaRussa P (2014) Detection of PCV-2 DNA in stool samples from infants vaccinated with RotaTeq®. *Hum Vaccin Immunother* 10: 25–32
- Falsey AR, Hennessey PA, Formica MA, Cox C, Walsh EE (2005) Respiratory syncytial virus infection in elderly and high-risk adults. *N Engl J Med* 352: 1749–1759
- Felde O, Kreizinger Z, Sulyok KM, Hrivnák V, Kiss K, Jerzsele Á, Biksi I, Gyuranecz M (2018) Antibiotic susceptibility testing of *Mycoplasma hyopneumoniae* field isolates from Central Europe for fifteen antibiotics by microbroth dilution method. *PLoS ONE* 13: e0209030
- Fiebig U, Holzer A, Ivanusic D, Plotzki E, Hengel H, Neipel F, Denner J (2017) Antibody cross-reactivity between porcine cytomegalovirus (PCMV) and human herpesvirus-6 (HHV-6). *Viruses*, 9(11), 317.
- Finney LJ, Ritchie A, Pollard E, Johnston SL, Mallia P (2014) Lower airway colonization and inflammatory response in COPD: a focus on *Haemophilus influenzae*. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* 9: 1119–1132
- Finsterbusch T, Mankertz A (2009) Porcine circoviruses - small but powerful. *Virus Res* 143: 177–183
- Fischer TK, Midgley S, Dalgaard C, Nielsen AY (2014) Human parechovirus infection, Denmark. *Emerging Infect Dis* 20: 83–87
- Fishman JA (2014) Assessment of infectious risk in clinical xenotransplantation: the lessons for clinical allotransplantation. *Xenotransplantation* 21: 307–308
- Fritsch, A., Schweiger, B., & Biere, B. (2019). Influenza C virus in pre-school children with respiratory infections: retrospective analysis of data from the national influenza surveillance system in Germany, 2012 to 2014. *Eurosurveillance*, 24(10).
- Frydas IS, Nauwynck HJ (2016) Replication characteristics of eight virulent and two attenuated genotype 1 and 2 porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) strains in nasal mucosa explants. *Vet Microbiol* 182: 156–162
- Fryer JFL, Griffiths PD, Fishman JA, Emery VC, Clark DA (2001) Quantitation of porcine cytomegalovirus in pig tissues by PCR. *J Clin Microbiol* 39: 1155–1156
- Galanti M, Birger R, Ud-Dean M, et al. (2019) Longitudinal active sampling for respiratory viral infections across age groups. *Influenza Other Respi Viruses* 13: 226–232

- Gibbs SG, Green CF, Tarwater PM, Mota LC, Mena KD, Scarpino PV (2006) Isolation of antibiotic-resistant bacteria from the air plume downwind of a swine confined or concentrated animal feeding operation. *Environ Health Perspect* 114: 1032-1037
- Ginders M, Leschnik M, Künzel F, Kampner D, Mikula C, Steindl G, Eichhorn I, Feßler AT, Schwarz S, Spargser J, Loncaric I (2017) Characterization of *Streptococcus pneumoniae* isolates from Austrian companion animals and horses. *Acta Vet Scand* 59: 79
- Glanville N und Johnston SL (2015). Challenges in developing a cross-serotype rhinovirus vaccine. *Curr Opin Virol* 11: 83-88
- Gomez RS, Guisle-Marsollier I, Bohmwald K, Bueno SM, Kalergis AM (2014) Respiratory Syncytial Virus: pathology, therapeutic drugs and prophylaxis. *Immunol Lett* 162: 237-247
- Gong SR, Bao LL (2018) The battle against SARS and MERS coronaviruses: reservoirs and animal models. *Animal Model Exp Med* 1: 125-133
- Goullon U (2012) Universitätsklinikum Kiel führt Untersuchung zu Erkältungskrankheiten bei Schweinehaltern durch. *Bauernblatt Schleswig-Holstein*, Dezember 2012
- Graaf H de, Pelosi E, Cooper A, Pappachan J, Sykes K, MacIntosh I, Gbesemete D, Clark TW, Patel SV, Faust SN, Tebruegge M (2016) Severe enterovirus infections in hospitalized children in the South of England: clinical phenotypes and causative genotypes. *Pediatr Infect Dis J* 35: 723-727
- Greber UF, Arnberg N, Wadell G, Benko M, Kremer, EJ (2013) Adenoviruses - from pathogens to therapeutics: a report on the 10th International Adenovirus Meeting. *Cell Microbiol* 15: 16-23
- Green CF, Gibbs SG, Tarwater PM, Mota LC, Scarpino PV (2006) Bacterial plume emanating from the air surrounding swine confinement operations. *J Occupat Environ Hygiene* 3: 9-15
- Gu W, Zeng N, Zhou L, Ge X, Guo X, Yang H (2014) Genomic organization and molecular characterization of porcine cytomegalovirus. *Virology* 460-461: 165-172
- Guery B, Poissy J, el Mansouf L, Séjourné C, Ettahar N, Lemaire X, Vuotto F, Goffard A, Behillil S, Enouf V, Caro V, Mailles A, Che D, Manuguerra J-C, Mathieu D, Fontanet A, van der Werf S (2013) Clinical features and viral diagnosis of two cases of infection with Middle East Respiratory Syndrome coronavirus: A report of nosocomial transmission. *Lancet* 381: 2265-2272
- Gurda BL, Parent KN, Bladek H, Sinkovits RS, DiMattia MA, Rence C, Castro A, McKenna R, Olson N, Brown K, Baker TS, Agbandje-McKenna M (2010) Human bocavirus capsid structure: insights into the structural repertoire of the parvoviridae. *J Virol* 84: 5880-5889
- Hathaway LJ, Grandgirard D, Valente LG, Täuber MG, Leib SL (2016) *Streptococcus pneumoniae* capsule determines disease severity in experimental pneumococcal meningitis. *Open Biol* 6(3), 150269.
- Hayden FG (2004) Rhinovirus and the lower respiratory tract. *Rev Med Virol* 14: 17-31
- Henningson JN, Rajao DS, Kitikoon P, Lorusso A, Culhane MR, Lewis NS, Anderson TK, Vincent AL (2015) Comparative virulence of wild-type H1N1pdm09 influenza A isolates in swine. *Vet Microbiol* 176: 40-49
- Henrickson KJ (2003) Parainfluenza viruses. *Clin Microbiol Rev* 16: 242-264
- Himmelreich R, Hilbert H, Plagens H, Pirkl E, Li BC, Herrmann R (1996) Complete sequence analysis of the genome of the bacterium *Mycoplasma pneumoniae*. *Nucleic Acids Res* 24: 4420-4449

- Hirano N, Suzuki Y, Haga S (1999) Pigs with highly prevalent antibodies to human coronavirus and swine haemagglutinating encephalomyelitis virus in the Tohoku District of Japan. *Epidemiol Infect* 122: 545–551
- Hogan AB, Glass K, Moore HC, Anderssen RS (2016) Exploring the dynamics of respiratory syncytial virus (RSV) transmission in children. *Theor Popul Biol* 110: 78–85
- Huggins LG, Robinson KD, Lasko KP, Clower LB, Gookin AJ, Segraves DE, Gainer JC, Basagic GP, Machuca KR, Rendon J (2018) Screening for community-acquired strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* susceptible to extracts of *Centaurea nigrescens*. *The Journal of Phytopharmacology* 2018; 7(3): 298–304.
- Hui D et al. The continuing 2019-nCoV epidemic threat of novel coronaviruses to global health-The latest 2019 novel coronavirus outbreak in Wuhan, China. *International journal of infectious diseases: IJID: official publication of the International Society for Infectious Diseases*, 2020, 91. Jg., S. 264.
- Huzly D (2014) Enterovirus-Infektionen. *In: S2k-Leitlinie Labordiagnostik schwangerschaftsrelevanter Virusinfektionen*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; S. 125–132
- Jacobs E, Ehrhardt I, Dumke R (2015) New insights in the outbreak pattern of *Mycoplasma pneumoniae*. *Int J Med Microbiol* 305: 705–708
- Kallen AJ, Mu Y, Bulens S, Reingold A, Petit S, Gershman K, Ray SM, Harrison LH, Lynfield R, Dumyati G, Townes JM, Schaffner W, Patel PR, Fridkin SK (2010) Health care-associated invasive MRSA infections, 2005–2008. *J Amer Med Assoc* 304: 641–648
- Karron RA und Collins PA (2015). Parainfluenza viruses. *In: Knipe DM, Howley P (editors) Fields Virology*. Philadelphia: Wolters Kluwer; S. 1497–1526
- Karsai A, Müller S, Platz S, Hauser M-T (2002). Evaluation of a homemade SYBR green I reaction mixture for real-time PCR quantification of gene expression. *BioTechniques* 32: 790
- Kim KY, Han SY, Kim HS, Cheong HM, Kim SS, Kim DS (2017) Human coronavirus in the 2014 winter season as a cause of lower respiratory tract infection. *Yonsei Med J* 58: 174–179
- Kinross P, Petersen A, Skov R, van Hauwermeiren E, Pantosti A, Laurent F, Voss A, Kluytmans J, Struelens MJ, Heuer O, Monnet DL (2017) Livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) among human MRSA isolates, European Union/European Economic Area countries, 2013. *Euro Surveill* 22, (44)
- Klevens RM, Morrison MA, Nadle J, Petit S, Gershman K, Ray S, Harrison LH, Lynfield R, Dumyati G, Townes JM, Craig AS, Zell ER, Fosheim GE, McDougal LK, Carey RB, Fridkin SK (2007) Invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in the United States. *J Amer Med Assoc* 298: 1763–1771
- Kock R, Loth B, Koksall M, Schulte-Wulwer J, Harlizius J, Friedrich AW (2012) Persistence of nasal colonization with livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pig farmers after holidays from pig exposure. *Appl Environ Microbiol* 78: 4046–4047
- Kock R, Mellmann A, Schaumburg F, Friedrich AW, Kipp F, Becker K (2011) The epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Germany. *Dtsch Arztebl Int* 108: 761–767
- Kramer S, Crauwels P, Bohn R, Radzimski C, Szaszak M, Klinger M, Rupp J, van Zandbergen G (2015). AP-1 transcription factor serves as a molecular switch between *Chlamydia pneumoniae* replication and persistence. *Infect Immun* 83: 2651–2660

- Kresken M, Hafner D, Körber-Irrgang B (2010) Epidemiologie und Resistenzsituation bei klinisch wichtigen Infektionserregern aus dem Hospitalbereich gegenüber Antibiotika. Bericht über die Ergebnisse einer multizentrischen Studie der Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie eV aus dem Jahre 2010: 1–68
- Krumbholz A, Joel S, Dremsek P, Neubert A, Johne R, Dürrwald R, Walther M, Müller TH, Kühnel D, Lange J, Wutzler P, Sauerbrei A, Ulrich RG, Zell R (2014) Seroprevalence of hepatitis E virus (HEV) in humans living in high pig density areas of Germany. *Med Microbiol Immunol* 203: 273–282
- Krumbholz A, Mohn U, Lange J, Motz M, Wenzel JJ, Jilg W, Walther M, Straube E, Wutzler P, Zell R (2012) Prevalence of hepatitis E virus-specific antibodies in humans with occupational exposure to pigs. *Med Microbiol Immunol* 201: 239–244
- Krumholz HM (2014) Neuraminidase inhibitors for influenza. *BMJ* 348: g2548
- Kumar S, Saigal SR, Sethi GR, Kumar S (2016). Application of serology and nested polymerase chain reaction for identifying *Chlamydomonas pneumoniae* in community-acquired lower respiratory tract infections in children. *Indian J Pathol Microbiol* 59: 499–503
- Kumthip K, Khamrin P, Kongkaew A, Vachirachewin R, Malasao R, Ushijima H, Maneekarn N (2019) Molecular epidemiology and characterization of porcine adenoviruses in pigs with diarrhea in Thailand. *Infect Genet Evol* 67: 73–77
- Kuntz-Simon G, Madec F (2009) Genetic and antigenic evolution of swine influenza viruses in Europe and evaluation of their zoonotic potential. *Zoonoses Public Health* 56: 310–325
- Lai M, Perlman S, Anderson LJ (2015) Coronaviridae. *In: Knipe DM, Howley P (editors) Fields Virology*. Philadelphia: Wolters Kluwer; S. 1305–1335
- Lau SKP, Woo PCY, Wu Y, Wong AYP, Wong BHL, Lau CCY, Fan RYY, Cai JP, Tsoi HW, Chan KH, Yuen KY (2013) Identification and characterization of a novel paramyxovirus, porcine parainfluenza virus 1, from deceased pigs. *J Gen Virol* 94: 2184–2190
- Laude H, van Reeth K, Pensaert M (1993) Porcine respiratory coronavirus: molecular features and virus-host interactions. *Vet Res* 24: 125–150
- Li W, Shi Z, Yu M, Ren W, Smith C, Epstein JH, Wang H, Crameri G, Hu Z, Zhang H, Zhang J, McEachern J, Field H, Daszak P, Eaton BT, Zhang S, Wang LF (2005). Bats are natural reservoirs of SARS-like coronaviruses. *Science* 310: 676–679
- Lim D, Strynadka NCJ (2002) Structural basis for the beta lactam resistance of PBP2a from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Nat Struct Biol* 9: 870–876
- Lion T (2014) Adenovirus infections in immunocompetent and immunocompromised patients. *Clin Microbiol Rev* 27: 441–462
- Liu WK, Liu Q, Chen DH, Liang HX, Chen XK, Huang WB, Qin S, Yang ZF, Zhou R (2013a) Epidemiology and clinical presentation of the four human parainfluenza virus types. *BMC Infect Dis* 13: 28
- Liu X, Liao S, Zhu L, Xu Z, Zhou Y (2013b) Molecular epidemiology of porcine Cytomegalovirus (PCMV) in Sichuan Province, China: 2010–2012. *PLoS ONE* 8: e64648
- Lorbach JN, Wang L, Nolting JM, Benjamin MG, Killian ML, Zhang Y, Bowman AS (2017) Porcine hemagglutinating encephalomyelitis virus and respiratory disease in exhibition swine, Michigan, USA, 2015. *Emerging Infect Dis* 23: 1168–1171

- Lu, R., Zhao, X., Li, J., Niu, P., Yang, B., Wu, H. & Bi, Y. (2020). Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *The Lancet*.
- Luehrs A, Siegenthaler S, Grützner N, Grosse Beilage E, Kuhnert P, Nathues H (2017) Occurrence of *Mycoplasma hyorhinis* infections in fattening pigs and association with clinical signs and pathological lesions of enzootic pneumonia. *Vet Microbiol* 203: 1-5
- Lunney JK, Fang Y, Ladinig A, Chen N, Li Y, Rowland B, Renukaradhya GJ (2016) Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV): pathogenesis and interaction with the immune system. *Annu Rev Anim Biosci* 4: 129-154
- Macedo N, Rovira A, Torremorell M (2015) *Haemophilus parasuis*: infection, immunity and enrofloxacin. *Vet Res* 46: 128
- Machnowska P, Ellerbroek L, Johne R (2014) Detection and characterization of potentially zoonotic viruses in faeces of pigs at slaughter in Germany. *Vet Microbiol* 168: 60-68
- Mack, Alison, et al. (2015). *Emerging Viral Diseases: The One Health Connection: Workshop Summary*. National Academies Press, 2015.
- Maes D, Segales J, Meyns T, Sibila M, Pieters M, Haesebrouck F (2008) Control of *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in pigs. *Vet Microbiol* 126: 297-309
- Mandell LA, Wunderink RG, Anzueto A, Bartlett JG, Campbell GD, Dean NC, Dowell SF, File TM, JR, Musher DM, Niederman MS, Torres A, Whitney CG (2007) Infectious Diseases Society of America and American Thoracic Society consensus guidelines on the management of community-acquired pneumonia in adults. *Clin Infect Dis* 44 Suppl 2: 72
- Marras SAE, Kramer FR, Tyagi S (2002) Efficiencies of fluorescence resonance energy transfer and contact-mediated quenching in oligonucleotide probes. *Nucleic Acids Res* 30: e122
- Martinson B, Zoghby W, Barrett K, Bryson L, Christmas R, Minion FC, Kroll J (2018) Efficacy of an inactivated *Mycoplasma hyorhinis* vaccine in pigs. *Vaccine* 36: 408-412
- Martinson B, Zoghby W, Barrett K, Bryson L, Kroll J (2019) Duration of immunity for an inactivated *Mycoplasma hyorhinis* vaccine in pigs. *Vet Microbiol* 230: 273-277
- Marx A, Török TJ, Holman RC, Clarke MJ, Anderson LJ (1997) Pediatric hospitalizations for Croup (Laryngotracheobronchitis): biennial increases associated with human parainfluenza virus 1 epidemics. *J Infect Dis* 176: 1423-1427
- Matsumoto S, Tan P, Baker J, Durbin K, Tomiya M, Azuma K, Doi M, Elliott RB (2014) Clinical porcine islet xenotransplantation under comprehensive regulation. *Transplant Proc* 46: 1992-1995
- Matsuzaki Y, Ikeda T, Abiko C, Aoki Y, Mizuta K, Shimotai Y, Sugawara K, Hongo S (2012) Detection and quantification of influenza C virus in pediatric respiratory specimens by real-time PCR and comparison with infectious viral counts. *J Clin Virol* 54: 130-134
- Meemken D, Blaha T, Tegeler R, Tenhagen B-A, Guerra B, Hammerl JA, Hertwig S, Kasbohrer A, Appel B, Fetsch A (2010) Livestock associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (LaMRSA) isolated from lesions of pigs at necropsy in northwest Germany between 2004 and 2007. *Zoonoses Public Health* 57: 8
- Mikola I, Balogh G, Nagy A, Mátyás M, Glávits R, Stipkovits L (1997) *Mycoplasma pneumoniae* járvány, mint zoonosis. *Orv Hetil* 138: 2933-2935
- Moller K, Kilian M (1990) V factor-dependent members of the family Pasteurellaceae in the porcine upper respiratory tract. *J Clin Microbiol* 28: 2711-2716



- Mori M, Morio T, Ito S, Morimoto A, Ota S, Mizuta K, Iwata T, Hara T, Saji T (2014) Risks and prevention of severe RS virus infection among children with immunodeficiency and Down's syndrome. *J Infect Chemother* 20: 455–459
- Morozov VA, Morozov AV, Denner J (2016) New PCR diagnostic systems for the detection and quantification of porcine cytomegalovirus (PCMV). *Arch Virol* 161: 1159–1168
- Mülhardt C (Hrsg.) (2013) *Der Experimentator Molekularbiologie/Genomics*. Berlin, Heidelberg, Springer
- Myers KP, Olsen CW, Gray GC (2007) Cases of swine influenza in humans: a review of the literature. *Clin Infect Dis* 44: 1084–1088
- Mynarek M, Ganzenmüller T, Müller-Heine A, Mielke C, Gonnermann A, Beier R, Sauer M, Eiz-Vesper B, Kohstall U, Sykora K-W, Heim A, Mäcker-Kolhoff B (2014) Patient, virus, and treatment-related risk factors in pediatric adenovirus infection after stem cell transplantation: results of a routine monitoring program. *Biol Blood Marrow Transplant* 20: 250–256
- Nelson MI, Vincent AL (2015) Reverse zoonosis of influenza to swine: new perspectives on the human-animal interface. *Trends Microbiol* 23: 142–153
- Neumann G, Noda T, Kawaoka Y (2009) Emergence and pandemic potential of swine-origin H1N1 influenza virus. *Nature* 459: 931–939
- Nichol KL, D'Heilly S, Ehlinger E (2005) Colds and influenza-like illnesses in university students: impact on health, academic and work performance, and health care use. *Clin Infect Dis* 40: 1263–1270
- Niemann H, Petersen B (2016) The production of multi-transgenic pigs: update and perspectives for xenotransplantation. *Transgenic Res* 25: 361–374
- Nygaard AB, Jørgensen CB, Cirera S, Fredholm M (2007) Selection of reference genes for gene expression studies in pig tissues using SYBR green qPCR. *BMC Mol Biol* 8: 67.
- Opriessnig T, Giménez-Lirola LG, Halbur PG (2011) Polymicrobial respiratory disease in pigs. *Anim Health Res Rev* 12: 133–148
- Otto M (2014) Staphylococcus aureus toxins. *Curr Opin Microbiol* 17: 32–37
- Paige SB, Malavé C, Mbabazi E, Mayer J, Goldberg TL (2015) Uncovering zoonoses awareness in an emerging disease 'hotspot'. *Soc Sci Med* 129: 78–86
- Palinski RM, Chen Z, Henningson JN, Lang Y, Rowland RRR, Fang Y, Prickett J, Gauger PC, Hause BM (2016) Widespread detection and characterization of porcine parainfluenza virus 1 in pigs in the USA. *J Gen Virol* 97: 281–286
- Pallansch M, Roos R (2015) Enteroviruses: polioviruses, coxsackieviruses, echoviruses, and newer enteroviruses. *In: Knipe DM, Howley P (editors) Fields Virology*. Philadelphia: Wolters Kluwer; S. 839–893
- Palzer A, Kolb K, Strutzberg-Minder K, Zoels S, Eddicks M, Heinritzi K, Ritzmann M (2015) Serologische Verlaufsuntersuchungen auf Haemophilus parasuis und Mycoplasma hyorhinis in drei Schweine-haltenden Betrieben. *Schweiz Arch Tierheilkd* 157: 97–103
- Panning M (2013). Influenza heute und in Zukunft. *Pneumologie* 10: 314–325
- Panuska JR, Hertz MI, Taraf H, Villani A, Cirino NM (1992). Respiratory syncytial virus infection of alveolar macrophages in adult transplant patients. *Am Rev Respir Dis* 145: 934–939
- Paynter S, Ware RS, Sly PD, Williams G, Weinstein P (2015) Seasonal immune modulation in humans: observed patterns and potential environmental drivers. *J Infect* 70: 1–10

- Peiris JSM, Guan Y, Yuen KY (2004) Severe acute respiratory syndrome. *Nat Med* 10: 97
- Pelaez A, Lyon GM, Force SD, Ramirez AM, Neujahr DC, Foster M, Naik PM, Gal AA, Mitchell PO, Lawrence EC (2009) Efficacy of oral ribavirin in lung transplant patients with respiratory syncytial virus lower respiratory tract infection. *J Heart Lung Transplant* 28: 67–71
- Perlman S, Netland J (2009) Coronaviruses post-SARS: update on replication and pathogenesis. *Nat Rev Microbiol* 7: 439–450
- Perrin BJ, Ervasti JM (2010) The actin gene family: function follows isoform. *Cytoskeleton (Hoboken)* 67: 630–634
- Plotzki E, Keller M, Ivanusic D, Denner J (2016) A new Western blot assay for the detection of porcine cytomegalovirus (PCMV). *J Immunol Methods* 437: 37–42
- Principi N, Esposito S (2014) Paediatric human metapneumovirus infection: epidemiology, prevention and therapy. *J Clin Virol* 59: 141–147
- Proença-Modena JL, Gagliardi TB, Escremim de Paula F, Iwamoto MA, Criado MF, Camara AA, Acrani GO, Cintra OAL, Cervi MC, de Paula Arruda, Luisa Karla, Arruda E, Aguilar PV (2011) Detection of human bocavirus mRNA in respiratory secretions correlates with high viral load and concurrent Diarrhea. *PLoS ONE* 6: e21083
- Raghunandan R, Lu H, Zhou B, Xabier MG, Massare MJ, Flyer DC, Fries LF, Smith GE, Glenn GM (2014) An insect cell derived respiratory syncytial virus (RSV) F nanoparticle vaccine induces antigenic site II antibodies and protects against RSV challenge in cotton rats by active and passive immunization. *Vaccine* 32: 6485–6492
- Rasschaert D, Duarte M, Laude H (1990) Porcine respiratory coronavirus differs from transmissible gastroenteritis virus by a few genomic deletions. *J Gen Virol* 71: 2599–2607
- Reichel M., Heisig P., Kampf G. (2011) Identification of variables for aerobic bacterial density at clinically relevant skin sites, *J Hospital Infect* 78: 5-10
- Robert Koch-Institut (2019) Empfehlungen der Ständigen Impfkommission (STIKO) am Robert Koch-Institut)
- Robinson CM, Singh G, Lee JY, Dehghan S, Rajaiya J, Liu EB, Yousuf MA, Betensky RA, Jones MS, Dyer DW, Seto D, Chodosh J (2013) Molecular evolution of human adenoviruses. *Sci Rep* 3: 1812
- Rosadini CV, Ram S, Akerley BJ (2014) Outer membrane protein P5 is required for resistance of nontypeable *Haemophilus influenzae* to both the classical and alternative complement pathways. *Infect Immun* 82: 640–649
- Rose MA (2014) Infektionen der oberen Atemwege. *Monatsschr Kinderheilkd* 162: 137–145
- Rothe C, Schunk M, Sothmann P, Bretzel G, Froeschl G, Wallrauch C, Zimmer T, Thiel V, Janke C, Guggemos W, Seilmaier M, Drosten C, Vollmar P, Zwirgmaier K, Zange S, Wölfel R, Hoelscher M (2020) Transmission of 2019-nCoV Infection from an Asymptomatic Contact in Germany. *NEJM*, PMID:32003551
- Royston L, Tapparel C (2016) Rhinoviruses and respiratory enteroviruses: not as simple as ABC. *Viruses* 8(1), 16.
- Saunders-Hastings PR, Krewski D (2016) Reviewing the history of pandemic influenza: understanding patterns of emergence and transmission. *Pathogens* 5 (4), 66
- Schaberg T, Burger R (2010) Die Influenza-Pandemie der Saison 2009/2010. *Pneumologie* 64: 755

- Schmithausen RM, Schulze-Geisthoevel SV, Heinemann C, Bierbaum G, Exner M, Petersen B, Steinhoff-Wagner J (2018) Reservoirs and transmission pathways of resistant indicator bacteria in the biotope pig stable and along the food chain: a review from a One Health perspective. *Sustainability* 10: 3967
- Schöffel N, Klingelhöfer D, Braun M, Brüggmann D, Groneberg DA (2018) Hand-Fuß-Mund-Krankheit (HFMK). *Zbl Arbeitsmed* 68: 91–93
- Schulze-Röbbecke R (2015). Übertragung nosokomialer Infektionen und Prinzipien der Transmissionsprävention. *Krankenh hyg. up2date* 09: 281–300
- Sederdahl, B. K., & Williams, J. V. (2020). Epidemiology and Clinical Characteristics of Influenza C Virus. *Viruses*, 12(1), 89.
- Segalés J (2012) Porcine circovirus type 2 (PCV2) infections: clinical signs, pathology and laboratory diagnosis. *Virus Res* 164: 10–19
- Semaan M, Ivanusic D, Denner J (2015). Cytotoxic effects during knock out of multiple porcine endogenous retrovirus (PERV) sequences in the pig genome by zinc finger nucleases (ZFN). *PLoS ONE* 10: e0122059
- Sewell EWC, Brown ED (2014) Taking aim at wall teichoic acid synthesis: new biology and new leads for antibiotics. *J Antibiot* 67: 43–51
- Shin IS, Kim D, Yang SJ, Lim BC, Cha Y, Kim S, Cho TJ (2018) Production and storage of virus simulants. *J Bacteriol Virol* 48: 37
- Sikkema R, Koopmans M (2016) One Health training and research activities in Western Europe. *Infect Ecol Epidemiol* 6: 33703
- Sommerkorn FM, Schauer B, Schreiner T, Fickenscher H, Krumbholz A (2017) Performance of Hepatitis E Virus (HEV)-antibody tests: a comparative analysis based on samples from individuals with direct contact to domestic pigs or wild boar in Germany. *Med Microbiol Immunol* 206: 277–286
- Statistisches Amt für Hamburg und Schleswig-Holstein (2016a). Die Schweinebestände in Schleswig-Holstein. [https://www.statistik-nord.de/fileadmin/Dokumente/Statistische\\_Berichte/landwirtschaft/C\\_III\\_1\\_hj\\_S\\_Achtung\\_Unterscheidung\\_Mai-November-Produkt/C\\_III%201\\_hj161\\_SH\\_endg%C3%BCftig.pdf](https://www.statistik-nord.de/fileadmin/Dokumente/Statistische_Berichte/landwirtschaft/C_III_1_hj_S_Achtung_Unterscheidung_Mai-November-Produkt/C_III%201_hj161_SH_endg%C3%BCftig.pdf)
- Statistisches Amt für Hamburg und Schleswig-Holstein (2016b). Die Viehwirtschaft in Schleswig-Holstein 2015. [https://www.statistik-nord.de/fileadmin/Dokumente/Statistische\\_Berichte/landwirtschaft/C\\_III\\_j\\_S/C\\_III\\_j15\\_SH.pdf](https://www.statistik-nord.de/fileadmin/Dokumente/Statistische_Berichte/landwirtschaft/C_III_j_S/C_III_j15_SH.pdf)
- Sun J, Yang M, Sreevatsan S, Davies PR (2015) Prevalence and characterization of *Staphylococcus aureus* in growing pigs in the USA. *PLoS ONE* 10: e0143670
- Suradhat S, Wongyanin P, Kesdangsakonwut S, Teankum K, Lumyai M, Triyarach S, Thanawongnuwech R (2015) A novel DNA vaccine for reduction of PRRSV-induced negative immunomodulatory effects: a proof of concept. *Vaccine* 33: 3997–4003
- Takacova M, Holotnakova T, Vondracek J, Machala M, Pencikova K, Gradin K, Poellinger L, Pastorek J, Pastorekova S, Kopacek J (2009) Role of aryl hydrocarbon receptor in modulation of the expression of the hypoxia marker carbonic anhydrase IX. *Biochem J* 419: 419–425
- Tan WSD, Peh HY, Liao W, Pang CH, Chan TK, Lau SH, Chow VT, Wong WSF (2016) Cigarette Smoke-induced lung disease predisposes to more severe infection with nontypeable *Haemophilus influenzae*: protective effects of andrographolide. *J Nat Prod* 79: 1308–1315

- Tettelin H, Nelson KE, Paulsen IT, Eisen JA, Read TD, Peterson S, Heidelberg J, DeBoy RT, Haft DH, Dodson RJ, Durkin AS, Gwinn M, Kolonay JF, Nelson WC, Peterson JD, Umayam LA, White O, Salzberg SL, Lewis MR, Radune D, Holtzapple E, Khouri H, Wolf AM, Utterback TR, Hansen CL, McDonald LA, Feldblyum TV, Angiuoli S, Dickinson T, Hickey EK, Holt IE, Loftus BJ, Yang F, Smith HO, Venter JC, Dougherty BA, Morrison DA, Hollingshead SK, Fraser CM (2001) Complete genome sequence of a virulent isolate of *Streptococcus pneumoniae*. *Science* 293: 498–506
- Thapaliya D, Hanson BM, Kates A, Klostermann CA, Nair R, Wardyn SE, Smith TC (2015) Zoonotic Diseases of Swine: Food-borne and Occupational Aspects of Infection. *In: Sing A (editor) Zoonoses - Infections affecting humans and animals*. Dordrecht: Springer Netherlands; S. 23–68
- Tong SYC, Davis JS, Eichenberger E, Holland TL, Fowler VG, JR (2015) *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clin Microbiol Rev* 28: 603–661
- Tully JG, Bove JM, Laigret F, Whitcomb RF (1993) Notes: revised taxonomy of the class mollicutes: proposed elevation of a monophyletic cluster of arthropod-associated Mollicutes to ordinal rank (Entomoplasmatales ord. nov.), with provision for familial rank to separate species with nonhelical morphology (Entomoplasmataceae fam. nov.) from helical species (Spiroplasmataceae), and emended descriptions of the Order Mycoplasmatales, Family Mycoplasmataceae. *Int J Syst Bacteriol* 43: 378–385
- Turner RB, Couch RB (2015) Rhinoviruses. *In: Knipe DM, Howley P (editors) Fields Virology*. Philadelphia: Wolters Kluwer; S. 895–909
- Vabret A, Dina J, Brison E, Brouard J, Freymuth F (2009) Coronavirus humains (HCoV). *Pathol Biol (Paris)* 57: 149–160
- Vaillant L, La Ruche G, Tarantola A, Barboza P (2009) Epidemiology of fatal cases associated with pandemic H1N1 influenza 2009. *Euro Surveill* 14(33), 19309
- van Cleef BA, van Benthem BH, Verkade EJ, van Rijen M, Kluytmans-van den Bergh MFQ, Schouls LM, Duim B, Wagenaar JA, Graveland H, Bos MEH, Heederik D, Kluytmans JAJW (2014) Dynamics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* carriage in pig farmers: a prospective cohort study. *Clin Microbiol Infect* 20: 71
- van den Hoogen BG, de Jong JC, Groen J, Kuiken T, de Groot R, Fouchier RA, Osterhaus AD (2001) A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease. *Nat Med* 7: 719–724
- van der Poll T, Opal SM (2009) Pathogenesis, treatment, and prevention of pneumococcal pneumonia. *Lancet* 374: 1543–1556
- van Duijkeren E, Jansen MD, Flemming SC, Neeling H de, Wagenaar JA, Schoormans AHW, van Nes A, Fluit AC (2007) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pigs with exudative epidermitis. *Emerging Infect Dis* 13: 1408–1410
- van Kempen M, Bachert C, van Cauwenberge P (1999) An update on the pathophysiology of rhinovirus upper respiratory tract infections. *Rhinology* 37: 97–103
- van Reeth K, Nauwynck H, Pensaert M (1996) Dual infections of feeder pigs with porcine reproductive and respiratory syndrome virus followed by porcine respiratory coronavirus or swine influenza virus: A clinical and virological study. *Vet Microbiol* 48: 325–335

- Verstappen KM, Willems E, Fluit AC, Duim B, Martens M, Wagenaar JA (2017) *Staphylococcus aureus* nasal colonization differs among pig lineages and is associated with the presence of other staphylococcal species. *Front Vet Sci* 4: 97
- Vijaykrishna D, Poon LLM, Zhu HC, Ma SK, Li OTW, Cheung CL, Smith GJD, Peiris JSM, Guan Y (2010) Reassortment of pandemic H1N1/2009 influenza A virus in swine. *Science* 328: 1529
- Vijgen L, Keyaerts E, Lemey P, Maes P, van Reeth K, Nauwynck H, Pensaert M, van Ranst M (2006) Evolutionary history of the closely related group 2 coronaviruses: porcine hemagglutinating encephalomyelitis virus, bovine coronavirus, and human coronavirus OC43. *J Virol* 80: 7270–7274
- Vilar MJ, Peralta B, García-Bocanegra I, Simon-Grifé M, Bensaid A, Casal J, Segalés J, Pina-Pedrero S (2016) Distribution and genetic characterization of Enterovirus G and Sapelovirus A in six Spanish swine herds. *Virus Res* 215: 42–49
- Waites KB, Talkington DF (2004) *Mycoplasma pneumoniae* and its role as a human pathogen. *Clin Microbiol Rev* 17: 697
- Waldmann KH, Plonait H, Bickhardt K (Hrsg.) (2004) *Lehrbuch der Schweinekrankheiten*. Stuttgart: Parey
- Walsh EE (2012) Respiratory syncytial virus. *In: Goldman's Cecil Medicine: Elsevier*; S. 2091–2092
- Wang X, Li H, Xia Z (2015) *Chlamydia pneumoniae pneumonia*. *In: Li H (Hg.) Radiology of infectious diseases: Volume 2*. Dordrecht: Springer Netherlands; S. 69–74
- Whitman WB, Rainey F, Kämpfer P, Trujillo M, Chun J, DeVos P, Hedlund B, Dedysh S (2015) *Bergey's manual of systematics of Archaea and Bacteria*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd
- Wold WSM, Horwitz MS (2015) Adenoviruses. *In: Knipe DM, Howley P (editors) Fields Virology*. Philadelphia: Wolters Kluwer; S. 2395–2436
- Wong SM, Bernui M, Shen H, Akerley BJ (2013) Genome-wide fitness profiling reveals adaptations required by *Haemophilus* in coinfection with influenza A virus in the murine lung. *Proc Natl Acad Sci USA* 110: 15413–15418
- Wright PF, Neumann G, Kawaoka Y (2015) Orthomyxoviruses. *In: Knipe DM, Howley P (editors) Fields Virology*. Philadelphia: Wolters Kluwer; S. 1692–1740
- Yamada K, Tasaki M, Sekijima M, Wilkinson RA, Villani V, Moran SG, Cormack TA, Hanekamp IM, Hawley RJ, Arn JS, Fishman JA, Shimizu A, Sachs DH (2014) Porcine cytomegalovirus infection is associated with early rejection of kidney grafts in a pig to baboon xenotransplantation model. *Transplantation* 98: 411–418
- Yoon KJ, Edington N (2006) Porcine cytomegalovirus. *Diseases of swine*. 9th ed., Ames, Iowa: Blackwell Publishing: 323–329
- Yu JM, Li XY, Ao YY, Li LL, Liu N, Li JS, Duan ZJ, Kapoor A (2013) Identification of a novel picornavirus in healthy piglets and seroepidemiological evidence of its presence in humans. *PLoS ONE* 8: e70137
- Yuanji, G., Fengen, J., Ping, W., Min, W., & Jiming, Z. (1983). Isolation of influenza C virus from pigs and experimental infection of pigs with influenza C virus. *Journal of General Virology*, 64(1), 177-182.

- Zell R, Delwart E, Gorbalenya AE, Hovi T, King AMQ, Knowles NJ, Lindberg AM, Pallansch MA, Palmenberg AC, Reuter G, Simmonds P, Skern T, Stanway G, Yamashita T (2017) ICTV Virus Taxonomy Profile: Picornaviridae. *J Gen Virol* 98: 2421–2422
- Zhai S, Yue C, Wei Z, Long J, Ran D, Lin T, Deng Y, Huang L, Sun L, Zheng H, Gao F, Zheng H, Chen S, Yuan S (2010) High prevalence of a novel porcine bocavirus in weanling piglets with respiratory tract symptoms in China. *Arch Virol* 155: 1313–1317
- Zhang, H., Porter, E., Lohman, M., Lu, N., Peddireddi, L., Hanzlicek, G. & Bai, J. (2018). Influenza C virus in cattle with respiratory disease, United States, 2016–2018. *Emerging infectious diseases*, 24(10), 1926.
- Zhang, S. F., Tuo, J. L., Huang, X. B., Zhu, X., Zhang, D. M., Zhou, K., ... & Li, M. F. (2018). Epidemiology characteristics of human coronaviruses in patients with respiratory infection symptoms and phylogenetic analysis of HCoV-OC43 during 2010-2015 in Guangzhou. *PloS one*, 13(1).
- Zhang Q, Young TF, Ross RF (1995) Identification and characterization of a *Mycoplasma hyopneumoniae* adhesin. *Infect Immun* 63: 1013–1019
- Zhou NN, Senne DA, Landgraf JS, Swenson SL, Erickson G, Rossow K, Liu L, Yoon KJ, Krauss S, Webster RG (1999) Genetic reassortment of avian, swine, and human influenza A viruses in American pigs. *J Virol* 73: 8851–8856
- Zhou Z, Liu T, Zhang J, Zhan P, Liu X (2018) Influenza A virus polymerase: an attractive target for next-generation anti-influenza therapeutics. *Drug Discov Today* 23: 503–518
- Zhu H, Wang D, Kelvin DJ, Li L, Zheng Z, Yoon S-W, Wong S-S, Farooqui A, Wang J, Banner D, Chen R, Zheng R, Zhou J, Zhang Y, Hong W, Dong W, Cai Q, Roehrl MHA, Huang SSH, Kelvin AA, Yao T, Zhou B, Chen X, Leung GM, Poon LLM, Webster RG, Webby RJ, Peiris JSM, Guan Y, Shu Y (2013) Infectivity, transmission, and pathology of human-isolated H7N9 influenza virus in ferrets and pigs. *Science* 341: 183–186
- Zinsstag J, Schelling E, Waltner-Toews D, Tanner M (2011) From "one medicine" to "one health" and systemic approaches to health and well-being. *Prev Vet Med* 101: 148–156

## 7 Anhang

**FRAGEBOGEN**

**Spektrum viraler und bakterieller Pathogene bei akuten respiratorischen Infektionen von Beschäftigten in der Schweinezucht/-mast und deren Angehörigen**  
(Bitte mit Kugelschreiber in Druckbuchstaben ausfüllen)

Datum des Probeneingangs:

Probennummer:

(im Labor auszufüllen)

- Familienname: .....
- Vorname: .....
- Anschrift, Straße, Nr.: .....
- PLZ, Ort: .....
- Geburtsdatum: ..... (z.B. 01.01.1980)
- Aktuelle Symptome:
  - Husten
  - Schnupfen
  - Halsschmerzen
  - Kopf-/Gliederschmerzen
  - Fieber (Temperatur über 38°C)
- Seit wann haben Sie diese Symptome? ..... (z.B. 01.11.2012)
- Datum der Tupferentnahme ..... (z.B. 02.11.2012)
- Schweinekontakt als
  - Landwirt oder Angestellter
  - andere Tätigkeit (bitte angeben):  
.....
  - Familienangehöriger mit Schweinekontakt
  - Familienangehöriger ohne Schweinekontakt
- Seit wann haben Sie Kontakt zu Schweinen (in Jahren)? .....
- Wie viele Tiere betreuen Sie im Bestand (Zahl)? .....
- Handelt es sich um (Mehrfachantwort möglich):
  - Ferkel
  - Mastschweine
  - Sauen
- Haben die Tiere gerade einen Atemwegsinfekt (z.B. Husten, Fieber, Fressunlust, Aborte, etc.)
  - ja  nein
- Haben Sie auch einen Rüsselabstrich bei jeweils zehn Schweinen entnommen?
  - ja  nein

Spektrum viraler und bakterieller Pathogene bei akuten respiratorischen Infektionen von Beschäftigten in der Schweinezucht/-mast und deren Angehörigen, Fragebogen Version 2, 24.09.2012  
PD Dr. Krumbholz, Institut für Infektionsmedizin, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, Brunswiker Strasse 4, 24105 Kiel

**Abb. 7.1: Standardisierter Anamnesebogen zu Symptomen der Landwirte**

**Tab. 7.1: Nachweis humanem  $\beta$ -Aktins in den Abstrichen der Landwirte.** Analyse mittels qPCR, Angabe der Einzelmesswerte für jeden Landwirt (Schwellenwertzyklus und Schmelztemperatur des Amplikons bei der Schmelzkurvenanalyse)

Landwirt	C <sub>P</sub>	T <sub>m</sub> [°C]	Landwirt	C <sub>P</sub>	T <sub>m</sub> [°C]	Landwirt	C <sub>P</sub>	T <sub>m</sub> [°C]
Landwirt 1	31,19	85,42	Landwirt 22	32,48	86,2	Landwirt 43	40,4	86
Landwirt 2	29,25	85,42	Landwirt 23	32,36	86,2	Landwirt 44	38,97	86
Landwirt 3	29,77	85,42	Landwirt	31,79	86,2	Landwirt 45	30,02	86
Landwirt 4	29,51	85,42	Landwirt 25	29,7	86,2	Landwirt 46	26,37	86
Landwirt 5	26,74	85,42	Landwirt 26	29,77	86,2	Landwirt 47	32,62	86
Landwirt 6	29,54	85,42	Landwirt 27	24,52	85,8	Landwirt 48	36,79	86,2
Landwirt 7	28,72	85,42	Landwirt 28	26,65	86,17	Landwirt 49	22,5	86,2
Landwirt 8	24,8	85,42	Landwirt 29	32,31	86,17	Landwirt 50	26,33	86,2
Landwirt 9	26,29	86,2	Landwirt 30	26,89	86,17	Landwirt 51	30,3	86,2
Landwirt 10	28,26	85,42	Landwirt 31	25,89	85,8	Landwirt 52	35,94	86,2
Landwirt 11	28,96	85,42	Landwirt 32	30,19	85,8	Landwirt 53	36,99	86,2
Landwirt 12	25,33	85,42	Landwirt 33	30,09	85,8	Landwirt 54	29	86,2
Landwirt 13	28,54	85,42	Landwirt 34	29,49	85,8	Landwirt 55	26,65	85,5
Landwirt 14	24,82	85,42	Landwirt 35	31,1	85,8	Landwirt 56	35,56	85,5
Landwirt 15	25,19	85,42	Landwirt 36	31,1	85,8	Landwirt 57	28,64	85,5
Landwirt 16	28,05	85,42	Landwirt 37	28,67	85,8	Landwirt 58	31	85,5
Landwirt 17	26,48	85,42	Landwirt 38	26,11	85,8	Landwirt 59	27,07	85,5
Landwirt 18	27,54	86,2	Landwirt 39	31,5	85,8	Landwirt 60	28	85,5
Landwirt 19	30,16	86,2	Landwirt 40	34,56	86	Landwirt 61	27,65	85,5
Landwirt 20	24,51	86,2	Landwirt 41	31,38	86	Landwirt 62	34,58	85,5
Landwirt 21	28,76	86,2	Landwirt 42	31,94	86	Landwirt 63	28,15	85,5



**Tab. 7.2: Nachweis porcinen Cytochrom B in den Rüsselabstrichen der Schweine.** Die fortlaufende Nummerierung der Schweinebestände folgt der der Landwirte. Analyse mittels qPCR, Angabe der Einzelmesswerte für jeden Landwirt (Schwellenwertzyklus und Schmelztemperatur des Amplikons bei der Schmelzkurvenanalyse)

Schweine	C <sub>P</sub>	T <sub>m</sub> [°C]	Schweine	C <sub>P</sub>	T <sub>m</sub> [°C]	Schweine	C <sub>P</sub>	T <sub>m</sub> [°C]
SB 1	24,33	81,7	SB 23	30,87	82,8	SB 43	26,8	83
SB 3	18,75	81,7	SB 25	24,96	82,8	SB 44	32,38	83
SB 4	16,89	81,7	SB 26	26,12	82,8	SB 45	26,62	83
SB 7	26,75	81,7	SB 27	30,71	83	SB 48	24,34	82,8
SB 8	25,08	82,2	SB 28	23,92	82,9	SB 51	27,78	82,9
SB 9	17,1	82,8	SB 31	26,43	83	SB 54	26,81	82,9
SB 10	24,23	81,7	SB 32	22,25	83	SB 55	31,63	82,2
SB 11	27,57	81,7	SB 35	23,6	81,4	SB 57	26,68	82,2
SB 14	20,55	81,7	SB 37	26,63	83	SB 58	22	81,4
SB 17	24,57	81,7	SB 38	24,88	83	SB 59	19,3	82,2
SB 20	27,01	82,8	SB 39	25,6	81,4	SB 60	27,3	82,8
SB 21	23,16	82,8	SB 40	29,14	83	SB 61	28,1	82,2

SB = Schweinebestand

## Danksagung

Zu Beginn möchte ich mich bei Prof. Dr. med. Helmut Fickenscher bedanken, dass ich im Rahmen meiner Promotion im Institut für Infektionsmedizin arbeiten durfte.

Des Weiteren gilt mein besonderer Dank Herrn PD Dr. med. Andi Krumbholz für die immer vorhandene wissenschaftliche Betreuung. Es war sicher nicht immer leicht mit mir, aber ich danke Dir, für das Durchhalten.

Den Kollegen im Labor, insbesondere Frau Corinna Wriedt und Frau Andrea Hölzgen, möchte ich für die fachliche Unterstützung danken.

Ein riesengroßer Dank geht an Janine. Du hast mich unterstützt, inspiriert, motiviert und standest mir zu jeder Zeit tatkräftig zur Seite. Ohne Dich wäre ich niemals fertig geworden.

Ein besonderer Dank geht an meinen Mann Jörn und meinen Sohn Johann Mattis. Ihr seid mein Fels in der Brandung. Danke für die Hilfe beim „Tabellenschubsen“ und Kind betüddeln, während ich an der Dissertation gearbeitet habe.

Ebenso ein Dank an meine lieben Eltern, ohne Euch wäre ich nicht die, die ich heute bin. Ihr seid in meinem Leben großartige Vorbilder in jeder Hinsicht. Danke für Eure 100%ige Unterstützung zu jeder Zeit.

Den anderen lieben Menschen in meinem Leben danke ich ebenfalls, dass sie mit mir mitgefiebert haben und ich auch immer wieder mein Herz ausschütten durfte.

## Publikation

*High genetic diversity of porcine enterovirus G in Schleswig-Holstein, Germany*

Jennifer Bunke · Kerstin Receveur · **Ann Christin Oeser** · Helmut Fickenscher ·  
Roland Zell · Andi Krumbholz. *Archives of Virology*, 2018, Volume 163, Number 2  
PMID: 29081014