



**EPIDEMIOLOGISCHE STUDIE ZUR VERBREITUNG
PORZINER CIRCOVIREN BEIM WILDSCHWEIN
IN DEUTSCHLAND**

SEBASTIAN CHRISTOPH KNELL

INAUGURAL-DISSERTATION

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

édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Epidemiologische Studie zur Verbreitung porziner Circoviren beim Wildschwein in Deutschland

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines

Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

Sebastian Christoph Knell

II

Aus der Klinik für Wiederkäuer und Schweine

Professur für Schweinekrankheiten

der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. G. Reiner

Epidemiologische Studie zur Verbreitung porziner Circoviren beim Wildschwein in Deutschland

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines

Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von

Sebastian Christoph Knell

Tierarzt aus Heidelberg

Giessen 2007

III

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

Dekan Prof. Dr. M. Reinacher

Gutachter: Prof. Dr. G. Reiner
Prof. Dr. T. H. Rümenapf

Tag der Disputation: 06.07.2007

Teile der Dissertation wurden veröffentlicht:

- 2005 Prävalenzen porziner Circoviren in ausgewählten deutschen Wildschwein-Populationen (S. Knell, H. Willems, B. Hertrampf, G. Reiner) Tierärztliche Praxis 2005; 33(G):247-53
- 2005 Comparative genetic characterization of Porcine Circovirus type 2 isolates from German wild boar populations (S. Knell, H. Willems, B. Hertrampf, G. Reiner) Veterinary Microbiology 109 (2005) 169-77
- 2004 Prevalence of Porcine Circo Virus Type 2 infection in German Wild Boar populations (S. Knell, H. Willems, B. Hertrampf, G. Reiner), Proceedings of the 18th Congress of the international Pig Veterinary Society, 27.06.2004 – 01.07.2004, Hamburg, p. 804

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	1
1. EINLEITUNG	6
2. LITERATURÜBERSICHT	8
2.1 DAS PORZINE CIRCOVIRUS	8
2.1.1 ALLGEMEINES	8
2.1.2 TAXONOMIE, MORPHOLOGIE UND EIGENSCHAFTEN	9
2.1.3 GENETISCHE CHARAKTERISIERUNG PORZINER CIRCOVIREN	10
2.1.4 ÄTIOLOGISCHE BEDEUTUNG PORZINER CIRCOVIREN	17
2.1.4.1 PCV 1	17
2.1.4.2 PCV 2	17
2.1.4.2.1 PMWS	17
2.1.4.2.2 WEITERE PCV 2-ASSOZIIERTE KRANKHEITSBILDER	20
2.1.5 EPIDEMIOLOGIE	22
2.1.6 PATHOGENESE	24
2.1.7 PCV 2-ASSOZIIERTE KRANKHEITSBILDER	27
2.1.7.1 POSTWEANING MULTISYSTEMIC WASTING SYNDROME (PMWS)	27
2.1.7.2 WEITERE MIT PCV 2 IN ZUSAMMENHANG GEBRACHTE KRANKHEITSBILDER	30

2.1.8	PCV 2 BEIM WILDSCHWEIN.....	31
2.1.9	PMWS UND KOERREGER BEIM WILDSCHWEIN	33
2.1.10	MÖGLICHE ANSÄTZE DER PRÄVENTION GEGEN PCV 2.....	34
2.2	NACHWEISMETHODEN	36
2.2.1	ANTIGENNACHWEIS	36
2.2.1.1	VIRUSISOLATION.....	36
2.2.1.2	ELEKTRONENMIKROSKOPIE	36
2.2.1.3	IN-SITU-HYBRIDISIERUNG (ISH).....	37
2.2.1.4	IMMUNHISTOCHEMIE (IHC).....	37
2.2.1.5	FLUORESZENZ-ANTIKÖRPER IM GEFRIERSCHNITT (FA).....	38
2.2.1.6	POLYMERASE-CHAIN-REACTION (PCR).....	38
2.2.1.7	ANTIGEN-ELISA	39
2.2.2	ANTIKÖRPERNACHWEIS.....	39
2.2.2.1	ANTIKÖRPER-ELISA	39
2.2.2.2	INDIREKTER-IMMUNFLUORESZENZ-ANTIKÖRPERTEST (IIFA).....	40
3	MATERIAL UND METHODEN	41
3.1	PROBENMATERIAL	41
3.1.1	ENTNAHME UND KONSERVIERUNG	43
3.1.2	ZAHNALTERSSCHÄTZUNG	43

3.1.3	GEWICHTSSCHÄTZUNG	45
3.1.4	GESCHLECHTSBESTIMMUNG.....	45
3.2	BEARBEITUNG DES PROBENMATERIALS	46
3.2.1	DNA-ISOLATION AUS MILZGEWEBE.....	46
3.2.2	PCR	47
3.2.3	GELELEKTROPHORESE	50
3.2.4	PHOTODOKUMENTATION.....	51
3.2.5	KLONIERUNG UND SEQUENZIERUNG	51
3.2.6	AUSWERTUNG	68
4	ERGEBNISSE.....	69
4.1	ERGEBNISSE DES PCR-SCREENINGS.....	69
4.1.1	PRÄVALENZEN FÜR PCV 1 UND PCV 2.....	69
4.1.2	ZUSAMMENHANG ZWISCHEN PCV-PRÄVALENZEN UND ALTER	75
4.1.3	ZUSAMMENHANG ZWISCHEN PCV-PRÄVALENZEN UND GESCHLECHT .	78
4.1.4	ZUSAMMENHANG ZWISCHEN PCV-PRÄVALENZEN UND KÖRPERGEWICHT.....	78
4.2.	ERGEBNISSE DER PCV-SEQUENZIERUNG	82
4.2.1	SEQUENZIERUNG EINES KOMPLETTEN PCV-GENOMS	82
4.2.1.1	ERSTELLEN DER KOMPLETTSEQUENZ.....	82

4.2.1.2	VERGLEICH DER WILDSCHWEINISOLATE MIT DEN BEIM HAUSSCHWEIN BESCHRIEBENEN ISOLATEN	90
4.2.1.3	VERGLEICH MIT CIRCOVIREN ANDERER SPEZIES	94
4.2.1.4	UNTERSUCHUNG DER LESERAHMEN UND DER INTERGENETISCHEN REGION	95
4.2.2	VERGLEICHENDE SEQUENZIERUNG DER VARIABLEN REGION DES CAPSIDPROTEINS	99
4.2.2.1	BETRACHTUNGEN ZUR ABGELEITETEN PROTEINSEQUENZ DES CAPSIDS	111
5.	DISKUSSION	115
5.1	PRÄVALENZEN PORZINER CIRCOVIREN BEIM WILDSCHWEIN	116
5.2	VERGLEICHENDE SEQUENZIERUNG	118
5.3	INTERAKTION ZWISCHEN WILD- UND HAUSSCHWEIN.....	121
6.	ZUSAMMENFASSUNG	122
7.	SUMMARY.....	124
8.	LITERATURVERZEICHNIS.....	126
9.	ABKÜRZUNGEN	141
10.	ANHANG	144
10.1	ANSÄTZE FÜR LÖSUNGEN.....	144
10.2	ÜBERSICHT DER VERWENDETEN PRIMER	147

10.3	AUFLISTUNG DER GENE BANK© ACCESSION-NO.....	149
	PCV 2 DENDROGRAMM.....	149
	CIRCO DENDROGRAMM.....	151
10.4	DANKSAGUNG	152
11.	ERKLÄRUNG	153

1. Einleitung

Ein infektiöses Kümmerersyndrom, subsummiert unter dem Namen „Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome“, wurde 1991 in Kanada beobachtet und 1996 erstmals in Europa beschrieben (Harding, 1996; Clark, 1997); die Entwicklung dieses Krankheitskomplexes wird in Zusammenhang mit einer PCV2-Infektion (Porzines Circovirus Typ 2) gesehen (Allan & Ellis, 2000d); das Krankheitsbild des PCV 2-assoziierten Kümmerens taucht weltweit in Schweine-produzierenden Ländern auf, es gilt als einer der bedeutendsten wirtschaftlichen Faktoren.

Betroffen von PMWS sind meist Absetzferkel und Mastläufer mit unspezifischen Symptomen wie Kümmeren, Blässe und Dyspnoe (Segales & Domingo, 1999); typische patho-morphologische und patho-histologische Befunde lassen sich übereinstimmend feststellen, PCV 2 ist stets nachweisbar (Segales & Domingo, 1999); serologische Studien zeigen, dass PCV 2 weltweit in den Schweinepopulationen verbreitet ist (Suh et al., 1998; Cotrell et al., 1999; Magar et al., 2000). Dennoch gibt es eine Vielzahl von Schweineherden, bei denen trotz nachweisbaren Kontakts zu PCV 2 keine klinische Manifestation des PMWS bzw. anderer Erkrankungen auftreten, die mit PCV 2 in Verbindung gebracht werden könnten (Harding, 1996; Sibila et al., 2001).

Die Ätiologie und Pathogenese des PMWS ist bislang nicht endgültig geklärt. In der Literatur werden verschiedene Faktoren aufgeführt, die für die Ausbildung der Symptome förderlich sein sollen: neben weiteren Infektionserregern werden z.B. Managementaspekte genannt wie Tierdichte, Luftqualität, Hygiene oder auch Impfgeme (Harding, 1996; Segales & Domingo, 1999). Die einzige prophylaktische Maßnahme gegen PMWS besteht momentan in einer Optimierung der Management- und Umweltbedingungen für die empfänglichen Schweine.

Bei der Verbreitung viraler Erkrankungen wie z.B. Aujeszky'sche Krankheit oder Klassische Schweinepest spielen Wildschweine als Reservoir eine wesentliche Rolle; vor diesem Hintergrund ist die Vermeidung des Kontakts zwischen Haus- und Wildschweinen eine wesentliche tierseuchenrechtliche Komponente. Weitestgehend unklar ist bisher die Prävalenz des PCV2 beim Wildschwein, die Bedeutung von Wildschweinen für die Verbreitung von Circoviren wie auch mögliche Übertragungswege zwischen Wild- und Hausschweinen.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Untersuchung des Vorkommens von PCV 1 und PCV 2 bei Wildschweinen in Deutschland mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR); desweiteren sollen die gefundenen Isolate mit den bei Hausschweinen bekannten Isolaten in ihrer Sequenz verglichen und untersucht werden, ob innerhalb der bei Wildschweinen auftretenden Isolate ein Bezug zwischen ihrer Variabilität und der geographischen Zuordnung hergestellt werden kann.

2. Literaturübersicht

2.1 Das porcine Circovirus

2.1.1 Allgemeines

Die Berliner Virologin Inge Tischer isolierte 1974 das porcine Circovirus als eine Kontaminante aus einer stabilen PK-15-Zelllinie aus Schweinenierenzellen (Tischer et al., 1974). Bei den daraufhin durchgeführten serologischen Untersuchungen in Nord- und Ostdeutschland wurde bei Schlachtschweinen eine Seroprävalenz von mehr als 85 % gefunden, die jedoch nicht mit einer klinischen oder pathomorphologischen Symptomatik in Zusammenhang gebracht werden konnte. Zu einem späteren Zeitpunkt wurden bei fünf von sechs Wildschweinen aus dem Raum Berlin Antikörper gegen PCV diagnostiziert (Tischer et al., 1986). Nachfolgende Infektionsversuche mit Ferkeln und neun Monate alten Schweinen induzierten zwar steigende Antikörpertiter, klinische oder pathomorphologische Veränderungen konnten dagegen nicht gesehen werden; eine Reisolation des Virus aus Organen der betroffenen Tiere gelang nicht, so dass man zu der Schlussfolgerung kam, dass es sich um ein in Deutschland zwar weit verbreitetes, jedoch apathogenes Virus handeln müsse (Tischer et al., 1986).

Das Thema Circoviren bei Schweinen erlangte erst 15 Jahre später erneute Aktualität, als 1991 in Südkanada (Saskatchewan) erstmals ein „Postweaning multisystemic wasting syndrome“ (PMWS) Probleme in den Beständen verursachte (Harding, 1996). 1997 gelang Clark die Isolation von PCV-Antigen aus den Organen betroffener Tiere. Die aus den PMWS-erkrankten Tieren isolierten viralen Nukleotidsequenzen zeigten untereinander eine Homologie von 96 %, mit dem aus der PK-15-Zelllinie isolierten Circovirus allerdings nur eine von 80 % (Hamel et al., 1998; Meehan et al., 1998; Morozov, 1998).

Daraus folgte eine Differenzierung in PCV 1 (aus der Zelllinie isoliertes PCV) und PCV 2 (aus den ersten Fällen von PMWS nachgewiesenen PCV).

2.1.2 Taxonomie, Morphologie und Eigenschaften

Das Circovirus wurde nach seiner Entdeckung als einzelsträngiges unbehülltes DNA-Virus mit 1760 nt klassifiziert, dessen Genom zirkulär vorliegt (Tischer, 1982; Buhk, 1985; Meehan et al., 1997). Wie man später erkannte, handelte es sich hierbei um das porcine Circovirus Typ1 (PCV 1) mit einer Länge von 1758 Nukleotiden (Mankertz et al., 2004) zu unterscheiden von dem Genom des porcinen Circovirus Typ2 (PCV 2) mit einem Umfang von 1768 Nukleotiden (Hamel et al., 1998; Larochelle et al., 1999; Fenaux et al., 2000).

Im Vergleich zu anderen Viren ist das unbehüllte porcine Circovirus, dessen Nukleokapsid ikosaedral angeordnet ist, mit einem Durchmesser von 17nm ausgesprochen klein (Tischer, 1987). Einem pH-Wert von 3,0 hält es ebenso stand wie hohen Temperaturen (56°C und 70°C) und Chloroform (Allan et al., 1994).

Phylogenetische Analysen des PCV 1, aviärer Circoviren sowie pflanzlicher Geminiviren und vorher als pflanzlichen Circoviren bezeichneten Nanoviren führten zu der Erkenntnis, dass das PCV 1 am engsten mit dem „Psittacine beak and feather disease virus“ (PBFDV) verwandt ist (Niagro et al., 1998).

Die Familie der Circoviridae wird in die beiden Genera Circovirus und Gyrovirus unterteilt (Mc Nulty et al., 2000).

Tabelle 1: Taxonomie

Genus Circovirus	Psittacine beak and feather disease virus (PBFDV) (Bassami et al., 1998)
	Pigeon or columbid circovirus (Mankertz et al., 2000b)
	Porzines Circovirus 1(Mankertz et al., 1997) und 2 (Hamel et al., 1998)
	Canary circovirus (Phenix et al., 2001)
Genus Gyrovirus	Chicken anemia virus (Kato et al., 1995)

Die Vertreter des Genus *Circovirus* weisen eine typische ambisense Struktur des Genoms auf, wohingegen der Vertreter des Genus *Gyrovirus* unterschiedlich strukturiert ist (Kato et al., 1995). Das Genus *Gyrovirus* wiederum zeigt ähnliche Eigenschaften wie das humane TT-Virus (Nishizawa et al., 1997; Handa et al., 2000) sowie das TTV-ähnliche Minivirus (Takahashi et al., 2000). Weitere ehemals als unklassifiziert eingestufte pflanzliche *Circoviren* (Lukert et al., 1995) werden heute unter der Gruppe der *Nanoviren* zusammengefasst. Dazu zählen: „Coconut foliar decay virus“, „Subterranean clover stunt virus“, „Faba bean necrotic yellows virus“, „Milk vetch dwarf virus“ und „Banana bunchy top virus“ (Rohde et al., 1990; Harding et al., 1993; Boevink et al., 1995; Katul et al., 1997; Sano et al., 1998).

2.1.3 Genetische Charakterisierung porziner *Circoviren*

Sowohl von PCV 1 als auch von PCV 2 sind die genomischen Sequenzen identifiziert und untereinander verglichen (Meehan et al., 1997; Hamel et al., 1998; Meehan et al., 1998; Morozov et al., 1998; Niagro et al., 1998; Fenaux et al., 2000) : innerhalb der Spezies konnten eine Homologie von über 90 %, zwischen den Spezies PCV 1 und PCV 2 von 68 bis 76 % festgestellt werden.

Die Replikation des Virus findet im Zellkern der Wirtszelle statt, auf Grund der geringen Größe des Genoms und der dadurch bedingten limitierten Codierungskapazität kann davon ausgegangen werden, dass die Replikation von Wirtszellproteinen abhängig ist (Mankertz et al., 2004). Mankertz et al. (Mankertz et al., 1997; Mankertz et al., 1998) folgerten nach Sequenzuntersuchungen des Genoms und der Replikationsproteine, dass diese Viren durch einen „rolling-circle Mechanismus“ replizieren, bei dem zu Beginn der Replikation das zirkuläre Genom an einer Stelle geschnitten wird, um aus dem so erhaltenen einzelnen Strang einen komplementären Strang erstellen zu können. Der Ursprung der Replikation ist eine hoch konservierte intergenetische Region mit einem „stem-loop“, der schon bei Nano- und Geminiviren ähnlich beschrieben wurde (Meehan et al., 1997). Die erwähnte Region liegt zwischen zwei „open reading

Neben der Basenzahl der „loops“ mit 12 Nukleotiden bei PCV 1 und 10 Nukleotiden bei PCV 2 ist auch die Abfolge der Nukleotide unterschiedlich. Innerhalb der „loop-Sequenz“ befindet sich jedoch ein für die Replikation essentielles identisches Octanukleotid (AGTATTAC). Die Arbeitsgruppe um Cheung konnte innerhalb dieses Octanukleotids mit essentiellen und nicht essentiellen Nukleotiden zwei Gruppen von Nukleotiden identifizieren: während die Replikation beim Ersetzen der essentiellen Nukleotide stoppt, sind die nicht essentiellen Nukleotide ohne jede Einschränkung der Replikation austauschbar (Cheung, 2004b). Dies findet in folgender Schreibweise Berücksichtigung: AxTAXTAC; die mit „x“ bezeichneten Positionen akzeptieren variable Basen.

Auch Geminiviren replizieren durch den „rolling-circle Mechanismus“, benötigen im Unterschied zu Circoviren aber nur ein Protein zur Replikation und weisen im „loop“ ein Nonamer auf. Verschiedene Forschergruppen konnten zeigen, dass das Protein bei Geminiviren zwischen dem siebten und achten Nukleotid des Nonamers (A und T) schneidet, um die „Plus-Strang-DNA-Synthese“ einzuleiten (Palmer, 1998; Hanley-Bowdoin et al., 2000). Die hoch konservierte Region bei Circoviren ähnelt der der Geminiviren und auch hier schneidet das Protein zwischen den Nukleotiden T und A. Der als „stem“ bezeichnete Stiel des „loops“ liegt in palindromischer Sequenz vor und gilt neben dem Oktamer als essentieller Bestandteil der Replikation (Mankertz et al., 1997; Cheung, 2004a). In vitro zeigt sich, dass der rechte Teil des „loops“ sowie H1 und H2 die minimale Bindungsstelle von Rep und Rep´ darstellen (Mankertz and Hillenbrand, 2002). Die Bindung von Rep und Rep´ an H1 und H2 wird somit als essentielle Voraussetzung für die Initialisierung der Replikation angesehen (Mankertz and Hillenbrand, 2002). In vivo konnte bisher jedoch keine sequenzspezifische Bindung am rechten Arm der palindromischen Sequenz bestätigt werden (Cheung, 2004a).

In unterschiedlichen Richtungen verlaufend liegen neben dem beschriebenen „stem-loop“ die beiden Leserahmen ORF 1 und 2. Der ORF 1 ist der längste bei PCV bekannte Leserahmen; er liegt neben der intergenetischen Region und wird im Uhrzeigersinn abgelesen. „Ungespliced“ codiert er das für die Replikation wichtige Protein Rep, das 312 Aminosäuren (aa) umfasst. Ebenso essentiell für die Replikation ist das Protein Rep´ (168 aa), welches durch „splicing“ aus Rep entsteht (Steinfeldt et al., 2001; Mankertz and Hillenbrand, 2002). Auf Grund des hohen Homologiegrades innerhalb der PCV konnte in einem Versuch durch die Proteine Rep und Rep´ von

PCV 1 eine Replikation von PCV 2 erreicht werden (Mankertz et al., 2004). Doch auch innerhalb der Circoviren zeigt sich eine Ähnlichkeit zu den Proteinen von PBFDV. Des Weiteren ist das 5'-Ende extensiv homolog zu Rep-Proteinen pflanzlicher Nanoviren und das 3'-Ende zu 2C-Proteinen von Picornaviren. Dies lässt bestimmte Schlussfolgerungen bezüglich des Virusursprungs zu (siehe 2.1.2.) (Gibbs and Weiller, 1999): Fehlt eines dieser beiden Proteine, findet keine Replikation statt (Steinfeldt et al., 2001), was ungewöhnlich für die „rolling-circle-replication“ wäre, da alle anderen bekannten Beispiele für diesen Mechanismus nur ein multifunktionelles Rep-Protein benötigen (Hanley-Bowdoin et al., 2000).

Rep ist das primäre Transkript. Durch nachfolgendes „splicing“ entstehen neben Rep´ die mRNAs Rep 3 a-c; bei PCV 1 können darüber hinaus noch die mRNAs Rep 3 c 1-4 nachgewiesen werden. Zusätzlich ließen sich bei Infektionen von Zellkulturen mit PCV 2 noch NS0, NS 672 und NS 515 und bei Infektionen mit PCV 1 NS0, NS 462 und NS 642 detektieren (Cheung and Bolin, 2002; Cheung, 2003a, 2003b). Experimentell kann jedoch nur beim Fehlen von Rep oder Rep´ ein Ausbleiben der Replikation bestätigt werden. Während einer produktiven Infektion von PK-15-Zellen mit PCV 2 werden alle acht oben genannten RNA´s sowie eine durch ORF 2 kodierte Capsid mRNA exprimiert (Cheung, 2003c). Um die Funktion der mRNA neben Rep und Rep´ zu klären, bedarf es noch weiterer Forschung (Cheung, 2003b). Möglicherweise kodiert keine dieser mRNAs für funktionelle Proteine (Cheung, 2003a).

Der ebenfalls neben der intergenetischen Region liegende ORF 2, der den zweitgrößten Leserahmen darstellt, umfasst das Capsidprotein (Cap) (Nawagitgul et al., 2000). Die Synthese findet wahrscheinlich nach der Infektion der Wirtszelle durch wirtskodierte Enzyme statt (Mankertz et al., 2004). Die RNA wird gegen den Uhrzeigersinn in komplementäre DNA transkribiert (Cheung, 2003a). Das synthetisierte Protein umfasst 234 aa mit einem argininreichen und basischen N-Terminus (Fenaux et al., 2000; Mankertz and Hillenbrand, 2002) und bildet das Capsid des Virus (Mankertz et al., 1997; Mankertz et al., 1998; Niagro et al., 1998). Es gelang, das Protein experimentell von Insekten exprimieren zu lassen (Nawagitgul et al., 2000). Daraufhin konnte mittels SDS-Page ein Molekulargewicht von 28 kDa ermittelt werden (Cheung, 2003b); ähnlich dem Protein, das in aufgereinigten Viruspartikeln gefunden wurde. Es formiert in capsidähnlichen Partikeln, was mittels Elektronenmikroskop nachgewiesen werden konnte (Nawagitgul et al., 2000).

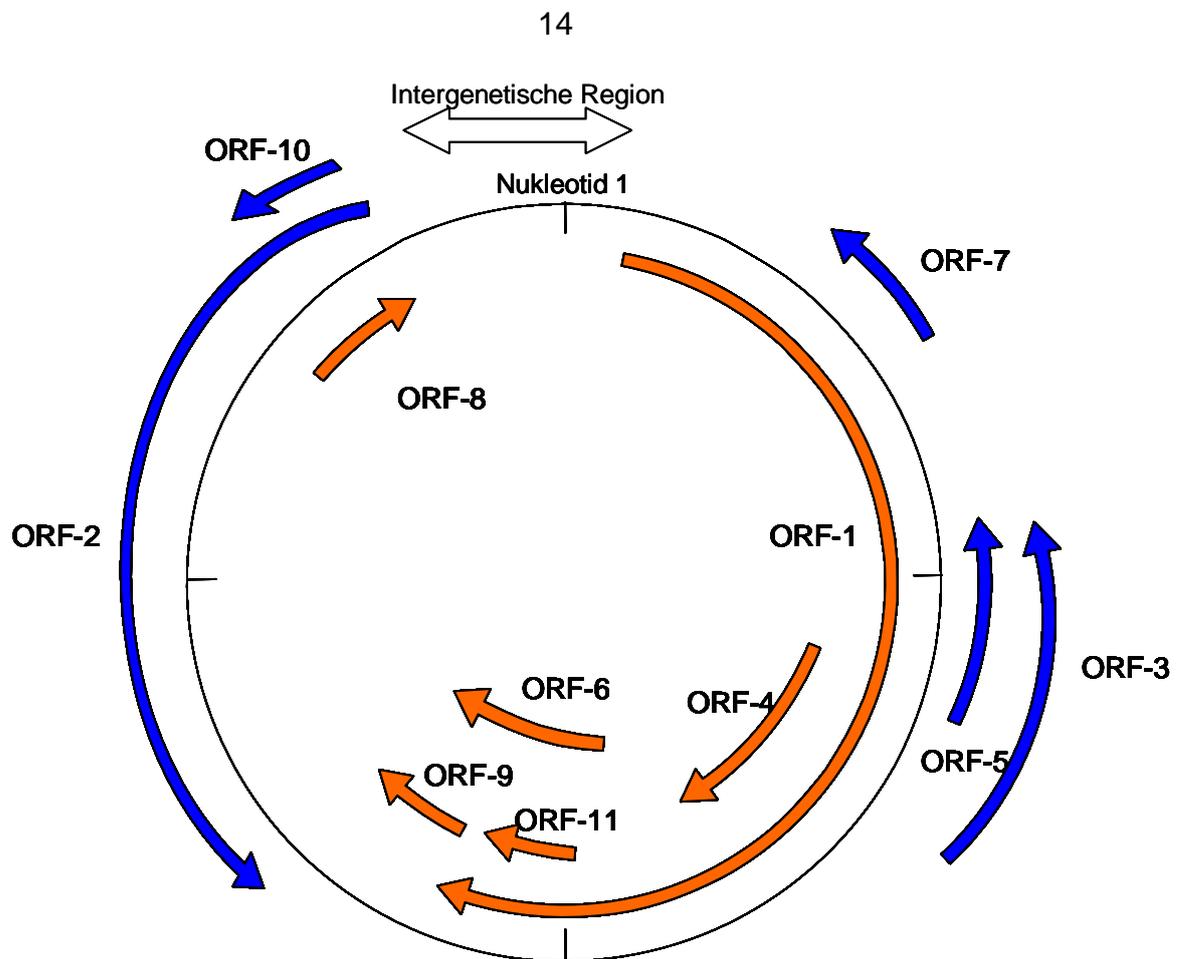


Abbildung 1a: Darstellung des circulären Genom mit den Leserahmen. Als weißer Blockpfeil sei hier ergänzend die Intergenetische Region dargestellt.

Die Homologie des ORF 2 von PCV 1 und 2 (65 - 67 % Nukleotidsequenz-Homologie) ist geringer als bei Rep-assoziierten Genen; aber auch innerhalb der PCV 2-Isolate liegt die Homologie im ORF 2 zwischen 91 und 100 % auf Nukleotid- und zwischen 90 und 100 % auf Aminosäureebene (Fenaux et al., 2000). Dieser Unterschied von PCV 1 zu 2 bildet die Grundlage für die Etablierung eines Enzyme-linked-immunosorbent-Assays (ELISA) zur Differenzierung zwischen PCV 1 und 2 (Blanchard et al., 2003a). Innerhalb der ORF 2 verschiedener Circoviren fällt auf, dass diese im Bereich des N-terminalen Endes eine identische Sequenz aufweisen, die auch zwischen PCV 1 und PCV 2 hoch konserviert ist. Dieser Bereich weist eine DNA-Bindungskapazität auf und steht vermutlich im nativen Virion mit der PCV-DNA in Verbindung (Fenaux et al., 2000). Untersuchungen unterschiedlicher PCV 2-Isolate aus Nordamerika zeigten, dass trotz eines relativ stabilen PCV 2-Genoms geringe Unterschiede zwischen Isolaten aus unterschiedlichen geographischen Regionen bestehen und die Variabilität im vermeintlichen Capsidgen am größten ist (Fenaux et al., 2000). Es konnten drei Hauptregionen heterogener Aminosäuresequenzen lokalisiert werden, von denen zwei

immunoreaktive Areale darstellen. Keines dieser beiden Areale konnte jedoch mit einem der Stämme in Verbindung gebracht werden, die bei PMWS-Fällen isoliert wurden (Larochelle et al., 2002).

Eine Studie, die das Auftreten immunodominanter Epitope mittels monoklonaler Antikörper (Ak) untersuchte, kam zu dem Schluss, dass diese sich innerhalb der Aminosäureposition 47 – 84, 165 – 200 sowie der letzten vier Aminosäuren des Capsidproteins befinden (Lekcharoensuk et al., 2004). Die Arbeitsgruppe um Mahe (Mahe et al., 2000) untersuchte die Reaktivität mittels polyklonaler Antikörper und synthetischer Peptide; dabei konnten Epitope an den Aminosäurepositionen 65-87, 113-147 und 157-183 lokalisiert werden. Zur Bestätigung bzw. Klärung wäre es erforderlich, das PCV 2-Capsid im Rahmen einer Strukturanalyse mittels Kryoelektronenmikroskopie sowie röntgenunterstützter Kristallographie zu untersuchen (Lekcharoensuk et al., 2004).

Die N-Terminalen 46 Aminosäuren mit zahlreichen basischen Gruppen sind nicht in die Formation des Epitops involviert aber möglicherweise für die Formation der inneren Oberfläche des Virions mitverantwortlich (Hamel et al., 1998; Meehan et al., 1998; Morozov et al., 1998). Für andere ikosaedrale Viren ist bekannt, dass die genannte Region während des Virusaufbaus mit negativen Ladungen der viralen DNA interagiert (Rossmann and Johnson, 1989). Bei einem Vergleich (Niagro et al., 1998) konnte festgestellt werden, dass dieses N-terminale Ende der Aminosäuresequenz des PCV-Capsids sowohl dem anderer Circoviren als auch dem eines Sobemovirus (Southern bean mosaic virus) ähnelt: für dieses wurde eine DNA-Bindungsaktivität an der N-terminalen Region nachgewiesen. Die dreidimensionale Struktur dieses Virus zeigt, dass die basischen Aminosäuren des N-Terminus des Capsids in engem Kontakt mit genomischer DNA stehen (Hermodson et al., 1982). Dies impliziert allerdings nicht, dass diese aus 46 Aminosäuren bestehende Region nicht immunogen ist, da mittels synthetischer Peptide zwischen Position 25 und 43 ein lineares Epitop gefunden werden konnte (Mahe et al., 2000). Folglich wären 187 Aminosäuren (von aa 47 bis zum C-Terminus) innerhalb des ORF 2-Proteins für die Capsidformation von Bedeutung (Lekcharoensuk et al., 2004).

Bezogen auf das gesamte Genom wurden beim PCV 1 sieben ORF identifiziert (Mankertz et al., 1997; Meehan et al., 1997; Mankertz et al., 1998) und beim PCV 2 je nach Autor bis zu elf (Hamel et al., 1998; Meehan et al., 1998; Morozov et al., 1998; Choi et al., 2002). In Anlehnung an eine aus dem Jahre 2002 stammende und sich auf das Isolat PCV 2 -P1 (Genebank Accession No. AY099495) beziehende Veröffentlichung von Choi und Mitarbeitern (Choi et al., 2002) sollen im Folgenden die Lokalisationen der ORFs tabellarisch dargestellt werden (Tabelle 2).

Tabelle 2: Lokalisationen der ORFs (nach Choi et al., 2002)

ORF	Lokalisation	Aminosäuren
1	1019-195	314
2	935-234	233
3	1639-1325	104
4	1533-1354	59
5	216-377	53
6	811-724	29
7	882-941	19
8	1721-1656	21
9	1061-932	42
10	724-831	35
11	233-189	14

2.1.4 Ätiologische Bedeutung porziner Circoviren

2.1.4.1 PCV 1

Nach der Entdeckung des PCV 1 im Jahre 1974 stellte man 1986 fest, dass dieses Virus in der Schweinepopulation zwar weit verbreitet aber nicht in Verbindung mit einer klinischen Symptomatik zu sehen ist: es handelt sich folglich um ein apathogenes Virus (Tischer et al., 1986).

2.1.4.2 PCV 2

2.1.4.2.1. PMWS

Die Art des Zusammenhangs zwischen PCV 2 und PMWS war lange Zeit umstritten, da einerseits die Henle-Koch'schen Postulate für PCV 2 nicht erfüllt waren und andererseits beim Auftreten des Krankheitsbildes Koinfektionen nachgewiesen wurden.

Zum Beispiel gelang es Ellis und Mitarbeitern (Ellis et al., 1999) bei gnotobiotischen Ferkeln über Zellkulturfiltrat oder Lymphknotenhomogenisat die meisten für PMWS typischen Läsionen zu reproduzieren; aus den Organen der so infizierten Tiere konnte dann neben PCV 2 aber auch PPV aus den Geweben rückisoliert werden: demzufolge blieb ungeklärt, ob PCV 2 auch allein PMWS induzieren kann. Eine andere Arbeitsgruppe (Balasch et al., 1999) konnte mittels Inokulation von Gewebe, das von PMWS erkrankten Tieren stammte, lediglich stark abgeschwächte klinische Symptome und pathologische Läsionen provozieren. In die Untersuchung waren acht vor Versuchsbeginn u. a. negativ auf PRRSV, PPV und Influenza getestete Schweine einbezogen.

Um Koinfektionen mit unbekanntem Viren auszuschließen, führte Fenaux einen Infektionsversuch mit rekombinantem kloniertem PCV 2 durch (Fenaux et al., 2002). Nach Infektion mit der geklonten kompletten genomischen DNA eines PCV 2-Strangs konnte nur eine subklinische Infektion mit ggr. patho-histologischen Veränderungen gesehen werden.

Eine weitere Reihe von Experimenten sollte den Zusammenhang zwischen der Entstehung von PMWS durch PCV 2 und Koerreger überprüfen. Allan et al. (Allan et al., 1999) infizierten kolostrumfrei aufgezogene Ferkel mit PCV 2 und/oder PPV. Sie beobachteten, dass alle mit PCV 2 und PPV infizierten Tiere die für PMWS typischen Symptome und Läsionen zeigten, z.T. sogar verendeten, während Tiere, die ausschließlich mit einem dieser Viren infiziert waren, keinerlei Anzeichen von PMWS aufwiesen. Untersuchungen von Krakowka und Mitarbeitern (Krakowka et al., 2000) bestätigten diese Ergebnisse bei gnotobiotischen Ferkeln. Kennedy und Mitarbeiter (Kennedy et al., 2000) stellten jedoch bei ausschließlich mit PCV 2 infizierten Tieren auch klinische Anzeichen von PMWS fest; bei allen Tieren dieser Gruppe konnten histopathologische Läsionen und in den veränderten Organen zudem PCV 2 detektiert werden. In diesen Ergebnissen sah man die Erfüllung der Henle-Koch'schen Postulate, ergänzte jedoch, dass Koinfektionen den Schweregrad der Erkrankung erhöhen und somit eine wichtige Rolle bei PMWS spielen.

Die sich bei den Infektionsversuchen abzeichnende Bedeutung der Koinfektionen wurde durch Feldstudien bestätigt. Ellis et al. (2000) konnten hierbei verdeutlichen, dass bei allen PMWS-Fällen PCV 2 nicht aber PPV und PRRSV vorhanden war und bestätigten damit die Annahme, dass PCV 2 für die Entwicklung von PMWS essentiell sei, den beiden anderen Erregern die Rolle von begünstigenden Kofaktoren zukomme. PRRSV erwies sich als häufigster viraler Koerreger (51,9 %) (Le Cann et al., 1997; Hinrichs et al., 1999a); (Pallares et al., 2002) während sich *Mycoplasma hyopneumoniae* mit 35,5 % als häufigster bakterieller Koerreger etablierte (Pallares et al., 2002). Daneben konnten mit *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Haemophilus parasuis* und *Pasteurella multocida* weitere bakterielle Koerreger gefunden werden (Del Pozo, 1999).

Neben den infektiösen sollen auch nicht-infektiöse Faktoren wie Luftqualität, Hygiene und Tierdichte den Krankheitsprozeß unterstützen (Harding, 1996; Domingo and Segales, 1999; Krakowka, 2001; Allan et al., 2003); auch Impfreime werden mit dem

Auftreten von PMWS in Zusammenhang gebracht: so konnte PMWS bei mit Kolostrum aufgezogenen Ferkeln nur in der gegen *Mycoplasma hyopneumoniae* und *Actinobacillus pleuropneumoniae* geimpften Gruppe durch eine PCV 2-Infektion provoziert werden (Allan et al., 2000b). Ebenso wurde PMWS aber auch durch PCV 2 in Kombination mit Immunstimulantien wie Freund'sches Adjuvanz (Krakowka and Ellis, 2000; Krakowka et al., 2001) oder Vakzinen (Allan et al., 2000b; Larochelle et al., 2003) experimentell provoziert. Diese Provokation von PMWS mittels Adjuvantien oder kommerzieller Vakzinen gelang jedoch nicht immer, so dass möglicherweise nur eine bestimmte Immunstimulation PMWS auslösen kann (Resendes et al., 2004). Im Rahmen weiterer Untersuchungen konnte festgestellt werden, dass geimpfte Tiere eine länger andauernde Virämie und höhere Mengen des PCV 2-Genoms im Serum aufwiesen; die Verteilung des Virus im Gewebe war ebenso wie die lymphozytäre Depletion stärker ausgeprägt. Vor dem Hintergrund dieses Ergebnisses forderten die Autoren ein Überdenken des Impfregimes in PMWS-gefährdeten Beständen (Opriessnig et al., 2003).

Bei PCV 2 handelt es sich um ein weit verbreitetes Virus, das nach Infektion nicht zwangsläufig zu klinischen oder histopathologischen Veränderungen führen muss (Larochelle et al., 1999): bei gesunden Schweinen mit Kontakt zu PMWS-Tieren werden auch ohne pathomorphologische Veränderungen bzw. Nachweis eines PCV 2-Antigens wesentlich später noch hohe Antikörpertiter nachgewiesen (Domingo and Segales, 1999; Harding et al., 1999). Nach wie vor ist man der Meinung, dass PCV 2 allein nicht zur Induktion von PMWS ausreicht (Fenaux et al., 2002; Larochelle et al., 2003; Sibila et al., 2004).

2.1.4.2.2. Weitere PCV 2-assoziierte Krankheitsbilder

Über den Zusammenhang mit PMWS hinaus wird die Bedeutung von PCV 2 bei einer Reihe weiterer klinischer Erscheinungsbilder diskutiert, wobei die ätiologische Bedeutung von PCV 2 noch unklar und der kausale Zusammenhang zwischen PCV 2 und diesen Krankheitsbildern nicht immer zweifelsfrei bewiesen ist.

Abgesehen von PMWS kommt der Beteiligung von PCV 2 am „Porzinen Dermatitis und Nephropathie Syndrom“ (PDNS) die größte Bedeutung zu. Hierbei handelt es sich um eine Typ III-Hypersensitivitätsreaktion, bei der durch Immunkomplexe Vaskulitiden initiiert werden (Higgins, 1993; Helie et al., 1995). Zunächst brachte man eine Reihe bakterieller Erreger wie *Pasteurella multocida* (Thomson, 1998), *Streptococcus species* (spp.) (Sierra et al., 1997) und *Actinobacillus pleuropneumoniae* (White and Higgins, 1993) sowie Lipopolysaccharide gram-negativer Bakterien (Duran et al., 1997) als mögliche auslösende Faktoren mit dieser Erkrankung in Verbindung. In mehreren Fällen konnte auch PRRSV nachgewiesen werden (Thibault et al., 1998; Segales et al., 1998b): bei Infektionsversuchen gelang es jedoch nicht, das Krankheitsbild zu reproduzieren. Zunehmend untersuchte man PDNS-erkrankte Schweine auf PCV 2 und konnte in nahezu allen Fällen das Virus in unterschiedlichen Organen nachweisen (Segales et al., 1998a; Peritogianni, 2000; Rosell et al., 2000b; Allan et al., 2000c). Virale Nukleinsäure befand sich hauptsächlich im Zytoplasma von Monozyten bzw. von Makrophagen-Zelllinien der untersuchten Organe. In vielen Fällen konnte neben PCV 2 auch PRRSV detektiert werden (Segales et al., 1998b; Rosell et al., 2000b). Eine andere Arbeitsgruppe stellte bei ihren Untersuchungen fest, dass im chronischen Stadium das PCV 2-Genom nicht immer nachweisbar ist und schlossfolgerte daraus, dass das Virus nur in der akuten Krankheitsphase zu finden sei (Segales et al., 1998b). Bei Untersuchungen der geschädigten Glomeruli und Arterienwände konnte mittels in-situ-Hybridisierung (ISH) kein Virus nachgewiesen werden, was vermuten lässt, dass die Immunkomplexe dort entweder nur kurz verweilen oder nicht das Genom des Virus, sondern nur virales Protein enthalten ist (Rosell et al., 2000b).

Neuere Untersuchungen deuten darauf hin, dass nur ein hoher PCV 2-Titer für die Entwicklung von PDNS die Grundlage bilden könnte (Wellenberg et al., 2004); sie unterstreichen damit die Rolle von PCV 2 als primäres Agens.

Im Hinblick auf Reproduktionsstörungen ist der Zusammenhang mit PCV 2 noch nicht vollständig geklärt. Auf Grund der geringen Größe von PCV 2 erscheint eine Passage der Plazentaschranke möglich. Experimentell konnte nachgewiesen werden, dass sich das Virus in sich schnell teilenden Zellen repliziert, wie sie in fetalem Gewebe vorhanden sind (Pensaert, 2001);(Sanchez, 2001b); die größten Virusmengen waren dabei im Herzen nachzuweisen. Untersuchungen an abortierten Feten, Totgeburten oder Neugeborenen auf PCV 2 erbrachten positive Resultate (Allan et al., 1995; West et al., 1999; Baudouard et al., 2001), andere Feldstudien zeigten jedoch nur ein geringes Vorkommen von intrauterinen Infektionen (Baudouard et al., 2001). Nach transzervikalen Infektionsversuchen an „spezifisch-pathogenfreien“ (SPF) Sauen während der Besamung konnten sowohl Aborte und verfrühtes aber auch termingerechtes Abferkeln beobachtet werden. In manchen Feten sowie in einigen Ferkeln wurden PCV 2-Genom und/oder Antikörper gefunden (Cariolet, 2001b). Die Autoren schlossen daraus, dass PCV 2 bei nicht immunen Sauen Reproduktionsstörungen hervorrufen kann. Auch bei intratrachealen sowie intramuskulären Infektionsversuchen an SPF-Sauen traten sowohl Aborte und mumifizierte Feten auf, es wurden aber auch normal entwickelte, lebende Ferkel geboren. Da diese Ferkel weder PCV 2-Genom noch –Antikörper aufwiesen, liegt die Vermutung nahe, dass die plazentäre Barriere in diesem Fall nicht von den Viren überwunden werden konnte. Nach (Cariolet, 2001a)) verlaufen diese Reproduktionsstörungen bei den Sauen mit moderatem Fieber und ggr. Störung des Allgemeinbefindens. Nur bei einem Erstkontakt des Sauenbestandes mit PCV 2 scheinen deutlichere Reproduktionsstörungen zu resultieren (Pensaert, 2001). Da auch in Ebersperma PCV 2 nachgewiesen wurde, ist es als Infektionsquelle ebenfalls in Betracht zu ziehen (Larochelle et al., 2000b).

Bei den respiratorischen Erkrankungen, die mit PCV 2 in Verbindung gesehen werden, ist möglicherweise ein multifaktorielles Geschehen für den Ausbruch der Erkrankung verantwortlich. In Bezug auf die Porzine Nekrotisierende Pneumonie“ (PNP) konnte noch kein primäres Agens identifiziert werden, eine Koinfektion von PCV 2 und PRRSV scheint ursächlicher Auslöser zu sein (Pesch et al., 2000; Segales, 2004). Das Auftreten des „porcine respiratory disease complex (PRDC)“ wird in erster Linie mit PRRSV- und *Mycoplasma hyopneumoniae*-Infektionen in Zusammenhang gebracht. Zusätzliche Agentien wie z.B. PCV 2 spielen hier wohl nur eine untergeordnete Rolle (Thacker and Thacker, 2000).

2.1.5 Epidemiologie

Nach derzeitigem Wissen infiziert PCV 2 ausschließlich Schweine. (Rodriguez-Arriola et al., 2003). Serumantikörper gegen PCV 1 dagegen konnten außer bei Schweinen auch bei Menschen, Mäusen und Rindern nachgewiesen werden (Tischer et al., 1995; Nayar et al., 1999). Vor dem Hintergrund des Einsatzes porziner Gewebe und Organe in der humanen Transplantationsmedizin wurden humane Zelllinien mit PCV 1 und 2 infiziert. Eine Initiation der Replikation wie auch der PCV-Genexpression konnte zwar nachgewiesen werden, die Infektion stellte sich jedoch als unproduktiv dar (Hattermann et al., 2004).

Die ersten in Deutschland durchgeführten Studien zur Verbreitung von PCV zeigten, dass 77 bis 85 % der Schlachtschweine Kontakt zu PCV hatten (Tischer, 1982). In weiteren Untersuchungen wurde für Großbritannien eine Seroprävalenz von 86 % (Edwards, 1994), für Nord-Irland von 92 % (Allan et al., 1994), für Kanada von 26 bis 55 % (Dulac, 1989) festgestellt, in den USA waren durchschnittlich über 50 % der Tiere PCV-positiv (Suh, 1998). Ritzmann und Mitarbeiter (Ritzmann et al., 2002) konnten bei 53 % der untersuchten Bestände in Bayern und 40 % der einbezogenen Hausschweine PCV 2-Genom nachweisen. Dabei stellte sich heraus, dass zwischen PCV 2- Infektion einerseits und der Populationsdichte, dem Alter der Tiere und der Betriebsstruktur andererseits eindeutige Zusammenhänge bestehen: eine erhöhte Nachweisrate von PCV 2 ist mit dem zunehmendem Alter der Tiere, mit steigender Populationsdichte sowie einer zunehmenden Anzahl von Tieren verschiedener Herkunft in den Betrieben im Vergleich zu geschlossenen Betrieben korreliert.

In neueren in Belgien (Sanchez, 2001a) und Kanada (Cotrell et al., 1999) durchgeführten Untersuchungen zur altersabhängigen Seroprävalenz waren im Saugferkelalter bis zu 80 % der Tiere Antikörpertiter positiv; dieser Prozentsatz sinkt jedoch signifikant im Absatzferkelalter (Harding et al., 1999). Ein erneuter Anstieg lässt sich bei 13 - 14 Wochen alten Tieren feststellen (Allan et al., 1994); ältere Schweine sind häufig zu 100 % PCV 2- seropositiv (Harding et al., 1999; Hassing et al., 2001; Sanchez, 2001b).

Betrachtet man die altersabhängige Häufigkeit des Nachweises von PCV 2-Genom mittels PCR, so fällt auf, dass Ferkel im Alter von fünf bis zehn Wochen in PMWS-positiven Betrieben signifikant häufiger PCV 2 aufweisen als in PMWS-negativen Betrieben; in anderen Altersgruppen fällt dieser Unterschied nicht auf (Sibila et al., 2001). Bis zum Jahr 1985, also mehrere Jahre vor dem erstmaligen Auftreten von PMWS, konnten im Rahmen retrospektiver Untersuchungen PCV 2-spezifische Antikörper (Magar et al., 2000) wie auch mittels in-situ-Hybridisierung PCV 2-Genom (Rodriguez-Arrioja et al., 2003) entdeckt werden. Im Rahmen neuerer Untersuchungen war mittels PCR die Unterscheidung zwischen PCV 1 und PCV 2 möglich. Studien an Schweinen aus Spanien, Frankreich und Deutschland zeigten ein Vorkommen von PCV 1 in 5 % und von PCV 2 in 26,8 % der Fälle (Mankertz et al., 2000a).

Der erstmaligen Beschreibung von PMWS in Kanada (Harding, 1996) folgten weitere in Nordamerika (Daft et al., 1996) und Europa (Le Cann et al., 1997; Segales et al., 1997; Kennedy et al., 1998; Spillane et al., 1998; Hinrichs et al., 1999a; Celer Jr. and Carasova, 2001; Miliotis et al., 2001; Schmoll et al., 2001) sowie in Korea und Japan (Choi and Chae, 1999; Onuki et al., 1999).

Untersuchungen der Nukleotidsequenz des gesamten PCV 2-Genoms ergaben, dass die verschiedenen PCV 2- Isolate zu 95-99 % übereinstimmten (Fenaux et al., 2000), die größte Abweichung im Vergleich zu den übrigen Sequenzen zeigten zwei französische Isolate (AF055393 und AF055394) mit nur 95-96 % Übereinstimmung. Sechs Isolate PMWS-positiver Tiere aus geographisch weit auseinander liegenden Regionen Nordamerikas wiesen dagegen eine Sequenzhomologie von 98-99 % auf; anhand der Sequenz ließ sich später nachvollziehen, aus welcher Region das Isolat stammte. Bestimmte Sequenzveränderungen konnten demnach bestimmten Regionen zugeordnet werden (Fenaux et al., 2000).

Über den Einfluß der Variabilität des PCV 2-Genoms auf den Grad der Virulenz liegen bisher kaum Kenntnisse vor. Bei Auftreten von PMWS in vormals PMWS-freien Beständen ließ sich eine höhere Variabilität feststellen, das erstmalige Auftreten von PMWS in einer bestimmten Region konnte dagegen nicht auf eine bestimmte Variante zurückgeführt werden (DeBoisson et al., 2004). Auch nach 120 Passagen in PK-15-Zellen konnten lediglich zwei Mutationen entdeckt werden, beide lagen innerhalb des ORF 2 (Nukleotidposition 328 und 573) und traten in Passage 30 bzw. 120 auf; diese Mutationen veränderten sich im Weiteren nicht mehr. Ein Infektionsversuch ging mit

einer Verringerung der Wachstumsfähigkeit *in vitro* und einer Abschwächung des PCV 2 *in vivo* einher (Fenaux et al., 2004b).

2.1.6 Pathogenese

Der pathogenetische Ablauf im Symptomenkomplex: PMWS ist bisher nur teilweise bekannt.

Virales Genom kann in Nasen- und Augentupfern (Krakowka et al., 2000), Sperma (Larochelle et al., 2000b), Kot (Yang et al., 2003), sowie abortierten Feten (West et al., 1999) und Neugeborenen (Tschachtschal, 2000) gefunden werden, horizontale wie vertikale Übertragung von Tier zu Tier und über Vektoren sind somit denkbar. Eine Forschergruppe fand die Ausscheidung von PCV 2 über die Nase ohne gleichzeitig vorliegende Virämie bzw. klinische Symptome (Sibila et al., 2001). Auch konnte das Virus häufiger in Nasentupfern als im Serum nachgewiesen werden: die Zahl der Tiere mit PCV 2- Nachweis im Nasentupfer steigt in Betrieben, in denen PMWS-Fälle nachgewiesen werden. Dies unterstützt die These, dass zum Ausbruch von PMWS eine bestimmte Virusmenge erforderlich ist (Olvera et al., 2004). Experimentell gelang es, Schweine bei Infektionsversuchen intranasal, intratracheal, intramuskulär, subkutan, intraperitoneal und intrauterin zu infizieren; ohne bisherigen wissenschaftlichen Nachweis gilt es als wahrscheinlich, dass die Transmission hauptsächlich auf oronasalem Weg erfolgt (Rosell et al., 1999; Krakowka et al., 2003).

Als DNA-Virus ist PCV 2 auf eine Polymerase angewiesen; da das PCV 2-Genom jedoch keine viruseigene Polymerase kodiert, ist es bei der Replikation auf zelleigene Polymerasen angewiesen, die während der S-Phase der Mitose der Zelle im Zellkern präsent sein müssen (Tischer et al., 1987). Eine maximale Replikationseffizienz liegt in sich häufig teilenden Zellen vor, so dass sich mit zunehmendem Alter der Schweine die Zielzellen von PCV 2 ändern: so weisen die sich am 57. Trächtigkeitstag noch vermehrt teilenden fetalen Kardiomyozyten höhere Virusmengen auf als zu späteren Zeitpunkten. Das Virus befindet sich dann hauptsächlich in Makrophagen, die als sich nicht schnell-

teilende Zellen keinen Ort der Replikation, sondern vermutlich einen der Verbreitung und Persistenz darstellen (Sanchez, 2003).

Zu Beginn des Krankheitsverlaufs kann sich das Virus in lokalem Lymphgewebe wie Tonsillen und regionalen Lymphknoten replizieren, um sich dann systemisch auszubreiten. Es ist ungeklärt, ob sich der Erreger nach primärer Vermehrung am Eintrittsort intrazellulär im Organismus, in Makrophagen und anderen Antigen-präsentierenden Zellen oder frei in Lymphe oder Blut verbreitet (Segales et al., 2004). Die Infiltration mit Histiozyten, die gleichzeitig mit der makroskopischen Lymphadenopathie auftritt, scheint von essentieller Bedeutung für den Krankheitsverlauf zu sein, der Mechanismus der Infiltration ist allerdings noch nicht erforscht (Clark, 1997; Rosell et al., 1999). Im Absetzalter scheinen Darmepithelien und Hepatozyten, vaskuläre Endothelien, Kupffer-Zellen sowie interstitielle histiozytenähnliche Zellen während des weiteren Krankheitsverlaufs eine wichtige Quelle für neu synthetisiertes infektiöses Virusmaterial zu sein, da sowohl das für die Replikation wichtige virale Nukleocapsid als auch die DNA-Replikase in diesen Zellen nachgewiesen werden kann (Krakowka et al., 2003).

Ein PCV 2-Antikörpertiter ist nicht mit dem Auftreten von PMWS assoziiert (Larochelle et al., 2003); zwischen dem Antikörpertiter und PNDS scheint jedoch ein Zusammenhang zu bestehen, da hohe PCV 2-Titer möglicherweise eine Grundlage für die Entstehung dieser Erkrankung darstellen (Wellenberg et al., 2004). Für den Ausbruch der klinischen Symptomatik von PMWS ist jedoch eine kritische Erregermenge erforderlich (Morozov et al., 1998; Liu et al., 2000; Shibara et al., 2000; Darwich et al., 2002; Olvera et al., 2004), ebenso scheint der Schweregrad der Erkrankung mit dem quantitativen Vorkommen infektiösen Virusmaterials in den Geweben zu korrelieren. Bei PNDS findet man im Vergleich zu PMWS weniger Virus (Olvera et al., 2004). Das Alter der Tiere zum Zeitpunkt der Infektion spielt eine Rolle im pathogenetischen Ablauf des PMWS (Blanchard et al., 2001; Sibila et al., 2001).

Nach der Manifestation der Infektion im Wirt können Läsionen in nahezu allen Organen lokalisiert sein, wobei die Zahl der betroffenen Organe positiv mit dem Grad der lymphoiden Läsionen korreliert (Segales et al., 2004).

Die sowohl im Blut als auch in den lymphoiden Geweben nachweisbare lymphozytäre Depletion (Rosell et al., 1999; Segales et al., 2000; Darwich et al., 2003) und die histiozytäre Infiltration stehen im Vordergrund der zellulären Veränderungen, so dass

ein immunsupprimierender Effekt von PMWS deutlich wird (Chianini et al., 2003). In vergleichenden Untersuchungen zur Antigenmenge und dem Grad der lymphozytären Depletion stellten mehrere Autoren eine Korrelation fest: mit steigendem Virusgehalt ist eine zunehmende Depletion nachzuweisen (Rosell et al., 1999; Darwich et al., 2002; Chianini et al., 2003). Die lymphozytäre Depletion ist folglich mit dem Stadium der Infektion in Zusammenhang zu sehen, da sie mit fortschreitender Infektion zunimmt.

Allem Anschein nach spielen komplexe Modulationen des Immunsystems wie Immunsuppression oder proinflammatorische Vorgänge eine Rolle in der Pathogenese des PMW (Darwich et al., 2004; Sipos, 2004). Unter Verabreichung immunmodulierender Substanzen untersuchte Krakowka die Rolle des Immunsystems: nach der Applikation von Cyclosporin konnte eine Potenzierung der Replikation des Virus beobachtet werden; die infizierten Tiere entwickelten jedoch keine PMWS-charakteristischen Läsionen, was wiederum eine Immunmediation der granulomatösen Entzündung vermuten lässt (Krakowka, 2002). Allerdings bleibt die Frage, warum mit immunsupprimierend wirkenden Kortikosteroiden nicht das gleiche Ergebnis zu erzielen ist.

2.1.7 PCV 2-assoziierte Krankheitsbilder

2.1.7.1 Postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS)

Klinik

Das Krankheitsbild PMWS tritt in der Regel bei sechs bis fünfzehn Wochen alten Absatzferkeln auf (Segales et al., 2002a); Saugferkel sind selten betroffen (Harding, 1996; Le Cann et al., 1997; Clark and Harding, 1998; Domingo and Segales, 1999; Pallares et al., 2002). Das klinische Leitsymptom der Erkrankung ist das Kümmeren der Tiere durch einen über Wochen zunehmenden Gewichtsverlust (Daft et al., 1996; Harding, 1996; Le Cann et al., 1997; Segales et al., 1997; Harding et al., 1999). Zusätzlich treten chronisch-rezidivierende, behandlungsresistente Atemwegserkrankungen mit Dyspnoe auf, unter bakteriellen Sekundärinfektionen wird Husten beobachtet; desweiteren wird Durchfallsymptomatik gesehen (Harding, 1996; Segales et al., 1997; Domingo and Segales, 1999; Harding et al., 1999; Madec et al., 2000). Klinisch auffällig ist darüber hinaus eine häufig auftretende mikrozytäre, hypochrome, nicht selten mit einer Leukopenie einhergehende Anämie sowie eine Vergrößerung der inguinalen Lymphknoten (Segales et al., 2000b); gelegentlich kommt es zum Ikterus (Daft et al., 1996; Harding, 1996; Le Cann et al., 1997; Segales et al., 1997; Harding et al., 1999).

Nicht bei jedem PMWS-erkrankten Tier treten alle genannten Symptome gleichzeitig auf. Grundsätzlich gilt aber, bei Kümmeren sowie einer Vergrößerung der inguinalen Lymphknoten eines Tieres oder einer Gruppe von Tieren PMWS differentialdiagnostisch in Betracht zu ziehen. Treten bei der histo-pathologischen Untersuchung in den lymphoiden Geweben typische Veränderungen wie eine lymphozytäre Depletion in Verbindung mit einer granulomatösen Entzündung, vielkernige Riesenzellen sowie PCV 2-typische zytoplasmatische Einschlusskörperchen auf und wird bei der virologischen Untersuchung PCV 2 in diesen Läsionen nachgewiesen, so handelt es sich um PMWS (Sorden, 2000; Quintana et al., 2001).

Folgende Aussagen lassen sich hinsichtlich PMWS zusammenfassend treffen: nach (Domingo and Segales, 1999) beträgt die Morbidität bis zu 60 % und die Letalität 50 - 90 %; Le Cann und Mitarbeiter (Le Cann et al., 1997) berichten von einer 18%igen

Mortalität und Verlusten von bis zu 35 %. Co-Infektionen mit anderen viralen bzw. mit bakteriellen Erregern werden für hohe Verluste verantwortlich gemacht (Domingo and Segales, 1999). Im Übrigen wird ein zyklisches Auftreten der Infektion beobachtet: ohne Bekämpfungsmaßnahmen können PMWS-Symptome annähernd zwei Jahre lang auftreten. Unterschiedliche Betriebsgrößen und -formen sind dabei in gleicher Weise betroffen.

Pathomorphologie

Makroskopische Befunde: PMWS-erkrankte Tiere zeigen in der Sektion als auffälligste Veränderung eine Vergrößerung der Lymphknoten, häufig verbunden mit einer generalisierten Lymphadenopathie (Le Cann et al., 1997; Clark and Harding, 1998; Kennedy et al., 1998; Segales et al., 1999a) sowie einer nicht kollabierten dunkel gefleckten Lunge (Rosell et al., 1999). Abgesehen von den inguinalen sind meistens die submandibulären, mesenterialen und mediastinalen Lymphknoten vergrößert (Rosell et al., 1999). Die Lymphknoten erscheinen im Anschnitt homogen weißlich, können aber in seltenen Fällen multifokale konfluierende nekrotische Bereiche aufweisen (Segales et al., 2000). Daneben sind jedoch auch in nicht vergrößerten oder atrophischen Lymphknoten schwerwiegende PMWS-typische, nur mikroskopisch sichtbare Veränderungen zu sehen (Segales et al., 2004). Die Lunge erscheint in der Sektion schlecht retrahiert und von fester oder gummiartiger Konsistenz (Clark and Harding, 1998). Die Oberfläche stellt sich fleckig, mit einem lobulären Muster verschiedener Farbabstufungen von grau-bräunlich über gelb bis zu rosa dar. (Le Cann et al., 1997; Clark and Harding, 1998; Segales et al., 1999a). Häufig auftretende Verdichtungen der apikalen Lungenlappen sind auf bakterielle Sekundärinfektionen zurückzuführen (Domingo and Segales, 1999).

Weitere bei PMWS gefundene Veränderungen sind Magenulzera in der Pars oesophagea (Pastor et al., 1998; Segales et al., 1999a), Ikterus (Segales et al., 1997) sowie eine atrophische oder vergrößerte Leber (Rosell et al., 2000a). Die Nieren sind zumeist blass, gefleckt und vergrößert (Clark and Harding, 1998; Segales et al., 1999a). Die Magenulzera werden jedoch nicht als direkte Folge der PCV 2-Infektion angesehen, sondern sind eher multifaktoriellen Ursprungs oder beruhen auf bakteriellen Infektionen. Diese Ulzera könnten infolge evtl. Blutungen zur Anämie beitragen, möglicherweise erklären sie auch Todesfälle bei PMWS-erkrankten Tieren (Segales et al., 2000), es

wurden jedoch auch Anämien bei entsprechenden Tieren beschrieben, die keine Magenulzera aufwiesen (Darwich et al., 2003). Chronisch PMWS-kranke Tiere sind zudem kachektisch, sie zeigen eine deutliche Muskel- und Fettatrophie (Segales et al., 1997).

Mikroskopische Befunde: Als charakteristische Veränderung für PMWS kann die unterschiedlich ausgeprägte lymphozytäre Depletion mit dem Verlust lymphozytärer Architektur in den lymphoiden Geweben angesehen werden (Clark, 1997; Kennedy et al., 1998; Segales et al., 1999a; Allan et al., 2004); diese Veränderung ist einzigartig und generell identifizierbar (Segales et al., 2004). Normalerweise tritt sie in Verbindung mit einer multifokalen bis diffusen, gering- bis hochgradigen histiozytären und/oder multinukleären Riesenzellinfiltration auf, die vor allem in den subkapsulären und in den Mark-Sinus sowie in den Lymphfollikeln lokalisiert ist bzw. - je nach Schweregrad - den gesamten Lymphknoten betreffend kann (Clark, 1997; Segales et al., 1999a).

Weiterhin spezifisch ist das Vorkommen von basophil-anfärbbaren zytoplasmatischen sphärischen Einschlusskörperchen in histiozytären Zellen (Clark, 1997; Rosell et al., 1999; Allan et al., 2004). In nekrotisierenden Läsionen der Lymphknoten sind in Bereichen koagulativer Nekrosen meist auch vaskuläre Thromben zu finden, was pathogenetisch bisher nicht eingeordnet werden konnte (Segales et al., 2004).

Entsprechend häufig wie in den lymphoiden Geweben stößt man in der Lunge auf histologische Veränderungen (Clark, 1997), meist in Form einer subakuten interstitiellen Pneumonie (Rosell et al., 1999; Segales et al., 1999a; Allan et al., 2004) mit Infiltration von histiozytären und multinukleären Riesenzellen in den verbreiterten Alveolarsepten; diese Entzündungszellen lassen sich auch in der Umgebung der Bronchien und Bronchiolen finden (Clark, 1997; Segales et al., 1999a). Gelegentlich wird in dem lymphoiden Gewebe des Bronchus (BALT) auch eine lymphozytäre Depletion sowie eine histiozytäre Infiltration gesehen (Segales et al., 2004). Wird eine kranio-ventrale Lungenverfestigung diagnostiziert, handelt es sich um eine katarrhalisch-eitrige Bronchopneumonie mit polymorphkernigen Neutrophilen im Inneren der Bronchien, Bronchiolen und Alveolen, ausgelöst durch eine bakterielle Sekundärinfektion (Segales et al., 1999a).

Die Veränderungen in der Leber stellen sich als eine periportale lymphohistiozytäre Infiltration dar; einzelne Leberzellen weisen Nekrosen auf, das Zytoplasma der Hepatozyten ist vakuolisiert und geschwollen (Clark, 1997). In Fällen hochgradiger

Läsionen ist eine generalisierte perilobuläre Fibrose, eine Zerstörung der Leberläppchenarchitektur sowie ein massiver Verlust an Hepatozyten festzustellen (Clark and Harding, 1998; Segales et al., 1999a). Entsprechend dem Zerstörungs- und Verteilungsgrad werden die Leberläsionen bei PMWS-Tieren in vier Stadien eingeteilt (Rosell et al., 2000a).

In der Niere kann sporadisch eine schwere subakute bis chronische interstitielle Nephritis mit hohem Gehalt an PCV 2 beobachtet werden (Segales et al., 2004).

Als weitere mikroskopische Läsionen finden sich bei schwerwiegend erkrankten Tieren in nahezu allen Organen gering- bis mittelgradige lympho-histiozytäre entzündliche Infiltrate (Clark, 1997; Rosell et al., 1999).

2.1.7.2 Weitere mit PCV 2 in Zusammenhang gebrachte Krankheitsbilder

Die weiteren in Zusammenhang mit PCV 2 genannten Krankheitsbilder sollen hier nicht im Detail beschrieben werden. Im Einzelnen handelt es sich um das erstmals 1993 in Großbritannien beschriebene „Porcine Dermatitis und Nephropathie Syndrom“ (PDNS) (Smith et al., 1993), den „Porcine Respiratory Disease Complex“ (PRDC) (Thacker and Thacker, 2000) und die „Proliferative und nekrotisierende Pneumonie“ (PNP) (Morin et al., 1990). Es gilt weiterhin als erwiesen, dass PCV 2 in der Lage ist, sowohl allein (West et al., 1999) als auch in Verbindung mit anderen beim Schwein bekannten Pathogenen (Baudouard et al., 2001; O'Connor et al., 2001) Reproduktionsstörungen hervorzurufen.

2.1.8 PCV 2 beim Wildschwein

Zur Untersuchung des Vorkommens porciner Circoviren beim Wildschwein (*Sus scrofa*) wurden 1986 außer bei Schlachtschweinen auch bei einigen Wildschweinen PCV-Antikörpertiter bestimmt: fünf der sechs untersuchten Wildschweine waren mit Titern von 1:2, 1:10 und 1:20 bzw. zweimal von 1:80 Antikörper-positiv (Tischer et al., 1986); zwischen PCV 1 und PCV 2 wurde hier jedoch nicht unterschieden.

Der Nachweis von PCV 2 gelang Ellis und Mitarbeitern (Ellis et al., 2003) bei in Freilandbedingungen aufgezogenen Wildschweinen; die kachektischen Tiere wiesen sowohl eine Pneumonie als auch eine Enteritis auf. In den betroffenen Geweben konnte mittels Immunhistochemie und in-situ-Hybridisierung PCV 2 identifiziert werden: aus gepoolten Organproben wurde ein PCV 2-ähnliches Virus isoliert, dessen ORF 2 eine 96,7%ige Homologie zu einem Referenz-PCV 2-Isolat aufwies.

Bei serologischen Untersuchungen in Belgien (Sanchez et al., 2001a) und Spanien (Segales et al., 2002c) wurden Seroprävalenzen von 35,6 % (100 von 281 untersuchten Tieren) in Belgien und von 34,6 % (9 von 26 Tieren) in Spanien gefunden. In die bisher weltweit umfangreichste Untersuchung in Spanien flossen Daten von 656 Wildschweinen ein: 47,89 % +/- 1,9 % der Tiere hatten einen positiven Serum-Titer. Sowohl Seroprävalenz als auch die Titerhöhe standen in engem Zusammenhang mit den Lebensbedingungen der Wildschweinpopulationen: Wildschweine aus Hausschwein-ähnlicher Haltung wiesen höhere Seroprävalenzen auf als solche, die unter natürlichen Bedingungen lebten. Die Untersuchung von Vicente et al. (Vicente et al., 2004) zeigte außerdem einen Zusammenhang zwischen PCV 2 und PMWS beim Wildschwein auf.

Bei einer Untersuchung zur Prävalenz und Sequenz von PCV und PPV bei Wildschweinen in Österreich wurden drei der 28 untersuchten Proben (10,7 %) als PCV 1 und 13 als PCV 2-positiv (46,4 %) eingestuft, nur eine der Proben enthielt sowohl PCV 1 als auch PCV 2; PPV konnte in 25 der 28 Fälle (89,3 %) nachgewiesen werden; kein Tier wies PMWS-typische Läsionen auf. Die Homologie zweier PCV 2-Isolate betrug 99,55 %, was einem Unterschied in acht Nukleotiden entspricht. Verglichen mit dem in der Datenbank vorhanden österreichischen AUT 1-Stamm (Genebank Accession No.

AY424402) lag der Unterschied der Wildschwein-Isolate bei 97,3 %, was wiederum einem Unterschied in 48 Nukleotiden entspricht (Exel et al., 2004).

Eine sehr detaillierte Beschreibung gibt einen PMWS Fall in Brandenburg (Schulze et al., 2003) wieder: bei der Sektion eines tot aufgefundenen zehn Monate alten Keilers fielen der magere Zustand sowie petechiale Blutungen auf. Die histologische Untersuchung zeigte eine typische lymphozytäre Depletion in Lymphknoten, Milz und Lunge sowie eine histiozytäre Infiltration und synzytiale Riesenzellen begrenzt auf die Lymphknoten. Darüber hinaus wurden eine Pneumonie sowie herdförmige Nekrosen in der Leber diagnostiziert; die in beiden Organen zu sehenden gram-negativen Stäbchen wurden als *Salmonella cholerae suis* var. *Kunzendorf* identifiziert. Elektronenmikroskopisch fielen vermehrt kleine runde Circoviren auf, die in der Immunfluoreszenzmikroskopie bei Verwendung von Antiserum gegen porcine Circoviren in Milz, Tonsillen und Lymphknoten eine positive Fluoreszenz zeigten. Der PCR-Nachweis einer PCV 2-spezifischen Nukleotidsequenz fiel positiv aus; mit einer semi-quantitativen PCR konnte dieser Befund präzisiert werden, wobei sich im Vergleich mit an PMWS erkrankten Hausschweinen, eine höhere Menge an PCV 2 feststellen ließ.

Bei einer ebenfalls aus der Region Brandenburg stammenden Wildschwein (*Sus scrofa*) /Hausschwein (*Sus scrofa scrofa*) -Kreuzung wurde die gefundene geringere lymphozytäre Depletion und kleinere Menge PCV 2-Genom als moderater Fall von PMWS interpretiert (Segales et al., 2003). Die Arbeitsgruppe um Segales beschrieb zwei weitere aus Spanien stammende Fälle: bei der Sektion eines abgemagerten Wildschweins in schlechter körperlicher Verfassung konnten neben einer nekrotisierenden Pneumonie, eine fibrinös-nekrotisierende Kolitis sowie Nekrosen in der Leber festgestellt werden; die Histologie mit lymphozytärer Depletion und histiozytärer Infiltration mit vielkernigen Riesenzellen bestätigte in Zusammenhang mit dem Nachweis des PCV 2-Genoms die Diagnose PMWS; auch hier wurde neben PCV 2 der Erreger *Salmonella cholerae suis* var. *Kunzendorf* isoliert. Das zweite Schwein zeigte diese Befunde in deutlich geringerem Umfang, es wurde als subklinischer Fall von PMWS eingestuft (Segales et al., 2003).

Diese Untersuchungsergebnisse legen folgenden Schluß nahe: Wildschweine könnten als Erregerreservoir eine wesentliche Rolle spielen und somit auch für die Verbreitung von PCV 2 in Hausschweinepopulationen verantwortlich sein. Der noch nicht geklärte Pathomechanismus, bei dem neben PCV 2 noch ein auslösender Kofaktor erforderlich

für die Verbreitung von PCV 2 ist (Krakowka et al., 2001), scheint beim Wild - ähnlich wie beim Hausschwein - zu funktionieren.

2.1.9 PMWS und Koerreger beim Wildschwein

Wegen des häufigen Nachweises von Koerreger beim klinischen Bild: PMWS beim Hausschwein (Le Cann et al., 1997; Hinrichs et al., 1999a), wurde neben PCV 2 auch der Nachweis von PPV und PRRSV in einige Untersuchungen beim Wildschwein einbezogen: in Österreich konnte in 25 von 28 Fällen PPV nachgewiesen werden, was einer Prävalenz von nahezu 90 % entspricht (Exel et al., 2004). Die Beteiligung von PRRSV wurde im Rahmen einer weitaus größeren Studie in Deutschland untersucht. Es wurden 482 Wildschweine aus Sachsen-Anhalt und 177 aus Brandenburg mittels IPMA auf PRRSV-Antikörper getestet: lediglich in zwei Seren von Schweinen aus Sachsen-Anhalt konnten PRRSV-Antikörper nachgewiesen werden (Oslage et al., 1994). Eine zwischen 1993 und 1995 in Frankreich durchgeführte Untersuchung von 909 Proben auf PRRSV-Antikörper ebenfalls mittels IPMA ergab mit 3,6 % (33 positive Proben) eine etwas höhere Prävalenz (Albina et al., 2000). In Kroatien dagegen wies keines der 44 untersuchten Wildschweinseren PRRSV-Antikörper auf. (Zupancic et al., 2002).

Über die Existenz weiterer Koerreger ist nichts bekannt.

2.1.10 Mögliche Ansätze der Prävention gegen PCV 2

Prinzipiell bieten sich folgende Ansatzpunkte der Prävention:

- a) Impfung
- b) Managementmaßnahmen

In den ersten Schritten der Entwicklung gelang es chimäre infektiöse DNA-Klone aus pathogenem PCV 2- und apathogenem PCV 1-Isolaten herzustellen. Das Genom von PCV 1 wurde von PCV 2-Capsid umgeben und anschließend Schweinen injiziert. Dies führte zu einer PCV 2-spezifischen Antikörperreaktion, die jedoch schwächer ausfiel als bei unveränderten PCV 2. Auch die PMWS-typischen Läsionen waren im Vergleich zur Kontrollgruppe, der man unverändertes infektiöses PCV 2 injizierte, stark reduziert (Fenaux et al., 2003). Infektionsversuchen mit dem Wildtyp-pathogenen PCV 2-Typ bestätigten diese Ergebnisse, wobei die ausgewählten Tiere zunächst untersucht, danach geimpft und anschließend infiziert worden waren. Nur bei einem von 36 geimpften Tieren gelang es PCV 2-Antigen zu detektieren. Parallel dazu war die lymphozytäre Depletion ebenfalls nur bei wenigen Tieren feststellbar. Hieraus konnte die Schlussfolgerung gezogen werden, dass die Vakzination mit einem chimären PCV 1-2-Klon eine protektive Immunität induziert (Fenaux et al., 2004a).

Basierend auf der Annahme, dass das Capsid das Hauptimmunogen sei, wurde Ferkeln wiederholt ein plasmidexprimiertes ORF 2-Protein sowie Granulozyten-Makrophagen-Stimulations-Faktor (GM-CSF) injiziert. Anhand der Wachstumsparameter der Schweine, ihrer klinischen Symptome wie auch der Serokonversion kam man zu dem Schluss, dass nach der Impfung ein gewisser Schutz gegen PCV 2 vorliegt (Blanchard et al., 2003b). Nach Klonierung von ORF 2 in Plasmiden konnten steigende Antikörpertiter auch in Mäusen provoziert werden, was diesen Ansatz unterstreicht (Kamstrup et al., 2004).

Mittlerweile sind verschiedene Impfpräparate auf dem Markt erhältlich: in Europa ist ein Totimpfstoff für Muttertiere lizenziert, in Nordamerika finden verschiedene Impfstoffe für Ferkel Anwendung. Für die Muttertier- (Reduktion der Mortalität, Rückgang der klinischen Erkrankungen und der medikamentellen Behandlung) und die Jungtierimpfungen (Reduktion der Virämie und histopathologischen Läsionen) konnten

unterschiedliche Wirkungen bewiesen werden (Joisel et al., 2006). Die Impfungen beruhen auf der Annahme, dass ein erhöhter Antikörperspiegel das Erkrankungsrisiko senkt (Thomas et al., 2005). Ein signifikanter Titeranstieg konnte für die Muttertierimpfung bewiesen werden (Charreyre et al., 2006), der zu einer nachweisbaren Verminderung (gemessen in mesenterialen Lymphknoten und Kot) der Replikation des Virus führt (Charreyre et al., 2006a).

Medikamentelle Behandlungen sind weitestgehend wirkungslos und scheinen nur die häufig vergesellschafteten Sekundärinfektionen zu mindern (Harding, 1996). Eine Therapie der einmal ausgebrochenen Krankheit am Einzeltier ist nicht bekannt.

Da PCV 2 für sich allein nur subklinische PMWS-Fälle induzieren kann, ist ein Präventionsansatz in der Auszuschaltung der erwähnten Kofaktoren sehen: dazu müssten allerdings zum einen alle beteiligten Kofaktoren bekannt sein, zum anderen ist bereits die Zahl der bereits identifizierten Kofaktoren so groß, dass sich eine völlige Ausschaltung äußerst schwierig gestalten dürfte.

Um gewisse Kofaktoren auszuschalten muß das Management der Hausschweinehaltung unter bestimmten Aspekten verbessert werden: z.B. konsequentes Rein-Raus-Verfahren (Harding, 1996), Separation bzw. ggf. Euthanasie erkrankter Tiere zur Senkung des Infektionsdrucks für die noch nicht erkrankten Tiere (Harding, 1998), des weiteren Überprüfung der Lüftung sowie die Vermeidung hoher Belegdichte (Domingo and Segales, 1999), um durch über eine Stressreduktion die Morbidität zu senken (Madec et al., 2000).

Obwohl es keinen Hinweis darauf gibt, dass eine bestimmte Rasse bevorzugt betroffen ist, wird eine genetische Prädisposition für die Entstehung des Krankheitsbildes angenommen (Darwich et al., 2004). Bei dem Aspekt der genetischen Prädisposition könnten folgende Faktoren eine Rolle spielen: Polymorphismen des „majorhistokompatibility-complex“ (MHC-I und MHC-II), T-Zell-Rezeptoren oder Zytokin-Gene. Es ist bekannt, dass Polymorphismen von Genen des „majorhistokompatibility-complex“ die Empfänglichkeit von Menschen oder Tieren gegenüber bestimmten viralen Infektionen determinieren (Garcia-Briones, 2000; Moore, 2002; Konnai, 2003).

2.2 Nachweismethoden

2.2.1 Antigennachweis

2.2.1.1 Virusisolation

Die Virusanzüchtung gelingt auf verschiedenen Schweinezelllinien. Da PCV 2 jedoch keinen zytopathogenen Effekt hervorruft, wird der Virusnachweis mittels anderer Techniken durchgeführt (Allan et al., 1998).

2.2.1.2 Elektronenmikroskopie

Nach Anzüchtung von PCV auf porzinen Nierenzellkulturen (PK-15) lassen sich neben einer großen Anzahl intrazytoplasmatischer Einschlüsse vereinzelt auch elektronendichte intranukleäre Einschlüsse von runder bis ovaler Form finden. Hierbei sind zwei Typen zu unterscheiden: Typ 1 verfügt über eher kleine Einschlüsse (0,1-0,5 µm), die zum Teil 0-14 nm große lockere Aggregate von ikosaedralen Nukleocapsiden oder kaum geformte parakristalline Bereiche enthalten. Typ 2 hingegen besitzt größere (0,5-5 µm) und zahlreichere Einschlüsse, die von einer trilaminaren Membran umrandet sind, daneben eine größere Elektronendichte. Die Virionen formieren sich zu parakristallinen Bereichen, manchmal jedoch auch zu losen Aggregaten, woraus sich unterschiedliche Virionenaggregatmengen ergeben. Intranukleäre Einschlüsse sind generell nicht membrangebunden und oft mit kleinen Nukleoli und Aggregaten von Heterochromatin assoziiert (Stevenson et al., 1999).

2.2.1.3 In-situ-Hybridisierung (ISH)

Mit Hilfe der In-situ-Hybridisierung (ISH) ist es möglich, den Erreger im pathohistologischen Schnittpräparat direkt sichtbar zu machen. Hierzu verwendet man eine aus Nukleinsäuren bestehende Sonde, die zum einen komplementär zu der gesuchten Sequenz und zum anderen endmarkiert ist; nach Anlagerung der Sonde erfolgt eine unter dem Lichtmikroskop sichtbare Farbreaktion. Um diese Anlagerung zu ermöglichen, ist zunächst eine Proteolyse des Gewebes sowie eine Denaturierung der DNA erforderlich. Ein Vorteil dieser Methode besteht darin, dass ein direkter Zusammenhang zwischen dem Erreger und dem histopathologischen Bild hergestellt werden kann.

Der Nachweis von PCV 2 mit Hilfe der ISH gelang in verschiedensten Geweben (Morozov et al., 1998; McNeilly et al., 1999; Rosell et al., 1999).

2.2.1.4 Immunhistochemie (IHC)

Bei der auf einer Antigen-Antikörperreaktion beruhenden immunhistochemischen Untersuchung wird das histologische Schnittpräparat mit einer PCV 2-spezifischen Antikörperlösung überschichtet. Dabei sind entweder diese im Normalfall von Kaninchen oder Mäusen stammenden Antikörper bereits markiert (direkte IHC) oder es erfolgt eine zweite Überschichtung mit markierten Antikörpern, die sich nun ihrerseits an die PCV 2-Antikörper binden (indirekte IHC). Das Vorhandensein von PCV 2 wird, wie bei der ISH, durch eine Farbreaktion sichtbar. Der Vorteil der IHC gegenüber der ISH liegt in den geringeren Kosten sowie dem geringeren Zeitaufwand (McNeilly et al., 1999; Sorden et al., 1999). Darüber hinaus sind mit Hilfe beider Untersuchungsvarianten retrospektive Untersuchungen an formalinfixierten oder in Paraffin eingebetteten Präparaten möglich.

2.2.1.5 Fluoreszenz-Antikörper im Gefrierschnitt (FA)

Im Gegensatz zu den zuvor beschriebenen Methoden an fixierten Schnittpräparaten erfolgt die Darstellung des PCV 2-Antigens hier in Gefrierschnitten. Bei Temperaturen zwischen -15 und -20°C wird ein ca. 5 µm dünner Schnitt des zu untersuchenden Gewebes mit Antikörpern überschichtet. Auch diese Methode ist als direkte oder indirekte Variante durchzuführen, wobei bei der indirekten Variante noch ein Arbeitsschritt hinzukäme, bevor unter dem Mikroskop - die Anwesenheit von PCV 2 vorausgesetzt - gefärbte Bereiche sichtbar werden (Allan et al., 1999).

2.2.1.6 Polymerase-Chain-Reaction (PCR)

Die momentan gängigste Methode zum Nachweis des PCV 2-Genoms ist die von Mullis und Mitarbeitern entwickelte PCR (Mullis et al., 1986): von einer vorhandenen Sequenz (DNA oder RNA), an die sich ein Primerpaar komplementär bindet, werden möglichst viele Kopien hergestellt, die dann in einer nachfolgenden Elektrophorese beispielsweise mit Hilfe von Etidiumbromid sichtbar gemacht werden; mit spezifischen Primern kann so auch zwischen PCV 1 und PCV 2 unterschieden werden (Morozov et al., 1998; Ellis et al., 2000). Als Untersuchungsmaterial eignen sich sowohl Gewebe wie auch Serum (Morozov et al., 1998; McNeilly et al., 1999; Rosell et al., 1999; Olvera et al., 2004). Die Aussagekraft ist allerdings rein qualitativer Natur; die hohe Sensitivität dieser Methode sollte bei der Interpretation jedoch stets berücksichtigt werden, da PCV 2 auch bei gesunden Tieren nachgewiesen werden kann (Buffereau et al., 2001).

Zur quantitativen Darstellung von PCV 2-Antigen wurde eine so genannte „Real-time-PCR“ etabliert (Rovira et al., 2002; Olvera et al., 2004), die an Bedeutung gewinnen könnte, da die Antigenmenge in der Pathogenese eine wichtige Rolle zu spielen scheint (Olvera et al., 2004).

2.2.1.7 Antigen-ELISA

Zur Detektion von PCV 2-Antigen (Ag) wurde ein Antigen-Enzyme-linked-immunosorbent Assay (Ag-ELISA) entwickelt (McNeilly et al., 2001; McNeilly et al., 2002), in dem zunächst PCV 2-spezifische Antikörper auf eine Platte und auf diese anschließend ein Gewebehomogenisat gegeben werden. Bei vorhandenem, sich an die Antikörper auf der Platte bindendem PCV 2, löst dieser Vorgang eine Enzymreaktion mit Änderung der optischen Durchlässigkeit aus, die dann gemessen und mit standardisierten Positiv- und Negativkontrollen verglichen wird.

2.2.2 Antikörpernachweis

2.2.2.1 Antikörper-ELISA

Im Unterschied zum Antigen-ELISA sollen bei dieser Methode nicht PCV-Antigen sondern mit Hilfe einer an ein Enzymsystem gekoppelten Reaktion PCV-Antikörper nachgewiesen werden. Eine Variante des Ak-ELISA basiert auf dem Nachweis von Antikörpern, die sich gegen ein rekombiniertes Hauptkapsidprotein richten, das Bestandteil von ORF 2 ist (Nawagitgul et al., 2002). Diese Variante ermöglicht es, Tiere, die Kontakt zu PCV 2 gehabt und daraufhin Antikörper gebildet haben, zu identifizieren.

2.2.2.2 Indirekter-Immunfluoreszenz-Antikörpertest (IIFA)

Im IIFA können über eine Verbindung der im Serum befindlichen Antikörpern mit auf einer Oberfläche gebundenen Antigenen PCV 2-spezifische Antikörper nachgewiesen im werden. Bei diesem indirekten Test wird noch ein zusätzlicher Arbeitsschritt, bei dem fluoreszinmarkierte, unter dem Mikroskop zu identifizierende Antikörper, die sich gegen die PCV 2-Antikörper richten, auf die Platte aufgebracht werden, erforderlich. Durch die Anfertigung einer Verdünnungsreihe des zu untersuchenden Serums ist eine Titerbestimmung möglich (Allan et al., 1998).

3 Material und Methoden

3.1 Probenmaterial

Für die Untersuchung standen Milzproben von 238 Wildschweinen aus 10 hessischen und rheinland-pfälzischen Revieren aus den Regionen rheinischer Westerwald (Reviere 1 bis 4), nordwestlicher Hunsrück (Revier 5 und 6), Rheingau (Revier 7) und Odenwald (Reviere 8 bis 10) zur Verfügung. (Abbildung 11).

Die Anzahl der untersuchten Proben aus den einzelnen Revieren ist Tabelle 3 zu entnehmen.

Die Reviere waren durchschnittlich 63,5 km voneinander entfernt (7,4 bis 140 km), in Ost-West-Richtung zwischen 2 bis 106 km, in Nord-Süd-Richtung 2 bis 93,5 km. Anhand ihrer geographischen Nähe wurden die Reviere zu Regionen zusammengefasst (Tabelle 3). Das Revier 4, bei dem es sich um ein Wildgatter handelte, wurde stets getrennt von den übrigen Revieren betrachtet.

Tabelle 3: Herkunft der beprobten Wildschweine im Überblick

Land	Region	Region	Revier	Tiere	Datum	
Rheinland-Pfalz	Rheinischer Westerwald	R1	1	26	24.11.03	
			2	44	22.11.03	
					13.12.03	
			3	40	20.11.03	
		Gatter	4	39	10.12.03	
	Nordwestlicher Hunsrück	R2	5	41	25.11.03	
			6	14	18.11.03	
	Rheingau	R3	7	14	09.11.03	
	Hessen	Odenwald	R4	8	1	Januar bis März 04
				9	12	
10				7		
	Summe			238		

3.1.1 Entnahme und Konservierung

Alle Wildschweine wurden bis auf die in Revier 4 im Gatter geschossenen Tiere bei Treibjagden erlegt und direkt vor Ort bzw. in Rheinland-Pfalz in der Zeit von November bis Dezember 2003 an zentralen, im Rahmen von § 14a der Schweinepestverordnung eingerichteten Stellen, aufgebrochen. Die Wildschweine wurden gekennzeichnet, ihr Zahnalter bestimmt und das Körpergewicht geschätzt, die danach entnommenen Milzproben wurden auf Eis transportiert und bis zur Verarbeitung bei -20°C gelagert.

3.1.2 Zahnaltersschätzung

Die Altersschätzung der erlegten Tiere orientierte sich am Zahnwechsel; eine monatsgenaue Altersschätzung ist trotz individueller Unterschiede und einer großen Variationsbreite in Bezug auf den Wechsel einzelner Zähne mit Hilfe des in Tabelle 4 aufgeführten Schemas möglich (Stubbe, 2001).

Tabelle 4: Zahnaltersschätzung nach Stubbe (2001)

Alter Monaten	in	Beschreibung
<1		I3 und c im Unterkiefer vorhanden
1		P4 durch Zahnfleisch durchgebrochen
2		I1 voll entwickelt
3		P3 voll entwickelt
4		I2 voll entwickelt
5,5		M1 voll entwickelt (für Alter 6 Monate keine sichere Differenzierung möglich, daher Mittel von 5,5 Monaten)
7		C oder i3 wackelt
8		I3 ausgefallen
9		C ausgefallen
10		I3 voll entwickelt oder M2 im Zahnfleisch ertastbar
11		M2 durch Zahnfleisch durchgebrochen
12		keine sichere Differenzierung möglich
13		I1 wackelt
14		I1 ausgefallen
15		I1 voll entwickelt oder P2-4 ausgefallen
16		P4 hat mindestens die halbe Höhe des M1 erreicht
17,5		P2-4 voll entwickelt (für Alter 18 Monate keine sichere Differenzierung möglich, daher Mittel von 17,5 Monaten)
19		I2 wackelt
20		I2 ausgefallen
22,5		I2 voll entwickelt (für das Alter von 21-24 Monaten ist das Wachstum des M3 für eine Differenzierung ungeeignet, daher ein Mittel von 22,5 Monaten)
25 und älter		M3 voll entwickelt

Großbuchstaben = Dauerzähne / Kleinbuchstaben = Milchzähne

3.1.3 Gewichtungsschätzung

Das Gewicht der einzelnen Tiere wurde von den Jägern geschätzt.

3.1.4 Geschlechtsbestimmung

Bei 191 der 238 erlegten Wildschweinen wurde das Geschlecht bestimmt; 84 Schweine waren männlichen, 107 weiblichen Geschlechts.

3.2 Bearbeitung des Probenmaterials

3.2.1 DNA-Isolation aus Milzgewebe

DNA wurde aus Milzgewebe mit Hilfe des PUREGENE® Genomic DNA Purification Kit (Gentra Systems, Minnesota, USA) isoliert. Nach Antauen des tiefgefrorenen Probenmaterials für etwa 10-15 Minuten bei Raumtemperatur wurden aus dem Kern jeweils 10 bis 20 mg für die DNA-Isolierung entnommen. Die mit einem Skalpell zerkleinerte Probe wurde in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß mit 300 µl Lysis-Puffer und 1,5 µl Proteinase K vermischt und zur Auflösung von Gewebe und Zellen unter einer Bühler-Wärmehaube (Bühler Inkubierhaube TH15 mit Bühler Schüttler KS15, Edmund Bühler Labortechnik, Hechingen) bei 50°C unter Schütteln über Nacht inkubiert. Zur Präzipitation der Proteinbestandteile wurde die Probe anschließend 10 Minuten auf Eis gekühlt und mit 100 µl Proteinprecipitation Solution vermischt, danach das Präzipitat bei 13.000 UPM ca. 3 Minuten abzentrifugiert (Heraeus Biofuge fresco, Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau). Aus dem Probenüberstand wurde in einem frischen 1,5 ml Eppendorfgefäß unter Zugabe von 300 µl 100%igen Isopropanols (Roth, Karlsruhe) die gelöste DNA präzipitiert und bei 13.000 UPM 1 Minute pelletiert, das DNA-Pellet zweimal mit 70%igem Ethanol (Roth, Karlsruhe) gewaschen und letzte Ethanolreste durch 15-minütige Verdunstung entfernt. Die so gewonnene DNA wurde in 50 µl DNA Hydration Solution bei 50 °C gelöst, photometrisch auf Quantität und Qualität geprüft (Ultrospec 1100 pro, Amersham Biosciences, Freiburg) und zur Aufbewahrung bei –20°C eingelagert.

3.2.2 PCR

Eine optimale Spezifität sollte durch Ausführung der PCR nach dem Hotstart-Prinzip erreicht werden: der PCR-Reaktionsansatz wurde aus einem vorbereiteten Premix, den entsprechenden Primern (Endkonzentration 5 μ molar) und 200 ng der Template-DNA, die mit Wasser zu 3 μ l ergänzt wurden, zu einem Gesamtvolumen von 25 μ l je Ansatz auf Eis zusammengemischt. Die Amplifikation erfolgte in einem T-Gradienten-Cycler (Whatman Biometra, Göttingen) über 35 Zyklen (Tab. 9); die fertigen Amplifikate wurden bei -20°C gelagert.

Die Zusammensetzung des Premix zeigt Tabelle 5.

Tabelle 5: Zusammensetzung des für die PCR verwendeten Premix

Substanz (Ausgangskonzentration)	Menge [μl]
Ampli Taq Gold Hot Start Polymerase (5 U/ μ l)	0,125
10 x GOLD Puffer	2,5
dNTP-Mix (10 mM)	2,0
MgCl (25 mM)	2,0
Primermix (5,0 μ M Endkonzentration pro Primer)	2,5
Wasser	12,875
Gesamtvolumen (ohne DNA)	22,0

Als Primer zur Amplifikation von PCV-, PCV 1- und PCV 2-Nukleotidabschnitten dienen die in den Tabellen 6 bis 8 dargestellten Paare, deren Sequenz in 5´-3´-Richtung angegeben wird. Die vermerkten Positionen der einzelnen Primer beziehen sich auf die Nummerierung der in der Datenbank unter der Nummer AY094619 abgelegten PCV 2-Sequenz (Abbildung 2). Primer, deren Sequenz dem Kodon entspricht, werden als forward (fwd), die, deren Sequenz dem Antikodon entspricht, als reverse (rev) bezeichnet.

Tabelle 6: Primerpaar zur Amplifikation eines PCV-spezifischen Nukleotidfragments, unabhängig von der PCV-Spezies

Name	5´-3´-Sequenz	Ausrichtung und Position
Porcirc 1*	5´-GCT GAA CTT TTG AAA GTG AGC-3´	501 – 521, fwd
Porcirc 2*	5´-CAC ACA GTC TCA GTA GAT CAT CC-3´	719 – 741, rev

*Nach Willems (nicht publiziert); das Amplifikat hat eine Länge von 243 bp.

Tabelle 7: Primerpaar zur Amplifikation eines PCV 2-spezifischen Nukleotidfragments

Name	5´-3´-Sequenz	Ausrichtung und Position
PCV2 IS*	5´-TAG GTT AGG GCT GTG GCC TT -3´	1322 – 1341, fwd
PCV2 IAS*	5´-CCG CAC CTT CGG ATA TAC TG -3´	1566 – 1585, rev

*Nach Larochelle et al. (Larochelle et al., 2000b); das Amplifikat hat eine Länge von 264 bp.

Tabelle 8: Primerpaar zur Amplifikation eines PCV 1-spezifischen Nukleotidfragments

Name	5'-3'-Sequenz	Ausrichtung und Position
PCV 1 S*	5'-AGG GGT CAT AGG CCA AGT TG -3'	1321 – 1340, fwd
PCV 1 AS*	5'-CCT TCA GAA ACC GTT ACA GAT GG -3'	1628 – 1650, rev

*nach Willems (nicht publiziert); das Amplifikat hat eine Länge von 327 bp.

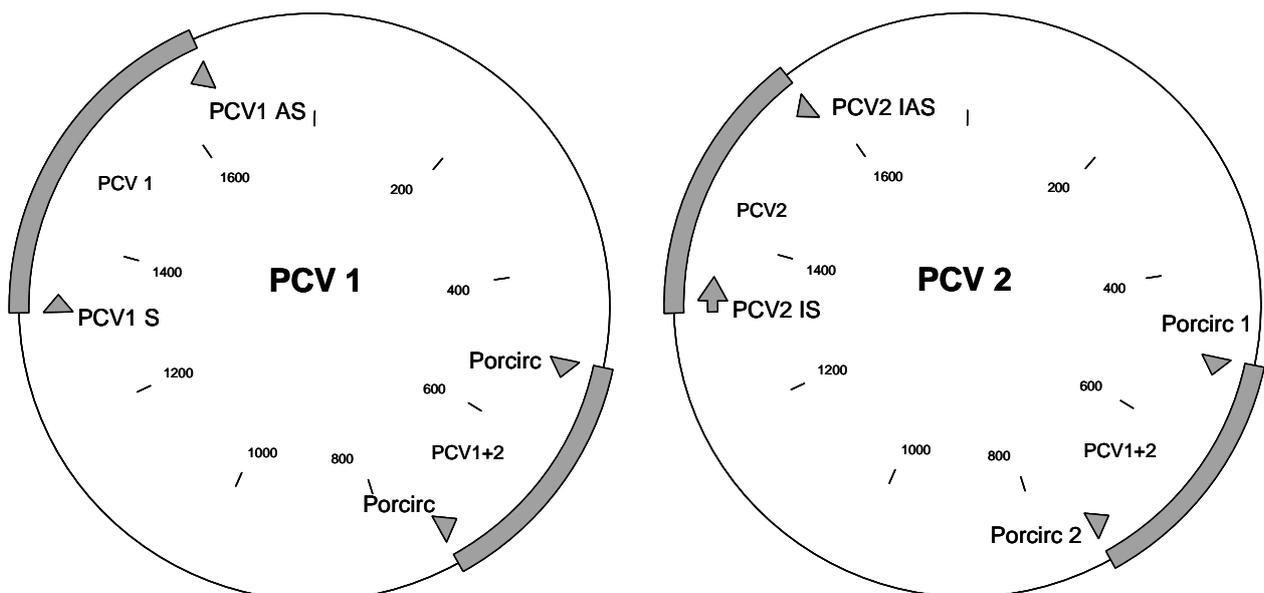


Abbildung 2: Lokalisation der Primer zur Amplifikation von PCV-, PCV 1- und PCV 2-Fragmenten, relativ zum PCV-Genom (PCV 1 (Access.-No.: AY184287) und PCV 2 (Access.-No.: AY094619)).

Tabelle 9: PCR-Bedingungen und Zyklenzahl

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit	Funktion	Anzahl
1	95	10 Min	Denaturierung und Aktivierung der Taq-Polymerase	1 x
2	94	30 Sek.	Denaturierung	33 x
3	61/59*	30 Sek.	Annealing	
4	72	90 Sek.	Extension	
5	72	10 Min	Final Extension	1 x

*Die Annealingtemperaturen für die PCV-, PCV 1- bzw. PCV 2-PCR betragen 59°C, 61°C bzw. 59°C.

3.2.3 Gelelektrophorese

Die PCR-Amplifikate wurden in 1,5%igen Agarosegelen (Agarose NEEO [Roth, Karlsruhe]) in TBE-Puffer bei 100 V über 60 Minuten aufgetrennt (Horizon 58-Gelkammer, Life Technologies, Gibco BRL Invitrogen, Karlsruhe). Die Geltaschen wurden jeweils mit 2,5 µl des PCR-Amplifikats, gemischt mit 0,5 µl Probenpuffer (6x Loading Dye Solution, MBI Fermentas, St. Leon-Roth) geladen. Als externer Größenstandard diente eine equimolare 100 bp-Leiter (Roth, Karlsruhe). Die Gele wurden nach Beendigung des Laufs für 5 Minuten im Ethidiumbromid-Bad gefärbt.

3.2.4 Photodokumentation

Die angefärbten und mit UV-Licht (365 nm) angeregten DNA-Banden wurden digital aufgenommen (Canon G2 Power-Shot, Canon Inc., Tokio, Japan), analysiert und archiviert (BioDoc Analyze, Whatman Biometra, Göttingen).

3.2.5 Klonierung und Sequenzierung

3.2.5.1 PCR

Die für die Prävalenzuntersuchung verwendeten Primer wurden im Rahmen dieser Untersuchung nicht eingesetzt, da sich innerhalb der 200 bis 300 bp langen Amplifikate nicht hinreichend viele Variationen in den bei Hausschweinen bekannten PCV 2-Sequenzen zeigten. Ziel der Untersuchung war es jedoch Variationen aufzuzeigen, weshalb eine Region im Genom gewählt wurde, die bei den beim Hausschwein bekannten Isolaten hochvariabel ist. Die Sequenzen der verwendeten Primer wie auch ihre Referenz sind in Tabelle 11 angegeben, ihre Lage im zirkulären Genom in Abbildung 3 dargestellt; die Angabe der Position bezieht sich wie in Abschnitt 3.2.2 auf die Nummerierung der Nukleotide im PCV-Genom.

Unter den bereits beschriebenen Voraussetzungen wurde der PCR-Ansatz vorbereitet (Tabelle 10) und unter veränderten Bedingungen (Tabelle 12) die Amplifikation durchgeführt. Die DNA (200 ng) wurde durch Wasserzugabe auf 3,25 µl aufgefüllt und zu dem Premix gemischt, so dass der Ansatz ein Gesamtvolumen von 25 µl hatte. Die Ausgangsmenge der DNA lag unterschiedlich konzentriert vor, so dass unterschiedliche Volumina nötig waren, die zur Erreichung einer equivalenten Ausgangsmenge mit H₂O bidest auf 3,25 µl aufgefüllt wurden.

Tabelle 10: Zusammensetzung des für die PCR verwendeten Premix

Substanz (Ausgangskonzentration)	Menge [μl]
10 x GOLD Puffer	2,5
dNTP-Mix (10 mM)	0,25
Primer Porcirc 1 (20 pmol)	1,25
Primer PCV IAS (20 pmol)	1,25
Wasser	16,5
Gesamtvolumen (ohne DNA)	21,75

Tabelle 11: Primerpaar zur Amplifikation des zur Sequenzierung ausgewählten PCV - spezifischen Nukleotidfragments

Name	5´-3´-Sequenz	Ausrichtung und Position
Porcirc 1	5´-GCT GAA CTT TTG AAA GTG AGC-3´	501 – 521, fwd
PCV 2IAS*	5´-CCG CAC CTT CGG ATA TAC TG-3´	1628 – 1650, rev

* nach Larochelle et al. (Larochelle et al., 2000a); das Amplifikat hat eine Länge von 1085 bp.

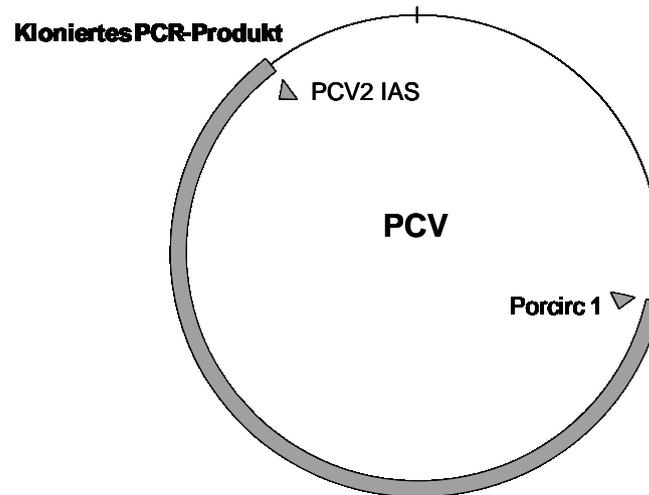


Abbildung 3 Darstellung des Amplifikats aus den Primern Porc1rc1 und PCV IAS am PCV-Genom. Es umfasst 1085 Nukleotide des ringförmigen Genoms.

Tabelle 12: PCR-Bedingungen und Zyklenzahl

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit	Funktion	Anzahl
1	95	5 Min	Denaturierung	1 x
2	95	30 Sek.	Denaturierung	33 x
3	62	30 Sek.	Annealing	
4	72	60 Sek.	Extension	
5	72	7 Min	Final Extension	1 x

Nach Beendigung der Zyklen erfolgte eine Lagerung der Probengefäße bei -20°C .

Die Amplifikate wurden mittels Gelelektrophorese nachgewiesen.

3.2.5.2 Aufreinigung der PCR-Produkte

Für die Klonierung wurden die PCR-Produkte mittels QIAquick® PCR Purification Kit (Fa. Qiagen, Hilden) aufbereitet, wobei DNA-Stränge von 100 nt bis 10000 nt von Primern, Salzen, Nukleotiden und Polymerasen gereinigt werden.

Das PCR-Produkt wurde zusammen mit der fünffachen Menge Puffer PB auf die QIAGEN-Säule pipettiert und für 1 Min bei 13000 U/Min zentrifugiert. Nach Verwerfen des Zentrifugats erfolgte eine zweimalige Waschung der auf der Säule gebundenen DNA mittels 0,75 ml Puffer PE, zum Trocknen dann nochmals eine einminütige Zentrifugation bei 13000 U/Min und die Elution der gebundenen DNA in 30 µl Puffer EB; abschließend wurde die gereinigte DNA bei -20°C gelagert.

3.2.5.3 Klonierung der PCR-Produkte

Für die zum Teil nach Klonierung erfolgte Sequenzierung der PCR-Produkte wurde das Amplifikat zunächst mit einem geeigneten Plasmid ligiert und anschließend die rekombinierte DNA durch Transformation in kompetenten Bakterien vermehrt. Die Klonierung selbst wurde mittels QIAGEN PCR Cloning^{plus} Kit (Fa. Qiagen, Hilden), das sowohl Plasmid als auch kompetente Zellen enthält, durchgeführt.

An dieser Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof Dr. H.-J. Thiel und Herrn PD Dr. P. Becher und deren Mitarbeiter bedanken, mit deren freundlicher Genehmigung und Unterstützung ich die Klonierung, die Ligation und die Plasmidpräparation in den S1-Labors der Veterinärmedizinischen Virologie der Justus-Liebig-Universität Gießen durchführen durfte.

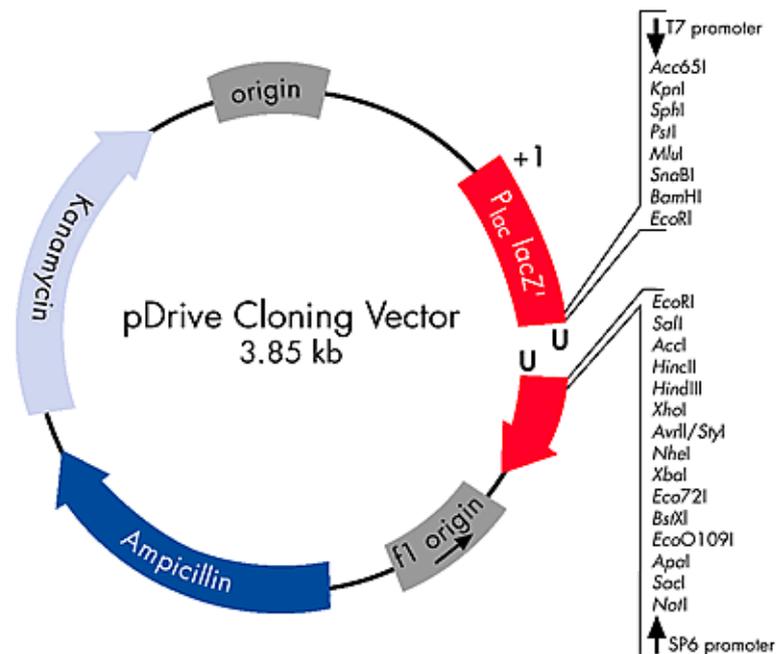


Abbildung 4: Darstellung des verwendeten Vektors der Fa. Qiagen (aus Produktbeilage QIAGEN PCR Cloning^{plus} Kit).

3.2.5.4 Ligation

Das Cloning^{plus} Kit macht sich zunutze, dass non-proofreading Taq-Polymerasen, wie das verwendete Amersham-Enzym, an den PCR-Produkten einen Adenosin-Überhang produzieren. Der in dem Kit enthaltene pDrive Cloning Vektor liegt in einer linearen Form mit einem Uracil-Überhang an beiden Seiten vor und zeigt durch die entstehende A-U-Bindung eine hohe Spezifität zu solchen PCR-Produkten. Durch die hinzugefügte Ligase erfolgt der Einbau des PCR-Produktes in das lineare Plasmid.

Tabelle 13: Zusammensetzung des für die Ligation verwendeten Ansatzes

Substanz (Ausgangskonzentration)	Menge [μ l]
pDrive Cloning Vektor (50ng/ μ l)	1
PCR-Produkt	4
2-fach Ligations-Mastermix	5
Gesamtvolumen	10

Aus der Konzentrationsberechnung des Bandenmusters auf einem Agarosegel im Vergleich zu dem nicht-equimolaren Längenstandard GeneRulerTM 50 bp Ladder (Fa. Fermentas, St. Leon-Rot) sowie der erforderlichen einzusetzenden Menge von 65 bis 130 ng eines 1000 bp langen PCR-Produktes, wurde - entsprechend der Empfehlung des Herstellers - die Menge des einzusetzenden PCR-Produktes berechnet.

Die Ligation erfolgte über die Dauer von 3 Stunden bei 14°C.

3.2.5.5 Transformation und Anzucht der transformierten Bakterien

Unter Transformation versteht man den Einbau des präparierten Plasmids in kompetente Zellen, in diesem Fall die QIAGEN EZ competent Cells (Fa. Qiagen, Hilden).

Gemäß der Empfehlung des Herstellers wurden 2 µl der Ligationsreaktion zu den aufgetauten QIAGEN EZ competent cells pipetiert, diese vorsichtig miteinander vermischt und fünf Minuten auf Eis inkubiert. Im Heizblock (Fa. Eppendorf, Hamburg) wurde das Gemisch 90 Sekunden lang auf 42°C erhitzt und anschließend sofort wieder zwei Minuten auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 250 µl des auf Raumtemperatur erwärmten im Kit enthaltenen SOC-Mediums wurde die Bakteriensuspension direkt auf den vorher präparierten Agarplatten (Fa. DIFCO, Kansas City, USA) ausgestrichen. Die Inkubation erfolgte über Nacht im Brutschrank (Fa. Memmert, Schwabach) bei 37°C.

Zuvor waren die Ampicillin (Fa. Fluka Chemical Co., Buchs, Schweiz) enthaltenden Agarplatten (Fa. DIFCO, Kansas City, USA) präpariert worden, indem sie mit 40 µl X-GAL (Fa. Sigma, Taufkirchen) und 10 µl IPTG (Fa. Sigma, Taufkirchen) bestrichen und dann im Brutschrank (Fa. Memmert, Schwabach) auf 37°C vorgewärmt wurden.

Durch Einsatz des Plasmids pDrive (Fa. Qiagen, Hilden) sowie des mit X-Gal und IPTG bestrichenen Nährbodens war nach einer ersten Inkubation über Nacht und einer zweiten Inkubation im Kühlschrank bei 4° bis 8°C über zwei Stunden eine Blau/Weiß-Selektion der gewachsenen Kolonien möglich. Diese Selektion ermöglicht bereits auf dem Agar eine Darstellung, bei welchen Kolonien die Ligation erfolgreich war (blau).

Einige dieser Kolonien wurden mittels Pipettenspitze gepickt und in 4 ml LB-Flüssigmedium gegeben; die Kultivierung erfolgte über Nacht bei 185 rpm und 37°C auf einem Schüttelinkubator (Fa. Infors AG, Bottmingen, Schweiz).

3.2.5.6 Plasmidpräparation

Zur Plasmidpräparation wurde die so genannte Minipräparation (bis 10 µg DNA) durchgeführt, deren Vorteile gegenüber der Midipräparation (bis 100 µg DNA) sowohl in der Auswahl als auch in der Vermehrung von vielen verschiedenen Klonen und der entsprechenden DNA-Stücke auf relativ einfache Art und Weise liegen; nachteilig sind dagegen die relativ geringe DNA-Menge sowie deren geringere Reinheit.

Die Präparation erfolgte durch alkalische Lyse (Sambrook et al., 1989): ein Teil des inkubierten Flüssigmediums (3,6 ml) wurde in Eppendorf-Reaktionsgefäßen bei ca. 4000 U/Min 15 Min abzentrifugiert und das Sediment in 200 µl der Lösung P1/RNase resuspendiert. Danach wurden 200 µl der Lösung P2 zugegeben, der Ansatz vorsichtig gemischt und für die Dauer von 10 Min bei 4°C auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl der Lösung P3, der Mischung der Suspension und einer 30-minütigen Zentrifugation bei 13000 U/Min und 4°C wurde der Überstand vorsichtig in ein frisches Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Die Präzipitation der DNA erfolgte mit 400 µl Isopropanol und nach Zentrifugation bei 13000 U/Min wurde mit 70%igem Ethanol gewaschen. Die luftgetrocknete DNA wurde schließlich in 50 µl H₂O_{bidest} (Fa. Roth) resuspendiert und bei -20°C eingelagert.

3.2.5.7 Screening der Klone mittels PCR

Zur Überprüfung der Ligation des gewünschten PCR-Amplifikats wurde eine PCR der durch die Plasmidpräparation gewonnenen DNA durchgeführt. Nach Zugabe der DNA ergab sich wiederum ein Gesamtvolumen von 25 µl (siehe oben).

Tabelle 14: Zusammensetzung des für die PCR verwendeten Premix

Substanz (Ausgangskonzentration)	Menge [μl]
10 x Amersham Taq Puffer	2,5
dNTP-Mix (25 mM)	0,25
Primer M 13 fwd (20pmol)	1,25
Primer M 13 rvs (20 pmol)	1,25
Wasser	16,5
Gesamtvolumen (ohne DNA)	21,75

Tabelle 15: Primerpaar zur Amplifikation des klonierten Nukleotidfragments

Name	5'-3'-Sequenz	Ausrichtung und Position
M 13 fwd	5'-ACG ACG TTG TAA AAC GAC GGC CAG-3'	Fwd
M 13 rvs	5'-TTC ACA CAG GAA ACA GCT ATG ACC-3'	Rev

Das Fragment hat eine Länge von 1323 bp.

Tabelle 16: PCR-Bedingungen und Zyklenzahl

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit	Funktion	Anzahl
1	95	5 Min	Denaturierung	1 x
2	95	30 Sek.	Denaturierung	25 x
3	52	30 Sek.	Annealing	
4	72	60 Sek.	Extension	
5	72	7 Min	Final Extension	1 x

Die nachfolgenden Schritte entsprechen den unter 3.2.3 beschriebenen.

3.2.5.8 Sequenzierung

Vorgabe für die Bestimmung der Basensequenz der Plasmid-DNA war die Dideoxy-Chain-Termination-Methode (Sambrook, 1989) mit dem CycleReader™ Auto DNA Sequencing Kit (Fermentas, St.-Leon-Rot), die auf dem Einsatz von Dideoxynukleotiden (ddNTP's) anstelle von Deoxynukleotiden (dNTP's) beruht.

Für jedes Dideoxynukleotid (A, C, T, G) wurde ein Premix mit je drei unveränderten Deoxynukleotiden vorbereitet (Tabelle 17) und stets mehrere Klone eines Nukleotid-fragments segmentiert, um Polymerasefehler auszuschließen.

Tabelle 17: Zusammensetzung des für die PCR verwendeten Premix

Substanz (Ausgangskonzentration)	Menge [μl]
Sequencing Buffer	2,5
5'-IR800 gelabelter Primer (2 pmol)	1
Reader™ Taq DNA polymerase	1
Plasmid-DNA	1-12,5
Wasser	0-3
Gesamtvolumen (ohne DNA)	17

Entgegen der Empfehlung des Herstellers wurden für die Sequenzierungsreaktion 4 μ g Plasmid-DNA eingesetzt und durch die Zugabe von Wasser auf 3 μ l aufgefüllt, so dass sich mit dem Premix ein Gesamtvolumen von 20 μ l ergab.

Tabelle 18: PCR-Bedingungen und Zyklenzahl

Schritt	Temperatur [$^{\circ}$C]	Zeit	Funktion	Anzahl
1	94	3 Min	Denaturierung	1 x
2	94	30 Sek.	Denaturierung	25 x
3	52/59*	30 Sek.	Annealing	
4	72	60 Sek.	Extension	

Die Annealingtemperaturen für die Sequenzierung betragen für die Primer M13 fwd/rvs bzw. für Procirc 1 52 $^{\circ}$ C bzw. 59 $^{\circ}$ C.

Tabelle 19: Zur Sequenzierung verwendete IR800-gelabelte Primer

Name	5'-3'-Sequenz	Ausrichtung und Position
M13 fwd	5'-ACG ACG TTG TAA AAC GAC GGC CAG-3'	Fwd
M13 rvs	5'-TTC ACA CAG GAA ACA GCT ATG ACC-3'	Rev
Porcirc 1	5'-GCT GAA CTT TTG AAA GTG AGC-3'	501 – 521, fwd

Nach Beendigung der PCR lagerten die Proben auf Eis. Zu jeder Reaktion wurden 3 µl Stop-Solution (Fa. Fermentas, St. Leon-Roth) gegeben, diese kurz abzentrifugiert und 3 Min. bei 72°C im Wasserbad denaturiert; bis zur Gelelektrophorese lagerten die Proben wiederum auf Eis.

3.2.5.9 Elektrophorese in denaturierendem Harnstoff-Polyacrylamid-Gel

Zur Herstellung des Gels wurden „Spacer“ (Dicke 0,25 mm, Fa. LI-COR, Bad Nauheim) zwischen die Glasplatten (41 cm Länge, Fa. LI-COR) gelegt, die Platten in dafür vorgesehene Schienen eingespannt und leicht schräg gestellt, so dass ein horizontales Gießen des Gels möglich war. Zu der Acrylamidlösung (siehe Anhang) wurden 400 µl 10%iges Ammoniumpersulfat (APS) und 40 µl TEMED gegeben und dieses Gemisch zwischen die Glasplatten pipettiert, mindestens 2 Stunden erfolgte die Polymerisation in waagrechtter Position.

Der Vorlauf wurde nach Einbau der Platten in den Sequenzer LI-COR 4200 (LI-COR) und Zugabe von 1000 ml TBE Puffer unter folgenden Bedingungen gestartet:

Tabelle 20: Vorlaufbedingungen für Polyacrylamidgel

Vorlaufbedingungen (41 cm 6 %iges Polyacrylamidgel, 0,25 mm)	
Spannung	1500 V
Stromstärke	31,5 mA
Leistung	50 W
Temperatur	50°C
Dauer	30 Min.

Nach Beladen der Geltaschen (1,3 µl je Tasche) wurde der Lauf 11 Stunden unter denselben Bedingungen fortgesetzt.

Die Analyse und Archivierung erfolgte mit der Software „eSEQ“ Version 2.0 der Firma LI-COR.

3.2.5.10 Komplettssequenzierung

Für die Sequenzierung des kompletten PCV 2-Genoms der Probe #214 wurden weitere Primer (Tabelle 21) verwendet und miteinander kombiniert (Tabelle 22), um durch die Sequenzierung die Nukleotide des gesamten restlichen PCV-Genoms analysieren zu können.

Tabelle 21: Primer für die Komplettssequenzierung

Name	5´-3´-Sequenz	Ausrichtung und Position
F1*	5´-ACC AGC GCA CTT CGG CAG -3´	1 – 18, fwd
Porcirc 3**	5´-GTA TGT GGT TTC CGG GTC -3´	615 – 632, rev
PCV2 IS	5´-TAG GTT AGG GCT GTG GCC TT -3´	1322 – 1341, fwd
1768R*	5´-AAT ACT TAC AGC GCA CTT CTT TCG -3´	1744 – 1767, rev
433R*	5´-TCC AGC AAG GTA CTC A -3´	418 – 433, rev
1696F*	5´-GGT GTC TTC GTC TTC GGT AAC G -3´	1695 – 1716, rev

*nach Kim & Lyoo (Kim and Lyoo, 2002); ** nach Willems (nicht publiziert)

Lage der Primer zur Komplettssequenzierung

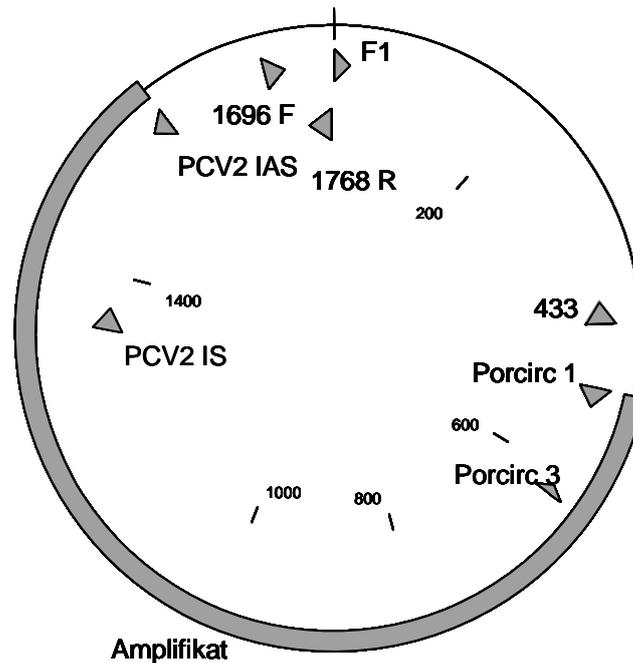


Abbildung 5: Darstellung der Primerlokalisierung am zirkulären PCV-Genom. Der klonierte Bereich ist grau dargestellt (in der Abbildung als Amplifikat bezeichnet); er liegt zwischen den Primern PCV2 IAS und Porcirc 1. Um den restlichen Bereich lückenlos zu analysieren, wurde ebenfalls aus dem Amplifikat heraus sequenziert (Primer Porcirc 3 und PCV2 IS).

Tabelle 22: Primerkombinationen für die Komplettssequenzierung

Primer 1	Primer 2
F1	Porcirc 3
PCV2 IS	1768R
PCV2 IS	433R

Der Primer 1696F kam als Sequenzierungsprimer zur Anwendung.

Als Annealing-Temperatur wurde 59°C gewählt und entsprechend den oben aufgeführten Bedingungen mit der Ampli-Taq-Gold-Polymerase amplifiziert.

3.2.5.11 Sequenzierung der variablen Region

Nach Literaturangaben und einem Vergleich der in der Datenbank vorhandenen Isolate stellte sich ein im ORF 2 gelegener Bereich als hoch variabel heraus, so dass er für die vergleichende Sequenzierung mehrerer Wildschwein-Isolate ausgewählt wurde. Für die Sequenzierung der variablen Region verschiedener Proben wurden die in Tabelle 23 angegebenen Primerkombinationen verwendet.

Tabelle 23: Primer zur Sequenzierung der variablen Region

Name	5'-3'-Sequenz	Ausrichtung und Position
nPCRfwd*	5'-CAA CTG CTG TCC CAG CTG TAG -3'	844 – 864, fwd
PCV2 IAS*	5'-CCG CAC CTT CGG ATA TAC TG -3'	1566 – 1585, rev

*nach Larochelle et al. (2000a); das Amplifikat hatte eine Länge von 742 bp.

Darstellung der Primer zur Sequenzierung der variablen Region

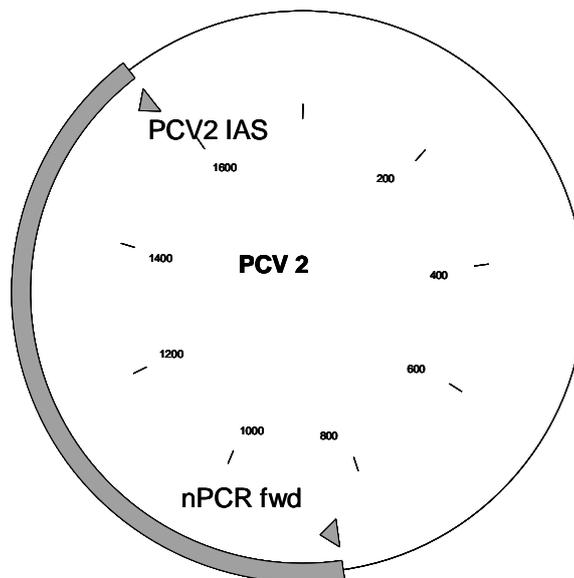


Abbildung 6: Lage des amplifizierten, einen Teil der variablen Region enthaltenden Fragments, dargestellt am zirkulären Genom (Access.-No.: AY094619).

Nach Vorbereiten des Premix (Tabelle 24) und Zugabe der auf 3 μl aufgefüllten DNA (200ng) wurde die Amplifikation im Cycler gestartet (Tabelle 25).

Tabelle 24: Zusammensetzung des für die PCR verwendeten Premix

Substanz (Ausgangskonzentration)	Menge [μl]
Ampli Taq Gold Hot Start Polymerase (5 U/ μl)	0,125
10 x GOLD Puffer	2,5
dNTP-Mix (10 mM)	2,0
MgCl (25 mM)	2,0
Primermix (5,0 μM Endkonzentration pro Primer)	2,5
Wasser	12,875
Gesamtvolumen (ohne DNA)	22,0

Tabelle 25: PCR-Bedingungen und Zyklenzahl

Schritt	Temperatur [$^{\circ}\text{C}$]	Zeit	Funktion	Anzahl
1	95	10 Min	Denaturierung und Aktivierung der Taq-Polymerase	1 x
2	94	30 Sek.	Denaturierung	33 x
3	61	30 Sek.	Annealing	
4	72	90 Sek.	Extension	
5	72	10 Min	Final Extension	1 x

3.2.6 Auswertung

Die Sequenzierung wurde mittels der Software „eSeq“ Version 2.0 (LICOR, Bad Nauheim) ausgewertet und eine Gegenüberstellung der Sequenzen mittels „ClustalX“ Version 1.81 durchgeführt. Zur Bestimmung der Sequenzidentität einzelner PCV2-Proben wurden durch Bootstrap-Analysen Distanzmatrixen und aus diesen Matrixen die Dendrogramme mittels „TreeView“ Version 1.6.6 nach R. D. M. Page erstellt. Für die zirkuläre Darstellung des Genoms unter Einbeziehung der Primer, Fragmente oder Leserahmen wurde „Clonemanager for Windows“ Version 4.0 verwendet.

Die Übersetzung der DNA in die Aminosäuresequenz wurde mit dem „Expasy Translation Tool“ durchgeführt (<http://au.expasy.org/tools/dna.html>).

Das Proteinalignment wurde mit Hilfe von „ClustalW“ erstellt (<http://www.ch.embnet.org/software/ClustalW.html>).

Die statistische Auswertung wurde mit dem „Statistical Package for Social Sciences“ (SPSS) Version 11.0 vorgenommen, Prävalenzunterschiede mit dem Chi²-Test und Verteilungsungleichgewichte zwischen PCV-Infektionsstatus, Alters- und Gewichtsmerkmalen mittels Kruskal-Wallis-Test auf Signifikanz überprüft.

4 Ergebnisse

4.1 Ergebnisse des PCR-Screenings

4.1.1 Prävalenzen für PCV 1 und PCV 2

Insgesamt wurden 238 Proben mittels PCR untersucht. Durch die Amplifikation der PCV 1-Nukleotidsequenz entstand eine charakteristische Bande von 327 Basenpaaren (bp), exemplarisch ist in Abbildung 7 ein PCV 1-spezifisches Bandenmuster dargestellt: auf Spur 2 und 4 finden sich auf PCV 1 positiv getestete Proben, auf Spur 3 eine negative Probe.

Tabelle 26 listet detailliert die Ergebnisse des PCV 1-Screenings auf.

PCV 1

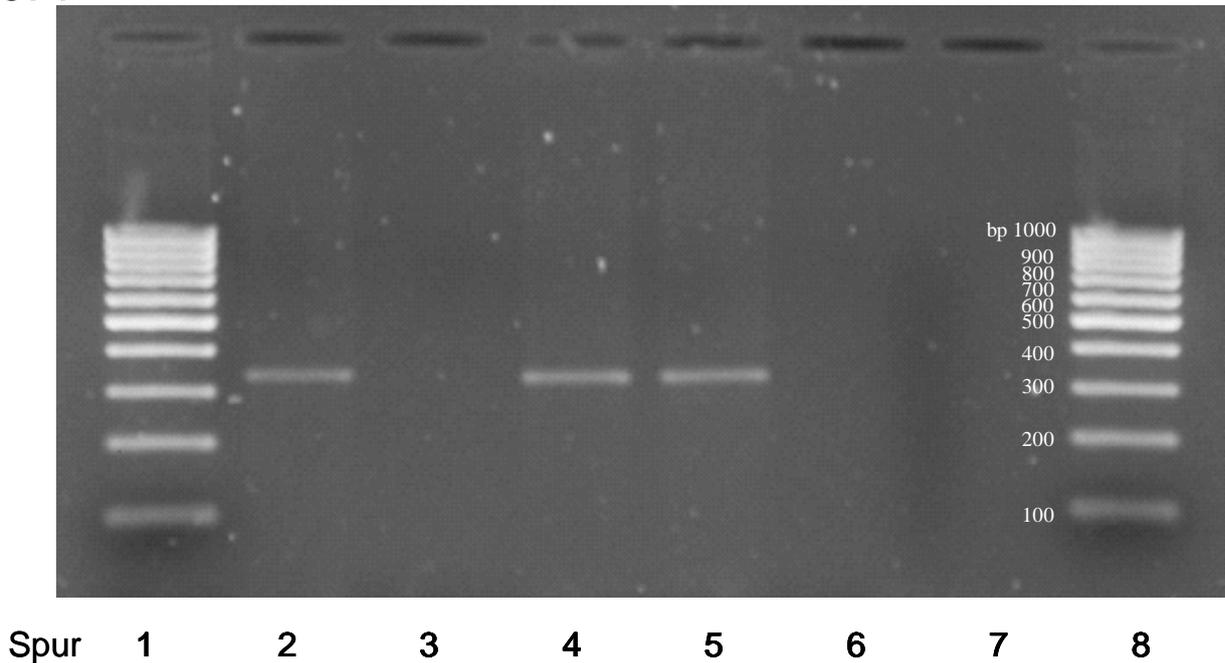


Abbildung 7: Typisches Bandenmuster der PCV 1-PCR. **Spur 1** Größenstandard (100-Basenpaar-Leiter), **Spur 2** Probe #7, **Spur 3** Probe #208, **Spur 4** Probe #26, **Spur 5** pos. Kontrolle, **Spur 6** neg. Kontrolle, **Spur 7** frei, **Spur 8** Größenstandard (Angaben in Basenpaaren)

Die PCV 2- spezifische Bande mit einer Länge von 267 bp ist exemplarisch in Abbildung 8 dargestellt: auf Bahn 3 und 4 finden sich positive Proben. Eine detaillierte Darstellung dieser Ergebnisse erfolgt in Tabelle 26.

PCV 2

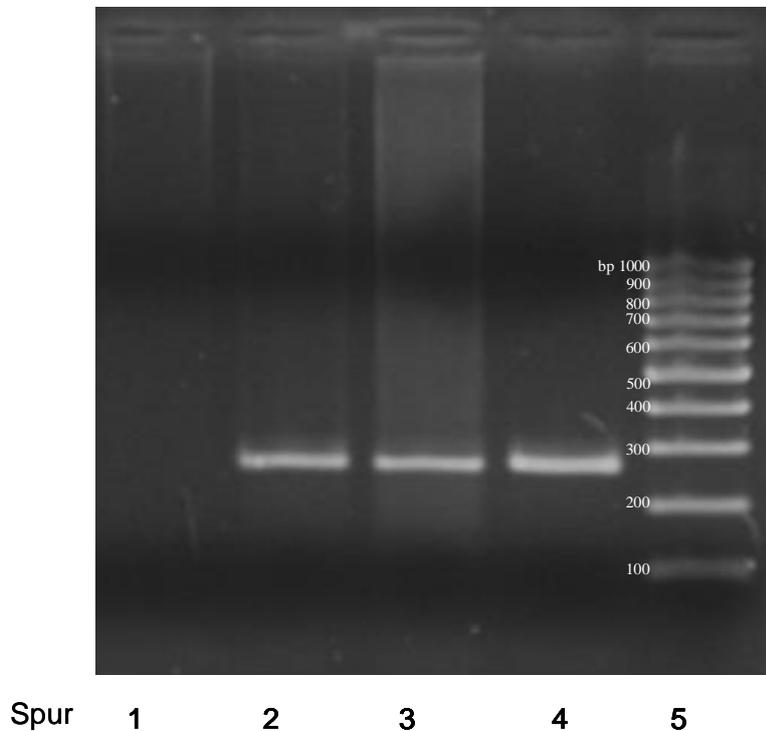


Abbildung 8: Typisches Bandenmuster der PCV 2-PCR. **Spur 1** neg. Kontrolle, **Spur 2** pos. Kontrolle, **Spur 3** Probe #108, **Spur 4** Probe #214, **Spur 5** Größenstandard (100-Basenpaar-Leiter, Angaben in Basenpaaren)

Bei den durchgeführten Untersuchungen konnten 147 von 238 untersuchten Tieren (61,8 %) als Circovirus negativ eingestuft werden, 48 Tiere waren PCV 1-positiv (20,2 %), 39 (16,4 %) enthielten PCV 2-Genom. Nur 4 (1,7 %) Wildschweine waren sowohl PCV 1- als auch PCV 2-positiv, so dass sich insgesamt 21,9 % der Tiere als PCV 1- und 18,1 % als PCV 2-positiv erwiesen.

In den betreffenden Bundesländern konnten in Hessen 45 % und in Rheinland-Pfalz 63,3 % der untersuchten Tiere als negativ eingestuft werden, das Vorkommen von PCV 1 lag in Hessen mit 35 % etwas über dem in Rheinland-Pfalz (18,8 %), das von PCV 2 hingegen mit jeweils etwa 20 % in beiden Bundesländern nahezu gleich (Abbildung 9). Insgesamt waren die Prävalenzen in Hessen und in Rheinland-Pfalz nicht signifikant verschieden.

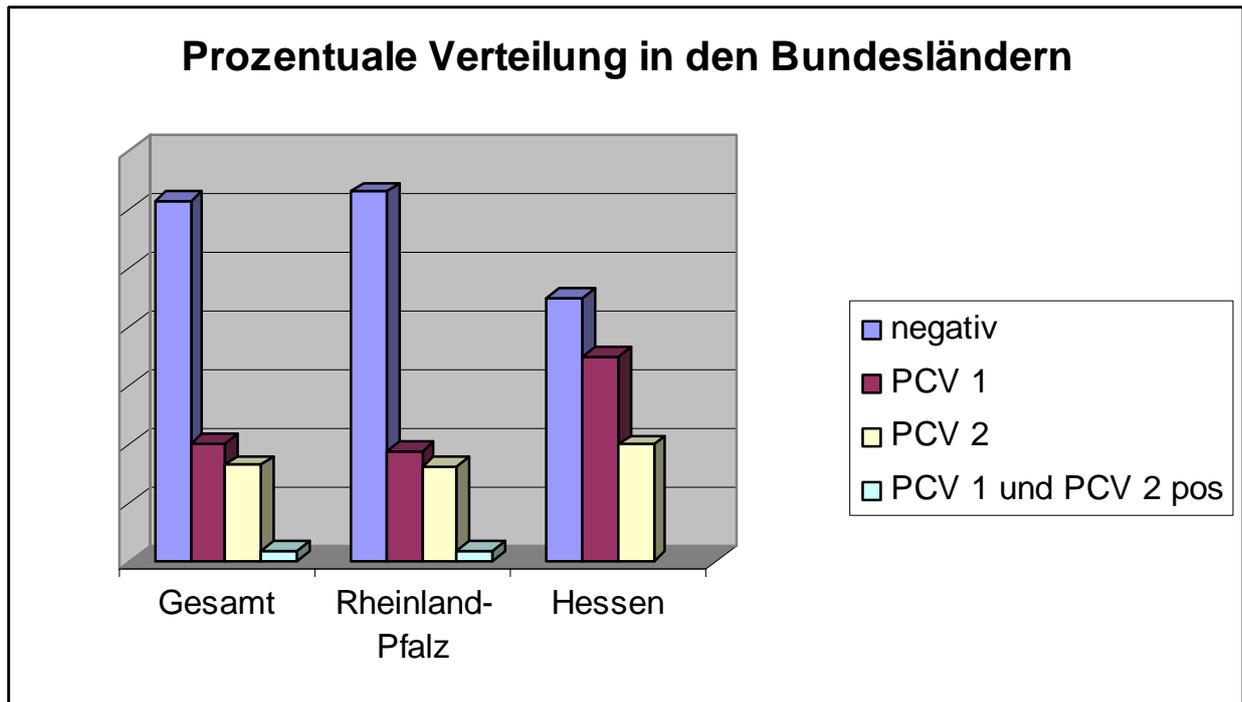


Abbildung 9: Darstellung der Untersuchungsergebnisse in Hessen und Rheinland-Pfalz im Vergleich zum Gesamtergebnis.

Der Anteil PCV-freier Tiere lag in den untersuchten Regionen zwischen 45 und 58,2 %, im Wildgatter (Revier 4) bei 94 %. Die Prävalenz für PCV 1 schwankte zwischen 17,3 und 35,7 %, bei den Schweinen aus dem Gatter konnte kein PCV 1 Genom nachgewiesen werden. Die Prävalenz für Tiere, die nur mit PCV-2 infiziert waren, lag zwischen 5,1 % (Gatter) und 23,6 %. Signifikante Unterschiede zwischen der regionalen Prävalenz bezüglich PCV-1 konnte zwischen dem Gatter (Revier 4) und allen anderen Regionen sowie zwischen Region 1 und Region 2 nachgewiesen werden. Hinsichtlich PCV-2 unterschieden sich lediglich Region 1 und das Gatter signifikant voneinander.

Der Anteil PCV-freier Wildschweine variierte in den untersuchten Revieren zwischen 25 und 94 %. Die Prävalenz für PCV-1-positive Tiere lag zwischen 0 und 50 %, die für PCV-2-positive Tiere zwischen 5,1 und 29,6 %. DNA beider PCV-Typen konnte in Proben der Reviere 1, 5 und 6 nachgewiesen werden. Die Verteilung in den Regionen und den Revieren ist in Tabelle 26 dargestellt.

Tabelle 26: Prävalenzen für PCV 1, PCV 2 und PCV 1 plus PCV 2 im Gesamtmaterial, nach Bundesland, Region und Revier (p = Signifikanz).

		negativ		PCV 1		PCV 2		PCV 1 + PCV 2	
		N	%	n	%	N	%	n	%
Gesamt		147	61,8	48	20,2	39	16,4	4	1,7
Land	Rheinland-Pfalz	138	63,3	41	18,8	35	16,1	4	1,8
	Hessen	9	45,0	7	35,0	4	20,0	0	0,0
	P		n.s.		n.s.		n.s.		n.s.
Region	R1	64	58,2	19	17,3	26	23,6	1	0,9
	R2	29	52,7	17	30,9	6	10,9	3	5,5
	R3	8	57,1	5	35,7	1	7,1	0	0,0
	R4	9	45,0	7	35,0	4	25,0	0	0,0
	P		n.s.		0.000		0.066		0.000
Revier	1	14	53,8	4	15,4	7	26,9	1	3,8
	2	23	52,3	11	25,0	10	22,7	0	0,0
	3	27	67,5	4	10,0	9	22,5	0	0,0
	4	37	94,9	0	0,0	2	5,1	0	0,0
	5	18	43,9	17	41,5	5	12,2	1	2,4
	6	11	78,6	0	0,0	1	7,1	2	14,3
	7	8	57,1	5	35,7	1	7,1	0	0,0
	8	1	100,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0
	9	3	25,0	6	50,0	3	25,0	0	0,0
	10	5	71,4	1	14,3	1	14,3	0	0,0
	P		n.s.		0.000		n.s.		0.000

Der in dem umzäunten Revier 4 (Gatter) isoliert lebenden Wildschweinepopulation war ein direkter Kontakt zu in freier Wildbahn lebenden Wildschweinen nicht möglich, der Kontakt untereinander durch das eingeschränkte Raumangebot entsprechend höher; die Abweichungen in den PCV-Prävalenzen im Vergleich zu den übrigen Revieren waren deutlich (Abbildung 10).

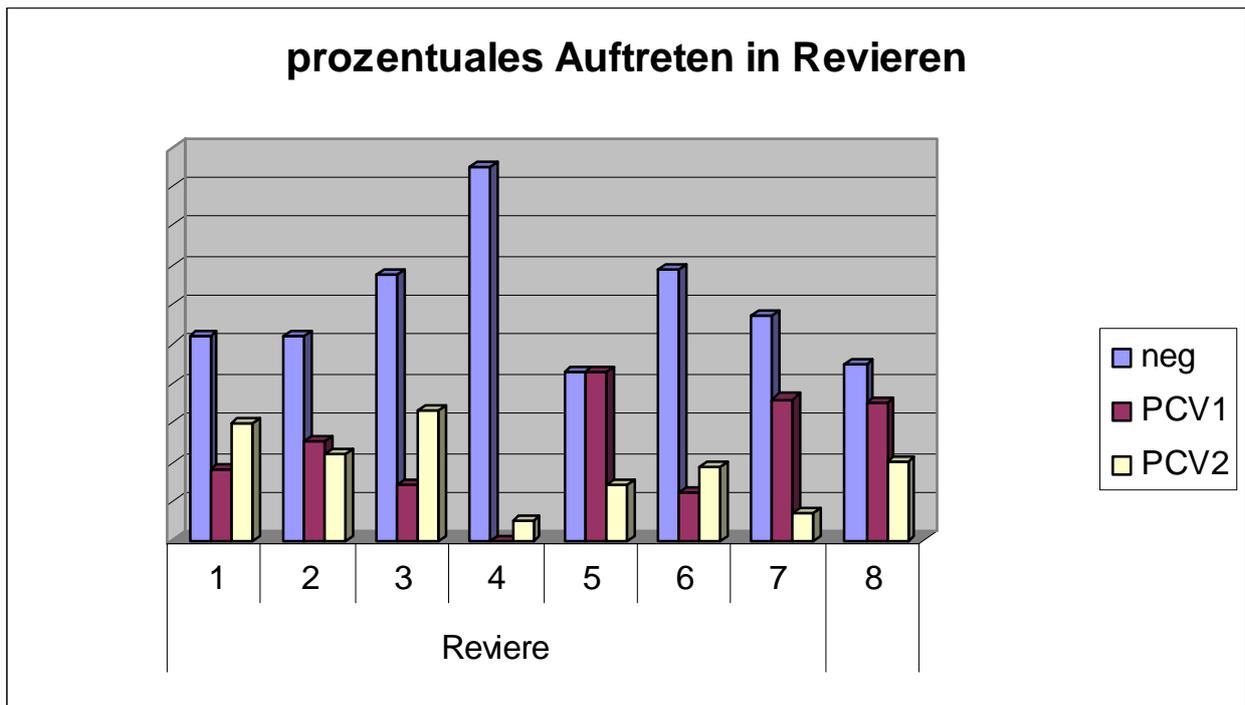


Abbildung 10: Vergleichende Darstellung der Ergebnisse in den einzelnen Revieren.

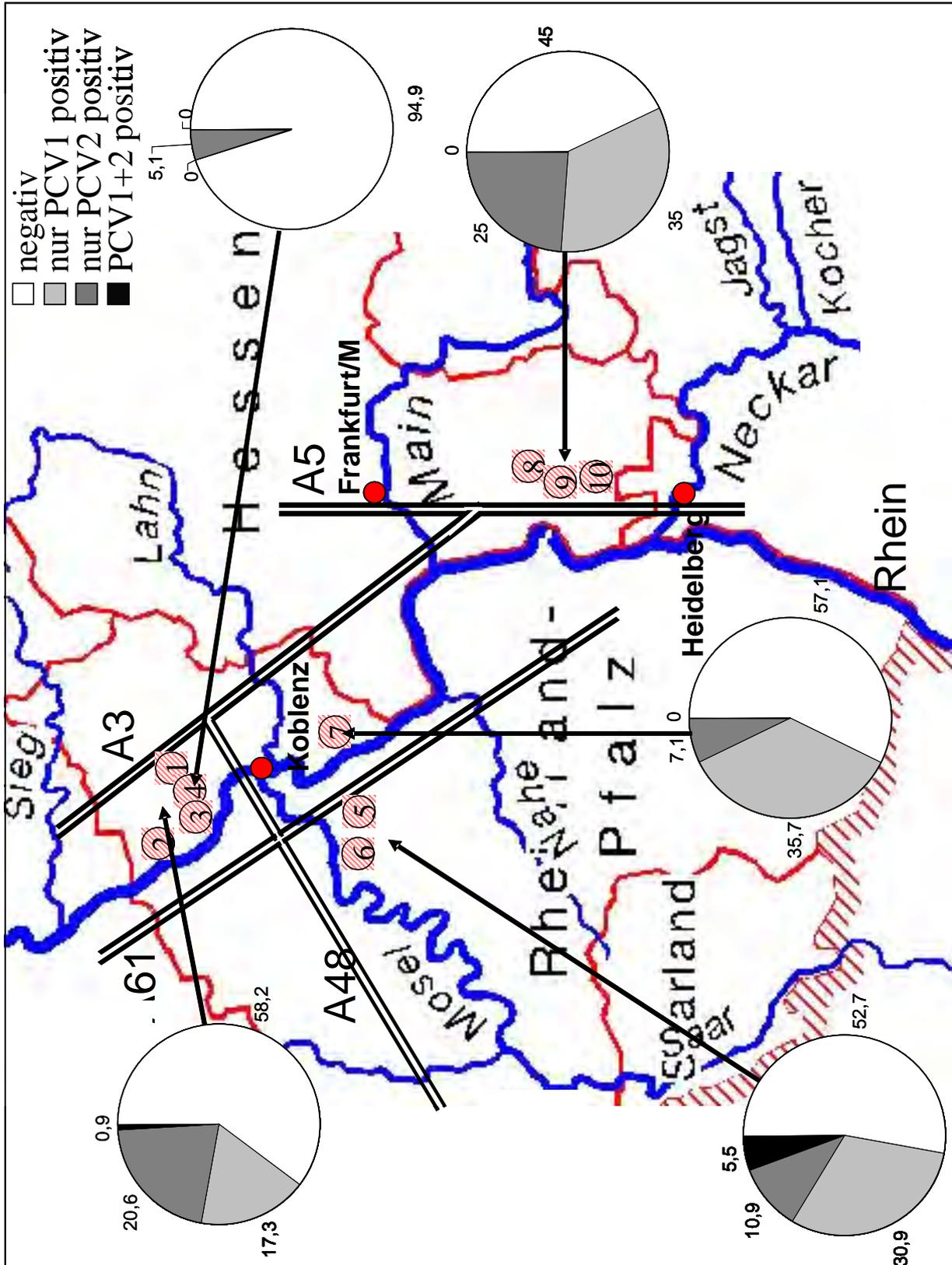


Abbildung 11: Schematische Karte der Revierlokalisierung. Die Kreisdiagramme zeigen das Auftreten von PCV 1 und 2.

4.1.2 Zusammenhang zwischen PCV-Prävalenzen und Alter

Nach den Ergebnissen der Zahnaltersbestimmung, die für insgesamt 185 Wildschweine vorliegen, waren die Tiere zwischen 3 und 25 Monate, durchschnittlich 10,43 Monate, alt; sie wurden anhand des Alters in vier Gruppen eingeteilt (Tabelle 27).

Tabelle 27: Zusammenhang zwischen Zahnalter und PCV-Prävalenzen

Alter [Monate]	Tierzahl [n]	negativ [%]	PCV 1 [%]	PCV 2 [%]	PCV1 + 2 [%]
bis 5	38	44,7	31,6	23,7	0,0
6 – 7	55	65,5	20,0	18,1	3,6
8 - 12	36	61,1	16,7	19,4	2,8
Über 12	56	78,6	14,3	7,1	0,0

Das Diagramm (Abbildung 12) zeigt die Verteilung der einzelnen Altersgruppen; die Verschiebung innerhalb der untersuchten Gruppe zu jungen Tieren ist in den Abschussrichtlinien für Jäger begründet, wonach vornehmlich (etwa 75%) bis zwölf Monate alte Tiere zu erlegen sind.

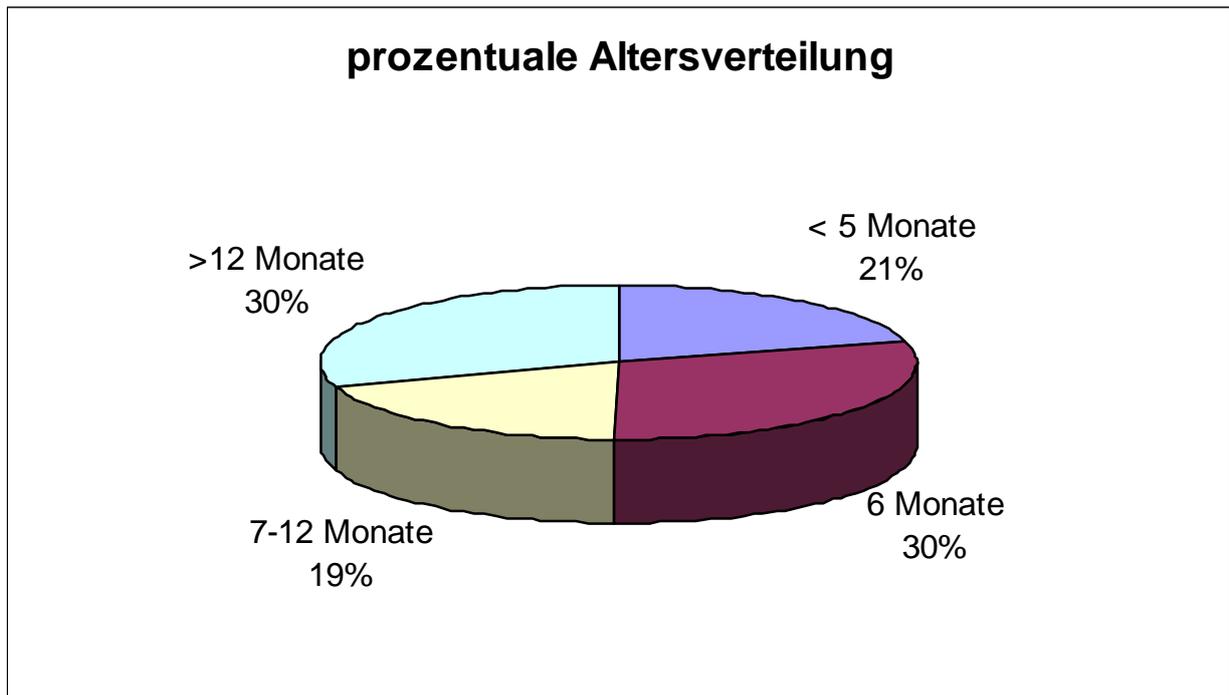


Abbildung 12: Prozentuale Verteilung der einzelnen Altersgruppen am gesamten Untersuchungsmaterial.

Sowohl die PCV 1- als auch die PCV 2-Prävalenz war in der Gruppe der bis zu 5 Monate alten Tiere am höchsten, sie wies somit die geringste Anzahl an PCV-freien Tieren auf. Bei den bis zu sechs Monate alten Tieren traten mehr als 60 % aller PCV-Infektionen auf. Die Wahrscheinlichkeit für einen Nachweis von PCV 2-DNA sank mit zunehmendem Alter signifikant (Abbildung 13).

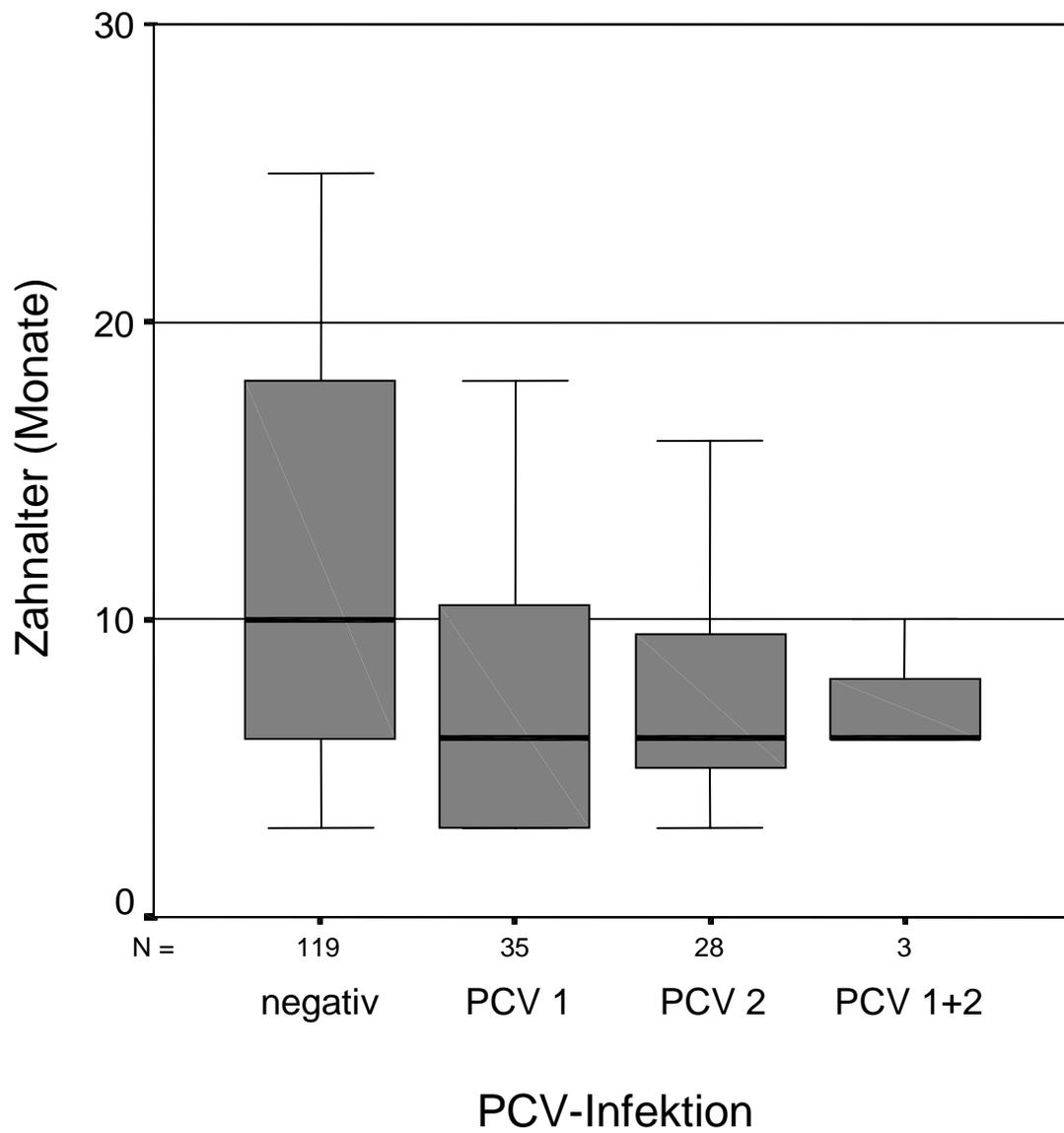


Abbildung 13: Zusammenhang zwischen PCV-Infektion und Alter (Zahnaltersbestimmung) der Wildschweine (Kruskal-Wallis-Test, $p=0,008$)

4.1.3 Zusammenhang zwischen PCV-Prävalenzen und Geschlecht

Eine Geschlechtsbestimmung wurde bei 144 der 238 untersuchten Tiere durchgeführt; der Zusammenhang zwischen dem Geschlecht der Tiere und der PCV 2-Infektion wird in Tabelle 28 verdeutlicht:

Tabelle 28: Zusammenhang zwischen Geschlecht und PCV-Prävalenzen

Geschlecht	Tierzahl	PCV neg	PCV 1 pos.	PCV 2 pos.	PCV1 + 2
männlich	63	58,7%	19,1%	26,9%	4,7%
weiblich	81	66,7%	18,5%	14,8%	0

Der Unterschied geschlechtsabhängiger Prävalenz ist statistisch nicht signifikant.

4.1.4 Zusammenhang zwischen PCV-Prävalenzen und Körpergewicht

Als Maß zur Beurteilung des körperlichen Entwicklungszustandes wurde für jedes Tier dessen theoretisches Soll-Gewicht aus der Regression zwischen Alter und Körpergewicht errechnet, dabei schwankten die geschätzten Körpergewichte zwischen 3 und 100 kg mit einem Durchschnitt von 30,18 kg; die untersuchten Tiere wichen um $0 \pm 10,22$ kg vom theoretischen Soll-Gewicht ab.

Die Abweichungen der einzelnen Werte vom Soll-Gewicht sind in Abbildung 14 dargestellt.

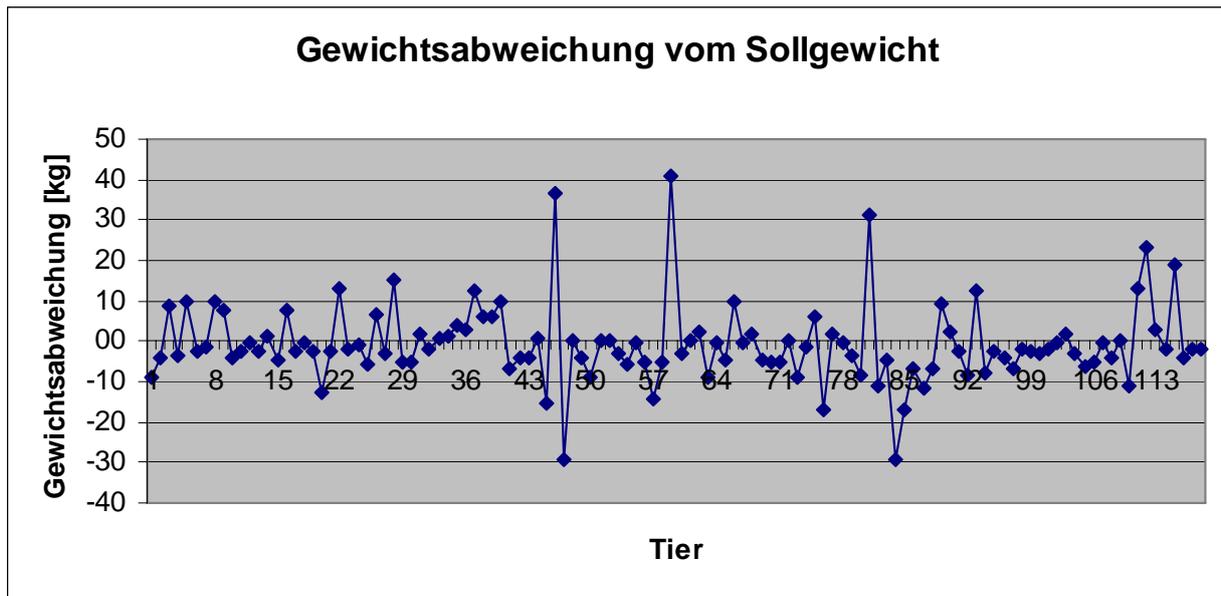


Abbildung 14: Darstellung der Gewichte der untersuchten Tiere im Vergleich zum errechneten Sollgewicht (x-Achse). Auf der y-Achse ist die Gewichtsabweichung in kg aufgetragen. Die Mehrzahl der Einzelwerte liegt nahe der x-Achse.

Ein Zusammenhang zwischen Körpergewicht und PCV 2-DNA - Nachweis in der Milz ist deutlich (Abbildung 15), es muß jedoch die enge Beziehung zwischen Alter und Körpergewicht berücksichtigt werden.

Eine Abweichung vom errechneten Sollgewicht zwischen den PCV-positiven und – negativen Tieren war im vorliegenden Untersuchungsmaterial nicht festzustellen (Abbildung 16).

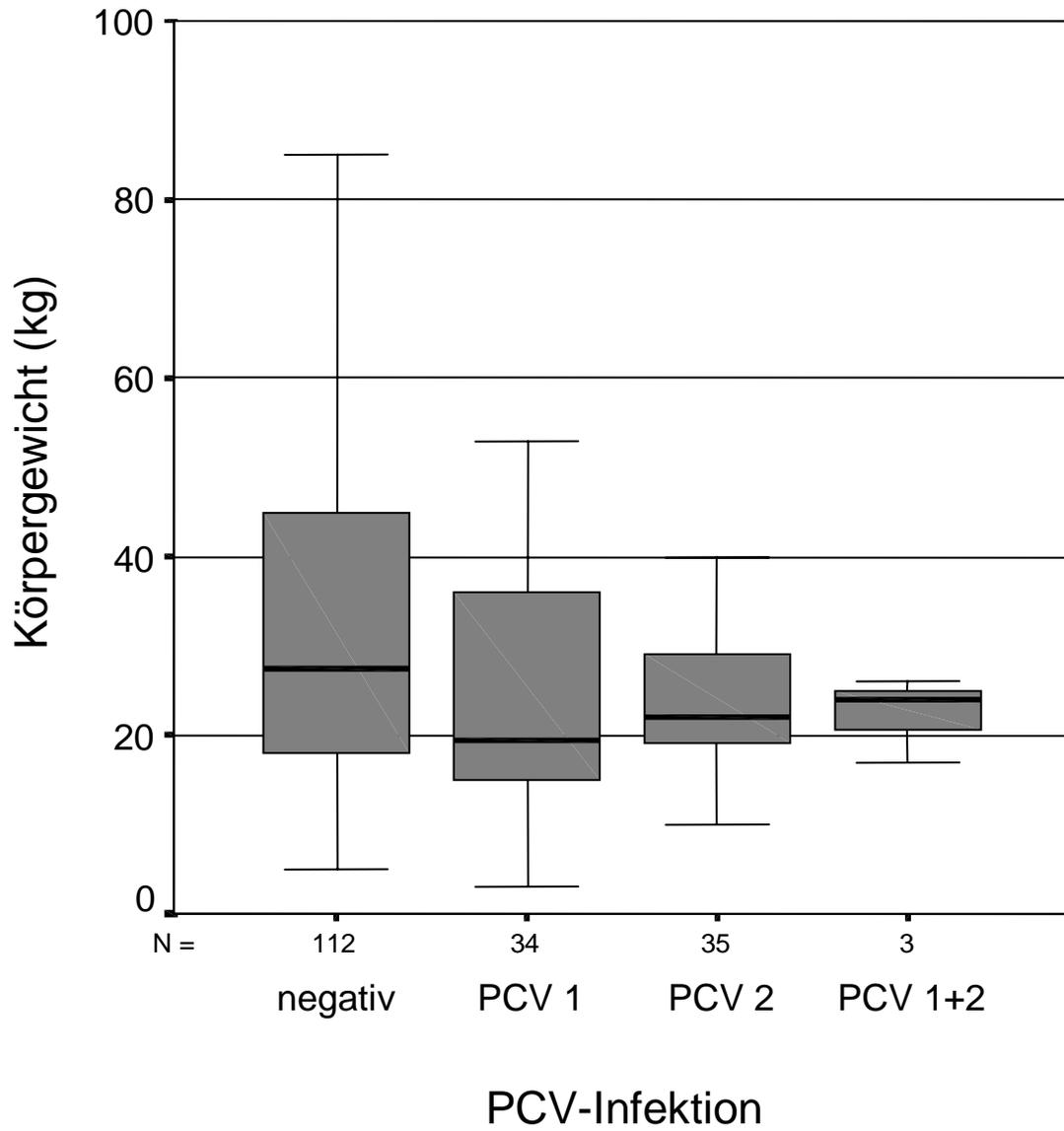


Abbildung 15: Zusammenhang zwischen PCV-Infektion und Körpergewicht (Kruskal-Wallis-Test, $p=0,053$).

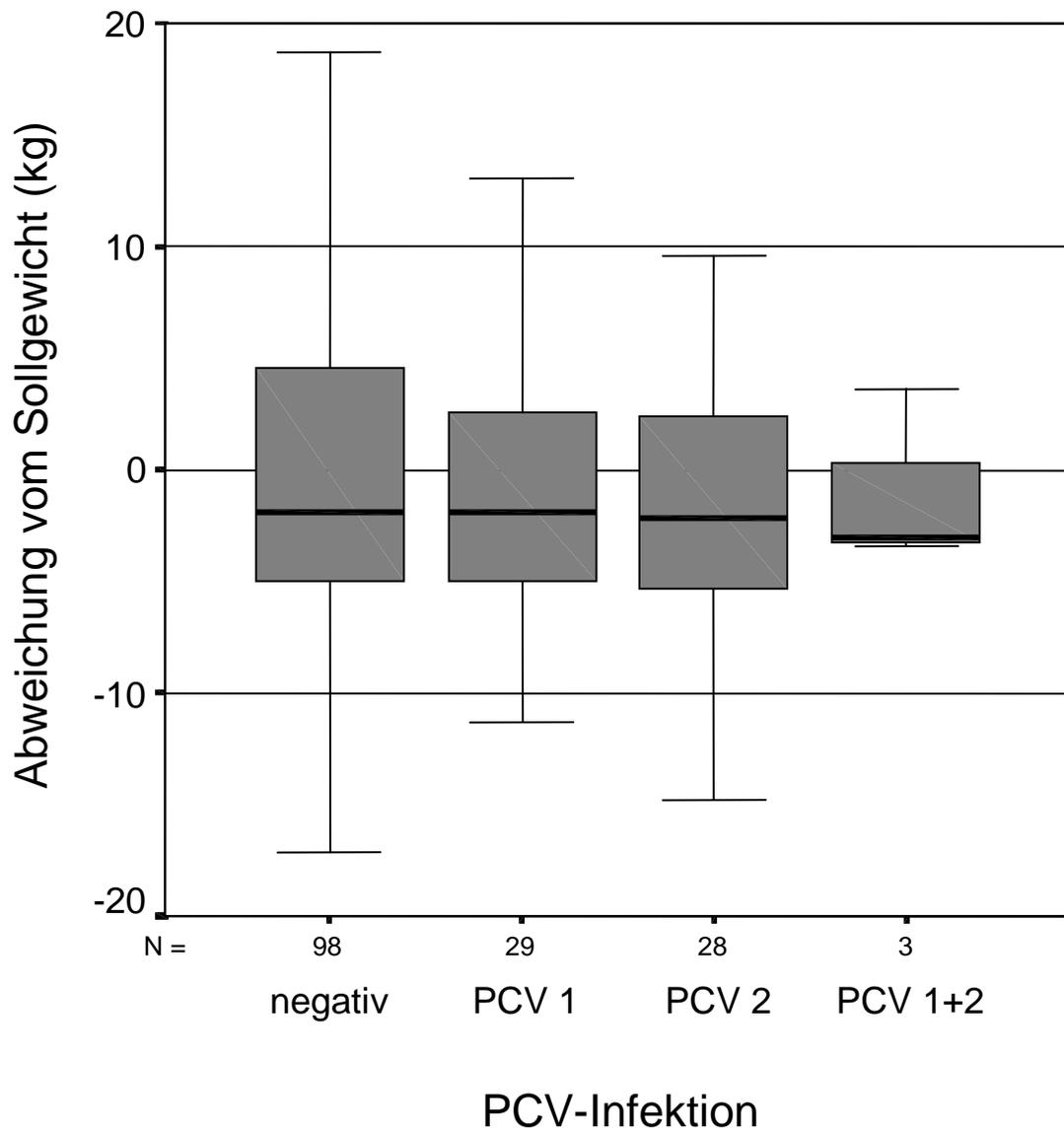


Abbildung 16: Zusammenhang zwischen PCV-Infektion und Abweichung vom altersabhängigen "Sollgewicht" (Kruskal-Wallis-Test, $p=0,962$).

4.2. Ergebnisse der PCV-Sequenzierung

4.2.1 Sequenzierung eines kompletten PCV-Genoms

4.2.1.1 Erstellen der Komplettssequenz

Zur Erstellung einer kompletten PCV-Sequenz wurde zunächst ein Fragment der Länge 1085 Nukleotide (nt) aus den Proben #108, #214 und #311 sequenziert. Da zu Beginn der Arbeit nicht absehbar war, ob und in welcher Lokalisation Variationen auftreten, wurde der zu klonierende Abschnitt so gewählt, dass Teile des ORF 1 und des ORF 2 enthalten waren.

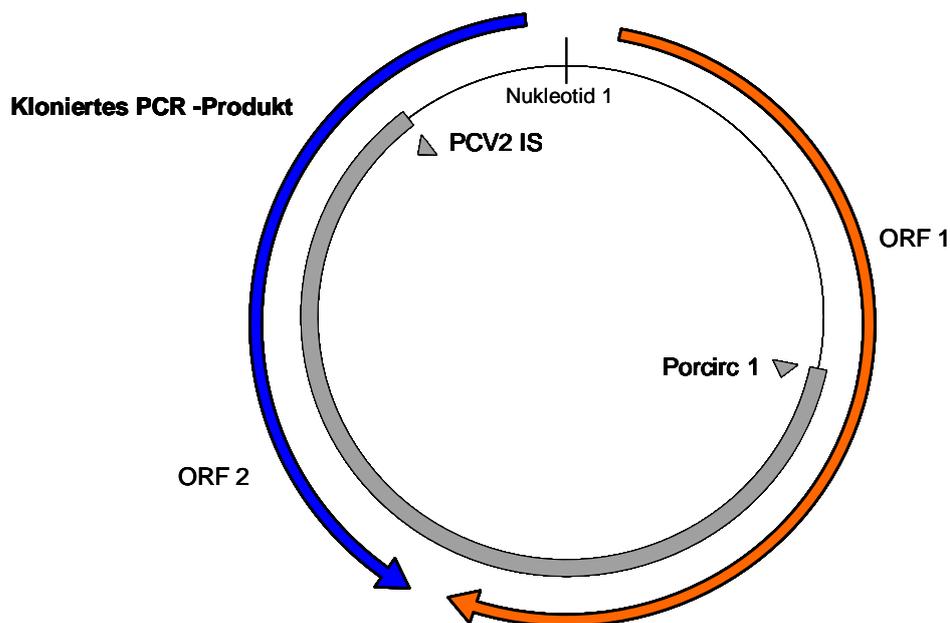
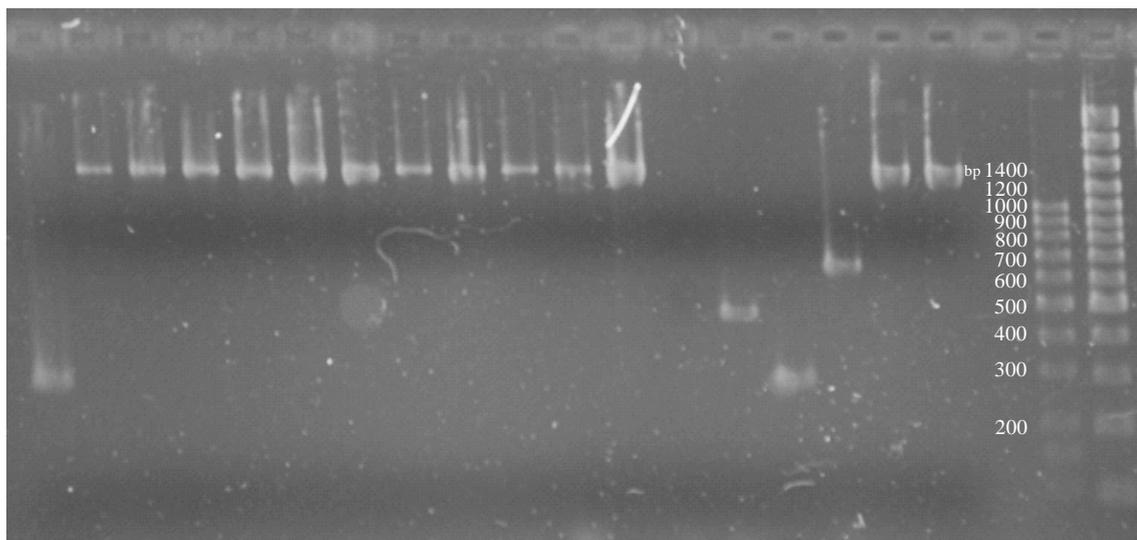


Abbildung 17: Lage des klonierten Fragments und der verwendeten Primer relativ zum ORF 1 und ORF 2; das Fragment hat eine Länge von 1085 nt.

Vor dem Schritt der Klonierung wurde eine Optimierung der PCR-Bedingungen geprüft und kontrolliert, ob die Amplifikation das erwünschte Ergebnis brachte: ein typisches Bandenmuster einer Kontrolle ist in Abbildung 22 Spur 8 abgebildet. Auch die Klonierung des 1085nt-Fragments wurde mittels PCR kontrolliert. Durch Verwendung eines M13- Standardprimers ergab sich durch die PCR ein längeres Fragment, da Teile des Plasmids in diesem Fragment enthalten sind. Die Amplifikatslänge entstand aus dem 1085 nt langen Fragment und den am 3' und 5' anhängenden Sequenzen, die zwischen M13 (fwd und rvs)-Primer und Ligationsstelle liegen (Abbildung 4); somit liegt die Bande im Falle der Ligation des gewünschten Fragments bei 1323 nt.

Abbildung 18 zeigt die Kontroll-PCR der klonierten Fragmente. Von jeder Probe wurden sechs Klone angefertigt, die aus unterschiedlichen PCR's stammten. Die erfolgreich klonierten Proben (Probe #108 5 Klone, Probe #214 6 Klone, Probe #311 2 Klone) wurden sequenziert.



Spur 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21

Abbildung 18: Typisches Bandenmuster der Kontroll-PCR der Klonierung des 1085nt-Fragments: **Spur 1-6** Probe #108 **Spur 7-12** Probe #214, **Spur 13-18** Probe #311, **Spur 19 + 20** Marker (bp)

Die Analyse wurde mittels „e-Seq“ Software (Version 2.0) durchgeführt; durch das Programm nicht eindeutig erkannte Nukleotide wurden anhand des Gelbildes manuell identifiziert.

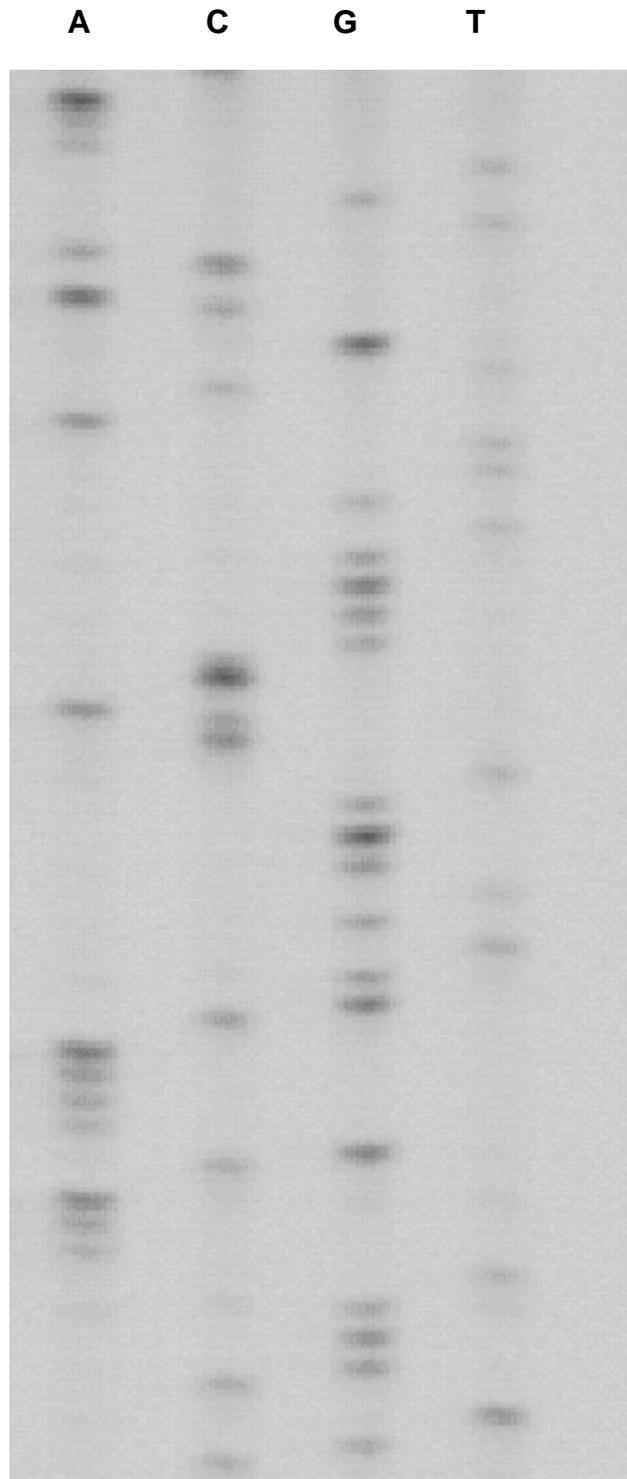


Abbildung 19: Typisches Bild der Sequenzierungsreaktion (Ausschnitt). Die Spuren stellen von links nach rechts die Reaktionsansätze für die Basen A, C, G und T dar.

1 60
 311 GCTGAAC TTTTGAAAAGTGAGCGGGAAAATGCAGAAGCGTGATTGGAAGACGGAATGTACAC
 108 GCTGAAC TTTTGAAAAGTGAGCGGGAAAATGCAGAAGCGTGATTGGAAGACGGAATGTACAC
 214 GCTGAAC TTTTGAAAAGTGAGCGGGAAAATGCAGAAGCGTGATTGGAAGACGGAATGTACAC

 61 120
 311 GTCATTGTGGGGCCACCTGGGTGTGGCAAAGCAAATGGGCTGCTAATTTTGCAGACCCG
 108 GTCATTGTGGGGCCACCTGGGTGTGGCAAAGCAAATGGGCTGCTAATTTTGCAGACCCG
 214 GTCATTGTGGGGCCACCTGGGTGTGGCAAAGCAAATGGGCTGCTAATTTTGCAGACCCG

 121 180
 311 GAAACCACATACTGGAAACCACCTAGAAACAAGTGGTGGGATGGTTACCATGGTGAAGAA
 108 GAAACCACATACTGGAAACCACCTAGAAACAAGTGGTGGGATGGTTACCATGGTGAAGAA
 214 GAAACCACATACTGGAAACCACCTAGAAACAAGTGGTGGGATGGTTACCATGGTGAAGAA

 181 240
 311 GTGGTTGTTATTGATGACTTTTTATGGCTGGCTGCCGTGGGATGATCTACTGAGACTCTGT
 108 GTGGTTGTTATTGATGACTTTTTATGGCTGGCTGCCGTGGGATGATCTACTGAGACTCTGT
 214 GTGGTTGTTATTGATGACTTTTTATGGCTGGCTGCCGTGGGATGATCTACTGAGACTCTGT

 241 300
 311 GATCGATATCCTTTGACTGTTGAGACTAAAGGTGGAAGTGTACCTTTTTTGGCCCCGAGT
 108 GATCGATATCCTTTGACTGTTGAGACTAAAGGTGGAAGTGTACCTTTTTTGGCCCCGAGT
 214 GATCGATATCCTTTGACTGTTGAGACTAAAGGTGGAAGTGTACCTTTTTTGGCCCCGAGT

 301 360
 311 ATTCTGATTACCAGCAATCAGACCCCGTTGGAAGGGTACTCCTCAACTGCTGTCCCAGCT
 108 ATTCTGATTACCAGCAATCAGACCCCGTTGGAAGGGTACTCCTCAACTGCTGTCCCAGCT
 214 ATTCTGATTACCAGCAATCAGACCCCGTTGGAAGGGTACTCCTCAACTGCTGTCCCAGCT

 361 420
 311 GTAGAAGCTCTCTATCGGAGGATTACTTCCTTGGTATTTTGAAGAATGCTACAGAACAA
 108 GTAGAAGCTCTCTATCGGAGGATTACTTCCTTGGTATTTTGAAGAATGCTACAGAACAA
 214 GTAGAAGCTCTCTATCGGAGGATTACTTCCTTGGTATTTTGAAGAATGCTACAGAACAA

 421 480
 311 TCCACGGAGGAAGGGGGCCAGTTCGTCACCCTTTCCCCCCCATGCCCTGAATTTCCATAT
 108 TCCACGGAGGAAGGGGGCCAGTTCGTCACCCTTTCCCCCCCATGCCCTGAATTTCCATAT
 214 TCCACGGAGGAAGGGGGCCAGTTCGTCACCCTTTCCCCCCCATGCCCTGAATTTCCATAT

 481 540
 311 GAAATAAATTACTGAGTCTTTTTTATCACTTCGTAATGGTTTTTTATTATTACCTTAGGGT
 108 GAAATAAATTACTGAGTCTTTTTTATCACTTCGTAATGGTTTTTTATTATTACCTTAGGGT
 214 GAAATAAATTACTGAGTCTTTTTTATCACTTCGTAATGGTTTTTTATTATTACCTTAGGGT

 541 600
 311 TAAGTGGGGGTCTTTAAGATTAAATTCTCTGAATTGTACATACATGGTTATACGGATAT
 108 TAAGTGGGGGTCTTTAAGATTAAATTCTCTGAATTGTACATACATGGTTATACGGATAT
 214 TAAGTGGGGGTCTTTAAGATTAAATTCTCTGAATTGTACATACATGGTTATACGGATAT

```

601                                                    660
311      TGTAGTCCTGGTCGTATTTACTGTTTTTCGAGCGCAGTGCCGAGGCCTACGTGGTCTACAT
108      TGTAGTCCTGGTCGTATTTACTGTTTTTCGAACGCAGTGCCGAGGCCTACGTGGTCTACAT
214      TGTAGTCCTGGTCGTATTTACTGTTTTTCGAACGCAGTGCCGAGGCCTACGTGGTCTACAT
          *****

661                                                    720
311      TTGCAGAGGTTTGTAGTCTCAGCCAGAGTTGATTTCTTTTATTATTGGGTTGGAAGTAAT
108      TTGCAGAGGTTTGTAGTCTCAGCCAGAGTTGATTTCTTTGTTATTGGGTTGGAAGTAAT
214      TTGCAGAGGTTTGTAGTCTCAGCCAGAGTTGATTTCTTTGTTATTGGGTTGGAAGTAAT
          *****

721                                                    780
311      CGATTGTCCTATCAAGGACAGGTTTGGGGGTAAAATAGCGGGAGTGGTAGGAGAAGGGCT
108      CGATTGTCCTATCAAGGACAGGTTTGGGGGTAAAATAGCGGGAGTGGTAGGAGAAGGGCT
214      CGATTGTCCTATCAAGGACAGGTTTGGGGGTAAAATAGCGGGAGTGGTAGGAGAAGGGCT
          *****

781                                                    840
311      GGGGGATTGTATGGCGGGCGGAGTAGTTAACATAGGGGTCATAGGTTAGGGCTGTGGCCT
108      GGGGGATTGTATGGCGGGCGGAGTAGTTAACATAGGGGTCATAGGTTAGGGCTGTGGCCT
214      GGGGGATTGTATGGCGGGCGGAGTAGTTAACATAGGGGTCATAGGTTAGGGCTGTGGCCT
          *****

841                                                    900
311      ATGTTAAAAAGTTATCATCTAGAATAACAGCAGTGGAGCCCCTCCCCTGTCACCTTGAG
108      TTGTTACAAAGTTATCATCTAGAATAACAGCAGTGGAGCCCCTCCCCTGTCACCTTGAG
214      TTGTTACAAAGTTATCATCTAGAATAACAGCAGTGGAGCCCCTCCCCTGTCACCTTGAG
          *****

901                                                    960
311      TGATTGGGGAGCAGGGCCAGAATTCAACCTTAACCTACCTTATTCTGTAGTATTAAGG
108      TGATTGGGGAGCAGGGCCAGAATTCAACCTTAACCTTCCCTTATTCTGTAGTATTAAGG
214      TGATTGGGGAGCAGGGCCAGAATTCAACCTTAACCTTCCCTTATTCTGTAGTATTAAGG
          *****

961                                                    1020
311      GCACAGTGAGGGGGTTTGTAGCCCCCTCTGGGGGAAGAAAGTCATTAATATCAAATCTCA
108      GCACAGTGAGGGGGTTTGTAGCCCCCTCTGGGGGAAGAAAGTCATTAATATCAAATCTCA
214      GCACAGTGAGGGGGTTTGTAGCCCCCTCTGGGGGAAGAAAGTCATTAATATCAAATCTCA
          *****

1021                                                    1080
311      TCATGTCTACAGCCCAGGAGGGTGTGAGACTGTGGTAGCCTTGACAGTATATCCGAAGG
108      TCATGTCCACCGCCCAGGAGGGTGTGAGACTGTGGTAGCCTTGACAGTATATCCGAAGG
214      TCATGTCCACCGCCCAGGAGGGTGTGAGACTGTGGTAGCCTTGACAGTATATCCGAAGG
          *****

1081      1085
311      TGCGG
108      TGCGG
214      TGCGG
          *****

```

Abbildung 20: Alignment der 1085nt-Fragmente der Proben #311, #108 und #214 (CLUSTAL W [1.74]) multiple sequence alignment). Die im Alignment ersichtlichen Unterschiede zwischen den einzelnen Proben sind zur besseren Übersicht schattiert dargestellt.

Die Proben #108 bzw. #311 unterscheiden sich von Probe #214 um 4 bzw. 17 Nukleotide, dies entspricht einer Homologie von 99,6 % bzw. 98,4 %. Probe #108 stammt aus dem rheinischen Westerwald (Region 1), die Probe #214 aus dem nördlichen Hunsrück (Region 3): beide Regionen liegen ca. 60 km Luftlinie auseinander; Probe #311 stammt aus dem etwa 130 km entfernten südlichen Hessen (Odenwald).

Probe #214 wurde für eine komplette Sequenzierung ausgewählt. Die für diese Untersuchung verwendeten Primer sind in Abbildung 21 dargestellt.

Darstellung der Primer und Lage der ORF 1 + 2

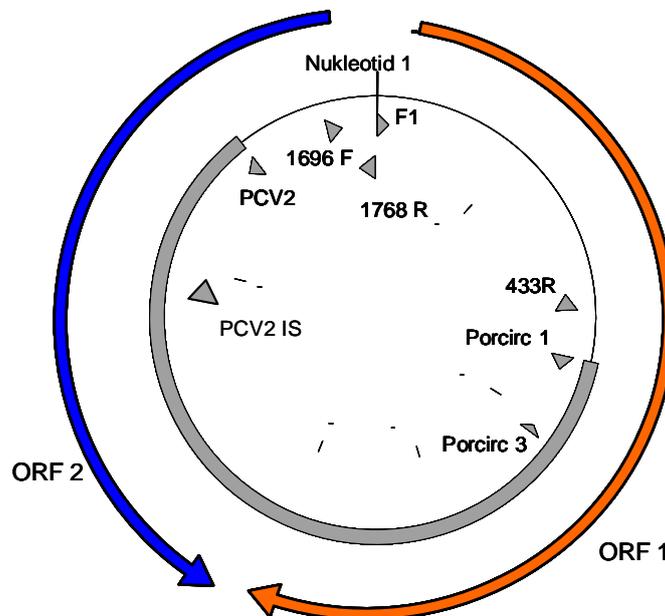


Abbildung 21: Lage der Primer für die Komplettssequenzierung. Die Ausrichtung ist durch Pfeile gekennzeichnet.

Das PCV 2-Porcirc 1-Fragment wurde zunächst kloniert, die restliche Sequenz durch Kombination verschiedener Primer in Form von 7 überlappenden DNA-Fragmenten amplifiziert und sequenziert.

Tabelle 29: Kombination der Primer und deren Fragmentlänge

Primerkombination	Fragmentlänge
F1 und Porcirc 3	632 nt
PCV2 IS und 1768R	446 nt
PCV2 IS und 433R	879 nt

Der Primer 1696F diente als Sequenzierungsprimer.

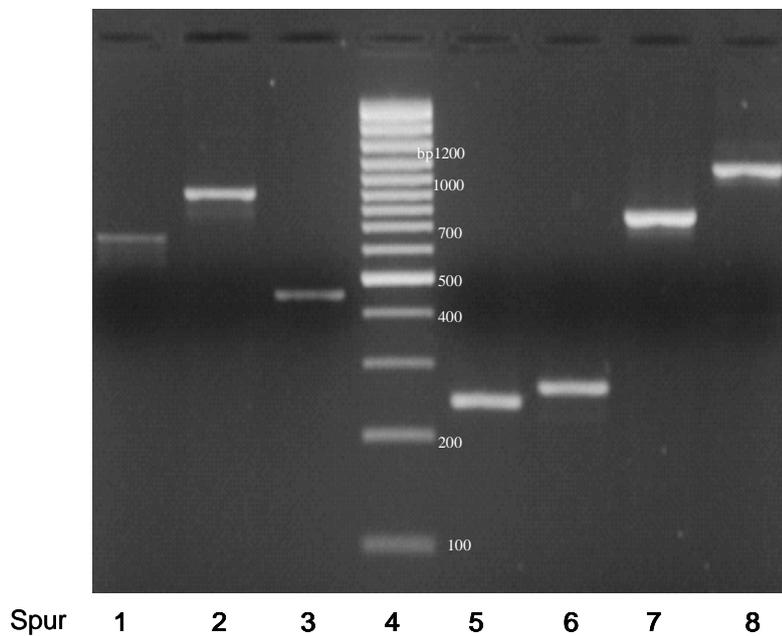


Abbildung 22: Bandenmuster der 7 DNA-Fragmente, mit denen die Sequenz von Probe #214 vervollständigt wurde **Spur 1** Primer F1 + Primer Porcirc 3, **Spur 2** Primer PCV2 IS + Primer 1768R, **Spur 3** Primer PCV2 IS + Primer 433R, **Spur 4** Marker (bp), **Spur 5** Primer Porcirc 1 + 2, **Spur 6** Primer PCV2 IS + Primer PCV2 IAS, **Spur 7** Primer PCV2 IAS + Primer nPCRfwd, **Spur 8** Primer Porcirc1 + Primer PCV2 IAS

1 ACCAGCGCACTTCGGCAGCGGCAGCACCTCGGCAGCACCTCAGCAGCAACATGCCAGCA 60
 61 AAAAGAATGGAAGAAGCGGACCCCAACCACACAAAAGGTGGGTGTTACGCTGAATAATC 120
 121 CTTCCGAAGACGAGCGCAAGAAAATACGGGAGCTTCCAATCTCCCTTTTTGATTATTTTA 180
 181 TTGTTGGCGAGGAGGGTAATGAGGAAGGACGAACACCCACCTCCAGGGGTTCGCTAATT 240
 241 TTGTGAAGAAGCAAACATTTAATAAAGTGAAATGGTATTTTCGGTGCCCGCTGCCACATCG 300
 301 AGAAAGCGAAAGGAACTGATCAGCAGAATAAAGAATACTGCAGTAAAGAAGGCAACTTAC 360
 361 TGATGGAATGTGGAGCTCCTAGATCTCAAGGACAACGGAGTGACCTGTCTACTGCTGTGA 420
 421 GTACCTTGTTGGAGAGCGGGAGTCTGGTGACCGTTGCAGAGCAGCACCTGTAACGTTTG 480
 481 TCAGAAATTTCCGCGGGCTGGCTGAACTTTTGAAAGTGAGCGGGAAAATGCAGAAGCGTG 540
 541 ATTGGAAGACAAATGTACACGTCAATTGTGGGGCCACCTGGGTGTGGCAAAGCAAATGGG 600
 601 CTGCTAATTTTGCAGACCCGAAACCACATACTGGAAACCACCTAGAAACAAGTGGTTGG 660
 661 ATGGTTACCATGGTGAAGAAGTGGTTGTTATTGATGACTTTTATGGCTGGCTGCCGTGGG 720
 721 ATGATCTACTGAGACTCTGTGATCGATATCCTTTGACTGTTGAGACTAAAGGTGGAAGT 780
 781 TACCTTTTTTGGCCCGCAGTATTCTGATTACCAGCAATCAGACCCCGTTGGAATGGTACT 840
 841 CCTCAACTGCTGTCCCAGCTGTAGAAGCTCTCTATCGGAGGATTACTTCCCTTGGTATTTT 900
 901 GGAAGAATGCTACAGAACAATCCACGGAGGAAGGGGGCCAGTTCGTACCCCTTTCCCCC 960
 961 CATGCCCTGAATTTCCATATGAAAATAAATACTGAGTCTTTTTTATCACTTCGTAATGGT 1020
 1021 TTTTATTATTCAATTTAGGGTTAAGTGGGGGGTCTTTAAGATTAAATTCTCTGAATTGTAC 1080
 1081 ATACATGGTTATAACGGATATTGTAGTCTGGTCGTATTTACTGTTTTTCGAACGCAGTGCC 1140
 1141 GAGGCCTACGTGGTCTACATTTGCAGAGTTTGTAGTCTCAGCCAGAGTTGATTTCTTTT 1200
 1201 GTTATTGGGTTGGAAGTAATCGATTGTCCTATCAAGGACAGGTTTGGGGGTGAAATAGCG 1260
 1261 GGAGTGGTAGGAGAAGGGCTGGGGGATTGTATGGCGGGCGGAGTAGTTTACATAGGGGTC 1320
 1321 ATAGGTTAGGGCTGTGGCCTTTGTTACAAAGTTATCATCTAGAATAACAGCAGTGGAGCC 1380
 1381 CACTCCCCTGTCACCTTGAGTGATTGGGGAGCAGGGCCAGAATTCAACCTTAACCTTCTT 1440
 1441 TATTCTGTAGTATTCAAAGGGCACAGTGAGGGGGTTTTGAGCCCCCTCTGGGGGAAGAAA 1500
 1501 GTCATTAATATTAATCTCATCATGTCCACCGCCAGGAGGGTGTGAGACTGTGGTAGC 1560
 1561 CTTGACAGTATATCCGAAGGTGCGGGAGAGGCGGGTGTGTAAGATGCCATTTTTCTTCT 1620
 1621 CCAACGGTAGCGGTGGCGGGGGTGGACGAGCCAGGGGCGGCGGAGGATCTGGCCAAG 1680
 1681 ATGGCTGCGGGGGCGGTGTCTTCTCCTTCGGTAACGCCTCCTTGAATACGTCATACCTGA 1740
 1741 AAACGAAAGAAGTGCCTGTAAGTATT

Abbildung 23: Komplette Sequenz des PCV 2-Genoms aus Probe #214 (Herkunft nördlicher Hunsrück), die in Genebank© unter der Nummer AY713470 abgelegt wurde.

4.2.1.2 Vergleich der Wildschweinisolat mit den beim Hausschwein beschriebenen Isolaten

Die Kompletsequenz der Probe #214 konnte mit bereits in der Datenbank gespeicherten Sequenzen anderer analysierten Isolate von Hausschweinen verglichen werden; Sequenzen von Wildschweinen lagen bisher nicht vor.

Bei dem Vergleich fiel auf, dass ein Nukleotid der PCV 2-Sequenz der Probe #214 relativ zu den bereits veröffentlichten Isolaten deletiert ist (Abbildung 24). Die Verringerung der Basenzahl resultiert aus der Deletion eines der 3 Adenine an der Position 1040 – 1042, über eine Verschiebung des STOP-Codon eine Position über das 3`-Ende hinaus folgt eine Verschiebung des ORF2; dadurch verlängert sich die Capsidprotein-Sequenz an Position 234 um eine Aminosäure (Lysin). Die abgeleitete Proteinsequenz umfasst daher 234 Aminosäuren anstelle der bei den meisten anderen in der Datenbank vorliegenden Sequenzen mit 233 Aminosäuren.

Die größte Homologie der Gesamtsequenz besteht mit einem chinesischen Stamm; alle in der Datenbank vorhandenen Stämme aus Deutschland zeigen wie auch die Isolate angrenzender Länder im Vergleich dazu eine reduzierte Übereinstimmung (Tabelle 30).

Im folgend aufgeführten Dendrogramm sind die Homologiegrade bildlich dargestellt (Abbildung 25); die in der Datenbank Genebank© hinterlegten Zugangsnummern (Accession No.) werden im Anhang aufgelistet.

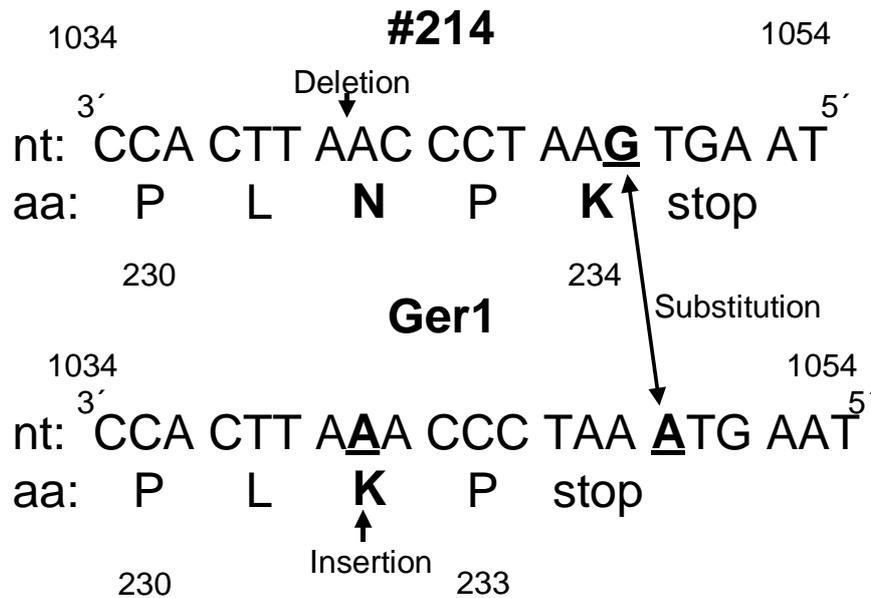


Abbildung 24: Darstellung einer typischen Nukleotid- (nt) und Aminosäuresequenz (aa) am N-Terminus des Capsidproteins. Zum Vergleich ist hier ein PCV 2-Isolat eines Hausschweins aus Deutschland (Ger1) dem der Probe #214 gegenübergestellt. Die Deletion eines Adenins führt zu einer Verkürzung des Gesamtgenoms des PCV 2 aus Probe #214 um ein Nukleotid auf 1767 nt und durch Verschiebung des Leserahmens zu einer Verlängerung des Capsidproteins um eine Aminosäure (K, Lysin) auf 234 Aminosäuren. Gleichzeitig erfolgt eine Aminosäuresubstitution an der Position 232 des Capsidproteins (K → N, Lysin → Asparagin).

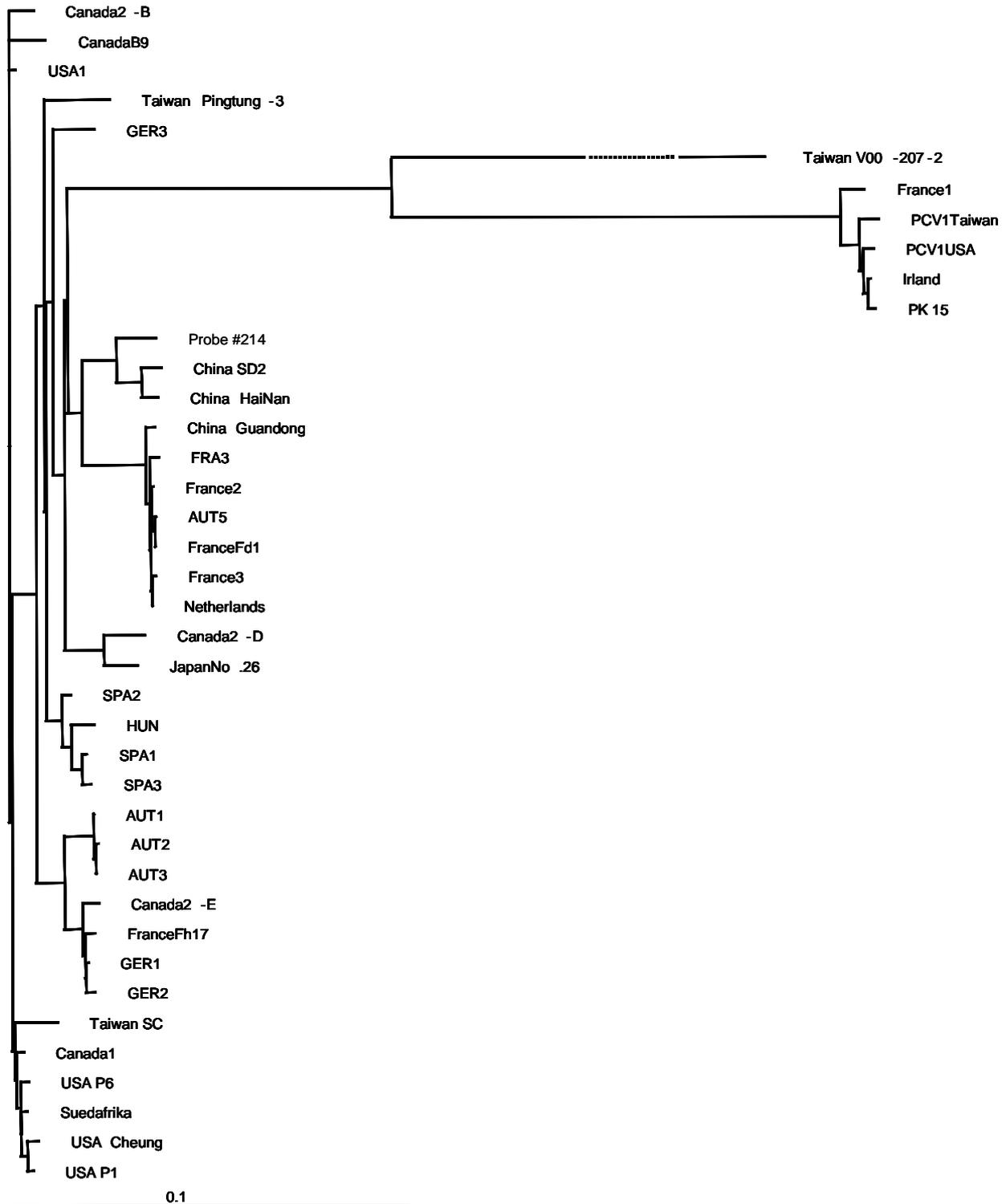


Abbildung 25: Dendrogramm der PCV 2-Sequenzen aus Probe #214 und einer Auswahl von PCV 2-Isolaten verschiedener Hausschweine aus der Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Nucleotide&itool=toolbar>); homologe Sequenzen wurden zu Gruppen zusammengefasst. Der am unteren Ende der Abbildung als schwarzer Balken angezeigte Maßstab drückt eine Homologieabweichung von 10 % aus.

Die PCV 2-Sequenz der Probe #214 wurde mit Isolaten von Hausschweinen aus China gruppiert. Die Nukleotidhomologie zwischen dem Wildschwein-Isolat und veröffentlichten PCV 2 Isolaten lag bei 95,5 % bis 97,8 %; die Homologie zu PCV 1-Isolaten betrug lediglich 68 bis 76 %.

Prozentuale Sequenzunterschiede konnten anhand einer Distanzmatrix veranschaulicht werden; aus Gründen der Übersicht wurden nur 11 Sequenzen aufgenommen (Tabelle 30).

Tabelle 30: Homologiegrade zwischen ausgewählten PCV-Sequenzen; eine Beschreibung der Isolate findet sich im Anhang.

	SPA 2	SD	#214	AUT 5	Can 2D	GER 3	USA P1	TAIWAN SC	USA 1	AUT 1	GER 1
SD	96,2 %										
#214	96,4 %	97,8 %									
AUT 5	96,4 %	96,1 %	96,3 %								
Can 2D	96,8 %	95,5 %	95,7 %	95,7 %							
GER 3	98,3 %	95,9 %	96,1 %	96,0 %	96,5 %						
USA P1	97,7 %	95,6 %	95,8 %	95,8 %	96,2 %	97,3 %					
TAIWAN SC	97,3 %	95,3 %	95,5 %	95,4 %	95,9 %	97,0 %	98,7 %				
USA 1	98,1 %	96,0 %	96,2 %	96,2 %	96,6 %	97,7 %	99,1 %	98,7 %			
AUT 1	97,8 %	95,7 %	95,9 %	95,9 %	96,3 %	97,4 %	97,4 %	97,0 %	97,8 %		
GER 1	97,7 %	95,7 %	95,8 %	95,8 %	96,2 %	97,4 %	97,3 %	97,0 %	97,7 %	98,8 %	
PK 15	78,2 %	77,3 %	77,4 %	77,4 %	77,5 %	77,9 %	77,6 %	77,3 %	78,0 %	77,7 %	77,6 %

Der Homologiegrad innerhalb der PCV 2 Gruppe lag zwischen 95,5 und 98,7 %, die Homologie zwischen PCV 2 und PCV 1 (PK15) betrug lediglich 77 bis 78 %.

4.2.1.3 Vergleich mit Circoviren anderer Spezies

Trotz der bereits erwähnten Ähnlichkeiten zwischen PCV 2 und Psittacine Beak and Feather Disease Virus in der Proteinsequenz bestehen deutliche Unterschiede in der Homologie der DNA-Sequenzen; die pflanzlichen Circoviren, ehemals den Circoviren zugeordnet, bilden eine eigene Familie. Die Verwandtschaft mit anderen Circoviren ist in Abbildung 26 in einem Dendrogramm dargestellt.

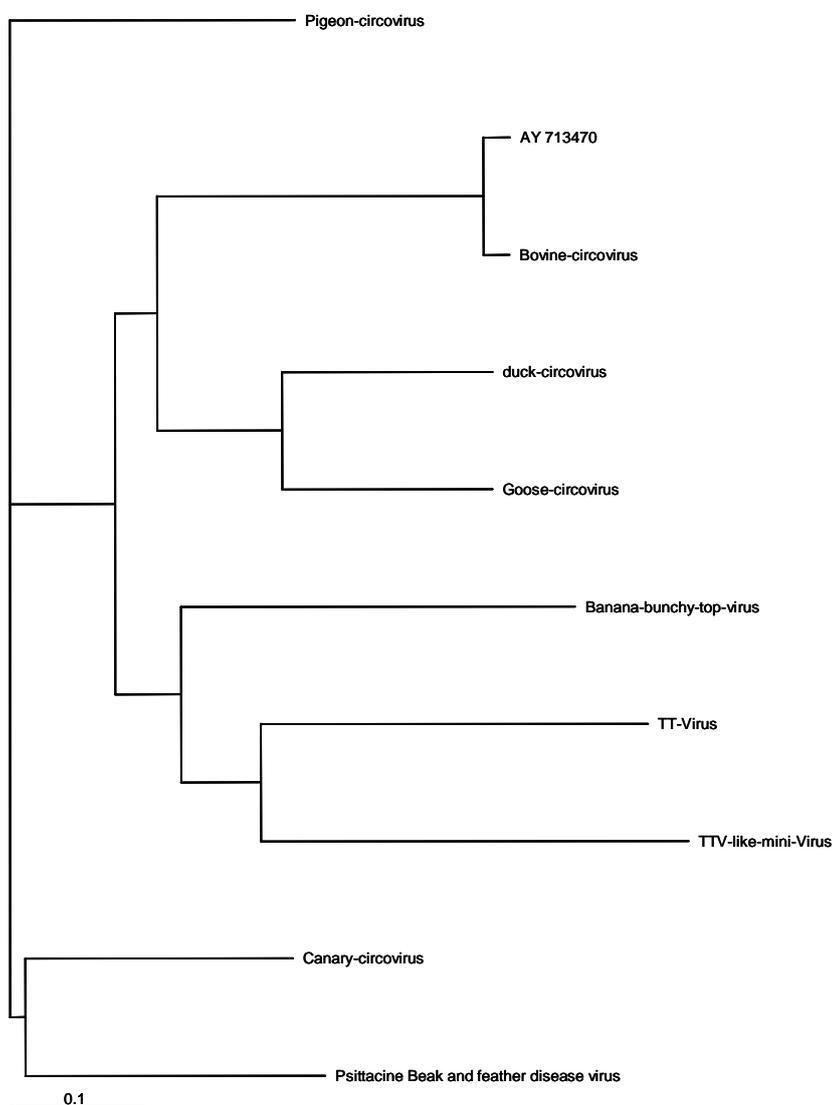


Abbildung 26: Dendrogramm der sequenzierten Probe (AY 713470) und weiterer circovirer Verwandter. Der Maßstab von 0,1 drückt eine Verwandtschaft von 10 % aus.

4.2.1.4 Untersuchung der Leserahmen und der intergenetischen Region

Für die Gesamtsequenz des PCV 2-Isolates der Probe #214 wurden mittels „Clonemanager for Windows“ Version 4.0 die Leserahmen identifiziert. Abbildung 27 und Tabelle 31 zeigen deren Lage im Genom.

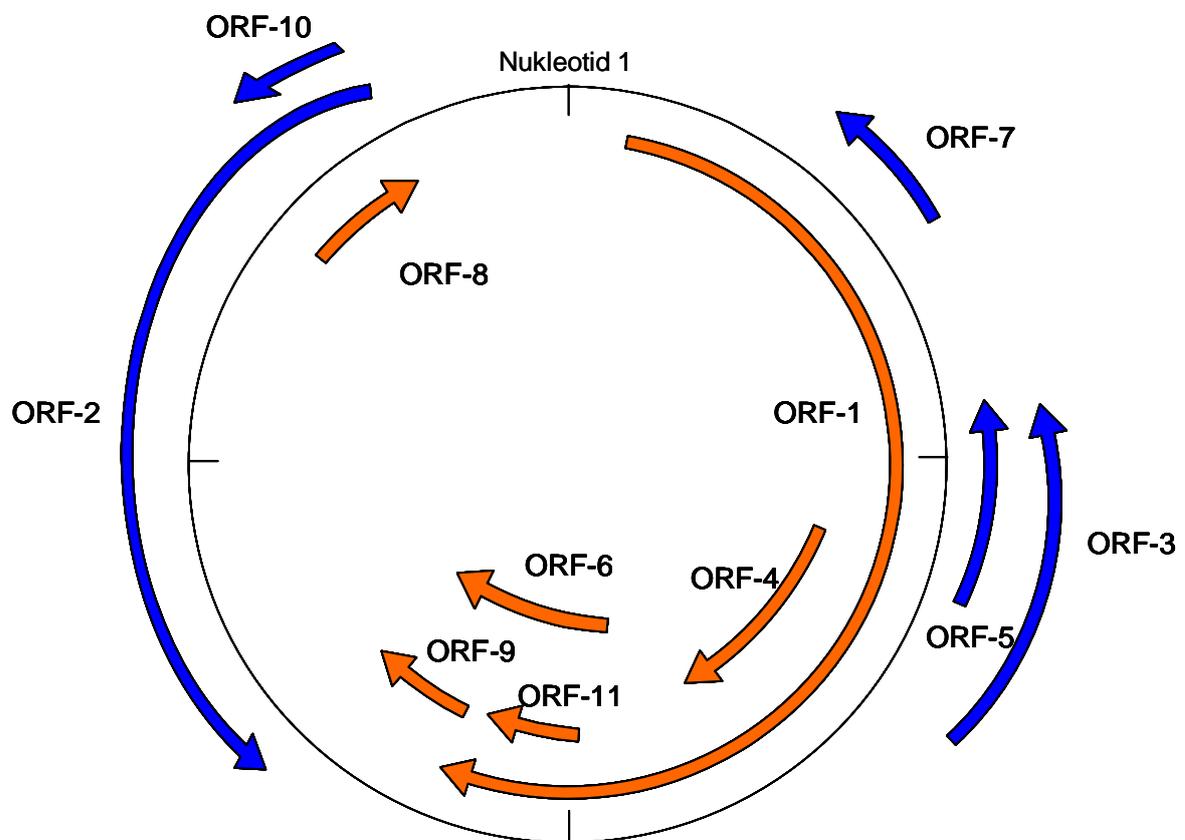


Abbildung 27: Lage der ORFs im zirkulären PCV-Genom. Leserahmen 1 kodiert für das REP-Protein, ORF 2 für das Capsidprotein CAP; die Rolle der weiteren Leserahmen ist bisher unklar. Leserahmen sind innerhalb (fwd) und außerhalb (rev) des zirkulären Genoms dargestellt.

Tabelle 31: Angaben zur Lage der ORFs im PCV-Genom von Probe #214; in der Tabelle finden sich nähere Angaben zur Lage und Ausrichtung der Leserahmen. Die Startangabe bezieht sich auf die Nummerierung der Nukleotide im PCV 2-Genom (Access.-No.: AY094619), der Frame gibt an, welcher Rahmen zur Aminosäureübersetzung verwendet wurde. Das C steht für Komplementär, verdeutlicht also, ob die Sequenz der des Kodons oder der des Antikodons entspricht; in der letzten Spalte ist die Anzahl der Aminosäuren vermerkt.

ORF	Start	Frame	Sequenz	Länge [aa]
1	51	3		314
2	1734	1	C	234
3	671	2	C	104
4	553	1		59
5	565	3	C	59
6	833	2		46
7	298	3	C	41
8	1523	2		35
9	1016	2		29
10	1610	2	C	29
11	907	1		26

Wie einleitend beschrieben, sind die Proteine, für die die Leserahmen eins und zwei kodieren, bekannt: bei ORF 1 handelt es sich um das für die Replikation essentielle Protein REP und bei ORF 2 um ein das Virus umgebende Capsidprotein CAP. Die Proteinsequenzen für beide Leserahmen konnten mittels „Expasy Translation Tool“ aus der Nukleotidsequenz der Probe #214 ermittelt werden; sie sind in Abbildung 28 und 29 dargestellt.

Met P S K K N G R S G P Q P H K R W V F T L N N P S E D E R K K I R E L P I S L F
 D Y F I V G E E G N E E G R T P H L Q G F A N F V K K Q T F N K V K W Y F G A R
 C H I E K A K G T D Q Q N K E Y C S K E G N L L **Met** E C G A P R S Q G Q R S D L
 S T A V S T L L E S G S L V T V A E Q H P V T F V R N F R G L A E L L K V S G K
Met Q K R D W K T N V H V I V G P P G C G K S K W A A N F A D P E T T Y W K P P
 R N K W L D G Y H G E E V V V I D D F Y G W L P W D D L L R L C D R Y P L T V E
 T K G G T V P F L A R S I L I T S N Q T P L E W Y S S T A V P A V E A L Y R R I T S
 L V F W K N A T E Q S T E E G G Q F V T L S P P C P E F P Y E I N Y **Stop**

Abbildung 28: Proteinsequenz des ORF 1 (Probe #214). Start- (Met) sowie Stop-Kodon (Stop) sind ausgeschrieben und hervorgehoben; die weiteren Aminosäuren sind abgekürzt. Eine Erläuterung zu den Abkürzungen findet sich im Anhang.

Der Abgleich mit der Datenbank für den ORF 1 zeigte eine durchweg hohe Homologie zu anderen REP-Proteinen: die höchste Homologie mit 98 % hatten die Isolate AUT 1 aus Österreich (AY424401) und SD aus China (AY181947).

Met T Y S R R R Y R R R R H R P R S H L G Q I L R R R P W L V H P R H R Y R W R
 R K N G I F N T R L S R T F G Y T V K A T T V S T P S W A V D **Met Met** R F N I N D
 F L P P G G G S N P L T V P F E Y Y R I R K V K V E F W P C S P I T Q G D R G V G
 S T A V I L D D N F V T K A T A L T Y D P Y V N Y S A R H T I P Q P F S Y H S R Y F
 T P K P V L D R T I D Y F Q P N N K R N Q L W L R L Q T S A N V D H V G L G T A F
 E N S K Y D Q D Y N I R I T **Met** Y V Q F R E F N L K D P P L N P K **Stop**

Abbildung 29: Proteinsequenz des ORF 2 (Probe #214).

Der Abgleich mit der Datenbank für den ORF 2 zeigte eine geringere Homologie zu anderen CAP-Proteinen; die höchste Homologie bestand mit 93 % zu dem Isolat SD aus China (AY181947).

4.2.2 Vergleichende Sequenzierung der variablen Region des Capsidproteins

Um Unterschiede in der Nukleotidsequenz zwischen verschiedenen von Wildschweinen stammenden PCV 2-Proben zu untersuchen, wurde ein Sequenzbereich mit einer möglichst hohen Variabilität ausgewählt: der betreffende Bereich umfasst 742 Nukleotide innerhalb des ORF 2 (Abbildung 31), entsprechend den Nukleotiden 844 bis 1585 des PCV 2-Genoms. Dieses Fragment wurde mit Hilfe der Primer nPCRfwd und PCV2 IAS amplifiziert.

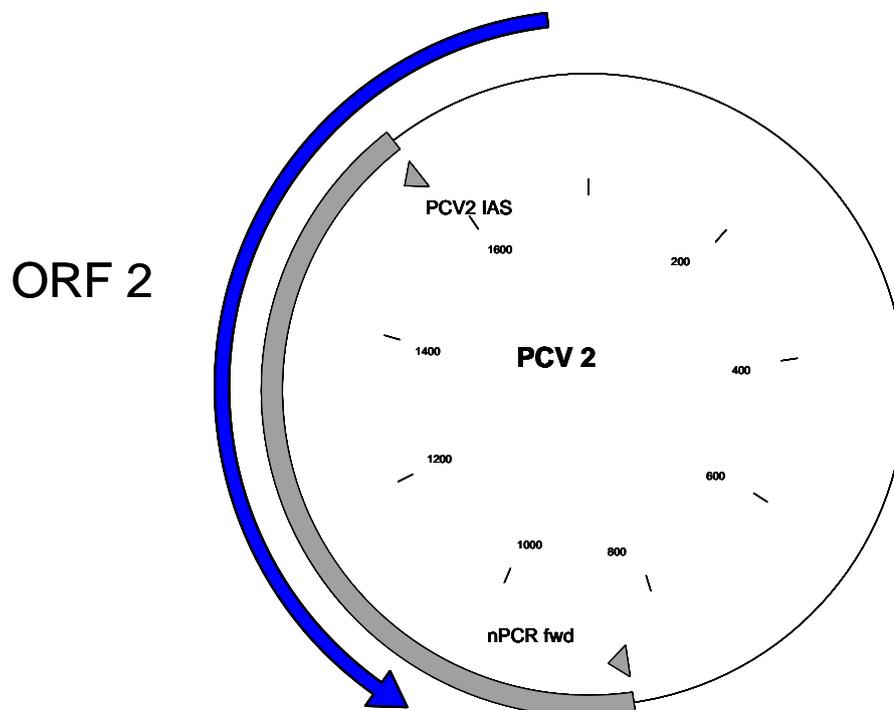


Abbildung 31: Darstellung des für die vergleichende Sequenzierung ausgewählten Fragments und der zugehörigen Primer. Zur Verdeutlichung der Lage im Genom ist der Leserahmen ORF 2 als Pfeil außerhalb des Genoms dargestellt.

Das typische Bandenmuster mit dem Fragment der Länge 742 bp ist in Abbildung 22 Bahn 7 zu sehen.

In die Untersuchung wurden 16 zufällig ausgewählte Tiere einbezogen.

Der Homologiegrad zwischen den Proben variierte zwischen 95,3 und 100 %. Acht aus der Region 1 stammende Proben (#9, #14, #19, #23, #36, #37, #50 und #55) wiesen eine identische Basenfolge auf. Diese wurden als „Consensus“ bezeichnet. Im Vergleich zur Consensus-Sequenz unterschieden sich eine aus Region 1 (#108) und eine aus Region 2 (#214) stammende Probe in je einem Nukleotid und die drei Proben der Region 4 (#311, #312, #315) in 2 bis 8 Nukleotiden. Die Anzahl der Nukleotidunterschiede zwischen den einzelnen Proben korrelierte signifikant mit der geografischen Entfernung der Regionen, aus denen die Proben stammten.

Proben aus den Regionen 3 (#138), 1 (#44) und 2 (#75) zeigten 17, 30 sowie 35 veränderte Nukleotide im Vergleich zu der übereinstimmenden Sequenz der acht Proben aus Region 1, was einer Homologie von 97,7 %, 96,0 % und 95,3 % entspricht.

	1	60
Consensus	CAGTTCGT	CACCCTTTCCCCCCCATGCCCTGAATTTCCATATGAAATAAATTACTGAGTC
214	CAGTTCGT	CACCCTTTCCCCCCCATGCCCTGAATTTCCATATGAAATAAATTACTGAGTC
108	CAGTTCG	CACCCTTTCCCCCCCATGCCCTGAATTTCCATATGAAATAAATTACTGAGTC
312	CAGTTCGT	CACCCTTTCCCCCCCATGCCCTGAATTTCCATATGAAATAAATTACTGAGTC
315	CAGTTCGT	CACCCTTTCCCCCCCATGCCCTGAATTTCCATATGAAATAAATTACTGAGTC
311	CAGTTCGT	CACCCTTTCCCCCCCATGCCCTGAATTTCCATATGAAATAAATTACTGAGTC
138	CAGTTCGT	CACCCTTTCCCCCCCATGCCCTGAATTTCCATATGAAATAAATTACTGAGTC
China_SD2_	CAGTTCGT	CACCCTTTCCCCCCCATGCCCTGAATTTCCATATGAAATAAATTACTGAGTC
GER3	CAGTTCGT	CACCCTTTCCCCCCCATGCCCTGAATTTCCATATGAAATAAATTACTGAGTC
GER1	CAGTTCGT	CACCCTTTCCCCCCCATGCCCTGAATTTCCATATGAAATAAATTACTGAGTC
GER2	CAGTTCGT	CACCCTTTCCCCCCCATGCCCTGAATTTCCATATGAAATAAATTACTGAGTC
75	CAGTTCGT	CACCCTTTCCCCCCCATGCCCTGAATTTCCATATGAAATAAATTACTGAGTC
44	CAGTTCGT	CACCCTTTCCCCCCCATGCCCTGAATTTCCATATGAAATAAATTACTGAGTC
	*****	*****

	61	120
Consensus	TTTTTTATCACTTCGTAATGGTTTTT	TATTATTCACCTTAGGGTT-AAGTGGGGGG-TCTTT
214	TTTTTTATCACTTCGTAATGGTTTTT	TATTATTCATTTAGGGTT-AAGTGGGGGG-TCTTT
108	TTTTTTATCACTTCGTAATGGTTTTT	TATTATTCACCTTAGGGTT-AAGTGGGGGG-TCTTT
312	TTTTTTATCACTTCGTAATGGTTTTT	TATTATTTACTTAGGGTT-AAGTGGGGGG-TCTTT
315	TTTTTTATCACTTCGTAATGGTTTTT	TATTATTTACTTAGGGTT-AAGTGGGGGGTCTTT
311	TTTTTTATCACTTCGTAATGGTTTTT	TATTATTTACTTAGGGTT-AAGTGGGGGG-TCTTT
138	TTTTTTATCACTTCGTAATGGTTTTT	TATTATTCACCTTAGGGTT-AAGTGGGGGG-TCTTT
China_SD2_	TTTTTTATCACTTCGTAATGGTTTTT	TATTATTCACCTTAGGGTT-AAGTGGGGGG-TCTTT
GER3	TTTTTTATCACTTCGTAATGGTTTTT	TATTATTCATTTAGGGTTTAAAGTGGGGGG-TCTTT
GER1	TTTTTTATCACTTCGTAATGGTTTTT	TATTATTCATTTAGGGTTTAAAGTGGGGGG-TCTTT
GER2	TTTTTTATCACTTCGTAATGGTTTTT	TATTATTCATTTAGGGTTTAAAGTGGGGGG-TCTTT
75	TTTTTTATCACTTCGTAATGGTTTTT	TATTATTCATTTAGGGTTTAAAGTGGGGGG-TCTTT
44	TTTTTTATCACTTCGTAATGGTTTTT	AATTATTCATTTAGGGTT-AAGTGGGGGG-TCTTT
	*****	*****


```

481                                                    525
Consensus      CCAGAATTCAACCTTAACCTTCCTTATTCTGTAGTATTCAAAGGG
214            CCAGAATTCAACCTTAACCTTCCTTATTCTGTAGTATTCAAAGGG
108            CCAGAATTCAACCTTAACCTTCCTTATTCTGTAGTATTCAAAGGG
312            CCAGAATTCAACCTTAACCTTCCTTATTCTGTAGTATTCAAAGGG
315            CCAGAATTCAACCTTAACCTTCCTTATTCTGTAGTATTCAAAGGG
311            CCAGAATTCAACCTTAACCTACCTTATTCTGTAGTATTAAGGG
138            CCAGAATTCAACCTTAACCTTCCTTATTCTGTAGTATTCAAAGGG
China_SD2_     CCAGAATTCAACCTTAACCTTCCTTATTCTGTAGTATTCAAAGGG
GER3           CCAGAATTCAACCTTAACCTTTCTTATTCTGTAGTATTCAAAGGG
GER1           CCAGAATTCAACCTTAACCTTTCTTATTCTGTAGTATTCAAAGGG
GER2           CCAGAATTCAACCTTAACCTTTCTTATTCTGTAGTATTCAAAGGG
75            CCAGAATTCAACCTTAACCTTTCTTATTCTGTAGTATTCAAAGGG
44            CCAGAATTCAACCTTAACCTTTCTTATTCTGTAGTATTCAAAGGG
***** ** *****

```

Abbildung 32: Alignment der sequenzierten Fragmente von 16 PCV 2-Proben (CLUSTAL W [1.74] multiple sequence alignment), der Genebank©–Sequenzen der Isolate GER1, GER2, GER3 sowie des chinesischen Isolates SD (die Access.-No. sind im Anhang tabellarisch aufgelistet); Basenabweichungen zwischen den Einzelsequenzen sind schattiert dargestellt.

Drei deutsche Isolate wie auch die Probe #75 zeigen eine Insertion an Position 104 des amplifizierten Bereiches, die bei den übrigen Proben nicht vorhanden ist; es handelt es sich um Nukleotidposition 1050. Eine weitere Insertion findet sich ausschließlich bei der Probe #315 im Bereich der Position 1061. Ab der Nukleotidposition 1170 des Gesamtgenoms tritt zunehmender Nukleotidaustausch auf, der sich bis zur Position 1420 auf 56 summiert.

Hervorzuheben ist weiterhin das Nukleotid 93 des Alignments (entsprechend 1039 der genomischen Position): hier findet sich bei den in das Alignment einbezogenen Proben die Base Cytosin, bei den drei Proben aus dem Odenwald allerdings das Nukleotid Thymidin.

Der phylogenetische Baum (Abbildung 33) wurde unter Einbeziehung der entsprechenden Sequenzen der ausgewählten Proben erstellt. Zusätzlich finden sich PCV 2 Sequenzen von Hausschweinen aus anderen Ländern, die bereits in Genebank© veröffentlicht sind.

Der Consensus wurde mit in sich ähnlichen PCV 2-Proben von Wildschweinen mit 1 bis 8 Nukleotidunterschieden gruppiert. Zu dieser Gruppe zählen die komplett sequenzierte und in der Datenbank hinterlegte Probe #214, sowie die Proben #108, #311, #312 und #315. Dieser Gruppe ist die Probe #138, die unmittelbar mit hauptsächlich chinesischen Isolaten gruppiert wurde, nahe zugeordnet. Probe #44 dagegen ist im Dendrogramm zusammen mit Probe #75 sowie hauptsächlich mit französischen Isolaten und PCV 2 Isolaten aus Deutschland und Österreich zu finden.

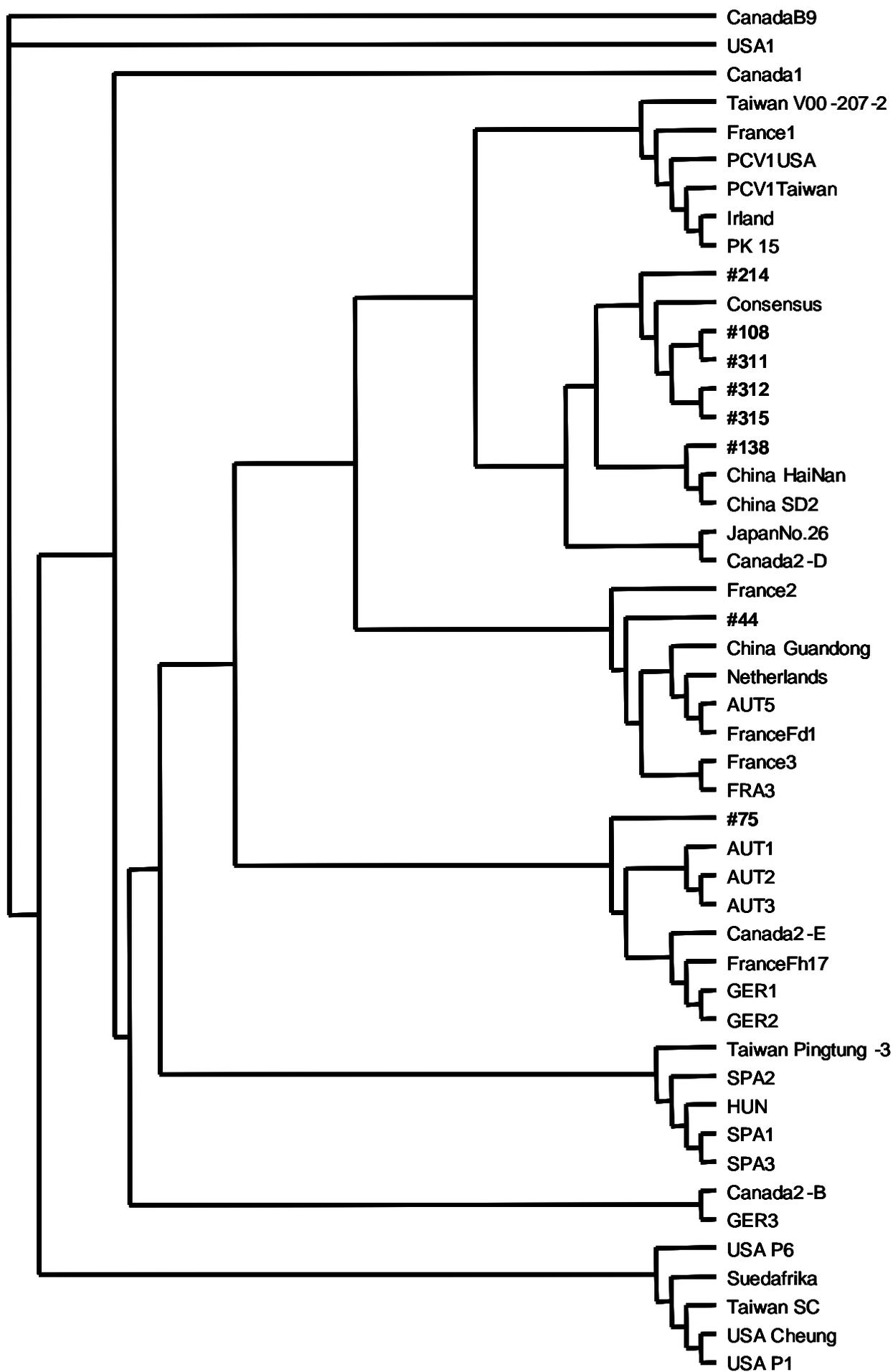


Abbildung 33: Phylogenetischer Baum auf Basis der variablen Region (nt 938 bis 1461) des Capsidproteins, einbezogen sind 16 Wildschweinproben und einige ausgewählte bereits veröffentlichte Hausschwein-Isolate: die Proben #44, #75, #108, #138, #214, #311, #312 und #315 sind entsprechend benannt. Die identischen Sequenzen der Proben #9, #14, #19, #23, #36, #37, #50, und #55 werden als "Consensus" bezeichnet. Die Bezeichnungen der Hausschweinisolat leiten sich von ihrer Herkunft ab: AUT: Österreich; CAN: Kanada; FRA: Frankreich; GER: Deutschland; SPA: Spanien.

Der detaillierten Darstellung der in dem Dendrogramm aufgezeigten Verwandtschaftsgrade dienen die Homologiewerte (Tabelle 32): sie zeigen erhebliche Abweichungen zwischen den PCV 2-Isolaten von Wildschweinen (Consensus) und Hausschweinen aus Deutschland sowie den angrenzenden Staaten; sie stimmen am besten mit einem chinesischen Isolat (SD) überein.

Tabelle 32: Homologiegrade der variablen Region (nt 938 – 1461). Die Proben #9, #14, #19, #23, #36, #37, #50, and #55 sind unter Bezeichnung Consensus zusammengefasst.

	312	315	311	108	214	Consensus	138	SD	Ger 3	Ger 1	Ger 2	75
315	98 %											
311	98 %	96 %										
108	99 %	98 %	98 %									
214	99 %	98 %	98 %	99 %								
Consensus	99 %	98 %	98 %	99 %	99 %							
138	96 %	95 %	95 %	96 %	96 %	97 %						
SD	98 %	96 %	96 %	97 %	97 %	98 %	98 %					
Ger 3	95 %	94 %	93 %	95 %	95 %	95 %	94 %	94 %				
Ger 1	93 %	92 %	91 %	92 %	93 %	93 %	93 %	93 %	95 %			
Ger 2	92 %	91 %	91 %	92 %	93 %	93 %	92 %	92 %	94 %	99 %		
75	93 %	92 %	91 %	93 %	93 %	93 %	93 %	93 %	94 %	99 %	98 %	
44	94 %	92 %	92 %	93 %	94 %	94 %	94 %	95 %	94 %	95 %	94 %	94 %

In Tabelle 33 ist die Revierzugehörigkeit der sequenzierten Proben und die Zuordnung im phylogenetischen Stammbaum dargestellt. Die Gruppe „China“ ist zusätzlich in „Consensus“, „geringfügige Abweichung“ und „mehr als 6 Nukleotidabweichungen“ unterteilt. Mit Ausnahme der Proben #44 (Frankreich) und #75 (Ger/Aut) ist die Mehrzahl der Proben der Gruppe „China“ zuzuordnen.

Tabelle 33: Zusammenhang zwischen Sequenzhomologie und Probenherkunft.

a: umfasst Proben #9, #14, #19, #23, #36, #37, #50 und #55. Die Lage der Regionen ist in Abbildung 11 dargestellt.

Region	Probenanzahl	Gruppe "China"			Gruppe "Frankreich"	Gruppe "Ger/Aut"
		Consensus	Geringfügige Abweichung	>6 Nukleotid-austausche		
1 (rheinischer Westerwald)	10	8 ^a	1 (#108)		1 (#44)	
2 (nordwestl. Hunsrück)	2		1 (#214)			1 (#75)
3 (Rheingau)	1			1 (#138)		
4 (Odenwald)	3		3 (#311, #312, #315)			
Gesamt	16	8	5	1	1	1

Tabelle 34 zeigt die Zuordnung der aufgetretenen Nukleotidvarianten in den beprobten Regionen (Tabelle 3). Region 1 liegt im rheinischen Westerwald, Region 2 im nordwestlichen Hunsrück, Region 3 im Rheingau und Region 4 im Odenwald.

Die Vergleiche sind auf die Consensus-Sequenz bezogen; es fällt auf, dass das Nukleotid 93 der Odenwälder Proben von den übrigen Proben differiert. Anstelle eines Cytosins tragen die Odenwälder PCV 2-Proben an entsprechender Stelle ein Thymin. Ein weiteres signifikantes Ungleichgewicht liegt an den Positionen 343 und 316 vor: an Position 343 findet sich in Region 2 in 66,7 % der Fälle ein Thymin statt des sonst vorkommenden Cytosins; an Position 316 ist bei den Proben der Region 2 mit gleicher Häufigkeit ein Guanin anstelle eines Adenins zu finden.

Die Nummerierung der angegebenen Nukleotidpositionen bezieht sich auf den sequenzierten Bereich, der vom 3'-Ende fortlaufend nummeriert wurde (Abbildung 32).

Tabelle 34: Zusammenhang zwischen der Basenbesetzung an bestimmten Nukleotidpositionen und der Probenherkunft.

variable Nukleotid-Position	Base	Region			chi ²
		1	2 und 3	4	P
N 93	T			100,0 %	
	C	100,0 %	100,0 %		0,000
N 95	T	10,0 %	66,7 %		
	C	90,0 %	33,3 %	100,0 %	0,057
N 155	T	90,0 %	33,3 %	100,0 %	
	C	10,0 %	66,7 %		0,057
N 227	G	90,0 %	33,3 %	100,0 %	
	C	10,0 %	66,7 %		0,057
N 316	G		66,7 %		
	A	100,0 %	33,3 %	100,0 %	0,007
N 319	G	10,0 %	66,7 %		
	A	90,0 %	33,3 %	100,0 %	0,057
N 322	G	100,0 %	66,7 %	66,7 %	
	A		33,3 %		
	C			33,3 %	0,058
N 343	T		66,7 %		
	C	100,0 %	33,3 %	100,0 %	0,007
N 363	A	10,0 %	66,7 %	66,7 %	
	C	90,0 %	33,3 %	33,3 %	0,061
N 460	T	90,0 %	33,3 %	100,0 %	
	C	10,0 %	66,7 %		0,057
N 463	G	10,0 %	66,7 %		
	A	90,0 %	33,3 %	100,0 %	0,057

4.2.2.1 Betrachtungen zur abgeleiteten Proteinsequenz des Capsids

Die Proteinsequenzen der teilsequenzierten PCV 2-Proben wurden aus den Nukleotidsequenzen abgeleitet („Expasy Translation Tool“) und miteinander verglichen. Der in die Untersuchung einbezogene als hochvariabel beschriebene Bereich umfasst die C-Terminal gelegenen zwei Drittel des Capsidproteins.

Met T Y S R R R Y R R R R H R P R S H L G Q I L R R R P W L V H P R H R Y R W R
 R K N G I F N T R L S R T F G Y T V K A T T V S T P S W A V D Met Met R F N I N D
F L P P G G G S N P L T V P F E Y Y R I R K V K V E F W P C S P I T Q G D R G V G
S T A V I L D D N F V T K A T A L T Y D P Y V N Y S A R H T I P Q P F S Y H S R Y F
T P K P V L D R T I D Y F Q P N N K R N Q L W L R L Q T S A N V D H V G L G T A F
E N S K Y D Q D Y N I R I T Met Y V Q F R E F N L K D P P L N P K Stop

Abbildung 34: Aminosäureabfolge des Capsidproteins aus dem ORF 2 von Probe #214; der untersuchte Abschnitt ist unterstrichen dargestellt.

```

90                                     145
Consensus PFEYYRIRKVKVEFWPCSPITQGDRGVGSTAVILDDNFVTKATALTYDPYVNYSSR
44 PFEYYRIRKVKVEFWPCSPITQGDRGVGSSAVILDDNFVTKATALTYDPYVNYSSR
75 PFEYYRIRKVKVEFWPCSPITQGDRGVGSSAIILDDNFVIKATAQTYDPYVNYSSR
108 PFEYYRIRKVKVEFWPCSPITQGDRGVGSTAVILDDNFVTKATALTYDPYVNYSSR
138 PFEYYRIRKVKVEFWPCSPITQGDRGVGSTAVVLDNFVTKANALTYDPYVNYSSR
214 PFEYYRIRKVKVEFWPCSPITQGDRGVGSTAVILDDNFVTKATALTYDPYVNYSSR
311 PFEYYRIRKVKVEFWPCSPITQGDRGVGSTAVILDDNFVTKATALTYDPYVNYSSR
315 PFEYYRIRKVKVEFWPCSPITQGDRGVGSTAVILDDNFVTKATALTYDPYVNYSSR
GER1 PFEYYRIRKVKVEFWPCSPITQGDRGVGSSAIILDDNFVIKATAQTYDPYVNYSSR
GER2 PFEYYRIRKVKVEFWPCSPITQGDRGVGSSAIILDDNFVIKATAQTYDPYVNYSSR
GER3 PFEYYRIRKVKVEFWPCSPITQGDRGVGSTAVILDDNFVTKATALTYDPYVNYSSR
SD (AY181947) PFEYYRIRKVKVEFWPCSPITQGDRGVGSTAVILDDNFVTKANALTYDPYVNYSSR
*****:***:***:*****:

146                                     201
Consensus HTIPQPFYSYHSRYFTPKPVLDRITIDYFQPNNKRNQLWLRQLQTSANVDHVGLGTAFE
44 HTITQPFYSYHSRYFTPKPVL DSTIDYFQPNNKRNQLWLRQLQTAGNVDHVGLGTAFE
75 HTIPQPFYSYHSRYFTPKPVL DSTIDYFQPNNKRNQLWMLRLQTDNRVDHVGLGTAFE
108 HTIPQPFYSYHSRYFTPKPVLDRITIDYFQPNNKRNQLWLRQLQTSANVDHVGLGTAFE
138 HTIPQPFYSYHSRYFTPKPVLDRITIDYFQPNNKRNQLWLRQLQTTGNVDHVGLGTAFE
214 HTIPQPFYSYHSRYFTPKPVLDRITIDYFQPNNKRNQLWLRQLQTSANVDHVGLGTAFE
311 HTIPQPFYSYHSRYFTPKPVLDRITIDYFQPNNKRNQLWLRQLQTSANVDHVGLGTAFE
315 HTIPQPFYSYHSRYFTPKLVNRTIDYFQPINRNQLWLRQLQTSANVDHVGLGTAFE
GER1 HTIPQPFYSYHSRYFTPKPVL DSTIDYFQPNNKRNQLWMLRLQTSRNVVDHVGLGTAFE
GER2 HTIPQPFYSYHSRYFTPKPVL DSTIDYFQPNNKRNQLWMLRLQTSRNVVDHVGLGTAFE
GER3 HTIPQPFYSYHSRYFTPKPVLDRITIDYFQPNNKRNQLWLRQLQTSANVDHVGLGTAFE
SD (AY181947) HTIPQPFYSYHSRYFTPKPVLDRITIDYFQPNNKRNQLWLRQLQTTGNVDHVGLGTAFE
*** *****:***:*****:*** *****:

202
Consensus NSKYDQDYNIRITMYVQFREFNLKDPPLN-PKStop 234
44 NSIYDQDEYNIRVTMYVQFREFNLKDPPLN-P-Stop 233
75 NSKYDQDYNIRVTMYVQFREFNLKDPPLK-P-Stop 233
108 NSKYDQDYNIRITMYVQFREFNLKDPPLN-PKStop 234
138 NSKYDQDYNIRVTMYVQFREFNLKDPPLN-PKStop 234
214 NSKYDQDYNIRITMYVQFREFNLKDPPLN-PKStop 234
311 NSKYDQDYNIRITMYVQFREFNLKDPPLN-PKStop 234
315 NSKYDQDYNIRITMYVQFREFNLKDPPTSTPPStop 235
GER1 NSKYDQDYNIRVTMYVQFREFNLKDPPLK-P-Stop 233
GER2 NSKYDQDYNIRVTMYVQFREFNLKDPPLK-P-Stop 233
GER3 NSKYDQDYNIRVTMYVQFREFNLKDPPLK-P-Stop 233
SD (AY181947) NSIYDQDYNIRITMYVQFREFNLKDPPLN-PKStop 234
** ***:***:*****:***

```

Abbildung 35: Alignment der abgeleiteten Proteinsequenzen (CLUSTAL W [1.74] multiple sequence alignment). Die im Alignment ersichtlichen Unterschiede zwischen den einzelnen Proben sind zur übersichtlicheren Darstellung schattiert dargestellt. Einbezogen wurden die 16 teilsequenzierten von Wildschweinen stammenden PCV 2-Proben sowie die der Literatur entnommenen Sequenzen der Hausschwein-Isolate GER 1-3 und SD (China). Unter der Bezeichnung „Consensus“ sind die identischen Aminosäuresequenzen der Proben #9, #14, #19, #23, #36, #37, #50, und #55 zusammengefasst.

Tabelle 35: Proteinsequenz-Homologien vergleichend zum Consensus

Probe/ Isolat	44	75	108	138	214	311	315	GER1	GER2	GER3	SD
Homologie [%]	93,7	93,6	99,3	97,2	99,3	97,2	95,1	93,7	93,7	97,2	97,2

Die in Tabelle 35 aufgeführten Proteinsequenz-Homologien liegen zwischen 93,6 und 100 %. Die ersten Austausche finden sich an Position 119, die letzte an Position 234. Als Consensus sind die Proben #9, #14, #19, #23, #36, #37, #50 und #55 bezeichnet. Mehr als sechs veränderte Aminosäuren sind bei den Proben #44, #75, #315, Ger1 und Ger2 im Vergleich zum Consensus zu finden.

Bei Betrachtung der Verteilung der Aminosäureaustausche zeigten sich Blöcke von veränderten Aminosäuren in Proben verschiedener Regionen (Abbildung 36): z.B. ein Block von Aminosäuren der Positionen 188, 189 und 213 in den Proben #44, #75 und #138. Ein weiterer Block zeigte Substitutionen an den Positionen 120, 167, 146 und 148; dieser verdeutlicht die enge Verwandtschaft der Proben #44 und #75. Ein Austausch an der Position 144 konnte bei den Proben #214, #108 und #311 gefunden werden. Einige Proben unmittelbarer benachbarter Reviere (R6-#214 und R5-#75; R8-#311 und R8-#315) zeigten z.T. keine gemeinsamen Blöcke.

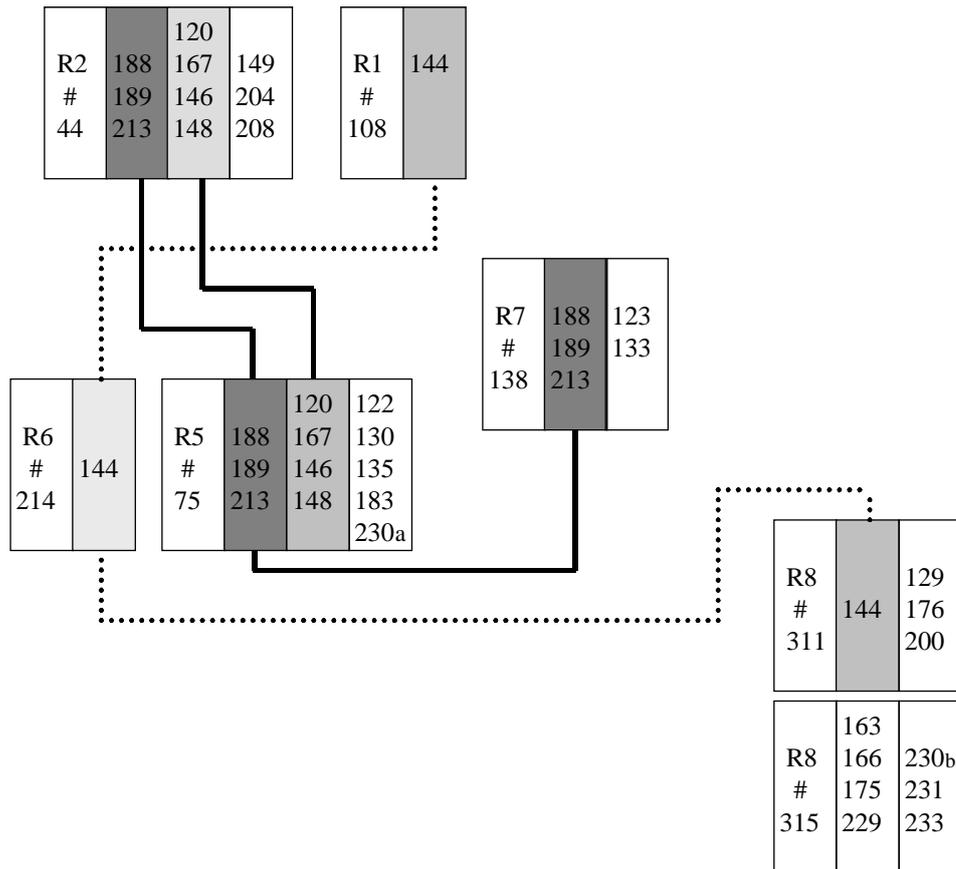


Abbildung 36: Verteilung der Aminosäureaustausche nach Proben und Revieren. Die angegebenen Nummern beziehen sich auf die Reviere (z.B. R6), die Probennummern (z.B. #311) und die Positionen der Aminosäuren, die vom Consensus abweichen (z.B. 129). Jeder Block stellt eine Probe dar, in der alle veränderten Aminosäuren in Bezug auf den Consensus vorkommen. Jede Abteilung innerhalb der Blocks stellt Gruppen von Aminosäuresubstitutionen dar. Gleiche Gruppen sind mit dem gleichen Grauton unterlegt. Buchstaben „a“ und „b“ hinter den Positionsangaben deuten auf unterschiedliche Substitutionen hin, die sich untereinander und vom Consensus unterscheiden.

5. Diskussion

Porzine Circoviren vom Typ II sind in Wechselwirkung mit verschiedenen Haltungs- und Hygienefaktoren an der Entstehung des „Postweaning Multisystemic Wasting Syndroms“ (PMWS) beteiligt (Allan and Ellis, 2000d). Weitere Erkrankungen wie Reproduktionsstörungen (Pensaert et al., 2001; Cariolet et al., 2001b) und der „porcine respiratory disease Complex (PRDC)“ werden mit dem Virus assoziiert (Harms et al., 2002); es spielt weiterhin eine wesentliche Rolle beim „Porzinen Dermatitis und Nephropathie Syndrom“ (PDNS) (Segales et al., 1998a; Wellenberg et al., 2004). Wie in retrospektiven Untersuchungen nachgewiesen, kommt das Virus schon seit mehr als 20 Jahren in Schweinepopulationen vor (Magar et al., 2000). Die dominierende Wirt-Virus-Interaktion entspricht der einer subklinischen persistierenden Infektion (Krakowka et al., 2003). Unter nach wie vor ungeklärten Umständen kommt es bei PCV 2-positiven Absatzferkeln zu den klinischen Symptomen des PMWS mit einer beachtlichen Morbidität (bis zu 60 %) und Mortalität (50-90 %) (Domingo and Segales, 1999).

Ziel dieser Arbeit war es, Vorkommen und Verbreitung der porziner Circoviren Typ 1 und 2 bei Wildschweinen in unterschiedlichen Regionen Deutschlands zu eruieren. Hierzu wurde DNA aus Milzgewebe isoliert und versucht, PCV-spezifische Nukleotidabschnitte mittels PCR zu amplifizieren. Im Gegensatz zur Aussagefähigkeit von Antikörpertitern kann bei positiven Reagenten von einer zum Untersuchungszeitpunkt tatsächlich existenten Infektion mit dem jeweiligen Circovirus (PCV 1 und/oder PCV 2) ausgegangen werden. Das als apathogen geltende porzine Circovirus 1 (Segales et al., 2004), über dessen Verbreitung beim Wildschwein wenig bekannt ist, wurde in die Untersuchung mitaufgenommen. Nach Sequenzierung des kompletten PCV 2-Genoms einer ausgewählten Probe konnte dieses mit vorhandenen Sequenzen von PCV 2 beim Hausschwein verglichen werden.

Der Sequenzabschnitt zwischen nt 844 und nt 1585, der als hochvariabel eingestuft wird (Mahe et al., 2000; Lekcharoensuk et al., 2004), wurde ausgewählt, um mit den Proben verschiedener Regionen eine vergleichende Sequenzierung durchzuführen. Ziel dieser Untersuchung war, die Variabilität der Wildschwein-Isolate relativ zueinander und zu den bekannten Sequenzen beim Hausschwein zu erfassen.

5.1 Prävalenzen porziner Circoviren beim Wildschwein

Bislang liegen nur marginale Befunde über das Vorkommen von PCV beim Wildschwein vor; lediglich ein Fallbericht zu PMWS beschäftigt sich mit Wildschweinen und Circoviren in Deutschland (Schulze et al., 2003). Die aktuelle Studie präsentiert die ersten Daten zur PCV-Infektionsprävalenz bei Wildschweinen in deutschen Revieren. Neben den Studien aus Spanien (Segales et al., 2002c) und Belgien (Sanchez et al., 2001a) handelt es sich um die drittgrößte Studie über PCV bei Wildschweinen weltweit. Die Untersuchungen aus Spanien und Belgien wurden als serologische Untersuchungen durchgeführt.

In den Untersuchungen konnte aufgezeigt werden, dass von den 238 untersuchten Wildschweinen 21,9 % mit PCV 1 und 18,1 % mit PCV 2 infiziert waren. Nur 4,6 % wiesen das Genom beider Circoviren auf. Der überwiegende Anteil (61,8 %) der Tiere war zum Zeitpunkt der Untersuchung nicht mit porzinem Circovirus infiziert. Verglichen mit in der Fachliteratur veröffentlichten Daten konnten deutlich niedrigere Prävalenzen ermittelt werden. So zeigten vergleichbare Studien von Vicente et al. (2004) und Exel et al. (2004), die ebenfalls mit molekularen Nachweisverfahren arbeiteten, für spanische und österreichische Wildschweinepopulationen PCV 2-Prävalenzen von 47 %, Studien auf serologischer Basis konnten Prävalenzen um 35 % aufzeigen. Weitere Daten zur Prävalenz von Circoviren beim Wildschwein sind in der Literatur bislang nicht veröffentlicht.

Vergleichende Untersuchungen an älteren Hausschweinen wiesen Seroprävalenzen von bis zu 100 % auf (Harding et al., 1999; Hassing et al., 2001; Sanchez et al., 2001b). Neuere Untersuchungen, die mittels PCR spezifisch zwischen PCV 1 und PCV 2 differenzieren und über den Genomnachweis eine aktuelle Infektion nachweisen, ergaben Prävalenzen von 5 % (PCV 1) bzw. 26,5-40 % (PCV 2) bei Hausschweinen in Spanien und Deutschland (Mankertz et al., 2000a; Ritzmann et al., 2002). Im Rahmen einer Studie aus Österreich, die sich u.a. mit dem Auftreten von PCV 1 und PCV 2 beim Wildschwein befasste, konnte - bezogen auf PCV 1 - eine Prävalenz von 10,7 % ermittelt werden (Exel et al., 2004). In der vorliegenden Arbeit lagen die Untersuchungsergebnisse mit 21,9 % für PCV 1 höher, während die Prävalenz von PCV 2 mit 18,1 %

im Vergleich zu 46,4 % positiven Tieren der österreichischen Gruppe deutlich niedriger war.

Bei näherer Betrachtung der Resultate in den einzelnen Revieren waren für PCV 1 Schwankungen von 25-50 % und für PCV 2 von 0 bis 27 % zu erkennen; in 60 % der Reviere lagen die PCV 2-Prävalenzen bei 0-15 %. Auffallend abweichend davon ist das Resultat der Untersuchung der Gatterpopulation zusehen, in der sehr niedrige Prävalenzen: PCV 1: 0 % und PCV 2: 5,1 % auftraten. Auf Grund der Populationsstruktur und der Haltungsbedingungen war zu erwarten, dass es hier bei begrenztem Platzangebot über Kontakt der Einzeltiere zu einer stärkeren Anreicherung der porcinen Circoviren im Vergleich zu den unter natürlichen Bedingungen lebenden Wildschweinen kommt (Vicente et al., 2004).

Bei den drei nordwestlich gelegenen Wildschweinepopulationen (Gatter ausgenommen) konnten PCV 1-Prävalenzen von durchschnittlich 18,2 % aufgezeigt werden, sie unterschieden sich damit deutlich von den weiter südlich gelegenen Regionen mit 31-36 %. Die Ursache dieser geographischen Verteilung bleibt unklar. So gilt z.B. zu klären, wie sich das Vorkommen von PCV 1 flächendeckend auf die den Odenwald umgebenden Gebiete bzw. ganz Deutschland darstellt und ob eventuell natürliche Barrieren wie z.B. Flüsse eine Rolle bei der Verbreitung spielen.

In statistischen Untersuchungen konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen PCV-Nachweis und Lebensalter sowie Körpergewicht dargestellt werden: danach scheint eine erhöhte Empfindlichkeit jüngerer Tiere gegenüber einer PCV-Infektion vorzuliegen. Mit Berücksichtigung des Körpergewichtes ließ sich eine Korrelation zwischen Gewicht und Alter aufzeigen, ein Zusammenhang zwischen PCV-Infektion und der altersgemäßen Gewichtsentwicklung konnte dagegen nicht festgestellt werden. Eine pathologisch-anatomische und -histologische Untersuchung der Tiere war leider nicht möglich; damit liegen keine detaillierten Informationen zum PMWS-Status bzw. zu weiteren assoziierten Krankheitsbildern vor.

5.2 Vergleichende Sequenzierung

Für die Sequenzierung galt es zu bedenken, dass konservierte Regionen nur eine geringe Unterscheidung von Isolaten erlauben. Andererseits kann eine zu hohe genetische Variabilität die Konfidenz der phylogenetischen Analyse durch einen hohen Anteil an zufällig identischen Mutationen oder Remutationen verschlechtern. Für genetische Untersuchungen auf verschiedenen Ebenen (Klasse, Familie, Gattung und Spezies bzw. intraspezifische Untersuchung) finden daher Genomregionen unterschiedlicher genetischer Variabilität Verwendung (Nei, 1996). Da in der vorliegenden Arbeit eine intraspezifische Untersuchung vorgenommen wurde und es sich beim porzinen Circovirus 2 zudem um ein homologes Virus (Hamel et al., 1998; Meehan et al., 1998; Morozov et al., 1998) handelt, wurde eine hoch variable Region innerhalb des ORF 2 ausgesucht.

Von einem Wildschwein wurde ein analysiertes Isolat sequenziert und unter anderem die Nukleotide des ORF 2 translatiert; dies zeigte eine Länge des Genoms von 1767 Nukleotiden und des CAP-Proteins von 234 Aminosäuren, im Gegensatz dazu wies das von Fenaux und Mitarbeitern (2000) untersuchte Isolat ein Genom von 1768 nt und ein Capsid von 233 aa auf. Die Deletion eines der drei Adenine an der Position 1040-1042 konnte dafür verantwortlich gemacht werden (siehe Abbildung 24): dies hat zur Konsequenz, dass das Stop-Codon zum 5'-Ende verschoben und das CAP-Protein um eine Aminosäure verlängert wird. Diese Veränderung konnte bei 14 der 16 untersuchten Proben aufgezeigt werden, bei den beim Hausschwein bekannten Isolaten war diese Veränderung bei einem chinesischen Isolat (AY1811947) zu sehen. Die Mehrzahl der in der Datenbank veröffentlichten Isolate vom Hausschwein sowie nur zwei (#14 und #75) der untersuchten Wildschweinproben wiesen diese Veränderung des Capsidproteins nicht auf.

In die Sequenzierung einbezogen wurde ein 742 Nukleotide langes Fragment am N-Terminus des ORF 2, das eine hohe Variabilität der Wildschweinisolat zeigt: ein Vergleich ergab, dass selbst in identischen Jagdrevieren die Homologie nur bei 95 % in den Nukleotiden und bei 93,7 % in den Aminosäuren lag. Auf der anderen Seite ist hervorzuheben, dass 50 % (acht der sechzehn Proben) der untersuchten Isolate eine zu 100 % homologe Sequenz in dem Teilstück aufwiesen; das schließt einen

Zufallsbefund aus. Ein weiteres Drittel (31 %) wich von den als Consensus bezeichneten acht Proben in 0,13 - 1,1 % (nt) bzw. 0,7 - 5,0 % (aa) ab. Innerhalb dieser Gruppe konnte mittels statistischer Analyse eine Korrelation ($r=0,871$; $p=0,000$) zwischen Substitution und geographischer Lage aufgezeigt werden (Abbildung 36). Bei den Proben #44 und #75 konnte in Bezug auf den Consensus mit einer Abweichung von 4,0 % bzw. 4,7 % der Nukleotide und in 7,0 % bzw. 10,5 % der Aminosäuren eine höhere Abweichung gezeigt werden. Diese hier gefundene Variation ist deutlich ausgeprägter als die von Fenaux und Mitarbeitern beschriebene (Fenaux *et al.*, 2000).

Der Vergleich der gesamten Sequenz der Probe #214 mit den Sequenzen der Datenbank ergibt Homologien zwischen 95 % (GER1) und 98 % (China-SD). Stellt man den ORF1 der Probe #214 und die ORF1-Protein-Sequenzen gegenüber, können relativ hohe Homologien von bis zu 98 % festgestellt werden. Bei den vom ORF2 kodierten Proteinsequenzen des Capsidproteins reichen diese lediglich bis zu 93 %.

Fenaux *et al.* (2004b) konnten Mutationen an den Positionen 110 und 191 von Prolin zu Arginin (P→A) bzw. von Arginin zu Serin (R→S) für eine Virulenzreduktion verantwortlich machen. Diese lagen in der vorliegenden Untersuchung bei keiner der untersuchten Proben vor: an beiden Positionen wies das Capsidprotein mit Isoleucin bzw. Valin eine andere Aminosäure auf. Auch die aus der Datenbank für die Dendrogramme hinzugezogenen Isolate von Hausschweinen unterschiedlicher Herkunft waren mit den Wildschweinproben in dieser Hinsicht homolog. Diese Region könnte für die Immunogenität des PCV 2-Capsids eine Rolle spielen. Die Ergebnisse von Sequenzuntersuchungen könnten ein Hinweis darauf sein, dass die Aminosäuren 117-131 und 169-183 des Capsidproteins möglicherweise Epitope darstellen (Kim and Lyoo, 2002), um welche Art Epitope es sich dabei handelt, wurde nicht erarbeitet. Andere Arbeitsgruppen vermuten Epitope u. a. an den Positionen 165-200 und 229-233 (Lekcharoensuk *et al.*, 2004) bzw. 157-183 (Mahe *et al.*, 2000). In der vorliegenden Studie konnten auch bei PCV 2-Isolaten von Wildschweinen in diesen Regionen Variationen aufgezeigt werden. Der Vergleich mit verwandten Viren lässt Vermutungen zu, dass hier v. a. basische Aminosäuren vorkommen, die an der Formation der inneren Oberfläche des Virions beteiligt sind (Hamel *et al.*, 1998; Meehan *et al.*, 1998; Morozov *et al.*, 1998).

Erstaunlich ist, dass die Mehrzahl der Proben chinesischen Isolaten stärker ähnelten als europäischen bzw. deutschen Isolaten. Vergleichend hierzu konnte in der

Untersuchung von Exel und Mitarbeitern (2004) die größte Homologie der von Wildschweinen aus Österreich untersuchten Proben mit österreichischen Isolaten von Hausschweinen aufgezeigt werden. Die bei den österreichischen Wildschweinen gefundenen Isolate wiesen auch untereinander eine ausgeprägte Homologie auf (99,5 %). In der vorliegenden Untersuchung hingegen konnten drei Grundtypen aufgezeigt werden. Offen bleibt jedoch, ob sich diese drei Typen (Consensus, #44 und #75) bei Wildschweinen entwickelt und verbreitet haben oder ob sie von außerhalb eingeführt wurden. Die beschriebenen Isolate könnten neue antigenetisch verschiedene Varianten mit Relevanz für die Infektionsproblematik darstellen; schließlich sind auch antigenrelevante Bereiche des Capsids von der Variabilität betroffen.

Als Startpunkt der Replikation konnte sowohl bei PCV 2 und als auch bei PCV 1 ein so genannter „stem-loop“ identifiziert werden (Meehan et al., 1997; Mankertz et al., 2004). Diesem schließen sich in Richtung des Kodons der Leserahmen ORF 1 und in Richtung des Antikodons der Leserahmen ORF 2 an. Ein entscheidender Unterschied zwischen PCV 1 und PCV 2 scheint in der Sequenz des loops zu bestehen (Abbildung 1). Hier ist bei beiden ein identisches Octanukleotid zu erkennen, der gesamte loop besteht allerdings aus 12 (PCV 1) bzw. 10 (PCV 2) Nukleotiden. Experimentell konnte bewiesen werden, dass das Octanukleotid für die Replikation essentiell ist (Mankertz et al., 1997). Es kann anhand der Kompletsequenz eines der Wildschwein-Isolate bestätigt werden, dass die intergenetische Region zu 100 % homolog zu der von Hausschwein-PCV 2-Isolaten ist.

5.3 Interaktion zwischen Wild- und Hausschwein

Ein Wildtier, das in einem Testverfahren positiv reagiert, kann Kontakt mit dem Erreger gehabt haben oder von einem antigenetisch verwandten Agens, das sich innerhalb der Wildpopulation getrennt von den Nutztierstämmen entwickelt hat, infiziert worden sein (Baradel et al., 1988). Prinzipiell ist bei derartigen Untersuchungen auch die Untersuchungsmethode zu betrachten. Im Fall von qualitativen Untersuchungen des Antikörpertiters beim Wildschwein ist aktuell nicht zu differenzieren, wie lange der Kontakt des Tieres zurück liegt, ob eine akute Infektion vorliegt oder ob der Erreger noch im Tier vorhanden ist. Perakute Infektionen werden mit dieser Untersuchungstechnik nicht erfasst, da noch keine Antikörperbildung stattgefunden hat. Mit dem Nachweis des viralen Genoms mittels PCR wird hingegen die Anwesenheit des Erregers direkt nachgewiesen.

Bei meist in geschlossenen Stallungen gehalten Hausschweine ist ein direkter Kontakt mit Wildschweinen auf der Weide nicht in Betracht zu ziehen, sondern auf Grund der hohen Tenazität des Virus eher die Möglichkeit der Verbreitung über Vektoren (Allan et al., 1994).

Wildschweine gelten als Reservoir für eine Reihe von Schweinekrankheiten, z.B. für Europäische Schweinepest, Aujeszky'sche Krankheit oder Brucellose (Heinritzi et al., 1999; Teifke et al., 2001; Ritzmann et al., 2002). Das Verhalten erfahrener Bachen und Keiler, insbesondere als Folge fehlerhafter Bejagungsstrategien, Gebiete von mehreren hundert Hektar zu durchstreifen, kann entscheidend zur Ausbreitung von Erregern beitragen (Heinritzi et al., 1999). Auf Grund der vorliegenden Untersuchung müssen Wildschweine auch als Reservoir und Überträger von Circoviren auf Hausschweinepopulationen angesehen werden. Für eine detaillierte Evaluierung der Interaktion porciner Circoviren zwischen Haus- und Wildschweinen bedarf es allerdings vergleichender molekularer Untersuchungen von Virusisolaten aus beiden Populationen.

6. Zusammenfassung

PMWS, weltweit die wirtschaftlich bedeutendste Erkrankung in der Schweineproduktion, wird mit PCV 2 assoziiert. Weitere Erkrankungen wie Reproduktionsstörungen und der „porcine respiratory disease Complex (PRDC)“ werden mit dem Virus assoziiert und das Virus gilt als ein Faktor für das „Porzine Dermatitis und Nephropathie Syndrom“ (PDNS). Porzine Circoviren vom Typ I, die als Zellkulturkontaminante entdeckt wurden, gelten als nicht pathogen. Der Erreger beider Typen ist in den Hausschweinepopulationen weit verbreitet, kommen aber auch beim Wildschwein vor. Nur vereinzelt vorliegende Daten über das Vorkommen von PCV 2 beim Wildschwein deuten eine potentielle Rolle von Wildschweinen als Multiplikator und Reservoir für den Erreger an. Ziel dieser Arbeit ist, die Verteilung porziner Circoviren bei Wildschweinen ausgewählter deutscher Reviere zu untersuchen und die Variabilität verschiedener von Wildschweinen stammender Isolate zu vergleichen.

Die Milzproben von 238 Wildschweinen aus vier Regionen (Westerwald, Hunsrück, Rheingau und Odenwald) wurden auf PCV 1- und PCV 2-spezifische Nukleinsäuren mittels PCR untersucht. In Hinblick auf das Alter und die körperliche Entwicklung der Wildschweine wurden die Befunde verglichen. Eine Probe (#214) wurde komplett sequenziert. Ein 742 Nukleotide umfassendes variables Fragment des PCV 2-Genoms wurde anhand von 16 Wildschwein-Isolaten vergleichend untersucht.

Bei 61,8 % der untersuchten Tiere konnte weder PCV 1, noch PCV 2 nachgewiesen werden, 21,9 % waren positiv für PCV 1 und 18,1 % für PCV 2. Hinsichtlich der Prävalenzen konnten signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Revieren und Regionen aufgezeigt werden. Im Vergleich zu bisher publizierten Ergebnissen waren in den untersuchten Regionen Porzine Circoviren vom Typ II stärker und solche vom Typ I weniger stark verbreitet. Statistische Untersuchungen zeigten, dass jüngere Tiere signifikant häufiger betroffen waren als ältere, bezogen auf die körperliche Entwicklung der Tiere konnte jedoch kein Zusammenhang mit der Infektion festgestellt werden.

Bei der vergleichenden Untersuchung des variablen Fragmentes konnten drei Varianten aufgezeigt werden. Eine Variante konnte bei 14 der 16 Proben identifiziert werden, beim Vergleich mit in der Datenbank veröffentlichten Sequenzen von Hausschwein-Isolaten zeigte diese die größte Übereinstimmung mit einem chinesisches Isolat. In der

Basensequenz zeigte sich eine Verschiebung des STOP-Codons in Richtung des 5'-Endes durch eine Deletion um ein Nukleotid. Diese hatte eine Verlängerung des Capsidproteins um eine Aminosäure zur Folge. Die anderen beiden Varianten wichen in bis zu 4,7 % der Nukleotide und in bis zu 10,5 % der Aminosäuren von den übrigen Proben ab. Im Vergleich der Nukleotide konnten diese Varianten in Clustern mit europäischen, vornehmlich deutschen und französischen Isolaten, gruppiert werden.

Ungeklärt bleibt die Frage, woher diese Isolate stammen, ob sie sich bei Wildschweinen entwickelt haben oder eingeführt wurden und in welcher Beziehung sie zur Entstehung von PMWS stehen.

7. Summary

Porcine circovirus type II is considered the major agent in the developing of the postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) and its economical factor is concerning in swine production worldwide. It is involved in further diseases like in the “porcine dermatitis and nephropathy syndrome” (PDNS) and in reproductive and respiratory disorders. Porcine circovirus type I is considered nonpathogenic. Circoviruses are wide spread in domestic pigs and also occur in feral pigs. Only several data is known about the occurrence of porcine Circovirus in feral pigs indicating a potential role of feral pigs as reservoir and multiplier of the agent. So far there has been no characterisation of the PCV found in feral pigs. Both questions have been topic of the present investigation.

Spleen samples of 238 feral pigs from four regions (Westerwald, Hunsrück, Rheingau und Odenwald) in Germany have been screened for PCV 1 and PCV 2 DNA by PCR. Results were related to age and body condition of the pigs. Spleen samples of 16 animals of four regions were used for the analysis of the viral genome. In one sample the sequence of the whole genome was determined. In the further 16 samples a highly variable 742 nucleotide long fragment was sequenced.

In 61,8 % of the investigated pigs no PCV-specific DNA could be detected, 21,9 % were positive for PCV 1 and 18,1 % for PCV 2. The results differed significantly between the prevalences in grounds and regions. Compared to results from other studies prevalences for PCV 1 were higher and lower for PCV 2 in the present study. Younger animals were affected significantly more than older, but no influence on the body condition of the animals could be proven. Comparative sequence analysis lead to three strains. One of them was represented by 14 of the 16 samples, it was closest related to Chinese but not to European strains. Genomic sequence analysis indicated a deletion of one nucleotide at the end of the ORF2 which lead to a shift of the open reading frame and the addition of one codon, so that the capsid-protein extended to 234 amino acids. The two other strains varied in up to 4,7 % of nucleotides and in up to 10,5 % of amino acids. They grouped into clusters of European origin.

It remains unclear, if the three strains have evolved in the wild pigs from one common ancestor, or if they have been introduced from external, maybe domestic sources, and whether these strains can be associated with PMWS in a different matter or not.

8. Literaturverzeichnis

- Albina, E., A. Mesplede, G. Chenut, M.F. Le Potier, G. Bourbao, S. Le Gal, and Y. Leforban. 2000. A serological survey on classical swine fever (CSF), Aujeszky's disease (AD) and porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus infections in French wild boars from 1991 to 1998. *Veterinary Microbiology*. 77:43-57.
- Allan, G., and J. Ellis. 2000d. Porcine circoviruses. A review. *J. Vet. Diagn. Invest.* 12:3-14.
- Allan, G., F. McNeilly, B. Meehan, I. McNair, J. Ellis, S. Krakowka, C. Fossum, E. Watrang, P. Wallgren, and B. Adair. 2003. Reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs experimentally inoculated with a Swedish porcine circovirus 2 isolate. *J Vet Diagn Invest.* 15:553-560.
- Allan, G.M., S. Kennedy, F. McNeilly, J.C. Foster, J.A. Ellis, S. Krakowka, B.M. Meehan, and B. Adair. 1999. Experimental reproduction of severe wasting disease by co-infection of pigs with porcine circovirus and porcine parvovirus. *J Comp Pathol.* 121:1-11.
- Allan, G.M., F. Mc Neilly, S. Kennedy, B. Daft, E.G. Clarke, J.A. Ellis, D.M. Haines, B.M. Meehan, and B.M. Adair. 1998. Isolation of porcine circovirus-like viruses from pigs with a wasting disease in the USA and Europe. *J. Vet. Diagn. Invest.* 10:3-10.
- Allan, G.M., E. McNeilly, S. Kennedy, B. Meehan, D. Moffett, F. Malone, J. Ellis, and S. Krakowka. 2000c. PCV-2-associated PDNS in Northern Ireland in 1990. Porcine dermatitis and nephropathy syndrome. *Vet Rec.* 146:711-712.
- Allan, G.M., F. McNeilly, J. Ellis, S. Krakowka, A. Botner, K. McCullough, H. Nauwyck, S. Kennedy, B.M. Meehan, and C. Charreyre. 2004. PMWS: experimental model and co-infections. *Vet. Microbiol.* 98(2):165-168.
- Allan, G.M., F. McNeilly, S. Kennedy, B. Meehan, J. Ellis, and S. Krakowka. 2000b. Immunostimulation, PCV 2 and PMWS. *Vet. Rec.* 147:170-171.
- Allan, G.M., F.M. Neilly, J.P. Cassidy, G.A. Reilly, B. Adair, W.A. Ellis, and M.S. Mc Nulty. 1995. Pathogenesis of porcine circovirus; experimental infections of colostrum deprived piglets and examination of pig foetal material. *Vet. Microbiol.* 44:49-64.
- Allan, G.M., K.V. Phenix, D. Todd, and M.S. MC Nulty. 1994. Some biological and physico-chemical properties of porcine circovirus. *Zentralbl. Veterinärmed. A* 41:17-26.
- Balasz, M., J. Segales, C. Rosell, M. Domoingo, A. Mankertz, A. Urniza, and J. Planaduran. 1999. Experimental inoculation of conventional pigs with tissue homogenates from pigs with post-weaning multisystemic wasting syndrome. *J. Comp. Pathol.* 121:139-148.

- Baradel, J.M., J. Barrat, J. Blanchou, J.M. Boutin, C. Chastel, G. Dannacher, D. Delmore, Y. Gerard, J.M. Gourreau, V. Kihm, B. Larenaudie, C. Legoff, P.P. Pastoret, P. Perreau, A. Schwers, E. Thiry, D. Trap, G. Uilenberg, and P. Vannier. 1988. Results of a serological survey of wild mammals in France. *Revue Scientifique et Technique*. 7:873-883.
- Bassami, M.R., D. Berryman, G.E. Wilcox, and S.R. Raidal. 1998. Psittacine beak and feather disease virus nucleotide sequence analysis and its relationship to porcine circovirus, plant circoviruses, and chicken anaemia virus. *Virology*. 249:453-459.
- Baudouard, M.A., Buffereau J.P., R. Vinet, P. Adam, P. Lamanda, L. Mieli, P. Blanchard, C. De Boisseson, D. Mahe, and A. Jestin. 2001. PCV2, PPV and PRRSV detection in lungs of aborted fetuses. *In: Int. Conf. ssDNA Viruses of Plants, Birds and Primates, Saint - Malo 2001, Proc.,:123.*
- Blanchard, P., D. Mahe, R. Cariolet, A. Keranflec'h, M.A. Baudouard, P. Cordioli, E. Albina, and A. Jestin. 2003b. Protection of swine against post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) by porcine circovirus type 2 (PCV2) proteins. *Vaccine*. 21:4565-4575.
- Blanchard, P., D. Mahe, R. Cariolet, C. Truong, M. Le Dimna, C. Arnauld, N. Rose, E. Eveno, E. Albina, F. Madec, and A. Jestin. 2003a. An ORF2 protein-based ELISA for porcine circovirus type 2 antibodies in post-weaning multisystemic wasting syndrome. *Vet Microbiol*. 94:183-194.
- Blanchard, P., D. Mahe, R. Cariolet, C. Truong, M. LeDimna, C. De Boisseson, N. Rose, E. Eveno, F. Madec, and A. Jestin. 2001. Detection of porcine circovirus type 2 (PCV2) specific antibodies in post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) studies. *In: Int. Conf. ssDNA Viruses of Plants, Birds and Primates, Saint - Malo 2001, Proc.,:104.*
- Boevink, P., P.W. Chu, and P. Keese. 1995. Sequence of subterranean clover stunt virus DNA: affinities with the geminiviruses. *Virology*. 207:354-361.
- Buffereau, J.P., M.A. Baudouard, R. Vinet, F. Adam, N. Amena, H. Morvan, P. Blanchard, C. Truong, D. Mahe, and A. Jestin. 2001. PCV1 and PCV2 detection by PCR and in situ hybridisation in the diagnostic laboratory. *In: Int. Conf. ssDNA Viruses of Plants, Birds and Primates, Saint - Malo 2001, Proc.,:107.*
- Buhk, H.J., I. Tischer u. M. A. Koch. 1985. Cloning and sequencing of the porcine circovirus PCV genome. *Zentralbl. Bakteriolog. Org. A* 260:465 - 472.
- Cariolet, R., P. Blanchard, M. Le Dimina, D. Mahe, J. P. Jolly, C. De Boisseson, C. Truong, P. Ecobichon, F. Madec u. A. Jestin. 2001a. Experimental infection of pregnant SPF sows with PCV2 through tracheal and muscular routes. *In: Int. Conf. ssDNA Viruses of Plants, Birds and Primates, Saint - Malo 2001, Proc.,:128.*
- Cariolet, R., P. Blanchard, M. Le Dimna, D. Mahe, A. Keranflec'h, P. Julou, B. Beaurepaire, C. De Boisseson, C. Truong u. A. Jestin. 2001b. Consequences of PCV2 experimental infection of non immune SPF sows using the intrauterine route. *In: Int. Conf. ssDNA Viruses of Plants, Birds and Primates, Saint - Malo 2001, Proc.,:129.*

- Celer Jr., V., and P. Carasova. 2001. Evidence of porcine circovirus type 2 infection of pigs in the Czech Republic. *In: Int. Conf. ssDNA Viruses of Plants, Birds and Primates, Saint - Malo 2001, Proc.:*125.
- Charreyere, C., S. Bésème, A. Brun, M. Bublot, B. Lapostolle, P. Sierra, and A. Vaganay. 2006a. Virological protection of piglets against a pcv2 experimental challenge by vaccinating piglets with an inactivated adjuvanted pcv2 vaccine. *Proceedings of 19th IPVS congress, Copenhagen, Denmark:*30.
- Charreyre, C., S. Bésème, A. Brun, B. Lapostolle, P. Sierra, and A. Vaganay. 2006. Post-Weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) protection of pigs born to sows vaccinated with an inactivated pcv2 vaccine under field conditions. *Proceedings of 19th IPVS congress, Copenhagen, Denmark:*27.
- Cheung, A.K. 2003a. Comparative analysis of the transcriptional patterns of pathogenic and nonpathogenic porcine circoviruses. *Virology.* 310:41-49.
- Cheung, A.K. 2003b. Transcriptional analysis of porcine circovirus type 2. *Virology.* 305:168-180.
- Cheung, A.K. 2003c. The essential and nonessential transcription units for viral protein synthesis and DNA replication of porcine circovirus type 2. *Virology.* 313:452-459.
- Cheung, A.K. 2004a. Detection of template strand-switching during initiation and termination of DNA replication of porcine circovirus. *J Virol.* 78:4268-4277.
- Cheung, A.K. 2004b. Identification of an octanucleotide motif sequence essential for viral protein, DNA, and progeny virus biosynthesis at the origin of DNA replication of porcine circovirus type 2. *Virology.* 324:28-36.
- Cheung, A.K., and S.R. Bolin. 2002. Kinetics of porcine circovirus type 2 replication. *Arch Virol.* 147:43-58.
- Chianini, F., N. Majo, J. Segales, J. Dominguez, and M. Domingo. 2003. Immunohistochemical characterisation of PCV2 associate lesions in lymphoid and non-lymphoid tissues of pigs with natural postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Vet Immunol Immunopathol.* 94:63-75.
- Choi, C., and C. Chae. 1999. In-situ hybridization for the detection of porcine circoviruses with postweaning multisystemic wasting syndrome. *J. comp. Pathol.* 121:263-270.
- Choi, J., G.W. Stevenson, M. Kiupel, B. Harrach, L. Anothayanontha, C.L. Kanitz, and S.K. Mittal. 2002. Sequence analysis of old and new strains of porcine circovirus associated with congenital tremors in pigs and their comparison with strains involved with postweaning multisystemic wasting syndrome. *Can J Vet Res.* 66:217-224.
- Clark, E. 1997. Post - weaning multisystemic wasting syndrome. *28th Ann. Meet. Am. Assoc. Swine Pract., Quebec City 1997:*499 -501.
- Clark, E., and J.C. Harding. 1998. Porcine circovirus and post-weaning multisystemic wasting syndrome. *29th Ann. Meet. Am. Assoc. Swine Pract., Boston 1998, Proc.:*445-446.

- Cotrell, T.S., R.M. Friendship, and C.E. Dewey. 1999. Epidemiology of postweaning multisystemic wasting syndrome in Ontario. *In: 30th Ann. Meet. Am. Assoc. Swine Pract., St. Paul 1999, Proc.:*389-390.
- Daft, B., R.W. Nordhausen, K.S. Latimer, and F.D. Niagro. 1996. Interstitial pneumonia and lymphadenopathy associated with circoviral infection in a sixweek-old pig. *39th Ann. Meet. Am. Assoc. Vet. Lab. Diag., Little Rock 1996, Proc.:*32-39.
- Darwich, L., S. Pie, A. Rovira, J. Segales, M. Domingo, I.P. Oswald, and E. Mateu. 2003. Cytokine mRNA expression profiles in lymphoid tissues of pigs naturally affected by postweaning multisystemic wasting syndrome. *J Gen Virol.* 84:2117-2125.
- Darwich, L., J. Segales, M. Domingo, and E. Mateu. 2002. Changes in CD4+, CD8+, CD4+/CD8+ and immunoglobulin M-positive mononuclear cells of postweaning multisystemic wasting syndrome-affected pigs and age-matched uninfected wasted and healthy pigs correlate with lesions and porcine circovirus type 2 load in lymphoid tissues. *Clin Diag Lab Immunol.* 9:236-242.
- Darwich, L., J. Segales, and E. Mateu. 2004. Pathogenesis of postweaning multisystemic wasting syndrome caused by Porcine circovirus 2: an immune riddle. *Arch Virol.* 149:857-874.
- Del Pozo, M. 1999. Klinische Symptomatologie des PMWS. *Circovirus und porcine Circovirose, Vortragszusammenfassung einer Tagung der Veterinärmedizinischen Fakultät der Autonomen Universität Barcelona 1999, dt. Übersetzung von Dr. H. Kästner, Interessengemeinschaft Tierärztl. Bestandsbetreuung - Schwein im BPT:*6 – 8.
- Domingo, M., and J. Segales. 1999. Geschichte und aktuelle Probleme des porcinen Circovirus - Ätiologie, Klinik, Diagnose. *Vortragsveranstaltung Schwein: Themenkreis porcines Circovirus und Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome. BPT-Kongress, Nürnberg 1999:*117-121.
- Dulac, G.C., u. A. Afshar. 1989. Porcine circovirus antigens in PK-15 cell line (ATCC CCL-33) and evidence of antibodies to circovirus in Canadian pigs. *Can. J. Vet. Res.* 53:431-433.
- Duran, M., F. Ramos-Vrvar, and D. Render. 1997. Porcine dermatitis nephropathy syndrome: a new condition to include into the differential diagnosis list for skin discoloration in swine. *Swine Health Prod.* 5:241-245.
- Edwards, S., u. J. J. Sands. 1994. Evidence of circovirus infection in British pigs. *Vet. Rec.* 134:680-681.
- Ellis, J., A. Bratanich, E.G. Clark, G. Allan, B. Meehan, D.M. Haines, J. Harding, K.H. West, S. Krakowka, C. Konoby, K. Hassard, K. Martin, and F. Mc Neilly. 2000. Coinfection by porcine circoviruses and porcine parvovirus in pigs with naturally acquired postweaning multisystemic wasting syndrome. *J. Vet. Diagn. Invest.* 12:21-27.
- Ellis, J., S. Krakowka, M. Lairmore, D. Haines, A. Bratanich, E. Clark, G. Allan, C. Konoby, L. Hassard, B. Meehan, K. Martin, J. Harding, S. Kennedy, and F. Mc Neilly. 1999. Reproduction of lesions of postweaning multisystemic wasting syndrome in gnotobiotic piglets. *J. Vet. Diagn. Invest.* 11:3-14.

- Ellis, J., M. Spinato, C. Yong, K. West, F. McNeilly, B. Meehan, S. Kennedy, E. Clark, S. Krakowka, and G. Allan. 2003. Porcine circovirus 2-associated disease in Eurasian wild boar. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 15(4):364-368.
- Exel, B., Steineck, W. Sipos, M. Schuh, and M. Schmoll. 2004. Evidence of porcine circovirus type 1, type 2 and porcine parvovirus in wild boars in Austria. *Proceedings of the 18th IPVS Congress, Hamburg, Germany 2004*. 1:106.
- Fenaux, M., P. Halbur, M. Gill, T.E. Toth, and X.-J. Meng. 2000. Genetic characterization of Type 2 Porcine Circovirus (PCV-2) from Pigs with Multisystemic Wasting Syndrome in Different Geographic Regions of North America and Development of a Differential PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Assay To Detect and Differentiate between Infections with PCV-1 and PCV-2. *J clin. Microbiol.* 38:2494-2503.
- Fenaux, M., P.G. Halbur, G. Haqshenas, R. Royer, P. Thomas, P. Nawagitgul, M. Gill, T.E. Toth, and X.J. Meng. 2002. Cloned genomic DNA of type 2 porcine circovirus is infectious when injected directly into the liver and lymph nodes of pigs: characterization of clinical disease, virus distribution, and pathologic lesions. *J Virol.* 76:541-551.
- Fenaux, M., T. Opriessnig, P.G. Halbur, F. Elvinger, and X.J. Meng. 2004a. A Chimeric Porcine Circovirus (PCV) with the Immunogenic Capsid Gene of the Pathogenic PCV Type 2 (PCV2) Cloned into the Genomic Backbone of the Nonpathogenic PCV1 Induces Protective Immunity against PCV2 Infection in Pigs. *J Virol.* 78:6297-6303.
- Fenaux, M., T. Opriessnig, P.G. Halbur, F. Elvinger, and X.J. Meng. 2004b. Two amino acid mutations in the capsid protein of type 2 porcine circovirus (PCV2) enhanced PCV2 replication in vitro and attenuated the virus in vivo. *J Virol.* 78:13440-13446.
- Fenaux, M., T. Opriessnig, P.G. Halbur, and X.J. Meng. 2003. Immunogenicity and pathogenicity of chimeric infectious DNA clones of pathogenic porcine circovirus type 2 (PCV2) and nonpathogenic PCV1 in weanling pigs. *J Virol.* 77:11232-11243.
- Garcia-Briones, M.M., Russell, G. C., Oliver, R. A., Tami, C., Taboga, O., Carrillo, E., Palma, E. L., Sobrino, F. u. Glass, E. J. 2000. Association of bovine DRB3 alleles with immune response to FMDV peptides and protection against viral challenge. *Vaccine.* 19:1167-1171.
- Gibbs, M.J., and G.F. Weiller. 1999. Evidence that a plant virus switched hosts to infect a vertebrate and then recombined with a vertebrate-infecting virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1999. 96:8022-8027.
- Hamel, A.L., L.L. Lin, and G.P. Nayar. 1998. Nucleotide sequence of porcine circovirus associated with postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs. *J. Virol.* 72:5262-5267.
- Handa, A., B. Dickstein, N.S. Young, and K.E. Brown. 2000. Prevalence of the newly described human circovirus, TTV, in United States blood donors. *Transfusion.* 40:245-251.

- Hanley-Bowdoin, L., S.B. Settlage, B.M. Orozco, S. Nagar, and D. Robertson. 2000. Geminiviruses: models for plant DNA replication, transcription and cell cycle replication. *Crit. Rev. Biochem. and Mol. Biol.* 35:105-140.
- Harding, J.C. 1996. Post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS): preliminary epidemiology and clinical presentation. *27th Ann. Meet. West. Can. Assoc. Swine Pract., Saskatoon*:21.
- Harding, J.C., E.G. Clark, and J.A. Ellis. 1999. The clinical expression of porcine circovirus. *Allen D. Lemay Swine Conference, Univ. Minnesota*:252-254.
- Harding, J.C., Clark, E. G., Strokappe, J. H., Willson, P. I. u. Ellis, J. A. 1998. Postweaning multisystemic wasting syndrome: epidemiology and clinical presentation. *Swine Health Prod.* 6:249-254.
- Harding, R.M., T.M. Burns, G. Hafner, R.G. Dietzgen, and J.L. Dale. 1993. Nucleotide sequence of one component of the banana bunchy top virus genome contains a putative replicase gene. *J Gen Virol.* 74 (Pt 3):323-328.
- Harms, P.A., P.G. Halbur, and S. Sorden. 2002. Three cases of porcine respiratory disease complex associated with porcine circo virus type 2 infection. *J. Swine Health Prod.* 10:27-30.
- Hassing, A.-G., A. Botner, A.-S. Ladekjaer-Mikkelsen, P. Baekbo, S.E. Jorsal, and V. Bille-Hansen. 2001. PMWS in Denmark? *In: Int. Conf. ssDNA Viruses of Plants, Birds and Primates, Saint - Malo 2001, Proc.*:93.
- Hattermann, K., C. Roedner, C. Schmitt, T. Finsterbusch, T. Steinfeldt, and A. Mankertz. 2004. Infection studies on human cell lines with porcine circovirus type 1 and porcine circovirus type 2. *Xenotransplantation.* 11:284-294.
- Heinritzi, K., K. Aigner, M. Erber, C. Kersjes, and B. Wangenheim. 1999. Brucellose und Aujeszky-Krankheit in einem Wildschweingatter. Fallbeschreibung. *Tierärztl. Praxis G.* 27:41-46.
- Helie, P., R. Drolet, M.C. Germain, and A. Bourgault. 1995. Systemic necrotizing vasculitis and glomerulonephritis in grower pigs in southwestern Quebec. *Can Vet J.* 36:150-154.
- Hermanson, M., C. Abad-Zapatero, S.S. Abdel-Meguid, S. Pundak, M.G. Rossmann, and J.H. Tremaine. 1982. Amino acid sequence of southern bean mosaic virus coat protein and its relation to three dimensional structure of the virus. *Virology.* 1982:133-149.
- Higgins, R.J. 1993. Glomerulo – nephropathy syndrome. *Pig Veterinary J.* 31:160-163.
- Hinrichs, U., V.F. Ohlinger, S. Pesch, L. Wa Ng, R. Tegeler, F. Delbeck, and M. Wendt. 1999a. Erster Nachweis einer Infektion mit dem porzinen Circovirus Typ 2 in Deutschland. *Tierärztl. Umsch.* 54:255-258.
- Joisel, F., S. Randoux, S. Longo, and A. Schade. 2006. Fieldevaluation of the effects of a pcV2 vaccine (Circovac) in Germany during the exceptional license process. *Proceedings of 19th IPVS congress, Copenhagen, Denmark*:26.

- Kamstrup, S., A.M. Barfoed, T.H. Frimann, A.S. Ladekjaer-Mikkelsen, and A. Botner. 2004. Immunisation against PCV2 structural protein by DNA vaccination of mice. *Vaccine*. 22:1358-1361.
- Kato, A., M. Fujino, T. Nakamura, A. Ishihama, and Y. Otaki. 1995. Gene organization of chicken anemia virus. *Virology*. 209:480-488.
- Katul, L., E. Maiss, S.Y. Morozov, and H.J. Vetten. 1997. Analysis of six DNA components of the faba bean necrotic yellows virus genome and their structural affinity to related plant virus genomes. *Virology*. 233:247-259.
- Kennedy, S., G. Allan, F. Mc Neilly, B.M. Adair, A. Hughes, and P. Spillane. 1998. Porcine circovirus infection in Northern Ireland. *Vet. Rec.* 142:495-496.
- Kennedy, S., D. Moffett, F. McNeilly, B. Meehan, J. Ellis, S. Krakowka, and G.M. Allan. 2000. Reproduction of lesions of postweaning multisystemic wasting syndrome by infection of conventional pigs with porcine circovirus type 2 alone or in combination with porcine parvovirus. *J Comp Pathol*. 122:9-24.
- Kim, J.H., and Y.S. Lyoo. 2002. Genetic characterisation of porcine circovirus-2 field isolates from PMWS pigs. *J. Vet. Sci.* 1:31-39.
- Konnai, S., Takeshima, S. N., Tajima, S., Yin, S. A., Okada, K., Onuma, M. u. Aida, Y. 2003. The influence of ovine MHC class II DRB1 alleles on immune response in bovine leukemia virus infection. *Microbiol Immunol*. 47:223-232.
- Krakowka, S., and J.A. Ellis. 2000. In vivo immunostimulation is the pivotal event in the production of wasting disease of pigs with pcv 2 . *Veterinary Pathology (in press)*.
- Krakowka, S., J.A. Ellis, F. Mc Neilly, S. Ringler, D.M. Rings, and G. Allan. 2001. Activation of the immune system is the pivotal event in the production of wasting disease in pigs infected with porcine circovirus-2 (PCV2). *Vet. Pathol*. 38:31-42.
- Krakowka, S., J.A. Ellis, F. McNeilly, B. Meehan, D.M. Rings, K. McCullough, A. Botner, H. Nauwynck, C. Charreyere, and G. Allan. 2003. The pathogenesis of PCV-2-associated postweaning multisystemic wasting syndrome in swine. *In: Proceedings of the 4th Int. Symp. Emerging and Re-emerging Pig Diseases, Rome 29.6.-2.7.2003*:143-147.
- Krakowka, S., J.A. Ellis, B. Meehan, S. Kennedy, F. McNeilly, and G. Allan. 2000. Viral wasting syndrome of swine: experimental reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome in gnotobiotic swine by coinfection with porcine circovirus 2 and porcine parvovirus. *Vet Pathol*. 37:254-263.
- Krakowka, S., Ellis, J. A., McNeilly, F., Gilpin, D., Meehan, B., McCullough, K. u. Allan, G. 2002. Immunologic features of porcine circovirus type 2 infection. *Viral Immunol*. 15:567-582.
- Krakowka, S., J. A. Ellis, F. Mc Neilly, S. Ringler, D. M. Rings u. G. Allan. 2001. Activation of the immune system is the pivotal event in the production of wasting disease in pigs infected with porcine circovirus-2 (PCV2). *Vet. Pathol*. 38:31-42.
- Larochelle, R., A. Bielanski, P. Muller, and R. Magar. 2000a. PCR detection and evidence of shedding of porcine circovirus type 2 in boar semen. *J Clin Microbiol*. 38:4629-4632.

- Larochelle, R., A. Bielanski, P. Müller, and R. Magar. 2000b. Evidence of shedding of porcine circovirus type 2 (PCV2) in boar semen following experimental infection. *In: 16th Int. Pig Vet. Soc. Congr., Melbourne 2000, Proc.:*580.
- Larochelle, R., R. Magar, and S. D'Allaire. 2002. Genetic characterization and phylogenetic analysis of porcine circovirus type 2 (PCV2) strains from cases presenting various clinical conditions. *Virus Res.* 90:101-112.
- Larochelle, R., R. Magar, and S. D'Allaire. 2003. Comparative serologic and virologic study of commercial swine herds with and without postweaning multisystemic wasting syndrome. *Can J Vet Res.* 67:114-120.
- Larochelle, R., M. Morin, M. Antaya, and R. Magar. 1999. Identification and incidence of porcine circovirus in routine field cases in Quebec as determined by PCR. *Vet. Rec.* 145:140-142.
- Le Cann, P., E. Albina, F. Madec, R. Cariolet, and A. Jestin. 1997. Piglet wasting disease. *Vet. Rec.* 141:660.
- Lekcharoensuk, P., I. Morozov, P. Paul, N. Thangthumnyom, W. Wajjawalku, and X.J. Meng. 2004. Epitope mapping of the major capsid protein of type 2 porcine circovirus (PCV2) by using chimeric PCV1 and PCV2. *J Virol.* 78:8135-8145.
- Liu, Q., L. Wang, P. Wilson, and L.A. Babiuk. 2000. Quantitative, competitive PCR analysis of porcine circovirus DNA in serum from pigs with post weaning multisystemic wasting syndrome. *J Clin Microbiol.* 38:3474-3477.
- Lukert, P., G.F. DeBoer, and J.L. Dale. 1995. The Circoviridae. *In: Murphy, F. A., C. M. Fauquet u. D. H. L. Bishop (Hrsg.) Virus taxonomy. Sixth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Springer Verlag, Wien und New York:*166-168.
- Madec, F., E. Eveno, P. Morvan, L. Hamon, P. Blanchard, R. Cariolet, N. Amenna, H. Morvan, C. Truong, D. Mahé, E. Albina, and A. Jestin. 2000. Post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs in France: clinical observations from follow-up studies on affected farms. *Livest. Prod. Sci.* 63:223-233.
- Magar, R., P. Müller, and R. Larochelle. 2000. Retrospective serological survey of antibodies to porcine circovirus type 1 and type 2. *Can. J. Vet. Res.* 64:184-186.
- Mahe, D., P. Blanchard, C. Truong, C. Arnauld, P. Le Cann, R. Cariolet, F. Madec, E. Albina, and A. Jestin. 2000. Differential recognition of ORF2 protein from type 1 and 2 porcine circoviruses and identification of immunorelevant epitopes. *J Gen Virol.* 81:1815-1824.
- Mankertz, A., R. Caliskan, K. Hattermann, B. Hillenbrand, P. Kurzendoerfer, B. Mueller, C. Schmitt, T. Steinfeldt, and T. Finsterbusch. 2004. Molecular biology of Porcine circovirus: analyses of gene expression and viral replication. *Vet Microbiol.* 98:81-88.
- Mankertz, A., M. Domingo, J.M. Folch, P. LeCann, A. Jestin, J. Segales, B. Chmielewicz, J. Plana-Duran, and D. Soike. 2000a. Characterisation of PCV-2 isolates from Spain, Germany and France. *Virus Res.* 66:65-77.

- Mankertz, A., K. Hattermann, B. Ehlers, and D. Soike. 2000b. Cloning and sequencing of columbid circovirus (coCV), a new circovirus from pigeons. *Arch Virol.* 145:2469-2479.
- Mankertz, A., and B. Hillenbrand. 2002. Analysis of transcription of Porcine circovirus type 1. *J Gen Virol.* 83:2743-2751.
- Mankertz, A., F. Persson, J. Mankertz, G. Blaess, and H.J. Buhk. 1997. Mapping and characterization of the origin of DNA replication of porcine circovirus. *J Virol.* 71:2562-2566.
- Mankertz, J., H.J. Buhk, G. Blaess, and A. Mankertz. 1998. Transcription analysis of porcine circovirus (PCV). *Virus Genes.* 16:267-276.
- Mc Nulty, M., J. Dale, P. Lukert, A. Mankertz, J. Randles, and D. Todd. 2000. Circoviridae. In: *Seventh report of the international committee on taxonomie of viruses*:299-303.
- McNeilly, F., S. Kennedy, D. Moffett, B.M. Meehan, J.C. Foster, E.G. Clarke, J.A. Ellis, D.M. Haines, B.M. Adair, and G.M. Allan. 1999. A comparison of in situ hybridization and immunohistochemistry for the detection of a new porcine circovirus in formalin-fixed tissues from pigs with post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *J Virol Methods.* 80:123-128.
- McNeilly, F., I. McNair, D.P. Mackie, B.M. Meehan, S. Kennedy, D. Moffett, J. Ellis, S. Krakowka, and G.M. Allan. 2001. Production, characterisation and applications of monoclonal antibodies to porcine circovirus 2. *Arch Virol.* 146:909-922.
- McNeilly, F., I. McNair, M. O'Connor, S. Brockbank, D. Gilpin, C. Lasagna, G. Boriosi, B. Meehan, J. Ellis, S. Krakowka, and G.M. Allan. 2002. Evaluation of a porcine circovirus type 2-specific antigen-capture enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs: comparison with virus isolation, immunohistochemistry, and the polymerase chain reaction. *J Vet Diagn Invest.* 14:106-112.
- Meehan, B.M., J.L. Creelan, M.S. Mc Nulty, and D. Todd. 1997. Sequence of porcine circovirus DNA: affinities with plant circoviruses. *J. Gen. Virol.* 78:221-227.
- Meehan, B.M., F. Mc Neilly, D. Todd, K. S., V.A. Jewhurst, J.A. Ellis, L.E. Hassard, E.G. Clark, D.M. Haines, and G.M. Allan. 1998. Characterization of novel circovirus DNAs associated with wasting syndromes in pigs. *J. Gen. Virol.* 79:2171-2179.
- Miliotis, C.C., K. Saoulidis, S.C. Kyriakis, S. Lekkas, and S. Kennedy. 2001. Postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in Greece: Clinical observation from 10 affected farms. In: *Int. Conf. ssDNA Viruses of Plants, Birds and Primates, Saint - Malo 2001, Proc.*:94.
- Moore, C.B., John, M., James, I. R., Christiansen, F. T., Witt, C. S. u. Mallal, S. A. 2002. Evidence of HIV-1 adaptation to HLA-restricted immune responses at a population level. *Science.* 296:1439-1443.
- Morin, M., C. Girard, Y. Elazhary, R. Fajardo, R. Drolet, and A. Lagace. 1990. Severe proliferative and necrotizing pneumonia in pigs:A newly recognized disease. *Can. Vet. J.* 40:277-278.

- Morozov, I., T. Sirinarumitr, S.D. Sorden, P.G. Halbur, M.K. Morgan, K.J. Yoon, and P.S. Paul. 1998. Detection of a novel strain of porcine circovirus in pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *J. Clin. Microbiol.* 36:2535-2541.
- Morozov, I., T. Sirinarumitr, S. D. Sorden, P. G. Halbur, M. K. Morgan, K.J. Yoon u. P. S. Paul. 1998. Detection of a novel strain of porcine circovirus in pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *J. Clin. Microbiol.* 36:2535-2541.
- Mullis, K.B., F.A. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn, and H. Erlich. 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Quant. Biol.* 51:263-273.
- Nawagitgul, P., P.A. Harms, I. Morozov, B.J. Thacker, S.D. Sorden, C. Lekcharoensuk, and P.S. Paul. 2002. Modified indirect porcine circovirus (PCV) type 2-based and recombinant capsid protein (ORF2)-based enzyme-linked immunosorbent assays for detection of antibodies to PCV. *Clin Diagn Lab Immunol.* 9:33-40.
- Nawagitgul, P., I. Morozov, S.R. Bolin, P.A. Harms, S.D. Sorden, and P.S. Paul. 2000. Open reading frame 2 of porcine circovirus type 2 encodes a major capsid protein. *J Gen Virol.* 81:2281-2287.
- Nayar, G.P., A.L. Hamel, L. Lin, C. Sachvie, E. Grudeski, and G. Spearman. 1999. Evidence for circovirus in cattle with respiratory disease and from aborted bovine fetuses. *Can Vet J.* 40:277-278.
- Nei, M. 1996. Phylogenetic analysis in molecular evolutionary genetics. *Annu. Rev. Gen.* 30:371-403.
- Niagro, F.D., A.N. Forsthoefel, and R.P. Lawther. 1998. Beak and feather disease virus and porcine circovirus genomes: intermediates between the geminivirus and plant circoviruses. *Arch. Virol.* 143:1723-1744.
- Nishizawa, T., H. Okamoto, K. Konishi, H. Yoshizawa, Y. Miyakawa, and M. M. 1997. A novel DNA virus (TTV) associated with elevated transaminase levels in posttransfusion hepatitis of unknown etiology. *Biochem. Biophys Res. Commun.* 241:92-97.
- O'Connor, B., H. Gauvreau, K. West, J. Bogdan, M. Ayroud, E.G. Clark, C. Konoby, G. Allan, and J.A. Ellis. 2001. Multiple porcine circovirus 2-associated abortions and reproductive failure in a multisite swine production unit. *Can. Vet. J.:*551-553.
- Olvera, A., M. Sibila, M. Calsamiglia, J. Segales, and M. Domingo. 2004. Comparison of porcine circovirus type 2 load in serum quantified by a real time PCR in postweaning multisystemic wasting syndrome and porcine dermatitis and nephropathy syndrome naturally affected pigs. *J Virol Methods.* 117:75-80.
- Onuki, A., K. Abe, K. Togashi, K. Kawashima, A. Taneichi, and H. Tsunemitsu. 1999. Detection of porcine Circovirus from lesions of a pig with wasting disease in Japan. *J. Vet. Med. Sci.* 61:1119-1123.
- Opriessnig, T., S. Yu, J.M. Gallup, R.B. Evans, M. Fenaux, F. Pallares, E.L. Thacker, C.W. Brockus, M.R. Ackermann, P. Thomas, X.J. Meng, and P.G. Halbur. 2003. Effect of vaccination with selective bacterins on conventional pigs infected with type 2 porcine circovirus. *Vet Pathol.* 40:521-529.

- Oslage, U., J. Dahle, T. Muller, M. Kramer, D. Beier, and B. Liess. 1994. Prevalence of antibodies against the viruses of European swine fever, Aujeszky's disease and "porcine respiratory and reproductive syndrome" in wild boars in the federal states Sachsen-Anhalt and Brandenburg. *Dtsch Tierärztl Wochenschr.* 101:33-38.
- Pallares, F.J., P.G. Halbur, T. Opriessnig, S.D. Sorden, D. Villar, B.H. Janke, M. Yaeger, J., D. Larson, J., K.J. Schwartz, K.J. Yoon, and L.J. Hoffman. 2002. Porcine circovirus type 2 (PCV-2) coinfections in US field cases of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *J Vet Diagn Invest.* 14(6):515-519.
- Palmer, K.E.u.R., E. O. 1998. The molecular biology of mastreviruses. *Adv. Virus Res.* 50:183-234.
- Pastor, J., J. Segales, R. Cuenca, and M. Balasch. 1998. Gastric ulcers and haematological disorders in post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) affected pigs. *15th Int. Pig Vet. Soc. Congr., Birmingham 1998, Proc.:*397.
- Pensaert, M.B., Sanchez, R. E., Jr. u. Nauwynck, H. J. 2001. Transmission of porcine circovirus type 2 from the sow to the litter. *In: Int. Conf. ssDNA Viruses of Plants, Birds and Primates, Saint - Malo 2001, Proc.,:*84.
- Peritogianni, V. 2000. Clinical presentation of combined postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) and porcine nephropathy syndrome (PDNS) case in a three site production system in Great Britain (GB). *In: 16th Int. Pig Vet. Soc. Congr., Melbourne 2000, Proc.:*345.
- Pesch, S., U. Schmidt, and V.F. Ohlinger. 2000. Proliferative necrotizing pneumonia (PNP) is a result of coinfection with porcine reproductive and respiratory disease virus (PRRSV) and porcine circovirus type 2 (PCV2). *In: Proceedings of the 16th International Congress on Pigs Veterinary Society,:*581.
- Phenix, K.V., J.H. Weston, I. Ypelaar, A. Lavazza, J.A. Smyth, D. Todd, G.E. Wilcox, and S.R. Raidal. 2001. Nucleotide sequence analysis of a novel circovirus of canaries and its relationship to other members of the genus Circovirus of the family Circoviridae. *J Gen Virol.* 82:2805-2809.
- Quintana, J., J. Segales, C. Rosell, M. Calsamiglia, G.M. Rodriguez-Arrijoja, F. Chianini, J.M. Folch, J. Maldonado, M. Canal, J. Plana- Duran, and M. Domingo. 2001. Clinical and pathological observations of pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *Vet. Rec.* 149:357-361.
- Resendes, A., J. Segales, M. Balasch, M. Calsamiglia, M. Sibila, H. Ellerbrok, E. Mateu, J. Plana-Duran, A. Mankertz, and M. Domingo. 2004. Lack of an effect of a commercial vaccine adjuvant on the development of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in porcine circovirus type 2 (PCV2) experimentally infected conventional pigs. *Vet Res.* 35:83-90.
- Ritzmann, M., K. Vorbucher, M. Majzoub, W. Hermanns, K. Heinritzi, K. Geißler, and U. Truyen. 2002. Untersuchungen zur Verbreitung des porzinen Circovirus Typ 2 in Bayern. *Tierärztl. Praxis G.* 30:386-391.
- Rodriguez-Arrijoja, G.M., J. Segales, M. Domingo, and J. Plana-Duran. 2003. Lack of PCV-2 Infection in non porcine species in Spain. *Vet. Rec.:*371-372.

- Rohde, W., J.W. Randles, P. Langridge, and D. Hanold. 1990. Nucleotide sequence of a circular single-stranded DNA associated with coconut foliar decay virus. *Virology*. 176:648-651.
- Rosell, C., J. Segalés, and M. Domingo. 2000a. Hepatitis and staging of hepatic damage in pigs naturally infected with porcine circovirus type 2. *Vet. Pathol.* 37:687-692.
- Rosell, C., J. Segalés, J. Plana-Durán, M. Balasch, G.M. Rodriguez-Arrioja, S. Kennedy, G.M. Allan, F. McNeilly, K.S. Latimer, and M. Domingo. 1999. Pathological, immunohistochemical, and in situ hybridization studies of natural cases of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs. *J. Comp. Pathol.* 120:59-78.
- Rosell, C., J. Segalés, J.A. Ramos-Vara, J.M. Folch, G.M. Rodriguez-Arrioja, C.O. Duran, M. Balasch, J. Plana-Durán, and M. Domingo. 2000b. Identification of porcine circovirus in tissues of pigs with porcine dermatitis and nephropathy syndrome. *Vet. Rec.* 146:40-43.
- Rossmann, M.G., and J.E. Johnson. 1989. Icosahedral RNA virus structure. *Annu. Rev. Biochem.* 58:533-573.
- Rovira, A., M. Balasch, J. Segales, L. Garcia, J. Plana-Duran, C. Rosell, H. Ellerbrok, A. Mankertz, and M. Domingo. 2002. Experimental inoculation of conventional pigs with porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus 2. *J Virol.* 76:3232-3239.
- Sambrook, J., Gething, M. J. 1989. Protein structure. Chaperones, paperones. *Nature.* 342:224-225.
- Sanchez, R., H. Nauwynck, and M. Pensaert. 2001a. Serological Survey of PCV2 Antibodies in domestic and feral pig populations in Belgium. Proc. SsDNA viruses of plants, birds, pigs and primates. *St.Malo(France)*:122.
- Sanchez, R., Nauwynck, H. u. Pensaert, M. 2001a. Serological Survey of PCV2 Antibodies in domestic and feral pig populations in Belgium. Proc. SsDNA viruses of plants, birds, pigs and primates. *St.Malo(France)*:122.
- Sanchez, R.E., Jr., Nauwynck, H. J., McNeilly, F., Allan, G. M. u. Pensaert, M. B. 2001b. Porcine circovirus 2 infection in swine foetuses inoculated at different stages of gestation. *Vet Microbiol.* 83:169-176.
- Sanchez, R.E.J., Meerts, P., Nauwynck, H.J., Pensaert, M.B. 2003. Change of porcine circovirus 2 target cells in pigs during development from fetal to early postnatal life. *Vet Microbiol.* 95:15-25.
- Sano, Y., M. Wada, Y. Hashimoto, T. Matsumoto, and M. Kojima. 1998. Sequences of ten circular ssDNA components associated with the milk vetch dwarf virus genome. *J Gen Virol.* 79 (Pt 12):3111-3118.
- Schmoll, F., T. Opriessnig, and B. Leeb. 2001. First report of post-weaning multisystemic wasting syndrome in pigs in Austria. *In: Int. Conf. ssDNA Viruses of Plants, Birds and Primates, Saint - Malo 2001, Proc.:*92.
- Schulze, C., G. Neumann, I. Grutze, A. Engelhardt, C. Mirle, F. Ehlert, and A. Hlinak. 2003. Case report: Porcine circovirus type 2 infection in an European wild boar

- (*Sus scrofa*) in the state of Brandenburg Germany. *Dtsch Tierarztl Wochenschr.* 110(10):426-428.
- Segales, J., M. Domingo, and K.S. Latimer. 1998a. Porcine circovirus is present in cases of porcine dermatitis and nephropathy syndrome (PDNS). *In: 15th Int. Pig Vet. Soc. Congr., Birmingham 1998, Proc.:*215.
- Segales, J., C. Gortazar, J. Vicente, and M. Domingo. 2003. First Description of post weaning multisystemic wasting syndrome in the wild boar (*Sus scrofa*) in Europe. *4th international Symposium on Emerging and Re-emerging Pig diseases-Rome June 29th-July 2nd, 2003:*177-178.
- Segales, J., F. Madec, and M. Domingo. 2002a. Postweaning multisystemic wasting syndrome and porcine circovirus type 2: the European perspective. *In: Zimmerman, J.J., Yoon, K.J., Morilla, A. (Eds.), Trends in Emerging Viral Diseases of Swine. Iowa State University Press, Iowa.:*397.
- Segales, J., I. Marco, and M. Calsamiglia. 2002c. Evidence of porcine circovirus type 2 infection in wild boar (*Sus scrofa*) in Spain. *Proc. 17th IPVS Congress, Ames (USA):*397.
- Segales, J., J. Pastor, R. Cuenca, and M. Domingo. 1999a. Pathologie des porcinen Circovirus. *Circovirus und porcine Circovirose, Vortragszusammenfassung einer Tagung der Veterinärmedizinischen Fakultät der Autonomen Universität Barcelona 1999, dt. Übersetzung von Dr. H. Kästner,:*8 - 10.
- Segales, J., J. Pastor, R. Cuenca, and M. Domingo. 2000. Haematological parameters in PMWS-affected pigs. *Vet. Rec.* 146:675-676.
- Segales, J., J. Piella, E. Marco, E.M. Mateu-De-Antonio, and M. Domingo. 1998b. Porcine dermatitis nephropathy syndrome in Spain. *Vet. Rec.* 142:483-486.
- Segales, J., C. Rosell, and M. Domingo. 2004. Pathological findings associated with naturally acquired porcine circovirus type 2 associated disease. *Vet Microbiol.* 98:137-149.
- Segales, J., Rosell, C. u. Domingo, M. 2004. Pathological findings associated with naturally acquired porcine circovirus type 2 associated disease. *Vet Microbiol.* 98:137-149.
- Segales, J., M. Sitjar, and M. Domingo. 1997. First report of postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs in Spain. *Vet. Rec.* 141:600-601.
- Shibara, T., K. Sato, Y. Ishikawa, and K. Kadota. 2000. Porcine circovirus induces B lymphocyte depletion in pigs with wasting disease. *J Vet Med Sci.* 62:1125-1131.
- Sibila, M., M. Calsamiglia, J. Segales, P. Blanchard, L. Badiella, M. Le Dimna, A. Jestin, and M. Domingo. 2004. Use of a polymerase chain reaction assay and an ELISA to monitor porcine circovirus type 2 infection in pigs from farms with and without postweaning multisystemic wasting syndrome. *Am J Vet Res.* 65:88-92.
- Sibila, M., M. Calsamiglia, J. Segalés, A. Jestin, and M. Domingo. 2001. Detection of porcine circovirus type 2 genome in nasal swabs and serum samples from naturally infected pigs using polymerase chain reaction. *J. Vet. Diagn. Invest.* 12:562-565.

- Sierra, M.A., J.M. De Las Mulas, R.F. Molenbeek, C. Van Maanen, M. Quezada, and E. Gruys. 1997. Porcine immune complex glomerulonephritis dermatitis (PIGD) syndrome. *Vet. Pathol.* 3:63-70.
- Sipos, W., Duvigneau, J. C., Willheim, M., Schilcher, F., Hartl, R. T., Hofbauer, G., Exel, B., Pietschmann, P. u. Schmoll, F. 2004. Systemic cytokine profile in feeder pigs suffering from natural postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) as determined by semiquantitative RT-PCR and flow cytometric intracellular cytokine detection. *Vet Immunol Immunopathol.* 99:63-71.
- Smith, W.J., J.R. Thomson, and S. Done. 1993. Dermatitis/nephropathy syndrome of pigs. *Vet. Rec.* 132:47.
- Sorden, S., P. Harms, P. Nawagitgul, D. Cavanaugh, and P. Paul. 1999. Development of a polyclonal-antibody-based method for the detection of type 2 porcine circovirus in formalin-fixed, paraffin embedded tissue. *J. Vet. Diagn. Invest.* 11:528-530.
- Sorden, S.D. 2000. Update on porcine circovirus and postweaning multisystemic wasting syndrome. *Swine Health Prod.* 8:133-136.
- Spillane, P., S. Kennedy, B. Meehan, and G. Allan. 1998. Porcine circovirus infection in the Republic of Ireland. *Vet. Rec.* 144:511.
- Steinfeldt, T., T. Finsterbusch, and A. Mankertz. 2001. Rep and Rep' protein of porcine circovirus type 1 bind to the origin of replication in vitro. *Virology.* 291:152-160.
- Stevenson, G.W., M. Kiupel, S.K. Mittal, and C.L. Kanitz. 1999. Ultrastructure of porcine circovirus in persistently infected PK-15 cells. *Vet. Pathol.* 36:368-378.
- Stubbe, C. 2001. Vom Frischling zum Hauptschwein. Wildbiologische Erkenntnisse. *Dt. Landwirtschaftsverlag (Hrsg.):Schwarzwild. Unsere Jagd.Special.:22-27.*
- Suh, D.K., C. S. Johnson, B. K. Park u. H. S. Joo. 1998. Seroepidemiology of porcine circovirus infection in Midwestern U.S. swine farms. *In: 15th Int. Pig Vet. Soc. Congr., Birmingham 1998, Proc.:214.*
- Takahashi, K., Y. Iwasa, M. Hijikata, and S. Mishiro. 2000. Identification of a new human DNA virus (TTV-like mini virus, TLMV) intermediately related to TT virus and chicken anemia virus. *Arch. virol.* 145:979-993.
- Teifke, J.P., V. Kaden, and U. Polster. 2001. Spontan aufgetretene progressive atrophische Rhinitis (PAR) bei europäischen Wildschweinen. Ein Fallbericht. *tierärztl. Praxis G.* 29:157-162.
- Thacker, B., and E. Thacker. 2000. The PRDC battle continues. *Pig Prog.:*16-18.
- Thibault, S., R. Drolet, M.C. Germain, S. D'Allaire, R. LaRoche, and R. Magar. 1998. Cutaneous and systemic necrotizing vasculitis in swine. *Vet. Pathol.* 35:108-116.
- Thomas, P., T. Opriessnig, N. McKeown, X.-J. Meng, and P. Halbur. 2005. Effect of PCV2 passive antibody levels on immunization with chimeric PCV1-2 vaccine and challenge with wild-type PCV2. *Proceedings of the American Association of Swine Veterinarians Meeting, Toronto, Ontario, Canada:23-25.*

- Thomson, J.R., A. Lainson, N. Thomson u. W. Donachie. 1998. A study of *Pasteurella multocida* as a possible aetiological agent in porcine immune complex glomerulonephritis and dermatitis syndrome. *In: 15th Int. Pig Vet. Soc. Cong., Birmingham 1998, Proc.*,:396.
- Tischer, I., L. Bode, J. Apodaca, H. Timm, D. Peters, R. Rasch, S. Pociuli, and E. Gerike. 1995. Presence of antibodies reacting with porcine circovirus in sera of humans, mice, and cattle. *Arch Virol.* 140:1427-1439.
- Tischer, I., D. Peters, R. Rasch u. S. Pociuli. 1987. Replication of porcine circovirus: induction by Glucosamine and cell cycle dependence. *Arch. Virol.* 96.
- Tischer, I., H. Gelderblom, W. Vettermann u. M. A. Hoch. 1982. A very small porcine virus with a circular single-stranded DNA. *Nature.* 295:64-66.
- Tischer, I., W. Mielsds, D. Wolff, M. Vagt, and W. Griem. 1986. Studies on epidemiology and pathogenicity of porcine circovirus. *Arch. Virol.* 91:271-276.
- Tischer, I., D. Peters, R. Rasch, and S. Pociuli. 1987. Replication of porcine circovirus: induction by Glucosamine and cell cycle dependence. *Arch. Virol.* 96:39-57.
- Tischer, I., R. Rasch, and G. Tochtermann. 1974. Characterization of papovavirus- and picornavirus-like particles in permanent pig kidney celllines. *Zentralbl. Bakteriol. Org. A* 226:153-176.
- Tschachtschal, J. 2000. Epidemiologie, klinische Erscheinungsformen, Pathomorphologie und Diagnostik der porzinen Circovirusinfektion. *Hannover, Tierärztl. Hochsch., Diss.*
- Vicente, J., J. Segales, U. Hofle, M. Balasch, J. Plana-Duran, M. Domingo, and C. Gortazar. 2004. Epidemiological study on porcine circovirus type 2 (PCV2) infection in the European wild boar (*Sus scrofa*). *Vet Res.* 35:243-253.
- Wellenberg, G.J., N. Stockhofe-Zurwieden, M.F. de Jong, W.J. Boersma, and A.R. Elbers. 2004. Excessive porcine circovirus type 2 antibody titres may trigger the development of porcine dermatitis and nephropathy syndrome: a case-control study. *Vet Microbiol.* 99:203-214.
- West, K.H., J.M. Bystrom, C. Wojnarowicz, N. Shantz, M. Jacobson, G.M. Allan, D.M. Haines, E.G. Clark, S. Krakowka, F. McNeilly, C. Konoby, K. Martin, and J.A. Ellis. 1999. Myocarditis and abortion associated with intrauterine infection of sows with porcine circovirus 2. *J. Vet. Diagn. Invest.* 11:530-532.
- White, M., and R.J. Higgins. 1993. Dermatitis nephropathy syndrome of pigs. *Vet. Rec.* 132:199.
- Yang, J.S., D.S. Song, S.Y. Ki, K.S. Lyoo, and B.K. Park. 2003. Detection of porcine circovirus type 2 in feces of pigs with or without enteric disease by polymerase chain reaction. *J Vet Diagn Invest.* 15 (4):369-373.
- Zupancic, Z., B. Jukic, M. Lojkic, and Z. Cac. 2002. Prevalence of Antibodies to Classical Swine Fever, Aujeszky's Disease, Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome, and Bovine Viral Diarrhoea Viruses in Wild Boars in Croatia. *J. Vet. Med. B* 49:253-256.

9. Abkürzungen

A	Adenosin, bei Aminosäuren: Alanin
aa	Aminosäuren
PBFDV	Psittacine beak and feather disease virus
Bp	Basenpaaren
Bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin, bei Aminosäuren: Cystin
Ca.	circa
CD	Cluster of differentiation
Cm	Zentimeter
D	Asparaginsäure
DNA	Deoxiribonucleid acid
dp	CD4+ und CD8+ doppelt positive Zellen
E	Glutaminsäure
EM	Elektronenmikroskopie
F	Phenylalanin
Fa.	Firma
G	Guanin bei Aminosäuren: Glycin
Ggr.	Geringgradig
H	Histidin
Hgr.	Hochgradig
I	Isoleucin
IL	Interleukin

IPTG	isopropyl-[beta]-D-thiogalactopyranoside
IPMA	indirekter Immunoperoxidase Monolayer Assay
i. Vgl.	im Vergleich
K	Lysin
KSP	klassische Schweinepest
L	Leucin
Lnn.	Lymphknoten
M	Molar, bei Aminosäuren: Methionin
mM	milliMolar
Mgr.	mittelgradig
Min	Minute
mRNA	Messenger RNA
N	normal, bei Aminosäuren: Asparagin
Neg	negativ
n.s.	nicht signifikant
nt	Nukleotide
ORF	Open reading frame
P	Prolin
PBMC	peripheral blood mononuclear cells
PCR	Polymerase chain reaction
pi	post infectionem
PK 15	„porzine Kidney“, Schweinenierenzelllinie
PMWS	postweaning multisystemic wasting syndrome
Pos	positiv

PPV	porzines Parvovirus
Q	Glutamin
R	Arginin
rcr	rolling circle replication
PRRSV	Porzines respiratorisches reproduktions Syndrom Virus
S	Serin
Sek	Sekunde
Std	Stunde
T	Thymin, bei Aminosäuren: Threonin
u.a.	unter anderem
UPM	Umdrehungen pro Minute
U	Uracil
V	Volt, bei Aminosäuren: Valin
W	Tryptophan
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -Galactopyranosid
Y	Tyrosin

10. Anhang

10.1 Ansätze für Lösungen

TBE-Puffer für Elektrophorese (10fach)

Verwendete Chemikalien_

1000 mM Tris-Base (Roth, Karlsruhe)	60,55 g
1000 mM Borsäure(Roth, Karlsruhe)	30,9 g
20 mM EDTA(Roth, Karlsruhe)	3,7 g

Zugabe von 500 ml Aqua Bidest

Einstellen mit 5N NaOH/1N HCl auf pH 8,3

Autoklavieren und anschließende Lagerung bei +4°C

Zum Gebrauch 1:10 verdünnen

LB-Medium

10g/l Trypton

5g/l Hefeextrakt

10g/l NaCl

mit 1N NaOH auf pH 7,5 einstellen

Substanzen: Agar-Agar (Fa. DIFCO, Kansas City, USA);

Ampicillin (Fa. Fluca Chemical Co., Buchs, Schweiz)

Geräte: Schüttler (Fa. Infors, Bottmingen, Schweiz)

Zur Herstellung fester Nährböden wurde dem Medium 1,5%iger Agar zugesetzt.

Lösungen für Minipräparation (Macherey & Nagel)

Lösung P1: 50 mM Tris-HCL, pH 8,0

10 mM EDTA

Lösung P1/RNase: Lösung P1

0,1 mg/ml RNase A

Lösung P2: 0,2 M NaOH

1 % SDS

Lösung P3: 2,55 M Kalium-Acetat, pH 5,5

Lösungen für die Sequenzierung:

Acrylamidgel, 0,25 mm, 6,5 %

Harnstoff (Roth)	25.2 g
Rotiphorese Gel 40 Acrylamid (Roth)	9 ml
TBE-Puffer	6 ml
Wasser bidest	ad 67,5 g

TBE-Puffer 10fach:

Tris-Base 890 mM (Roth)	107,8 g
Borsäure 890 nM (Roth)	54,9 g
EDTA 20 mM (Roth)	7,4 g
H ₂ O bidest	1000 ml

Mit 5N NaOH / 1 N HCl auf pH 8,3 einstellen

Autoklavieren und lagern bei +4°C

Zum Gebrauch 1:10 verdünnen

10.2 Übersicht der verwendeten Primer

Primer	Primer - Sequenz 5' 3'	Anwendung ^a	Position und Ausrichtung ^b
F1 ^d	ACC AGC GCA CTT CGG CAG	PCR, Sequenzierung	1-18, f
433R ^d	TCC AGC AAG GTA CTC A	PCR, Sequenzierung	418-433, r
Porcirc 1	GCT GAA CTT TTG AAA GTG AGC	PCR, Sequenzierung	501-521, f
Porcirc 3	GTA TGT GGT TTC CGG GTC	PCR, Sequenzierung	615-632, r
Porcirc 2	CACACAGTCTCAGTAGATCATCC	PCR, Sequenzierung	719-741, r
nPCRfwd	CAA CTG CTG TCC CAG CTG TAG	PCR, Sequenzierung, vergleichende. Sequenzierung	844-864, f
PCV1 S	AGG GGT CAT AGG CCA AGT TG	Prävalenzuntersu chungen	1321–1340, f
PCV1 AS	CCT TCA GAA ACC GTT ACA GAT GG	Prävalenzuntersu chungen	1628–1650, r
PCV2 IS ^c	TAG GTT AGG GCT GTG GCC TT	PCR, Sequenzierung	1322-1341, f

PCV2 IAS ^c	CCG CAC CTT CGG ATA TAC TG	PCR, Klonierung, Sequenzierung, vergleichende Sequenzierung	1566-1585, r
1696F ^d	GGT GTC TTC GTC TTC GGT AAC G	Sequenzierung	1695-1716, f
1768R ^d	AAT ACT TAC AGC GCA CTT CTT TCG	PCR, Sequenzierung	1744-1767, r
M13 fwd	ACGACGTTGTAAAACGACGGCCAG	Sequenzierung	f
M13 rvs	TTCACACAGGAAACAGCTATGACC	Sequenzierung	r

a: Für PCR, Sequenzierung, vergleichende Sequenzierung und/oder Klonierung verwandte Oligonukleotide.

b: Position der Oligonukleotide. f: forward; r: reverse

c: Larochelle et al., 2000;

d: (Kim and Lyoo, 2002).

10.3 Auflistung der Genebank© Accession-No.

PCV 2 Dendrogramm

Land	Bezeichnung im Dendrogramm	Accession- No.
Frankreich	France 1	AF012107
	France 2	AF055394
	France 3	AF055393
	FRA 3	AF201311
	France Fd1	AY322000
	France Fh17	AY322004
Irland	Irland 1	U49186
Österreich	AUT 1	AY424401
	AUT 2	AY424402
	AUT 3	AY424403
	AUT 5	AY424405
Spanien	SPA 1	AF201308
	SPA 2	AF201309
	SPA 3	AF201310
Deutschland	GER 1	AF201305
	GER 2	AF201306
	GER 3	AF201307
PK 15 Zell-	PK 15	AF071879

Kontaminante		
Holland	Netherlands	AF201897
Ungarn	HUN	AY256459
Canada	Canada B09	AF086834
	Canada 1	AF055392
	Canada 2b	AF112862
	Canada 2D	AF117753
	Canada 2E	AF109399
USA	USA 1	AF055391
	PCV 1 USA	AY184287
	USA P1	AY099495
	USA (Cheung)	AY094619
Japan	Japan 26	AB072302
China	China (Guandong)	AY177626
	China (SD2)	AY181947
	China(HaiNan)	AY556476
Taiwan	PCV 1 Taiwan	AY219836
	Taiwan (VOO- 207-2)	AF305533
	Taiwan (SC)	AF465211
Südafrika	Suedafrika SA1	AY325495

Auflistung der in Abbildung 25 aufgeführten Einträge in der Datenbank Genebank©.

Circo Dendrogramm

Rind	Bovine	NC_002068
Papagei	PBFDV	AF080560
Ente	Duck	NC_005053
Taube	Pigeon	NC_002361
Banane	Banana	NC_003477
Kanarienvögel	Canary	NC_003410
Gans	Goose	NC_003054
Mensch	TT Virus	NC_002076
Mensch	TT-like-mini- Virus	NC_002195

Auflistung der in Abbildung 26 aufgeführten Einträge in der Datenbank Genbank©.

10.4 Danksagung

Zu guter Letzt will ich mich noch bei allen bedanken, die zu einem erfolgreichen Gelingen der Dissertation beigetragen haben.

Mein Dank gilt insbesondere folgenden Personen:

Meinem Doktorvater Prof. Dr. Gerald Reiner für die hervorragende und nette Betreuung. Darüber hinaus auch für seinen Einsatz diese Arbeit zu ermöglichen.

Frau Dr. Hertrampf, die maßgeblich daran beteiligt war meine Arbeit zu überarbeiten und ihr den letzten Schliff zu geben.

Den Mitgliedern des molekularbiologischen Labors der Professur für Schweinekrankheiten Siegrid Franke, Nadine Mühlhäuser und PD Dr. Hermann Willems für eine schöne Zeit im Labor und dafür, dass ich ohne deren Hilfe sicher heute noch keine Ergebnisse hätte.

Nochmals PD Dr. Hermann Willems, der mir durch alle Tücken der PCR und der Sequenzierung hindurch half.

Prof. Dr. Gerald Reiner und Jens Neef, die maßgeblich an der Entwicklung der Idee dieses Themas mitgewirkt haben.

Den Jägern und Jagdpächtern, ohne deren Erlaubnis und Mithilfe die Probenentnahme nicht möglich gewesen wäre. In diesem Zusammenhang auch allen, die dabei mithalfen.

Unermüdlich waren auch die Mühen meiner Korrekturen. Vielen Dank Cornelia Hübler, Serafine Curtiss, Nicola Steffen, Holger Thoms, Lars Hartmann und meiner Mutter Elke Knell.

Meiner Prüfungsgruppe Julika Horn, Thorsten Waberschek und Jens Neef, die mit mir zusammen Tierarzt wurden.

Meinen Eltern, die mir alle Unterstützung zur Erstellung dieser Dissertation angedeihen ließen.

11. Erklärung

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

Sebastian Christoph Knell

édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D - 3 5 3 9 6 G I E S S E N

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

ISBN 3-8359-5187-4



9 783835 951877