

# Untersuchungen zur PCV2-Infektion bei Wild- und Hausschweinen in Deutschland



Adriane Corinna Hohloch



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



*édition scientifique*  
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

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

1. Auflage 2013

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

1<sup>st</sup> Edition 2013

© 2013 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN  
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890  
email: [redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)

Aus dem Institut für Veterinär-Pathologie  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. M. Reinacher

**Untersuchungen zur PCV2-Infektion bei Wild- und Hausschweinen  
in Deutschland**

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

eingereicht von  
**Adriane Corinna Hohloch**  
Tierärztin aus Würzburg

Gießen, 2012



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

Dekan: Prof. Dr. Dr. M. Kramer

Gutachter:

Prof. Dr. M. Reinacher

Prof. Dr. Dr. G. Reiner

Tag der Disputation: 23.01.2013

Ich erkläre:

Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle

Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen

Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die

Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“

niedergelegt sind, eingehalten.

**Meiner Familie  
und  
*in memoriam*  
meiner Großmutter  
Gertrud Focken - Schübel**



---

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2. Literaturübersicht</b>	<b>3</b>
2.1. Geschichte .....	3
2.2. Taxonomie .....	5
2.3. Morphologie, Eigenschaften .....	6
2.4. Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome (PMWS).....	8
2.4.1. Klinik .....	8
2.4.2. Pathologische Befunde .....	9
2.4.2.1. Pathologisch-anatomische Befunde.....	9
2.4.2.2. Pathologisch-histologische Befunde .....	10
2.5. Pathogenese .....	13
2.6. Kofaktoren .....	16
2.7. Epidemiologie.....	18
2.8. Porzines Circovirus 2 (PCV2) beim Wildschwein.....	21
2.9. PCVAD (PCV-assoziierte Krankheitsbilder).....	26
2.9.1. Porzines Dermatitis und Nephropathie Syndrom (PDNS).....	26
2.9.2. Porcine Respiratory Disease Complex (PRDC).....	27
2.9.3. Enteritis.....	27
2.9.4. PCV2 - assoziierte Reproduktionsstörungen.....	28
2.9.5. Kongenitaler Tremor .....	28
2.10. Nachweismethoden .....	29
2.10.1. Virusisolation.....	29
2.10.2. Elektronenmikroskopie .....	30
2.10.3. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).....	30
2.10.4. Polymerase chain reaction (PCR) .....	30
2.10.5. In situ-Hybridisierung (ISH) .....	31
2.10.6. Immunhistologie.....	32

<b>3. Material und Methoden</b>	<b>34</b>
3.1. Untersuchungsmaterial.....	34
3.1.1. Wildschweine .....	34
3.1.2. Hausschweine.....	38
3.2. Histopathologische Untersuchung .....	40
3.2.1. Durchführung der histopathologischen Untersuchung .....	40
3.2.2. Beurteilung der HE-Färbung .....	40
3.3. Immunhistologie .....	41
3.3.1 Durchführung der Immunhistologie .....	41
3.3.2. Seren und Antiseren .....	41
3.3.2.1. Pferdeserum.....	41
3.3.2.2. Antiseren .....	41
3.3.2.2.1. Primärantikörper .....	41
3.3.2.2.2. Sekundärantikörper.....	41
3.3.2.2.3. Streptavidin Horseradish Peroxidase .....	42
3.3.3. Durchführung der immunhistologischen Untersuchung .....	42
3.3.4. Immunhistologische Kontrollen .....	44
3.3.5. Beurteilung der Immunhistologie.....	45
3.4. Real-time-PCR .....	46
3.5. Ziehl-Neelsen-Färbung.....	47
3.5.1. Durchführung der Ziehl-Neelsen-Färbung.....	47
3.5.2. Beurteilung der Ziehl-Neelsen-Färbung.....	48
3.6. Statistische Analyse .....	49
<b>4. Ergebnisse</b>	<b>51</b>
4.1. Wildschweine .....	51
4.1.1 Alter und Gewicht der Wildschweine .....	51
4.1.2. Endoparasitosen der Wildschweine .....	52
4.1.3. Ergebnisse der immunhistologischen Untersuchung der Wildschweine ...	52
4.1.4. Ergebnisse der Real-time-PCR der Wildschweine .....	56
4.1.5. Ergebnisse der histologischen Untersuchung der Wildschweine .....	59

4.1.5.1. Ergebnisse der histologischen Untersuchung der immunhistologisch positiven Wildschweine .....	59
4.1.5.2. Ergebnisse der histologischen Untersuchung der Wildschweine in Zusammenhang mit den Ergebnissen der Real-time-PCR .....	66
4.1.6. Ergebnisse der Ziehl-Neelsen-Färbung .....	68
4.2. Hausschweine .....	69
4.2.1. Alter und Gewicht der beprobten Hausschweine .....	69
4.2.2. Ergebnisse der immunhistologischen Untersuchung der Hausschweine ..	71
4.2.3. Ergebnisse der histologischen Untersuchung der Hausschweine .....	74
4.2.3.1. Histologische Befunde unter Berücksichtigung des Antigen- nachweises mittels Immunhistologie .....	75
4.2.3.1.1. Histologische und immunhistologische Untersuchung desselben Organs .....	75
4.2.3.1.2. Histologische Untersuchung im Bezug auf das Vorkommen von PCV2-Antigen im Tier .....	77
4.2.3.2. Assoziation der histologischen Befunde mit dem PCV2-Genomnachweises mittels PCR .....	78
4.2.3.2.1. Histologische Untersuchung und PCV2-Genomnachweis in demselben Organ .....	79
4.2.3.2.2. Histologische Untersuchung und Nachweis des PCV2- Genoms an irgendeiner Stelle im Tier .....	80
4.2.4. Ergebnisse der Real-time-PCR bei den Hausschweinen .....	83
4.2.5. Assoziation der Ergebnisse der Real-time-PCR mit der Immunhistologie bei den Hausschweinen .....	84
4.2.6. Ergebnisse der Ziehl-Neelsen-Färbung .....	86
4.3. Vergleich der PCR-Werte zwischen Wild- und Hausschweinen .....	87
<b>5. Diskussion</b>	<b>89</b>
5.1. Wildschweine .....	89
5.1.1. Wildschweine mit Abmagerung .....	89
5.1.2. Wildschweine mit Metastrongyloiden .....	90
5.1.3. Wildschweine mit Antigennachweis .....	91
5.1.3.1. Immunhistologisch positive Wildschweine der Jagdsaison 2004/05...	91

5.1.3.2. Immunhistologisch positive Wildschweine der Jagdsaison 2006/07...	92
5.1.4. Beurteilung der Real-time-PCR-Ergebnisse bei den Wildschweinen .....	94
5.1.5. Vergleich der Ergebnisse der Immunhistologie und der Real-time-PCR unter Berücksichtigung der pathohistologischen Befunde der Wildschweine .....	94
5.1.6. Beurteilung der Wildschweine, die weder PCV2-Antigen, noch mehr als $5 \times 10^6$ PCV2-Kopien pro $\mu\text{g}$ isolierter DNA aufwiesen .....	95
5.1.7. Alter der Wildschweine mit PMWS .....	98
5.1.8. PMWS bei Wildschweinen .....	99
5.2. Hausschweine .....	100
5.2.1. Abmagerung bei den Hausschweinen .....	100
5.2.2. Altersverteilung der immunhistologischen Ergebnisse der Hausschweine .....	101
5.2.3. Vergleich der Ergebnisse der Immunhistologie in den verschiedenen untersuchten Geweben .....	101
5.2.4. Diskussion der Ergebnisse des Antigen- und DNA-Nachweises sowie der histologischen Läsionen .....	102
5.2.5. PMWS bei Hausschweinen .....	104
5.2.6. Assoziation der Ergebnisse von IHC und der Real-time-PCR bei Hausschweinen.....	104
5.3. Vergleich Wildschweine mit Hausschweinen .....	105
5.4. Ziehl-Neelsen-Färbung .....	107
<b>6. Zusammenfassung</b>	<b>108</b>
<b>7. Summary</b>	<b>110</b>
<b>8. Literaturverzeichnis</b>	<b>112</b>
<b>9. Anhang</b>	<b>127</b>
9.1. Lösungen und Puffer.....	127
9.2. Bezugsquellen für Chemikalien.....	129
9.3. Liste der verwendeten Abkürzungen.....	132

## 1. Einleitung

Im Jahr 1974 wurde in einer Schweinenieren-Zelllinie eine Viruskontaminante entdeckt, die als porcines Circovirus (PCV) bezeichnet wurde (Tischer et al., 1974).

In Kanada wurde 1996 bei Hausschweinen eine neue Erkrankung beschrieben: Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome (PMWS).

Dem Namen entsprechend zeigten Tiere nach dem Absetzen Abmagerung. Weitere klinischen Symptome waren Ikterus und Dyspnoe (Harding and Clark, 1997).

Zwei Jahre später wurde in den erkrankten Schweinen ein Virus entdeckt, das dem beschriebenen PCV ähnelte (Allan et al., 1998; Ellis et al., 1998; Meehan et al., 1998).

Daraufhin wurde das Virus aus der Schweinenieren-Zelllinie als PCV1 und das Virus aus PMWS-erkrankten Schweinen als PCV2 bezeichnet.

PCV1 gilt bis heute als apathogen, wohingegen die Bedeutung einer Infektion mit PCV2 kontrovers diskutiert wird.

Aufgrund der Problematik, dass auch in gesunden Tieren PCV2 gefunden werden kann und Kofaktoren für das Auftreten von PMWS eine Rolle spielen, wurden von Sorden im Jahre 2000 drei Kriterien vorgeschlagen, die erfüllt sein müssen, um die Diagnose PMWS stellen zu können:

Neben klinischen Symptomen (Abmagerung oder verminderte Gewichtszunahme mit oder ohne Dyspnoe und Ikterus) muss in der pathologisch-histologischen Untersuchung eine lymphozytäre Depletion und eine histiozytäre Proliferation vor allem in den lymphatischen Organen vorliegen und das Virus muss nachweisbar sein (Sorden, 2000).

Mittlerweile ist PMWS weltweit bei Hausschweinen beschrieben worden (Choi and Chae, 1999; Drew et al., 2004; Finlaison et al., 2007; Harding and Clark, 1997; Liu et al., 2002; Segales et al., 1997).

Aber nicht nur bei Hausschweinen, vereinzelt wurde auch bei Wildschweinen über eine Infektion mit PCV2 und eine Erkrankung an PMWS berichtet.

Bisher liegt aus Deutschland nur ein Fallbericht über ein PMWS-erkranktes Wildschwein vor (Schulze et al., 2003) .

Ziel dieser Arbeit war es, Erkenntnisse über PCV2-Infektionen bei Wildschweinen zu gewinnen. Dafür wurden Wild- und Hausschweine pathohistologisch und immunhistologisch untersucht.

In einer parallelen Studie der Klinik für Wiederkäuer und Schweine, Professur für Schweine, wurde untersucht, inwieweit bei Haus- und Wildschweinen gleiche oder unterschiedliche PCV2-Stämme vorliegen und die Virusgenommene quantifiziert.

Bei dem Material handelt es sich um die bisher größte Studie über das Vorkommen von PCV2 bei Wildschweinen in Deutschland.

Die Situation wurde mit derjenigen bei Hausschweinen in den gleichen Gebieten verglichen.

## 2. Literaturübersicht

### 2.1. Geschichte

Erstmals wurde porcines Circovirus 1974 als eine Viruskontaminante durch eine elektronenmikroskopische Untersuchung eines Überstandes einer PK-15-Schweinenieren-Zelllinie beschrieben (Tischer et al., 1974).

Aufgrund der einzelsträngigen, zirkulär angeordneten DNA wurde es porcines Circovirus (PCV) genannt (Tischer et al., 1982).

Weitere Untersuchungen ergaben ein Vorkommen von Antikörpern gegen PCV in Schweinen (Tischer et al., 1982). Da die Tiere weder Krankheitsanzeichen noch pathologische Veränderungen aufwiesen, wurde das Virus als apathogen eingestuft.

24 Jahre nach der ersten Beschreibung als Kontaminante in PK-15-Zellen wurden bei Schweinen, die an Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome (PMWS) erkrankt waren, Viruspartikel entdeckt, die von der Größe und Morphologie her identisch mit PCV waren. Es wurde PCV aus der PK-15 Zelllinie mit Isolaten aus erkrankten Schweinen aus Nordamerika und Europa verglichen. Dabei konnte eine Übereinstimmung der Nukleotidsequenz innerhalb der Isolate aus erkrankten Schweinen zu 96 % nachgewiesen werden, zu der PK-15-Zellkontaminante lediglich zu < 80 %. Daraufhin wurden die Circoviren, die in der PK-15 Zelllinie gefunden worden waren, als PCV1 und die Viren, die aus PMWS-erkrankten Tieren isoliert worden waren, als PCV2 bezeichnet (Allan et al., 1998; Ellis et al., 1998; Meehan et al., 1998).

Mittlerweile wurde bei immer mehr Erkrankungen wie Reproduktionsstörungen (Johnson et al., 2002; West et al., 1999), Enteritiden (Jensen et al., 2006; Kim et al., 2004a) und respiratorischen Erkrankungen (Harms et al., 2002; Opriessnig et

al., 2007) eine Beteiligung von PCV2 diskutiert. Deshalb werden Erkrankungen, bei denen PCV2 als Auslöser vermutet wird, unter dem Oberbegriff PCVD (Porcine Circovirus Disease) bzw. PCVAD (Porcine Circovirus-associated Disease) zusammengefasst.

## 2.2. Taxonomie

Zu der Familie der Circoviridae gehören das Chicken Anaemia Virus, Beak and Feather Disease Virus (BFDV), Pigeon oder Columbid Circovirus (PiCV/CoCV), Goose Circovirus (GCV), Canary Circovirus und das Porcine Circovirus (PCV). Zum Genus der Circoviren werden PCV1, PCV2, BFDV, CoCV, GCV und das Canary Circovirus zusammengefasst. Das einzige Virus im Genus Gyrovirus ist das Chicken Anaemia Virus. Circoviren sind unbehüllte Viren mit einem durchschnittlichen Durchmesser von 17 bis 23,5 nm und besitzen eine zirkuläre, einzelsträngige DNA (Mankertz et al., 2000b; Meehan et al., 1997; Niagro et al., 1998; Pringle, 1999; Todd et al., 2001a; 2001b).

Überraschenderweise lag die größte Übereinstimmung zwischen dem Protein von ORF1 von PCV und einem Protein von Banana Bunchy Top Virus vor. Ebenfalls konnte mit Proteinen von anderen pflanzenpathogenen Viren wie Subterranean Clover Stunt Virus und Coconut Foliar Decay Virus eine Übereinstimmung festgestellt werden (Meehan et al., 1997). Zu Columbid Circovirus lag nur eine Übereinstimmung des Genoms von weniger als 40 % vor, zu Canary Circovirus zu 53 % (Mankertz et al., 2000b; Todd et al., 2001a).

## 2.3. Morphologie, Eigenschaften

Porzines Circovirus ist ein unbehülltes Virus, das eine einzelsträngige, zirkuläre DNA mit einem Molekulargewicht von  $0,58 \times 10^6$  besitzt. Das Virus weist einen Durchmesser von  $17 \pm 1,3$  nm und ein Molekulargewicht des Kapsidproteins von 36 000 auf (Ellis et al., 1998; Tischer et al., 1982).

Die komplette Nukleotidsequenz beträgt für PCV1 1 758-1 760 Basenpaare, für PCV2 1 767-1 768 Basenpaare (Fenaux et al., 2000; Hamel et al., 1998; Mankertz et al., 2000a; Meehan et al., 1997).

Die Übereinstimmung der Nukleotidsequenz innerhalb PCV2 beträgt mehr als 96 %, innerhalb PCV1 mehr als 98 % und von PCV2 zu PCV1 68-80 % (Hamel et al., 1998; Meehan et al., 1998).

In mehreren Studien wurde über verschiedene Genotypen von PCV2 berichtet, die von den Autoren unterschiedlich benannt worden waren. Deshalb versuchten Segales et al. (2008) ein einheitliches System aufzustellen. Nach diesem wurde PCV2 in PCV2a, PCV2b und PCV2c unterteilt. PCV2a wurde v. a. von 1997-2003 in Betrieben, in denen z. T. PMWS auftrat, festgestellt und PCV2b ab 2004. PCV2c wurde in dänischen Schweinen gefunden. Es scheint eine Kreuzimmunität zwischen PCV2a und PCV2b zu bestehen (Opriessnig et al., 2010). Wie auch Segales et al. (2008) stellten Kim et al. (2011) fest, dass in dem Zeitraum von 2000 bis 2008 in 540 untersuchten Lymphknoten eine Abnahme von PCV2a und eine Zunahme von PCV2b zu verzeichnen war. Daneben konnten Kombinationen innerhalb eines Virus von PCV2a und PCV2b festgestellt werden (Trible and Rowland, 2012).

Sechs open reading frames (ORFs) kodieren für Proteine.

Das von ORF1 kodierte Protein weist die größte molekulare Masse auf (Meehan et al., 1998). Es ist für die Replikation der viralen DNA essentiell (Nawagitgul et al., 2000a).

ORF1 von PCV2 ist 942 bp lang und kodiert für ein 314 Aminosäuren langes Protein, wohingegen ORF1 von PCV1 936 bp lang ist und ein Protein von 312 Aminosäuren kodiert. ORF1 weist eine Nukleotidhomologie von 82 % - 83 %

zwischen PCV1 und PCV2 auf. Die Homologie innerhalb von PCV2 oder PCV1 beträgt 96 % bzw. 99 %.

Das von ORF1 kodierte Protein hat die am stärksten konservierte Sequenz aller Virusproteine. Dies überrascht nicht, da das Protein für die Virusreplikation essentiell ist (Hamel et al., 1998; Mankertz et al., 2000a; Meehan et al., 1997; Meehan et al., 1998; Morozov et al., 1998).

ORF2 kodiert für ein Protein, das für die Bildung des Kapsids zuständig ist und ähnelt einem Protein des Chicken Anaemie Virus (Nawagitgul et al., 2000a).

Der ORF2 von PCV2 kodiert für ein 233 und der von PCV1 für ein 230-231 Aminosäuren langes Protein. Das Kapsidprotein zeigt mit 62 % nach Mankertz et al. (2000a) bzw. mit 67 % nach Morozov et al. (1998) eine geringere Homologie zwischen PCV1 und PCV2 als ORF1, weshalb es sich für den alleinigen Nachweis von PCV2 eignet (Zhao et al., 2010). Innerhalb von PCV2 bzw. PCV1 zeigt das Protein eine Übereinstimmung von 90 % bzw. 94 %. Daher wurde ein Zusammenhang zwischen der Variation des Kapsidproteins und der Virulenz von PCV2 vermutet (Fenaux et al., 2000; Mankertz et al., 2000a; Morozov et al., 1998). So konnten Grau-Roma et al. (2008) PCV2 in 2 Genotypen auf Grundlage von verschiedenen ORF2 Sequenzen einteilen. Alle Schweine aus Betrieben, in denen PMWS aufgetreten war, konnten in Gruppen 1 eingeordnet werden, oder zeigten das Vorliegen beider Genotypen, während bei Schweinen aus Betrieben ohne PMWS Ausbrüche Genotyp 2 gefunden wurde.

Das von ORF3 gebildete Protein soll laut einer Studie Apoptosen auslösen (Liu et al., 2005). In infizierten Zellen, bei denen das ORF3-Gen ausgeschaltet wurde, sinkt die Apoptoserate signifikant, wobei dies nicht in anderen Untersuchungen bestätigt werden konnte (Gillespie et al., 2009). In PCV2 ist ORF3 315 bp lang, in PCV1 612 bp. Außerdem beträgt die Homologie der Aminosäuren lediglich 62 % zwischen PCV2 und der korrespondierenden PCV1-Region (Liu et al., 2005).

Royer et al. (2001) probierten verschiedene Desinfektionsmittel in einem in vitro Modell aus. Dabei führten Phenole, quaternäre Ammoniumverbindungen sowie Oxidationsmittel zu einer signifikanten Reduktion von PCV2-Virus, wohingegen Alkohol, Jod, Formaldehyde und Chlorhexidine wirkungslos blieben.

## **2.4. Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome (PMWS)**

1996 wurde eine neue Krankheit bei Schweinen in Kanada beschrieben: Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome (PMWS) (Harding and Clark, 1997).

Innerhalb von 6-8 Monaten stieg die Zahl betroffener Bestände an und es konnten weitere Fälle in Amerika und Europa festgestellt werden (Harding and Clark, 1997; Segales et al., 1997).

Aufgrund des relativ unspezifischen klinischen Bildes und des Nachweises von PCV2 auch in gesunden Tieren müssen folgende drei Kriterien erfüllt sein, um die Diagnose „PMWS“ stellen zu können:

1. Klinik (Abmagerung bzw. reduzierte Gewichtszunahme eventuell in Verbindung mit Dyspnoe und Ikterus)
2. Pathologisch-histologische Befunde (Lymphozytendepletion und Makrophageninfiltration vor allem in den lymphatischen Organen und der Lunge und weniger häufig in Leber, Niere, Pankreas und Darm)
3. Nachweis von PCV2 innerhalb der Läsionen  
(Sorden, 2000)

### **2.4.1. Klinik**

Die unspezifischen klinischen Symptome konnten bei 5-17 Wochen alten Ferkeln oder 2-3 Wochen nach dem Absetzen festgestellt werden. Als Leitsymptom galt eine Abmagerung der Tiere. Sehr häufig konnten Dyspnoe (durch eine interstitielle Pneumonie) und vergrößerte Lymphknoten diagnostiziert werden. Diarrhoe (durch eine fokale nekrotisierende Enteritis und teils atonische Darmabschnitte) und Blässe (durch Blutungsanämie aufgrund Magenulzera) kamen häufig und Ikterus (durch Lebernekrosen) weniger häufig vor (Allan and Ellis, 2000; Harding and

Clark, 1997; Harding, 2007; Kim et al., 2002; Nielsen et al., 2008; Segales et al., 1997; 2000).

Nicht immer konnten alle oben aufgeführten Symptome bei einem Tier beobachtet werden. Bei einer Untersuchung des Bestandes war meist jedoch das gesamte klinische Bild vorhanden (Harding, 2004).

Durch Koinfektionen konnten die klinischen Symptome variieren (Chae, 2004).

## **2.4.2. Pathologische Befunde**

Da die klinisch erhobenen Befunde nicht eindeutig eine Erkrankung an PMWS bewiesen, war die pathologische Untersuchung ein wichtiger Bestandteil der Diagnosestellung (Segales et al., 2004).

### **2.4.2.1. Pathologisch-anatomische Befunde**

Als Allgemeindiagnosen konnten Anämie und Ikterus festgestellt werden. Bei Schweinen, die einen chronischen Krankheitsverlauf zeigten, lag eine Kachexie mit Atrophie des Fett- und Muskelgewebes vor (Harding and Clark, 1997; Segales et al., 2004).

Die Lymphknoten wiesen eine Vergrößerung auf. Vor allem die Inguinal-, Mesenterial-, Bronchial- und Mediastinallymphknoten waren betroffen. Selten konnte eine multifokale bis konfluierende, nekrotisierende Lymphadenitis festgestellt werden (Chianini et al., 2003; Harding and Clark, 1997; Rosell et al., 1999; Segales et al., 2004).

Ein nicht vollständiges Kollabieren der hellen Hauptlappen der Lunge mit einer derberen Konsistenz kranioventral konnte beobachtet werden (Chianini et al., 2003; Rosell et al., 1999).

Die Milz war von fleischiger Konsistenz und vergrößert, die Leber gelb-orange marmoriert. Meist waren die Nieren ohne besonderen Befund und wiesen selten eine Vergrößerung oder helle subkapsuläre Herde auf (Chianini et al., 2003; Harding and Clark, 1997).

In Magen und Darm konnte eine ulzerative Gastritis mit Ödematisierung der Magenwand, eine Parakeratose des Mageneingangs, Ödematisierung der Zäkumwand und flüssiger Darminhalt gesehen werden (Chianini et al., 2003; Harding and Clark, 1997; Rosell et al., 1999).

Die oben beschriebenen Bronchopneumonien und Magenukzera waren vermutlich durch bakterielle Sekundärinfektionen bedingt (Chianini et al., 2003; Segales et al., 2004).

Da die oben aufgeführten pathologisch-anatomischen Veränderungen nicht spezifisch für PMWS sind, sollte erst beim Auftreten des gesamten Spektrums an Läsionen der Verdacht auf PMWS geäußert werden (Segales et al., 2004).

#### **2.4.2.2. Pathologisch-histologische Befunde**

Die Hauptveränderung bei einer Erkrankung an PMWS findet sich im lymphatischen Gewebe in Form einer Lymphozytendepletion sowie einer Histiozytose (Chianini et al., 2003; Segales et al., 2004).

In Tonsillen und Lymphknoten wurden eine Lymphozytendepletion im B-Zell- und im T-Zell-Bereich sowie eine Infiltration an Histiozyten und eine Reduktion der Lymphfollikel beschrieben. Im lymphatischen Gewebe waren verstreut liegende eosinophile Granulozyten, mehrkernige Riesenzellen (vor allem in den Keimzentren), Mitose- und Apoptosefiguren sowie bei 2 % der PMWS-erkrankten Tiere eine nekrotisierende Lymphadenitis sichtbar (Chianini et al., 2003; Galindo-Cardiel et al., 2011; Harding and Clark, 1997; Rosell et al., 1999; Segales et al., 2004).

Ebenso konnten in der Milz eine Lymphozytendepletion sowie eine Histiozytose mit Riesenzellen in den periarteriellen Lymphozytenscheiden (PALS) und in den Follikeln vorliegen (Harding and Clark, 1997; Rosell et al., 1999).

Eine multifokale bis diffuse interstitielle Pneumonie mit lymphohistiozytärer Infiltration sowie Granulome mit gelegentlichem Auftreten von mehrkernigen Riesenzellen wurden in der Lunge gesehen. Eine Obturation der Bronchien durch eine partielle oder vollständige Ablösung des Bronchialepithels konnte vorkommen. Aufgrund bakterieller Sekundärinfektionen wurde eine Exsudation

von neutrophilen Granulozyten in die Bronchien, Bronchiolen und Alveolarräume beobachtet (Chianini et al., 2003; Harding and Clark, 1997).

In der Leber lagen eine mononukleäre Infiltration der Portalzone und Lebersinusoiden und gelegentlich eine Atrophie des Gallengangsepithels mit perilobulärer Fibrose vor. In der frühen Phase der Erkrankung war es möglich, Einzelzellnekrosen mit apoptotischen Körperchen (Councilman-Körperchen) und in der späten Phase eine Schwellung und Vakuolisierung des Zytoplasmas der Hepatozyten mit Karyomegalie festzustellen (Harding and Clark, 1997; Hirai et al., 2003; Rosell et al., 1999; 2000).

Im Gastrointestinaltrakt konnten eine lymphohistiozytäre Infiltration der Magen-, Zäkum- und Kolonschleimhaut sowie Ödeme in der Submukosa und eine Ablösung des Drüsen- oder Kryptenepithels vorkommen. Mehrkernige Riesenzellen lagen im Bindegewebe der Darmzotten vor. Die Peyer-Plaques wiesen eine Lymphozytendepletion und Histiozyteninfiltration auf (Chianini et al., 2003; Harding and Clark, 1997; Rosell et al., 1999). Eine lokale Atrophie des Drüsenepithels und eine lymphohistiozytäre Infiltration lagen im Interstitium des Pankreas vor (Harding and Clark, 1997).

Im Nierenparenchym konnten Aggregate an Lymphozyten, Histiozyten und eosinophilen Granulozyten im Interstitium festgestellt werden. Dort fanden sich auch Ödeme mit Fibroblastenproliferation (Chianini et al., 2003; Harding and Clark, 1997; Sarli et al., 2008).

Selten konnte im Gehirn eine mononukleäre Meningoenzephalitis sowie in Herz oder Nebenniere eine lymphoplasmazytäre Myokarditis bzw. Adrenalitis diagnostiziert werden (Rosell et al., 1999).

Charakteristisch für eine Infektion mit PCV2 war das Vorkommen von intrazytoplasmatischen, magenta bis basophil gefärbten Einschlusskörperchen, bei denen es sich um eine Anhäufungen von Viren handelt (Ellis et al., 1998; Harding and Clark, 1997; Kiupel et al., 1998; Stevenson et al., 1999). Die Einschlusskörperchen sind scharf abgegrenzte, einzeln oder multipel liegende, traubenartige Einschlüsse und kommen meist in Histiozyten vor (Chianini et al., 2003; Ellis et al., 1998).

Einschlüsse befanden sich in Histozyten in Lymphknoten, Tonsille, Milz und Peyer-Plaques des Ileums. Auch in Bronchialepithel, Hepatozyten, Kupfferzellen, mehrkernigen Riesenzellen und im Epithel der Nierentubuli konnten Einschlüsse gefunden werden (Allan et al., 1998; Harding and Clark, 1997; Hirai et al., 2003; Huang et al., 2008; Kim and Chae, 2004; Rodriguez-Carino and Segales, 2009).

## 2.5. Pathogenese

Circoviren sind aufgrund des kleinen einzelsträngigen Genoms auf zelluläre Enzyme zur DNA-Replikation angewiesen. Da die benötigte zelluläre DNA-Polymerase nur während der S-Phase des Zellzyklus exprimiert wird, benötigt das Virus mitotisch aktives Gewebe (Tischer et al., 1987; Truyen et al., 2000).

Sanchez et al. (2003) infizierten Schweine intrauterin und postnatal. Dabei zeigte sich eine Änderung des Zelltropismus. Während im fetalen Tier Hepatozyten, Makrophagen und am meisten Kardiomyozyten betroffen waren, änderte sich die Verteilung postnatal, als vor allem Makrophagen infiziert wurden. Eine zunächst von den Autoren aufgestellte Hypothese, dass dies in Zusammenhang mit der unterschiedlichen postnatalen Zellteilungsrate stünde, wurde von diesen selber widerlegt und es wurde postuliert, dass andere, unbekannte zelluläre Faktoren eine Rolle spielen müssten.

Zwei Wege wurden für die Virusaufnahme in die phagozytierenden Zellen vorgeschlagen. Erstens wurde vermutet, dass PCV2 in das Zytoplasma der Makrophagen durch Phagozytose anderer, infizierter Zellen gelangt (Shibahara et al., 2000). Die zweite Ansicht postulierte das Vorhandensein von PCV2-spezifischen Rezeptoren auf der Oberfläche von Makrophagen, die dem Virus die Penetration in das Zytoplasma ermöglichen. Solche Rezeptoren konnten bisher jedoch nicht gefunden werden (Darwich et al., 2004).

Unklar ist bisher, wo das Virus repliziert wird. Rodriguez-Carino et al. (2009; 2010) postulieren, dass die Virusreplikation in den Makrophagen an den Mitochondrien erfolgt.

Aber nicht nur Makrophagen sind die Zielzellen bei einer PCV2-Infektion. Neben Makrophagen kann auch in Lymphozyten eine Virusvermehrung erfolgen. Diese sinkt jedoch ab dem 21. Tag post infectionem (Yu et al., 2007).

In histologischen Untersuchungen konnte eine Depletion im B-Zell-Bereich und im T-Zell-Bereich diagnostiziert werden (Chianini et al., 2003; Yu et al., 2007).

Für die Lymphozytendepletion wurden verschiedene Ursachen diskutiert. Nach Mandrioli et al. (2004) ist die Läsion aufgrund einer Abnahme der Proliferation im

Lymphgewebe in der frühen Phase der Infektion und nicht durch einen Anstieg der Apoptose erklärbar.

Im Gegensatz dazu führte eine Studie aus dem Jahre 2000 die Reduktion der Lymphozyten auf Apoptosen dieser zurück (Shibahara et al., 2000).

Auch im Blut PMWS-erkrankter Tiere lag eine Reduktion der T- und B-Lymphozyten, mit einem Abfall von CD3<sup>+</sup>- und CD4<sup>+</sup>-Zellen vor. CD8<sup>+</sup>-Zellen waren im Vergleich zu gesunden Tieren dagegen unverändert. Der Mangel an CD4<sup>+</sup>-Zellen und die Umkehr des Verhältnisses von CD4<sup>+</sup>- zu CD8<sup>+</sup>-Zellen sind Kennzeichen für Immundefizienzen bei Menschen und Katzen, die an Humanem Immundefizienz-Virus (HIV) bzw. Felinem Immundefizienz-Virus (FIV) erkrankt sind (Segales et al., 2001).

Eine Ursache für die Immundefizienz bei PMWS-Erkrankten könnte die beeinträchtigte Antigenpräsentation durch eine reduzierte MHC-II Expression sein. Dies erschien Mandrioli et al. (2006) als Ursache wahrscheinlicher als die Abnahme der Lymphozyten.

Eine weitere wichtige Rolle bei der Erkrankung an PMWS spielte die passive Immunität. Durch diese konnte ein Ausbruch von PMWS zwar verhindert werden, jedoch nicht eine subklinische Infektion. Die Verteilung und Persistenz des Virus im Gewebe schien von der Menge an Antikörpern zum Zeitpunkt der Infektion abzuhängen (Ostanello et al., 2005).

Eine Übertragung des Virus fand vertikal und horizontal statt, letzteres vor allem oro-nasal (Hamel et al., 2000; Harding, 2004), wobei sogar in *Musca domestica* (Große Stubenfliege) und Hausschweinen aus dem selben Betrieb identische ORF2-Sequenzen gefunden wurden (Blunt et al., 2011).

6 % der klinisch gesunden Eber wiesen PCV im Sperma auf (Hamel et al., 2000). In männlichen Ferkeln von Sauen, die mit PCV2 kontaminiertem Sperma befruchtet worden waren, konnte in den Reproduktionsorganen PCV2-Antigen nachgewiesen werden (Gava et al., 2008).

Da Yang et al. (2003) im Kot von Schweinen, die klinisch keine Enteritis zeigten, trotzdem PCV2 fanden, vermuteten sie zusätzlich eine fäko-orale Übertragung.

Im Vergleich zu anderen Geweben enthielten die Bronchiallymphknoten in einer Studie von Yu et al. (2007) die höchsten Virusgehalte. Dies führten die Autoren darauf zurück, dass die Schweine intranasal infiziert worden waren und die PCV2-Replikation in den Lymphknoten beginnt, die der Infektionsstelle am nächsten sind. Dieses Lymphgewebe spielte eine große Rolle für die Persistenz im Wirt. Die weitere Verbreitung im Körper erfolgte über den Blutweg.

Nach Krakowka et al. (2001) siedeln sich die Viren bei einer oro-nasalen Infektion in den regionalen Histiocyten des Oropharynx ab. Danach kommt es zu einer Replikation in diesen.

Antikörper gegen PCV2 konnten ab 2 Wochen post infectionem nach Bolin et al. (2001) bzw. 3 Wochen post infectionem nach Nawagitgul et al. (2000a) festgestellt werden.

Es war möglich das Virus in Nasen-, Rachen-, Rektum- und Tonsillentupfern, in Kot und Blut bereits kurz nach der Infektion nachzuweisen (Bolin et al., 2001; Shibata et al., 2003; Tischer et al., 1986). Der Nachweis gelang mindestens 140 Tage post infectionem bis zum Ende der Studie (Opriessnig et al., 2010) .

## 2.6. Kofaktoren

Lange Zeit wurde diskutiert, ob die alleinige Infektion mit porcinen Circoviren zu einer Erkrankung an PMWS führen kann. Deshalb wurden in verschiedenen Studien Infektionsversuche mit PCV und Koinfektionen durchgeführt.

Dabei wurde festgestellt, dass eine Infektion mit PCV1 und/oder PPV (porzinem Parvovirus) nicht zu PMWS führte (Allan et al., 2004).

Durch die Infektion mit PCV2 alleine konnte in einigen Studien keine, in anderen Studien jedoch eine Erkrankung an PMWS hervorgerufen werden (Allan et al., 2004; Kim et al., 2002; Opriessnig et al., 2004; Pallares et al., 2002).

Diese widersprüchlichen Ergebnisse führten Rovira et al. (2002) auf die Verwendung verschiedener Stämme, die Virusdosis, die Passageanzahl der Viren in der Zellkultur vor Infektion, das Alter der Versuchstiere, die Eintrittspforte der Infektion und auf die Aufzucht der Versuchstiere (Feldbedingungen, gnotobiotisch, mit oder ohne Kolostrumfütterung, Geburt via Kaiserschnitt) zurück.

Tiere, die mit einer Kombination von PPV / PRRSV (porzines Reproduktives und Respiratorisches Syndrom Virus) / *Mycoplasma hyopneumoniae* / Swine Influenza Virus / *Streptococcus suis* / *Pasteurella multocida* / *Hämophilus parasuis* / *Actinobacillus pleuropneumoniae* und PCV2 infiziert wurden, zeigten deutliche PMWS-typische Läsionen (Allan et al., 2004; Kim et al., 2002; Opriessnig et al., 2004; Pallares et al., 2002; Wallgren et al., 2007).

Lediglich bei 2 % (9/484) (Pallares et al., 2002) bis 15 % (Chae, 2004) der PMWS-Fälle konnte eine alleinige PCV2-Infektion gefunden werden. Es wurden widersprüchliche Ergebnisse erhoben, ob eine gleichzeitige Immunstimulation zu einem Ausbruch an PMWS führte (Allan et al., 2004; Krakowka et al., 2001; Rose et al., 2012).

Eine Verschlimmerung der Klinik durch eine Beteiligung von schlechten Haltungsbedingungen wie Luftzug, Überbelegung und Zusammenlegung verschiedener Altersklassen wurde bereits bei den ersten Beschreibungen von PMWS diskutiert (Harding and Clark, 1997).

Mittlerweile wurde anerkannt, dass eine alleinige Infektion mit PCV2 zu PMWS führen kann und somit PCV2 das ursächliche Agent darstellt und die Henle-Koch-Postulate erfüllt werden können, aber die Läsionen durch Kofaktoren verstärkt werden (Allan et al., 2004; Kennedy et al., 2000; Krakowka et al., 2001). Jedoch ist der exakte Mechanismus, weshalb es zu einer Beeinflussung der PCV2-Infektion durch Kofaktoren kommt, bisher unklar (Opriessnig and Halbur, 2011).

## 2.7. Epidemiologie

PCV2 wurde in Nord- und Südamerika, Europa, Afrika, Asien und Australien beschrieben (Choi and Chae, 1999; Drew et al., 2004; Finlaison et al., 2007; Harding and Clark, 1997; Liu et al., 2002; Segales et al., 1997). Durch die phylogenetische Analyse der in verschiedenen Gegenden vorkommenden Virusstämme konnte z. T. eine Verwandtschaft von Virusstämmen mit denjenigen in Nachbarländern festgestellt werden. Dies ließ sich aufgrund des Ex- und Imports von Schweinen erklären (Lipej et al., 2005). Überraschenderweise gab es innerhalb gleicher geographischer Regionen aber auch deutliche Unterschiede in den Genomsequenzen (Fenaux et al., 2000; Maldonado et al., 2004).

Retrospektiv konnte bis 1970 PCV2 in England, in Deutschland bis 1962 PCV2 und bis 1985 PMWS nachgewiesen werden. In den untersuchten Schweinen wurde von 1961 bis 1984 lediglich bei 3 % (10/361) Antigen nachgewiesen. Dieser Wert stieg bei Tieren im Untersuchungszeitraum 1985 bis 1998 auf 32 % an (27/84). Die Vermutung, dass PMWS durch einen neuen oder modifizierten Virusstamm ausgelöst würde, wurde in einigen Studien durch die hohe genetische Ähnlichkeit zwischen den älteren Isolaten, bevor PMWS-Erkrankungen auftraten, und den Isolaten aus aktuell Erkrankten widerlegt (Grierson et al., 2004; Jacobsen et al., 2009). Auch Allan et al. (2002) wiesen nach, dass PCV2, das aktuell PMWS auslöst, sich bereits einige Zeit in der Schweinepopulation befand, ohne eine Erkrankung hervorzurufen. Dem widerspricht eine Arbeit von Krakowka et al. (2011). Sie fanden einen Unterschied der Sequenz zwischen dem Virus aus den Jahren 1970-1971 und dem Virus aus der heutigen Zeit in neun Basen, der für die Virulenz von PCV2 verantwortlich erscheint.

Antikörper gegen PCV1 wurden 1986 in Seren von 77 % - 95 % der untersuchten Schlachtschweine in Deutschland nachgewiesen. Circa 60 % der positiven Tiere hatten einen Titer, der ähnlich dem von experimentell infizierten Tieren 2-3 Wochen post infectionem war. Dies ließ den Rückschluss zu, dass die Tiere sich während der Mast infiziert hatten. Aber nicht nur junge Schweine wiesen

Antikörper auf. Auch 83 % der 2-3 jährigen Laborschweine waren positiv, jedoch mit niedrigeren Titern (Tischer et al., 1986).

Um die Prävalenz von PCV1 und PCV2 in Deutschland in Schweinen, die nicht an PMWS erkrankt waren, zu ermitteln, wurden Blut, Lungen- und Milzproben untersucht. PCV1 wurde zu 5 % und PCV2 zu 27 % mittels PCR im Jahre 1998 nachgewiesen (Mankertz et al., 2000a). Eine in Deutschland durchgeführte Befragung von Tierärzten ergab, dass die Anzahl an PMWS-Erkrankungen im Jahre 2003 laut 32 % der Tierärzte zugenommen hätte, laut 23 % konstant geblieben wäre und laut 45 % aufgrund der Änderungen im Management abgenommen hätte. In Regionen mit hoher Schweinedichte in Nordwestdeutschland und in intensiven Schweinehaltungen in Ostdeutschland waren weniger Schweine an PMWS erkrankt als in kleineren und weniger strukturierten Haltungen in Süd- und Mitteldeutschland sowie in Schleswig-Holstein (große Beilage and Brakmann, 2004).

Die ersten Fälle von PMWS waren in Betrieben verschiedener Größe von 50 bis 1 200 Schweinen aufgetreten (Harding and Clark, 1997). Häufig waren Betriebe betroffen, die frei von Krankheiten waren, die Darm- oder Atemwegsprobleme verursachen, wie zum Beispiel *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, Salmonellose und Schweinedysenterie (Harding and Clark, 1997).

Die Morbidität betrug 5 % - 10 % (Sorden, 2000).

Die Mortalität stieg in Betrieben auf 10 % - 25 % bei einem akuten Ausbruch an. In endemisch infizierten Herden waren die Morbidität und Mortalität geringer (Chae, 2004; Harding and Clark, 1997).

Nach dem Auftreten von PMWS kann nach Wallgren et al. (2007) ein Bestand wieder als frei betrachtet werden, wenn 4 Monate lang der Produktivitätslevel wie vor der Erkrankung erreicht wurde.

Neben Schweinen konnte auch in anderen Spezies PCV nachgewiesen werden. In einer von Tischer et al. (1995) durchgeführten Studie blieb unklar, ob die Antikörper, die im Serum von Menschen, Mäusen und Rindern gefunden worden

waren, eine Infektion mit PCV1 anzeigten, oder eine Infektion mit einem Virus vorlag, dass PCV-ähnliche Epitope aufwies. In einer Studie von Lorincz et al. (2010) wiesen Mäusen und Ratten ähnliche PCV2 Sequenzen wie untersuchte Schweine aus demselben Betrieb auf. Dadurch stellt sich die Frage, inwieweit eine Übertragung von PCV2 durch Nager erfolgt. Nayar et al. (1999) fanden in Lungen- und Abortproben von Rindern und einem Bison Viren, die eine Nukleotidhomologie von 99 % mit PCV2 aufwiesen und von den Autoren zunächst bovines Circovirus genannt wurden.

## 2.8. Porzines Circovirus 2 (PCV2) beim Wildschwein

Tischer et al. untersuchten 1986 sechs circa 8 Monate alte, in Grunewald geschossene Wildschweine auf das Vorliegen von PCV. 5 der Tiere wiesen neutralisierende Antikörper auf.

PMWS wurde das erste Mal 2003 bei einem Wildschwein in Deutschland nachgewiesen (Schulze et al., 2003). Ein 10 Monate alter Keiler mit sehr schlechtem Ernährungszustand war in Brandenburg tot aufgefunden worden.

In der Sektion fielen vergrößerte, blutig imbibierte Lymphknoten, Petechien im Lungenparenchym und ein hochgradiges alveoläres Ödem auf.

Bei der histologischen Untersuchung konnte in den Lymphknoten eine lymphatische Depletion, Histiozytose, Bildung synzytialer Zellen, eine purulente Lymphadenitis, Blutresorption und Nekrosen diagnostiziert werden. In der Milz wies die rote Pulpa eine hochgradige pulpöse Hyperplasie und die weiße Pulpa eine lymphatische Depletion auf. In der Lunge waren Kapillarthromben, eine fibrinöse Pneumonie, eine Lymphozytendepletion im BALT und in der Leber Nekrosen vorhanden.

Die Immunfluoreszenzmikroskopie, bei der ein Antiserum gegen PCV verwendet wurde, ergab flächenhaft Fluoreszenzen, besonders in histiozytären Zellen im Bereich der Lymphfollikel. Eine PCR bestätigte die Infektion mit PCV2.

Die Läsionen entsprachen denen bei Hausschweinen. Ungewöhnlich war jedoch das hohe Alter des Wildscheins. Da keine klinischen Daten vorlagen, wurde die Diagnose PMWS nur auf Grundlage der pathologischen Untersuchung und des Virusnachweises gestellt.

Bei der bakteriologischen Untersuchung des Keilers konnte *Salmonella choleraesuis* var. Kunzendorf nachgewiesen werden. Dies ist eine Infektion, die nach Schulze et al. (2003, 2004) selten bei Wildschweinen vorkommt. Eventuell diente diese Erkrankung als auslösender Faktor.

Während der Jagdsaison 2003/2004 wurden 238 Milzproben von Wildschweine aus Hessen und Rheinland-Pfalz von Knell et al. (2005a, b) beprobt und mittels PCR untersucht. 62 % (147/238) der Tiere wiesen weder eine Infektion mit PCV1 noch mit PCV2 auf. 20 % (48/238) waren mit PCV1, 16 % (39/238) mit PCV2 und 2 % (4/238) mit PCV1 und PCV2 infiziert.

Da vor allem jüngere Tiere betroffen waren, wurde eine höhere Empfindlichkeit jüngerer Tiere gegenüber einer Infektion vermutet.

Die komplette Nukleotidsequenzanalyse des PCV2 eines Tieres ergab eine Genomlänge von 1767 Nukleotiden. Damit wies diese im Vergleich mit den meisten anderen PCV2-Sequenzen ein Nukleotid weniger auf. Die höchste Übereinstimmung gab es mit einer PCV2-Sequenz aus China.

Mittels PCR konnte in Österreich, Ungarn, Slowenien und Rumänien PCV2 bei Wildschweinen nachgewiesen werden. Es wurden keine pathologisch-histologischen Untersuchungen durchgeführt (Cadaru et al., 2010; Csagola et al., 2006; Exel et al., 2004; Toplak et al., 2004).

In Österreich wurden Mesenteriallymphknoten von 28 Wildschweinen auf das Vorliegen von PCV1, PCV2 und PPV untersucht. 3 Tiere wiesen PCV1, 13 Tiere PCV2 und 25 Tiere PPV auf. Die Tiere zeigten keine PMWS-typischen makroskopischen Veränderungen (Exel et al., 2004).

In Ungarn wurden 307 Tiere untersucht, von denen 21 % PCV2-positiv waren. Die Genome waren 1767 bis 1768 Basenpaare lang (Csagola et al., 2006).

Die slowenische Studie ergab, dass von 32 untersuchten Milzproben 8 PCV2-positiv waren. Darunter befanden sich 5 junge Tiere mit einem Körpergewicht von 12-28 kg und 3 ältere Tiere, 1-2 Jahre alt, 58 kg, 62 kg und 92 kg wiegend. Eine Befragung der Jäger bezüglich zuvor bemerkter klinischer Anzeichen ergab kein Ergebnis.

Der Nukleotidvergleich ergab, dass die in den Wildschweinen isolierten Stämme von PCV2 verwandt mit PCV2-Stämmen von Hausschweinen aus verschiedenen Kontinenten waren (Toplak et al., 2004).

Im Vergleich zu Ungarn und Slowenien konnte in Rumänien in 469 Proben nur bei 14 % der Wildschweine PCV2 nachgewiesen werden (Cadaru et al., 2010).

2003 untersuchten Ellis et al. in Gattern (mit Management wie z. B. Antibiotikagabe) lebende Wildschweine in Kanada. Die Klinik und die Pathologie der erkrankten Tiere glich der erkrankter Hausschweine. PCV2 wurde mit Hilfe von IHC und PCR nachgewiesen.

Acht ebenfalls in Gattern (mit Management wie z. B. Impfung) lebende Wildschweine waren in Kroatien tot aufgefunden worden. In alle acht Tiere konnte mittels PCR PCV2-Virusgenom nachgewiesen werden. Ein Tier zeigte darüber hinaus Läsionen, so dass es als PMWS-erkrankt bewertet wurde. Bemerkenswert war, dass 7 von 8 Tieren mit *Salmonella choleraesuis*, wie schon von Schulze et al. (2003) beschrieben, infiziert waren (Lipej et al., 2007).

Ein weiteres an PMWS erkranktes Wildschwein wurde in einer spanischen Studie aus dem Jahre 2004 beschrieben (Vicente et al., 2004).

Von 656 in Spanien gejagten Tieren wiesen 48 % PCV2-Antikörper im Serum auf. Es waren keine Zusammenhänge mit dem Geschlecht oder dem Alter, jedoch mit den Managementbedingungen zu finden. 56 Tiere, von denen eines im Alter von 6 Monaten abgemagert und tot aufgefunden worden war, wurden histologisch und mittels ISH (In situ-Hybridisierung) untersucht. Das tot aufgefundene Wildschwein stammte aus einem Betrieb mit intensivem Management und zeigte Lymphozytendepletion sowie Histiozyteninfiltration im lymphatischen Gewebe. Das Virusgenom konnte vor allem im Zytoplasma von Makrophagen im Lymphknoten, Milz, Lunge und Leber in großer Menge nachgewiesen werden.

Zwei weitere Tiere wiesen PCV2-Nukleinsäuren nur in Lymphknoten auf, die restlichen 53 Wildschweine waren in der ISH negativ (Vicente et al., 2004).

Tiere, die unter farmähnlichen Bedingungen lebten, wiesen höhere Titer auf, als frei lebende Tiere (Vicente et al., 2004).

Dies wurde auch von Ruiz-Fons et al. (2006) bestätigt. Antikörper gegen PCV2 konnten in 58 % (n = 215) der Tiere aus umzäunten und in 28 % (n = 57) der Tiere aus offenen Ländereien diagnostiziert werden.

Ein ähnliches Ergebnis weist eine spanische Untersuchung der Sera von 818 Wildschweinen auf. Auch hier bestand ein signifikanter Unterschied zwischen

Tieren, die aus umzäunten Gebieten stammten (56 % PCV2-Antigen positiv) und Tieren, die aus freier Wildbahn stammten (29 % PCV2-Antigen positiv) (Boadella et al., 2011).

Ein männliches Wildschwein war moribund mit Abmagerung und Dyspnoe in Griechenland aufgefunden worden. Das Tier wies bei der histologischen Untersuchung eine Lymphozytendepletion, eine Histiozytose und Riesenzellen in Lymphknoten auf. Zudem fanden sich eine interstitielle Pneumonie, eine interstitielle Nephritis, mononukleäre periportale Infiltrate und eine Fibrose in der Leber sowie eine gering- bis mittelgradige fokale interstitielle Myokarditis. PCV2-DNA konnte in Lunge, Herz, Darm und Lymphknoten nachgewiesen werden. Das Tier wurde aufgrund der Summe der Befunde als erkrankt an PMWS eingestuft. Drei Jahre zuvor war ein tragendes Wildschwein ebenfalls in Griechenland tot aufgefunden worden. Dieses zeigte in der Milz, der Lunge und der Leber histologische Läsionen, die auf eine Erkrankung an PMWS hindeuten. Dies wurde durch den Nachweis von PCV2-DNA im Gewebe unterstützt. Sogar im Uterus konnte das Virus nachgewiesen werden, wobei PCV2-DNA nicht in den Feten vorkam. Das Tier wurde aufgrund der histologischen Befunde und des Nachweises von PCV2 im Gewebe als an PMWS erkrankt gewertet (Sofia et al., 2008).

In Italien konnte von 16 Wildschweinen mittels PCR in 7 Tieren PCV2 nachgewiesen werden. In einem dieser Tiere waren gegen PCV2 gerichtete Antikörper mittels IHC nachweisbar. Dieses Tier zeigte blasse und vergrößerte Bronchiallymphknoten. Die histologische Untersuchung ergab Koagulationsnekrosen in der Tonsille und eine granulomatöse Entzündung in den Bronchiallymphknoten (Petrini et al., 2009).

Eine amerikanische Studie von Corn et al. (2009) wies mittels ELISA sowohl in Nord (29/49) als auch Süd Carolina (86/120) Antikörper gegen PCV2 in Wildschweinen nach. Aufgrund der Ergebnisse wurde eine Übertragung von intensiv gehaltenen Tieren auf freilebende Wildschweine vermutet.

In Brasilien zeigten 47 von 78 untersuchten Wildschweinen klinische Symptome sowie makroskopische und histologische Befunde, die charakteristisch für eine Infektion mit PCV2 sind. Mittels Immunhistologie wurde in 29 Tieren PCV2-Antigen nachgewiesen (Borba et al., 2011).

---

## 2.9. PCVAD (PCV-assoziierte Krankheitsbilder)

PMWS ist nicht die einzige Erkrankung, die mit einer Infektion mit PCV2 assoziiert werden kann. Daher wurden von der American Association of Swine Veterinarians die Oberbegriffe PCVD (in Europa: PCV-diseases) / PCVAD (in Amerika: PCV-associated diseases) eingeführt, die PMWS, PDNS (porzines Dermatitis und Nephropathie Syndrom) und Reproduktionsstörungen sowie Erkrankungen der Atemwege und des Darmtrakts zusammenfassen.

Entgegen der Vermutung, dass für die verschiedenen PCV-assoziierten Krankheitsbilder unterschiedliche PCV2-Typen verantwortlich sind, konnte eine hohe Homologie der verschiedenen isolierten Genome von über 90 % festgestellt werden (Chae, 2005).

Neben PMWS wird derzeit bei folgenden Erkrankungen ebenfalls eine Beteiligung von PCV2 diskutiert:

### 2.9.1. Porzines Dermatitis und Nephropathie Syndrom (PDNS)

Tiere im Alter von 1,5 bis 4 Monate zeigen multifokale, 1-20 mm im Durchmesser große bis konfluierende, gut umschriebene, leicht erhabene, dunkelrote Hautläsionen. Der klinische Verlauf wird durch Fieber, Appetitlosigkeit und Gewichtsverlust geprägt. Neben den Hautläsionen kann in der Sektion eine Vergrößerung der Nieren mit roten, 2-4 mm großen Herden in der helleren Rinde sowie eine Vergrößerung der Nieren- und Inguinallymphknoten festgestellt werden. Die charakteristischen histologischen Befunde sind eine hochgradige nekrotisierende Vaskulitis der Haut und Nieren mit einer exsudativen Glomerulonephritis. Die histologischen Läsionen sind charakteristisch für eine Typ 3-Hypersensitivität durch eine Ablagerung von Immunkomplexen in die Wand der Glomerula und Gefäße. Die Mortalität kann bis zu 20 % betragen (Chae, 2005; Harding, 2004).

### **2.9.2. Porcine Respiratory Disease Complex (PRDC)**

Immer häufiger wurde in Schweine, bei denen eine Pneumonie vorlag, porcine Circoviren nachgewiesen. Mit 22 % war PCV2 der zweithäufigste virale Erreger nach PRRSV und vor Swine Influenza Virus im Jahre 2000. Erkrankte Schweine im Alter von 16-22 Wochen zeigten verzögertes Wachstum, Appetitlosigkeit, Fieber, Husten und Dyspnoe. Histologisch konnten eine peribronchiale und peribronchioläre Fibrose sowie eine Infiltration der Alveolarsepten mit Makrophagen, Lymphozyten und Plasmazellen festgestellt werden. Weiterhin lag eine Hypertrophie der Typ 2-Pneumozyten vor. In den Alveolarräumen befand sich reichlich Zelldetritus. Aufgrund der Überlappung der histologischen Befunde bei PMWS und PRDC ist der Lungenbefund alleine nicht aussagekräftig. Bei zusätzlichem Auftreten von Läsionen in den lymphatischen Organen wurde PMWS diagnostiziert. Waren die lymphatischen Gewebe unauffällig, wurde PRDC diagnostiziert (Chae, 2005; Harms et al., 2002). Meist lagen Koinfektionen von PCV2, PRRSV, Swine Influenza Virus, *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Actinobacillus pleuropneumoniae* und *Pasteurella multocida* vor (Chae, 2005).

### **2.9.3. Enteritis**

40-70 Tage alte Schweine, die an einer mit PCV2 assoziierten Enteritis erkrankt waren, zeigten Durchfall, der anfänglich gelblich gefärbt war und im Verlauf der Erkrankung schwarz wurde. Es konnte vor allem in Ileum und Colon eine nekrotisierende Enteritis diagnostiziert werden (Jensen et al., 2006). Es lag im Darm eine granulomatöse Enteritis mit Lymphozytendepletion in den Peyer-Plaques vor. Neben mehrkernigen Riesenzellen konnten intrazytoplasmatische Einschlusskörperchen in Makrophagen und MRZ gesehen werden. Zur Abgrenzung von der Differentialdiagnose proliferative Enteritis (*Lawsonia intracellularis*) diente der Nachweis PCV2-Antigen-positiver Zellen in der Submukosa, der Lamina propria, in dem Kryptepithel und den Lymphfollikeln (Chae, 2005; Jensen et al., 2006; Kim et al., 2004a).

#### **2.9.4. PCV2-assoziierte Reproduktionsstörungen**

Vertikale Infektionen sind über Plazenta und Sperma möglich. Es können Mumifikation, embryonaler Tod und Aborte sowohl in der Mitte der Trächtigkeit als auch am Ende auftreten. Zum Teil wurden Pneumonien und im Herzen Degeneration oder Nekrose des Myokards mit Ödem, Fibrose und Infiltration mit mononukleären Entzündungszellen diagnostiziert. Jedoch treten nicht immer Läsionen auf. Da PCV2 bei klinisch unauffälligen Tieren vorkommt, die nicht an PMWS erkranken, ist es unklar, inwieweit der alleinige Nachweis von PCV2 in abortierten Ferkeln als Abortursache zu werten ist (Chae, 2005; Gava et al., 2008; Harding, 2004).

#### **2.9.5. Kongenitaler Tremor**

Eine Demyelinisierung im Gehirn und im Rückenmark führt bei Ferkeln zu klonischen Krämpfen und durch die Unfähigkeit zu saugen zum Tod. Bei Tieren mit kongenitalem Tremor wurde in vielen Neuronen in Gehirn und Rückenmark PCV2 nachgewiesen (Chae, 2005; Harding, 2004).

Für Chae (2005) blieb jedoch unklar, ob PCV2 das klinische Bild des kongenitalen Tremors auslöst .

---

## 2.10. Nachweismethoden

Der Nachweis von DNA, Antigen, Antikörpern oder Viruspartikeln von bzw. gegen PCV2 kann mittels Polymerase chain reaction (PCR), In situ-Hybridisierung (ISH), Enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA), Virusisolation, Elektronenmikroskopie oder Immunhistologie (IHC) erfolgen.

Bei einem Vergleich der IHC und der ISH wies erstere nach McNeilly et al. (1999) eine größere Anzahl an positiven Zellen und ein stärkeres Signal auf. Zu einem ähnlichen Ergebnis gelangte eine polnische Studie, die eine höhere Sensitivität und Spezifität der IHC im Vergleich zu der ISH ergab (Szczołka et al., 2011). Wohingegen Kim et al. (2009; 2004) eine höhere Sensitivität bei der ISH feststellten. Es wurde diskutiert, dass die PCR sensitiver als die IHC oder die ISH sei. Dies lag nach Meinung der Autoren darin begründet, dass für die PCR das Virusgenom aus einer größeren Menge Gewebe isoliert wurde und damit mehr Gewebe untersucht wurde als bei einem ca. 5 µm dicken Paraffinschnitt in der IHC oder ISH (Calsamiglia et al., 2002; Kim and Chae, 2004). Jedoch korrelierte die ISH besser mit dem Auftreten charakteristischer histologischer Läsionen. Daher sei die ISH die bessere Nachweismethode im Vergleich zur PCR, um Erkrankungen an PMWS zu diagnostizieren (Calsamiglia et al., 2002). Ebenso wiesen Chae (2004) und Grierson et al. (2004) darauf hin, dass auch der Antigennachweis mittels IHC der PCR überlegen sei, da die PCR jede Infektion mit PCV2 und damit auch subklinische Infektionen erfasse.

### 2.10.1. Virusisolation

Bei Inokulationen von tierischen Zellkulturen mit porcine Circovirus konnten keine zytopathogenen Effekte nachgewiesen werden. Es war möglich, das Virus in permanenten Nierenzelllinien und in Zellkulturen von Makrophagen aus verschiedenen Ursprungsgeweben, aber nicht in Zellkulturen aus B- oder T-Lymphozyten vom Schwein zu replizieren. Auch Zellkulturen von Makrophagen aus Rindern, aber nicht von Schafen, konnte das Virus infizieren (Allan et al.,

1994; Tischer et al., 1982). Eine Studie mit humanen Zellkulturen ergab, dass porcine Circoviren verschiedene Zellkulturen infizieren konnten. PCV1 rief dabei im Gegensatz zu PCV2 keinen zytopathogenen Effekt hervor (Hattermann et al., 2004).

### **2.10.2. Elektronenmikroskopie**

In der elektronenmikroskopischen Untersuchung konnten 15-17 nm große unbehüllte Viruspartikel gesehen werden (Allan et al., 1998; Ellis et al., 1998).

Stevenson et al. (1999) unterschieden im Zytoplasma von PK-15 infizierten Nierenzellen 0,5 bis 5,0 µm große, scharf begrenzte, elektronendichte Einschlüsse und kleine 0,1 bis 0,5 µm große, undeutlich begrenzte Einschlüsse. Im Nukleus lagen 0,1 bis 1,0 µm und 10-12 nm große, nicht membrangebundene Einschlüsse vor.

### **2.10.3. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)**

Mittels ELISA konnten sowohl Antikörper als auch Antigene von Tieren in Amerika und Europa nachgewiesen werden (McNeilly et al., 2001; Walker et al., 2000). Bolin et al. (2001) und Nawagitgul et al. (2002) fanden 14 bzw. 21 Tage nach einer Infektion PCV2-Antikörper. Truong et al. (2001) konnten 6 und 11 Wochen nach der Inokulation bei spezifisch pathogenfreien Schweinen PCV2-Antikörper in 22 % bzw. 100 % der Tiere nachweisen.

### **2.10.4. Polymerase chain reaction (PCR)**

Durch die Anwendung verschiedener Primer besteht die Möglichkeit, Nukleinsäure von PCV1 oder PCV2 oder beiden gleichzeitig nachzuweisen. Dies gelang mit DNA, die aus lymphatischem Gewebe (Tonsille, Thymus, Peyer-Plaques, Milz, Mesenterial-, Inguinal-, Bronchial- und Mediastinallymphknoten) und nicht-lymphoidem Gewebe (Lunge, Sperma, Myokard, Niere, Leber, Glutealmuskulatur,

Serum, Kot) gewonnen wurde (Hamel et al., 2000; McIntosh et al., 2009; Quintana et al., 2001). Mittels quantitativer Real-time-PCR kann die Virusmenge bestimmt werden. Dabei fiel auf, dass in Tieren, die an PMWS erkrankt waren, signifikant höhere Werte an viraler DNA nachgewiesen werden konnten, als in gesunden Tieren (Liu et al., 2000; McIntosh et al., 2009). Höhere PCV2-Mengen korrelierten mit stärkeren histologischen Läsionen, mit der Menge an nachgewiesenem Virusgenom in der ISH und dem Auftreten von klinischen Erkrankungen.

Durch den Vergleich verschiedener Arbeiten wurde ein Schwellenwert für die Diagnosestellung „PMWS“ von  $10^7$  PCV2-Genomen/ml Serum postuliert. Bei Tieren mit einer Infektion mit PCV2 oder PCV2 und PRRSV (porzines Reproduktives und Respiratorisches Syndrom Virus) wiesen letztere mit  $10^6$  bis  $10^9$  eine signifikant höhere PCV2-Kopienanzahl/ml Serum auf (Brunborg et al., 2004; Harding et al., 2008; Olvera et al., 2004; Rovira et al., 2002).

Es wiesen allerdings auch einige gesunde Schweine Werte wie die erkrankten Ferkel auf. Dies interpretierten die Autoren dahingehend, dass PCV2 für eine Erkrankung an PMWS zwar erforderlich, aber nicht alleine ausreichend war (Liu et al., 2000).

#### **2.10.5. In situ-Hybridisierung (ISH)**

Mittels geeigneter Sonden konnte das Virusgenom im Gewebe nachgewiesen werden. Ein positives Signal konnte in Histiozyten, lymphozytenähnlichen Zellen, mehrkernigen Riesenzellen, Enterozyten, Kupfferzellen, Hepatozyten, Entzündungszellen, Endothelzellen von Herzkapillaren sowie Epithelzellen der Nierentubuli und des Pankreas gefunden werden (Choi and Chae, 1999; Kim and Chae, 2003; Morozov et al., 1998; Rosell et al., 1999; Rosell et al., 2000).

Die betroffenen Gewebe waren lymphatische Gewebe, Leber, Herz, Lunge, Nasenmuschel, Niere, Pankreas, Darm, Knochenmark und Nebenniere (Choi and Chae, 1999; Morozov et al., 1998; Rosell et al., 1999).

Da PCV eine einzelsträngige DNA aufweisen, sind DNA-Sonden sicherer als RNA-Sonden (Choi and Chae, 1999).

Eine antisense RNA-Sonde führte zu einer Anfärbung des Kernes, des Zytoplasmas oder von beidem. Eine Sense-RNA-Sonde ergab lediglich ein Signal im Kern der infizierten Zelle (Morozov et al., 1998). Ein stärkeres Signal mit der Antisense-Sonde lies sich erklären, da diese mit der doppelsträngigen Replikationsform der DNA, der mRNA und der einzelsträngigen DNA reagiert, wohingegen die Sense-Sonde nur an die doppelsträngigen Replikationsform der DNA binden kann (Nawagitgul et al., 2000b).

### **2.10.6. Immunhistologie**

Die Immunhistologie ermöglicht den Nachweis des Vorkommens von PCV2-Antigen und gleichzeitig dessen genaue Lokalisation im Gewebe.

Das Antigen war mittels direkter Immunfluoreszenz vor allem in Histiozyten und Riesenzellen in verschiedenen Geweben nachweisbar. Da das Virus nicht in der Lage war, die Kernmembran zu durchwandern und erst mit Abschluss der Mitose in den Zellkern eindrang und sich folglich Antigen im Zytoplasma ansammelte, war eine Markierung vor allem im Zytoplasma und nur selten im Kern vorhanden (Rosell et al., 1999).

Gelegentlich war das Antigen auch in Lymphozyten nachweisbar. In der Lunge konnten die mononukleären Zellen im Interstitium, die Entzündungszellen in den Bronchien und Alveolen, das respiratorische Epithel und selten die glatten Muskelzellen ebenfalls ein Signal aufweisen. Auch in den glatten Muskelzellen der Milztrabekel, den Hepatozyten, den Gallengangsepithelzellen, den Kupfferzellen, den Epithelzellen der Nierentubuli, den mononukleären Entzündungszellen in der Niere und in den glatte Muskelzellen der Arteriolen in der Nierenrinde war das Antigen nachweisbar. Weiterhin konnte das Antigen in dem Drüsen- und Gangepithel des Pankreas, in der Nebenniere und gelegentlich im Epithel von Darmzotten vorkommen (Chianini et al., 2003; McNeilly et al., 1999; Rosell et al., 1999).

In den Lymphknoten war die Färbeintensität am stärksten im Vergleich zu anderen Geweben wie Lunge, Herz, Tonsille, Thymus, Milz, Darm, Leber, Niere und Pankreas (Kim and Chae, 2004). Weiterhin erfolgte im Gegensatz zu

Lymphgewebe, in dem das Antigen stets zu finden war, erst in späteren Erkrankungsstadien ein Nachweis in Lunge, Leber und Niere.

Mit Ausnahme des Nierengewebes konnte eine Korrelation zwischen der Intensität des PCV2-Nachweises und der Schwere der histologischen Veränderungen festgestellt werden (Becskei et al., 2010; Chianini et al., 2003; Rosell et al., 1999; Sarli et al., 2008).

Im Gegensatz zur direkten Immunfluoreszenz, bei der sich Fluoreszenz-markierte Antikörper direkt an das PCV-Antigen binden, verwandten Allan et al. (1998; 1999) in einer Studie indirekte Immunfluoreszenztests. Die Verwendung eines monoklonalen Antikörpers für den Nachweis von Isolaten aus erkrankten Schweinen aus Amerika und gleichzeitig aus Frankreich war zunächst nicht möglich. Ein Jahr später beschrieben die Autoren die Verwendung eines weiteren indirekten Immunfluoreszenztestes. Dabei reagierte das Antiserum, das gegen ein PCV2-Isolat eines kanadischen Tiers gerichtet war, ebenso mit Isolaten aus erkrankten europäischen Tieren. Eine Unterscheidung zwischen PCV1 und PCV2 war ebenfalls möglich. Es konnte kein Unterschied zwischen der Verwendung von monoklonalen Antikörpern oder polyklonalen Antiseren festgestellt werden.

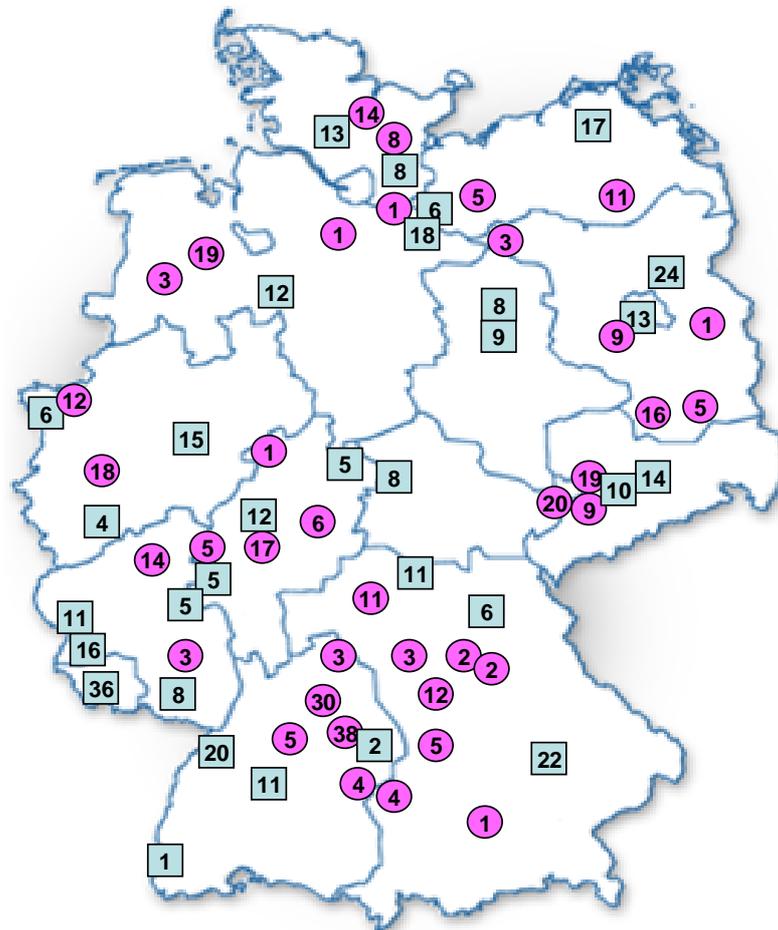
## **3. Material und Methoden**

### **3.1. Untersuchungsmaterial**

#### **3.1.1. Wildschweine**

Deutschlandweit (mit Ausnahme der Stadtstaaten Hamburg und Bremen) wurden während den Jagdsaisons 2004/05 und 2006/07 bei 37 Jagden insgesamt 356 Wildschweine beprobt (siehe Abbildung 1). Die Zuordnung vom Aufbruch zum Stück wurde bei nicht-zentralem Aufbruch sichergestellt durch Ohrmarken am Schwein sowie entsprechend markierte Tüten, die den Jägern vorher ausgehändigt worden waren.

Gewicht, Alter (siehe Tabelle 1) und Geschlecht der Tiere wurden ermittelt. Die entsprechenden Organgewebe wurde mit sterilen Einmalskalpellen und Einmalhandschuhen 30 bis 120 Minuten nach Tötung entnommen. Für die pathohistologische Untersuchung lagen von den 186 Tieren aus der ersten Jagdsaison die Bronchiallymphknoten in 10 %igem Formalin fixiert vor. Soweit möglich wurde von jedem der 170 Schweine aus den Jagden 2006/07 Proben der Milz, der Tonsillen, aus dem dorsalen Bereich der Hauptlappen der Lunge, der Mesenterial- und der Bronchiallymphknoten in neutralem, gepuffertem Formalin (s. Anhang 9.1.) für die pathohistologische und gefroren für die molekularbiologische Untersuchung gelagert (siehe Tabelle 2).



**Abbildung 1:** Verteilung der untersuchten Tiere in Deutschland;

Anzahl der beprobten Hausschweine (●)

Anzahl der beprobten Wildschweine (■)

**Tabelle 1:** Zahnaltersschätzung der Wildschweine nach Stubbe (2001; 2004)

Alter in Monaten	Beschreibung
< 1	i3 und c im UK und OK vorhanden
1	p4 durch Zahnfleisch durchgebrochen
2	i1 voll entwickelt
3	p3 voll entwickelt, M1 Durchbruch
4	i2 voll entwickelt
5	P1 im Zahnfleisch ertastbar
6	M1 als Dauerzahn
7	c oder i3 wackelt
8	i3 ausgefallen
9	c ausgefallen
10	I3 voll entwickelt, M2 im Zahnfleisch ertastbar, P1 als Dauerzahn
11	M2 durch Zahnfleisch durchgebrochen
12	C als Dauerzahn
13	i1 wackelt
14	i1 ausgefallen
15	I1 voll entwickelt , p2-4 ausgefallen
16	P4 hat mindestens die halbe Höhe des M1 erreicht

(Fortsetzung und Legende s. nächste Seite)

**Tabelle 1** (Fortsetzung): Zahnaltersschätzung der Wildschweine

<b>Alter in Monaten</b>	<b>Beschreibung</b>
17	P2-4 voll entwickelt
19	i2 wackelt, M3 im Zahnfleisch tastbar
20	i2 ausgefallen
21	I2 voll entwickelt
24	M1 beginnt flächige Zahnabnutzung im OK und UK
26	M3 durchgebrochen
30	M3 als Dauerzahn
36	M2 Beginn der flächigen Abnutzung im UK
48	M1 flächige Abnutzung im UK
60	M2 im OK und M3 im UK beginnt flächige Abnutzung
72	M1 im OK flächig abgenutzt
84	M2 im UK flächige Abnutzung
96	M2 im OK flächig abgenutzt, M3 im OK beginnt flächige Abnutzung
108	M3 im UK flächig abgenutzt

Großbuchstaben: Dauerzähne; Kleinbuchstaben: Milchzähne; i/I: Dentes incisivi (Schneidezähne); c/C: Dentes canini (Eckzähne); p/P: Dentes praemolares (vordere Backenzähne); m/M: Dentes molares (hintere Backenzähne), OK: Oberkiefer, UK: Unterkiefer

**Tabelle 2:** Probenanzahl von Wild- und Hausschweinen für die pathohistologische und immunhistologische Untersuchung

	<b>Lunge</b>	<b>Milz</b>	<b>Tonsillen</b>	<b>MesLk</b>	<b>BroLk</b>
<b>Wildschweine</b>	164	168	130	162	298
<b>Hausschweine</b>	338	338	324	337	324

MesLk: Mesenteriallymphknoten; BroLk: Bronchiallymphknoten

### 3.1.2. Hausschweine

340 Hausschweine wurden an den Schlachthöfen Andernach, Giessen, Köln, Kupferzell und Würzburg untersucht. Die Herkunft und Stückzahl der Tiere ist in Abbildung 1 dargestellt. Für jedes Tier wurden ein steriles Einmalskalpell und ein neues Paar Einmalhandschuhe zur Probengewinnung benutzt. Aufgrund der Zahnaltersschätzung nach Dyce et al. (1991) und Nickel et al. (1999) wurde das Alter der Schweine beurteilt (siehe Tabelle 3). Das Schlachtgewicht wurde entweder an einer Waage am Schlachtband direkt ermittelt oder im Rahmen der Schlachtdaten vom Schlachthof zur Verfügung gestellt.

Es wurden sowohl Tiere, die zum menschlichen Verzehr geeignet waren ( $n = 309$ ), als auch Tiere beprobt, die bei der Schlachtieruntersuchung ein Schlachtverbot erhalten hatten ( $n = 31$ ). Soweit möglich wurden von den Hausschweinen Proben der Milz, der Tonsillen, aus dem dorsalen Bereich der Hauptlappen der Lunge, der Mesenterial- und der Bronchiallymphknoten entnommen und in neutralem, gepuffertem Formalin (s. Anhang 9.1.) für die pathohistologische und gefroren für die molekularbiologische Untersuchung gelagert (siehe Tabelle 2).

**Tabelle 3:** Zahnaltersschätzung der Hausschweine nach Dyce et al. (1991) und Nickel et al. (1999)

Alter in Monaten	Zahnformel Unterkiefer
0 (Geburt)	i3, c durchgebrochen
1	i1, p3, p4 durchgebrochen
2	p2 durchgebrochen
3	i2 durchgebrochen
4	P1 durchgebrochen
6	M1 durchgebrochen

Großbuchstaben: Dauerzähne; Kleinbuchstaben: Milchzähne; i/I: Dentes incisivi (Schneidezähne); c/C: Dentes canini (Eckzähne); p/P: Dentes praemolares (vordere Backenzähne);

## **3.2. Histopathologische Untersuchung**

### **3.2.1. Durchführung der histopathologischen Untersuchung**

Die Proben wurden in 10 %igem Formalin fixiert. Zwischen 24 und 72 Stunden nach Fixationsbeginn wurden die Proben in einem Einbettungsautomaten (Autotechnikon, Miles Scientific, Illinois, USA) in Paraffin überführt.

Für die lichtmikroskopische Untersuchung wurden von den in Paraffin eingebetteten Proben 3 µm dicke Schnitte am Mikrotom angefertigt und auf Objektträger (StarFrost, Engelbrecht) aufgezogen.

Die Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung wurde in einer automatischen Färbekbank (Shandon Varstan 24-3, Shandon Southern Products, Runcorn, UK) vorgenommen. Die Eindeckung unter Folie erfolgte in einem Eindeckautomaten (Tissue Tec<sup>®</sup>; Vogel GmbH, Giessen, Modell 4756).

### **3.2.2. Beurteilung der HE-Färbung**

Die lymphatischen Gewebe wurden am HE-Schnitt auf das Vorhandensein von eosinophilen Granulozyten, mehrkernigen Riesenzellen, Lymphfollikeln sowie Mitose- und Apoptosefiguren untersucht. Weiterhin wurde der Gehalt an Lymphozyten und Histozyten bewertet. In der Lunge wurde befundet, ob Interstitien, Alveolarräume oder Bronchien Entzündungszellen aufwiesen. Weiterhin wurden Apoptose- und Mitosefiguren, Befall mit Lungenwürmern, mehrkernige Riesenzellen und Atelektasen erfasst.

### **3.3. Immunhistologie**

#### **3.3.1 Durchführung der Immunhistologie**

Nach Fixation in 10 %igem Formalin und Überführung in Paraffin wurden für die immunhistologische Untersuchung 3 µm dicke Schnitte am Mikrotom angefertigt, auf SuperFrost® Plus Objektträger aufgezogen und bei Raumtemperatur getrocknet.

#### **3.3.2. Seren und Antiseren**

##### **3.3.2.1. Pferdeserum**

Von gesunden Pferden wurde Vollblut gewonnen und nach einer Standzeit von zwei bis vier Stunden bei Raumtemperatur für 10 Minuten bei 1500 x g zentrifugiert. Anschließend wurde das Serum filtriert, portioniert und bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

##### **3.3.2.2. Antiseren**

###### **3.3.2.2.1. Primärantikörper**

Als primärer Antikörper fand ein kommerzieller monoklonaler Antikörper aus der Maus Verwendung. Dieser war PCV2-spezifisch und richtete sich gegen das von ORF2 kodierte Protein (Ingenasa, Madrid, Spanien (36A9)).

###### **3.3.2.2.2. Sekundärantikörper**

Für die Streptavidin-Biotin-Methode wurde als biotinmarkierter Sekundärantikörper ein kommerziell erhältlicher biotinylierter Pferd anti-Maus-Antikörper (Vector Laboratories, Burlingame, Kalifornien, USA (BA-2000)) eingesetzt.

### **3.3.2.2.3. Streptavidin Horseradish Peroxidase**

Zur Visualisierung gebundener Antikörper wurde Streptavidin Horseradish Peroxidase (HRP) Conjugate (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, 43-4323) verwendet.

### **3.3.3. Durchführung der immunhistologischen Untersuchung**

1. Aufziehen der Paraffinschnitte auf SuperFrost<sup>®</sup> Plus Objektträger und Trocknung mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur
2. Entparaffinieren der Schnitte dreimal für jeweils 10 Minuten in Xylol-Ersatz (Roti-Histol<sup>®</sup>), danach Entfernung des Xylol-Ersatzes durch dreimaliges Spülen in Isopropanol und je einmaliges Spülen für jeweils 3 Minuten in 96 %igem und in 80 %igem Alkohol
3. Hemmung der endogenen Peroxidase mittels Methanol mit frisch zugesetztem 0,5 % Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) für 30 Minuten bei Raumtemperatur
4. Zweimaliges Waschen der Schnitte für jeweils 5 Minuten in Tris-buffered saline (TBS) (pH 7,8; s. Anhang 9.1.)
5. Verbringen der Schnitte auf Coverplates und Fixierung der Coverplates in der Halterung
6. Spülen der Schnitte für 5 Minuten in TBS
7. Inkubation der Schnitte mit unverdünntem Pferdeserum für 60 Minuten bei Raumtemperatur

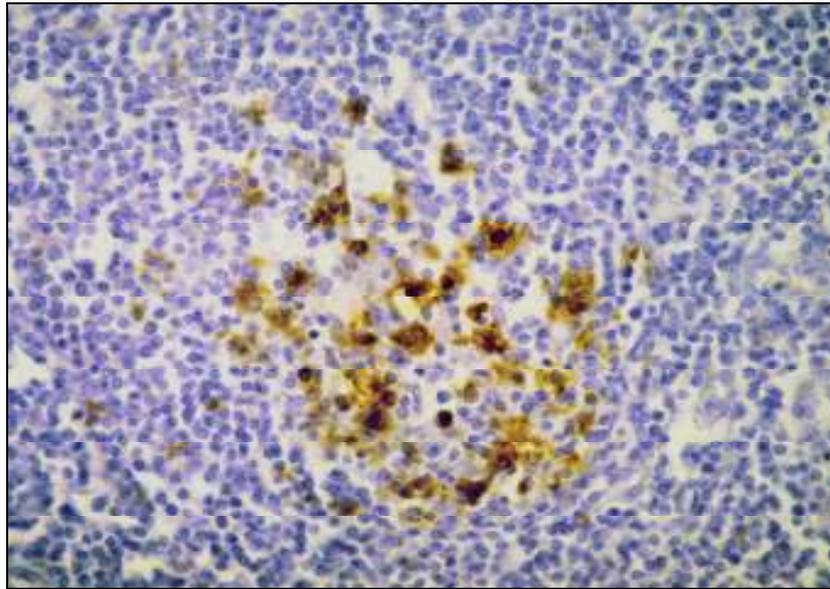
8. Auftrag des primären Antikörpers 1:500 verdünnt in TBS mit 1 % bovinem Serumalbumin (Jackson Immuno Research, West Grove, USA, 001-000-162) oder Auftrag von TBS mit 1 % bovinem Serumalbumin (Negativkontrollschnitte) und Inkubation bei 4 °C für 12 bis 18 Stunden
9. Dreimaliges Spülen der Schnitte für jeweils 5 Minuten in TBS
10. Auftrag des sekundären Antikörpers (9 µl Sekundärantikörper auf 1000 µl TBS) und Inkubation für 30 Minuten bei Raumtemperatur
11. Dreimaliges Spülen der Schnitte für jeweils 5 Minuten in TBS
12. Auftrag des Streptavidin-HRP 1:500 verdünnt in TBS und Inkubation für 30 Minuten bei Raumtemperatur
13. Zweimaliges Spülen der Schnitte für jeweils 5 Minuten in TBS
14. Entnahme der Objektträger aus den Coverplates und Spülen in einer mit TBS gefüllten Küvette für 5 Minuten
15. Inkubation der Schnitte für 10 Minuten bei Raumtemperatur in 3,3'-Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid-Lösung (s. Anhang 9.1.) unter ständigem Rühren
16. Dreimaliges Spülen in TBS für jeweils 5 Minuten
17. Waschen für 5 Minuten in Aqua dest.

18. Inkubation der Schnitte für 5 Minuten in Kardasewitsch (s. Anhang 9.1.) zur Entfernung des Formalinpigments und anschließendes Waschen für 5 Minuten mit Aqua dest.
19. Gegenfärben mit Papanicolaous Gebrauchslösung (s. Anhang 9.1.) für 20 Sekunden
20. Bläuen der Schnitte in Leitungswasser für 5 Minuten
21. Spülen der Schnitte für 5 Minuten in Aqua dest.
22. Entwässern der Schnitte für jeweils 3 Minuten in Alkohol (1 x 50 %igem Alkohol, 1 x 80 %igem Alkohol, 1 x 96 %igem Alkohol), zweimal in Isopropanol und dreimal in Xylol-Ersatz (Roti-Histol<sup>®</sup>)
23. Eindecken mit Folie im Eindeckautomaten (TissueTec<sup>®</sup>)

#### **3.3.4. Immunhistologische Kontrollen**

Als Methodenkontrollen dienten Gewebeschnitte eines an PMWS-erkrankten Wildschweins, welche freundlicherweise von Herrn Dr. C. Schulze, Landeslabor Brandenburg, zur Verfügung gestellt wurden (siehe Abbildung 2). Weiterhin wurden Hausschweine aus dem Sektionsbetrieb des Institutes für Veterinär-Pathologie der Justus-Liebig-Universität Gießen verwendet, die ein typisches klinisches Bild sowie typische pathologisch-anatomische und pathologisch-histologische Befunde aufwiesen und bei denen zusätzlich der Virusnachweis mittels PCR positiv war.

Als Negativkontrollen dienten Folgeschnitte des paraffineingebetteten Materials, die anstelle des Primärantikörpers in TBS mit 1 % bovinem Serumalbumin inkubiert wurden.



**Abbildung 2:** Positivkontrolle für die immunhistologische Untersuchung, Lymphknoten des ersten nachgewiesenermaßen an PMWS erkrankten Wildschweins weltweit, freundlicherweise von Herrn Dr. C. Schulze, Landeslabor Brandenburg, zur Verfügung gestellt, IHC, Obj. x 40

### 3.3.5. Beurteilung der Immunhistologie

Als positive Reaktion wurde eine mittel- bis dunkelbraune granuläre Färbung des Zytoplasmas und/oder des Zellkerns von Makrophagen, mehrkernigen Riesenzellen und Lymphozyten gewertet, die im Kontrollschnitt nicht nachweisbar war. Die Menge an Antigen-tragenden Zellen wurde semiquantitativ erfasst. Dafür wurden folgende Bewertungsstufen verwendet:

0 = kein Signal vorhanden; 1 = vereinzelt liegende, PCV2-positive Zellen;  
2 = viele PCV2-positive Zellen; 3 = sehr viele PCV2-positive Zellen

### **3.4. Real-time-PCR**

Die Ergebnisse der Real-time-PCR wurden freundlicherweise von der Klinik für Wiederkäuer und Schweine, Professur für Schweine, zur Verfügung gestellt.

Die Durchführung erfolgte nach Reiner et al. (2010).

## 3.5. Ziehl-Neelsen-Färbung

### 3.5.1. Durchführung der Ziehl-Neelsen-Färbung

1. Entparaffinieren und Rehydrierung der Schnitte in Xylol und absteigender Alkoholreihe (96 %, 70 %, 50 %) für je 5 Minuten
2. Spülen in Aqua dest. für 5 Minuten
3. Objektträger in Carbol-Fuchsin-Lösung eine Stunde bei 60 °C im Brutschrank inkubieren
4. Abspülen mit Leitungswasser
5. Differenzieren in 50 %igem Alkohol mit 3 %iger Salzsäure bis keine Farbwolken mehr aufsteigen
6. 10 Minuten in fließendem Wasser abspülen
7. Verbringen in Methylenblaulösung für 5 Sekunden
8. Abspülen in Aqua dest.
9. 5 Minuten in 96 %igem Alkohol entwässern
10. In Isopropylalkohol und Xylol für jeweils 5 Minuten inkubieren
11. Eindecken mit Folie im Eindeckautomaten (TissueTec®)

Als Positivkontrolle diente eine Darmprobe von einer an Paratuberkulose erkrankten Ziege.

### **3.5.2. Beurteilung der Ziehl-Neelsen-Färbung**

In der Ziehl-Neelsen-Färbung stellen sich säurefeste Bakterien rot dar. Das übrige Gewebe färbt sich blau.

Somit kann mittels der Ziehl-Neelsen-Färbung auf Mykobakterien untersucht werden.

Von allen Proben, die mehrkernige Riesenzellen aufwiesen, wurde eine Ziehl-Neelsen-Färbung angefertigt. Bei den Wild- bzw. Hausschweinen wurden 14 bzw. 5 Lungen, 2 bzw. 4 Milzen, 5 bzw. 31 Tonsillen, 5 bzw. 20 Mesenteriallymphknoten und 3 bzw. 15 Bronchiallymphknoten untersucht.

### 3.6. Statistische Analyse

Die statistische Analyse erfolgte mit freundlicher Unterstützung der Arbeitsgruppe Biomathematik und Datenverarbeitung des Fachbereichs Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen. Dabei wurde das Statistikprogrammpaket BMDP (Dixon, 1993) eingesetzt.

Semiquantitative Merkmale wurden aufgrund ihres Skalenniveaus mittels Angaben von Stichprobenumfang, Minima, Maxima, Median und Quartilen in Box-and-Whisker-Plots dargestellt.

Für Merkmale mit zwei Stufen wurde zur Überprüfung des Gruppeneinflusses auf signifikante Unterschiede der exakte Fisher-Test mittels des Programms BMDP4F angewendet.

Wenn ein Merkmal mehr als zwei geordnete Stufen aufwies, wurde zum Gruppenvergleich der Wilcoxon-Mann-Whitney-Test unter Verwendung des Programms BMDP3D durchgeführt.

Für die Darstellung und Bewertung des Zusammenhangs von zwei Merkmalen mit jeweils mehr als zwei Stufen, die geordnet waren, kam der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman mittels des Programms BMDP3D zum Einsatz.

Generell wurde bei der Bewertung statistischer Signifikanzen ein Signifikanzniveau von  $\alpha = 0,05$  zugrunde gelegt. Aufgrund des Problems multipler Tests in derselben Grundgesamtheit durch Betrachtung der zwei histologischen Parameter Lymphozytendepletion und Histiozytose als Kriterium für eine Erkrankung an PMWS kam es zu einer globalen Erhöhung der Fehlerwahrscheinlichkeit 1. Art ( $\alpha$ -Fehler). Dieser Problematik wurde durch die Anwendung der Bonferroni-Adjustierung begegnet, so dass nun die Ergebnisse der statistischen Untersuchungen als hinweisend auf die Zusammenhänge verschiedener Faktoren gewertet werden können. Nach Bonferroni wird die globale Irrtumswahrscheinlichkeit zu gleichen Teilen auf die Einzeltests ( $0,05/2 = 0,025$ ) aufgeteilt. Bei den übrigen Kriterien wurde als lediglich explorativer Datenanalyse der Nebeneffekte an dem nominellen Signifikanzniveau von 0,05

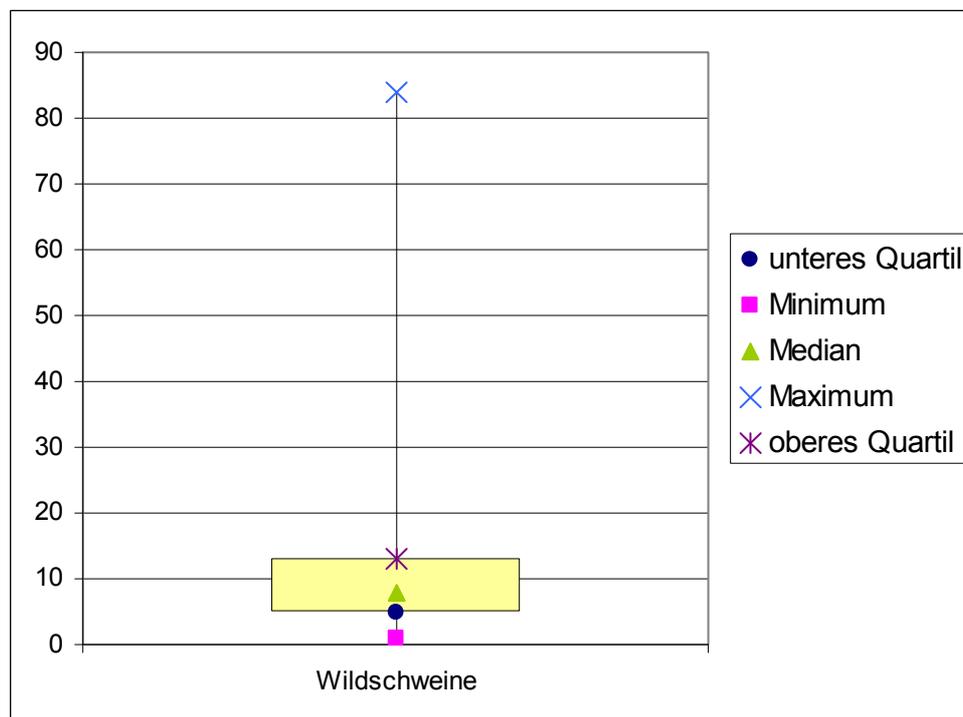
festgehalten, da ansonsten bei der Vielzahl der Effekte keinerlei Differenzierung möglich gewesen wäre.

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Wildschweine

#### 4.1.1 Alter und Gewicht der Wildschweine

Das Alter der beprobten Wildschweine lag zwischen 1 Monat und 7 Jahren (siehe Abbildung 3).



**Abbildung 3:** Altersverteilung der Wildschweine in Monaten

Unteres Quartil: Die kleinsten 25 % der Datenwerte sind kleiner oder gleich diesem Wert  
Oberes Quartil: Die größten 25 % der Datenwerte sind größer oder gleich diesem Wert

---

Die Wildschweine V 2/06 und V 123/06 konnten mit 15 kg und 19 kg bei einem Alter von 6 Monaten und das Wildschwein V 92/06 mit 55 kg bei einem Alter von 60 Monaten als abgemagert angesehen werden. In den untersuchten Geweben der drei Tiere konnte kein PCV2-Antigen nachgewiesen werden. Die Tiere wiesen in der Real-time-PCR maximale PCV2-DNA-Kopienanzahlen von 0/ $\mu\text{g}$  DNA (V 123/06),  $2,3 \times 10^3$ / $\mu\text{g}$  DNA (V 92/06) und  $1,2 \times 10^6$ / $\mu\text{g}$  DNA (V 2/06) auf.

#### **4.1.2. Endoparasitosen der Wildschweine**

Bei 39 Wildschweinen lag in der Lunge ein Befall mit Metastrongyloiden vor.

Bei einem dieser Tiere (V 157/06) wurde zusätzlich in den Mesenteriallymphknoten eine Lymphozytendepletion und eine Histiozytose festgestellt. Die restlichen untersuchten Organe waren bei diesem Tier unauffällig.

Die übrigen 38 Wildschweine zeigten keine PMWS-typischen histologischen Läsionen.

Die PCV2-DNA-Kopienanzahl betrug bei 67 % (n = 26) der Tiere 0/ $\mu\text{g}$  DNA. Die höchste Kopienanzahl von  $1,2 \times 10^6$  wies ein histologisch unauffälliges Tier (V 2/06) auf.

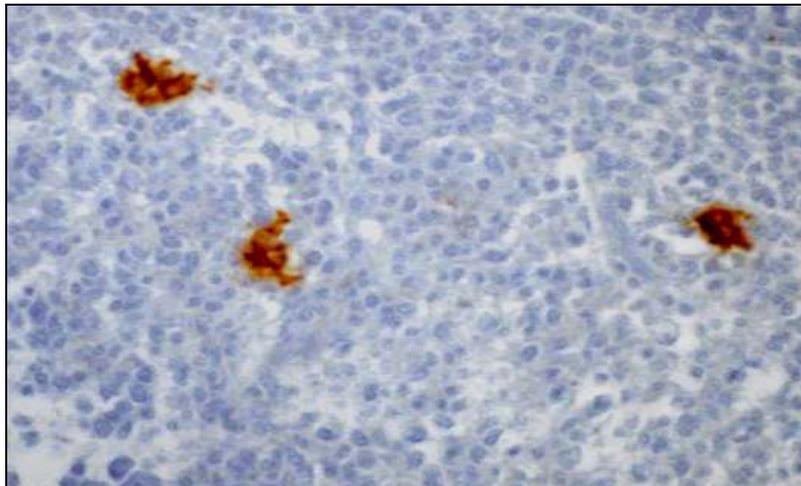
#### **4.1.3. Ergebnisse der immunhistologischen Untersuchung der Wildschweine**

In fünf der 186 Wildschweine aus der Jagdsaison 2004/05 konnte in den Bronchiallymphknoten immunhistologisch PCV2-Antigen nachgewiesen werden (siehe Tabelle 4, Abbildung 6).

**Tabelle 4:** Stärke des immunhistologischen Signals der fünf immunhistologisch positiven Wildschweine aus der Jagdsaison 2004/05

Tiernummer	Bronchiallymphknoten
Wildschwein 10-1-6	2
Wildschwein 10-1-17	1 (siehe Abbildung 4)
Wildschwein 11-1-10	2
Wildschwein 11-1-11	2
Wildschwein 11-1-14	2

1: vereinzelt positive Zellen; 2: viele positive Zellen



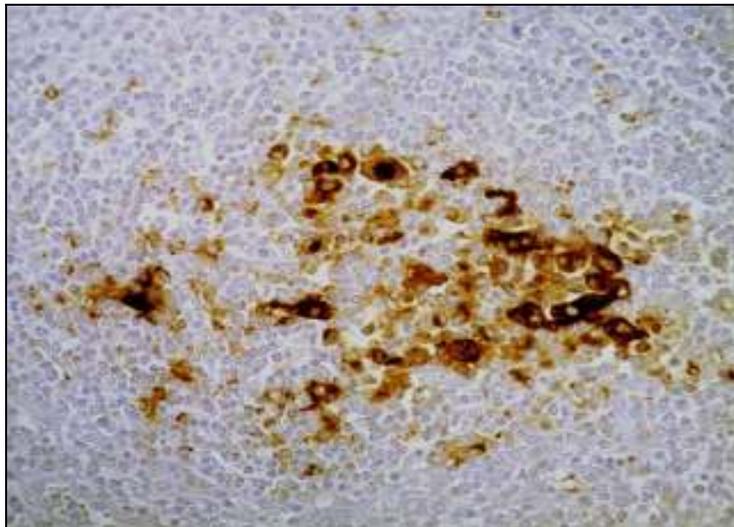
**Abbildung 4:** Wildschwein10-1-17, Bronchiallymphknoten, immunhistologisches Signal der Stärke 1, IHC, Obj. x40

Von den in der Jagdsaison 2006/07 untersuchten 170 Wildschweinen wiesen drei Tiere ein positives Signal in der Immunhistologie auf (siehe Tabelle 5).

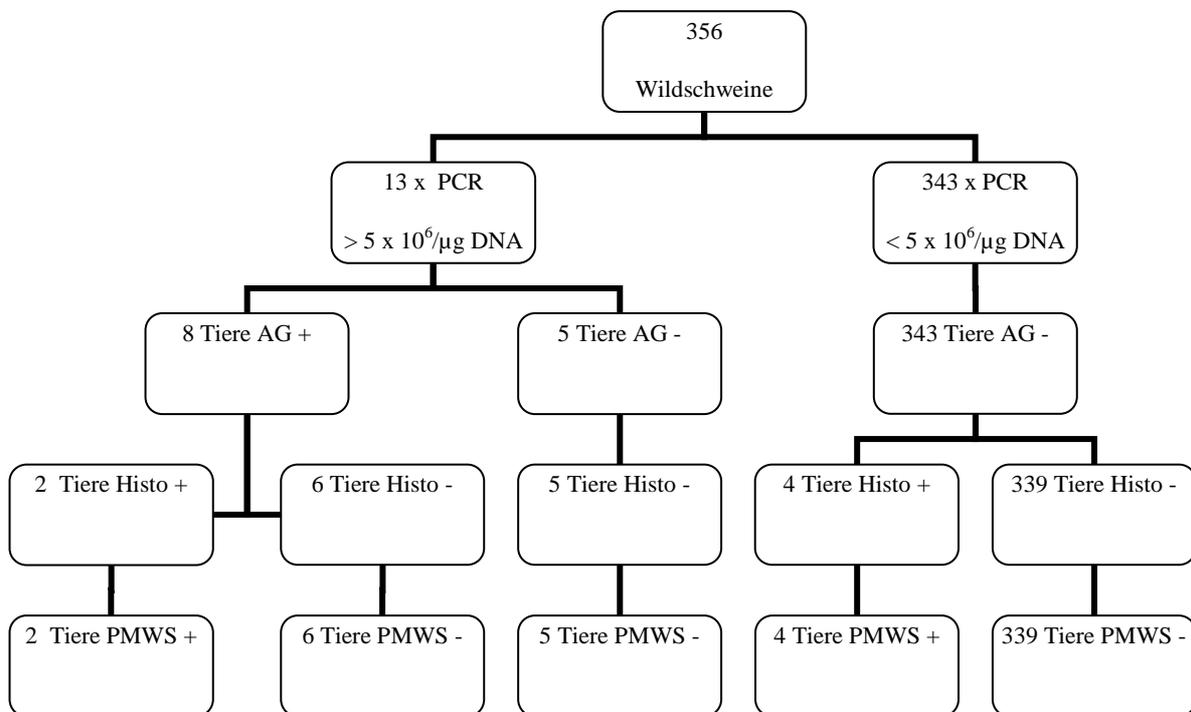
**Tabelle 5:** Stärke des immunhistologischen Signals der drei Antigen aufweisenden Wildschweine aus der Jagdsaison 2006/07

Tiernummer	Lunge	Milz	Tonsillen	MesLk	BroLk
Wildschwein V 84/06	1	1	1	1	1
Wildschwein V 85/06	0	1	2 (s. Abb.5)	2	2
Wildschwein V 87/06	0	0	1	1	0

MesLk: Mesenteriallymphknoten; BroLk: Bronchiallymphknoten; 0: kein Signal; 1: vereinzelt positive Zellen; 2: viele positive Zellen



**Abbildung 5 :** Wildschwein V 85/06, Tonsille, immunhistologisches Signal der Stärke 2, IHC, Obj. x40



**Abbildung 6:** Übersicht über Immunhistologie, Real-time-PCR und Diagnosestellung „Erkrankung an PMWS“ bei Wildschweinen

PCR >  $5 \times 10^6/\mu\text{g DNA}$ : in mindestens einem Gewebe Kopienanzahlen von mehr als  $5 \times 10^6/\mu\text{g DNA}$ ;

PCR <  $5 \times 10^6/\mu\text{g DNA}$ : in keinem Gewebe Kopienanzahlen von mehr als  $5 \times 10^6/\mu\text{g DNA}$ ;

AG+: PCV2-Antigennachweis; AG-: kein PCV2-Antigennachweis;

Histo+: histologisch Lymphozytendepletion und Histozytose diagnostiziert;

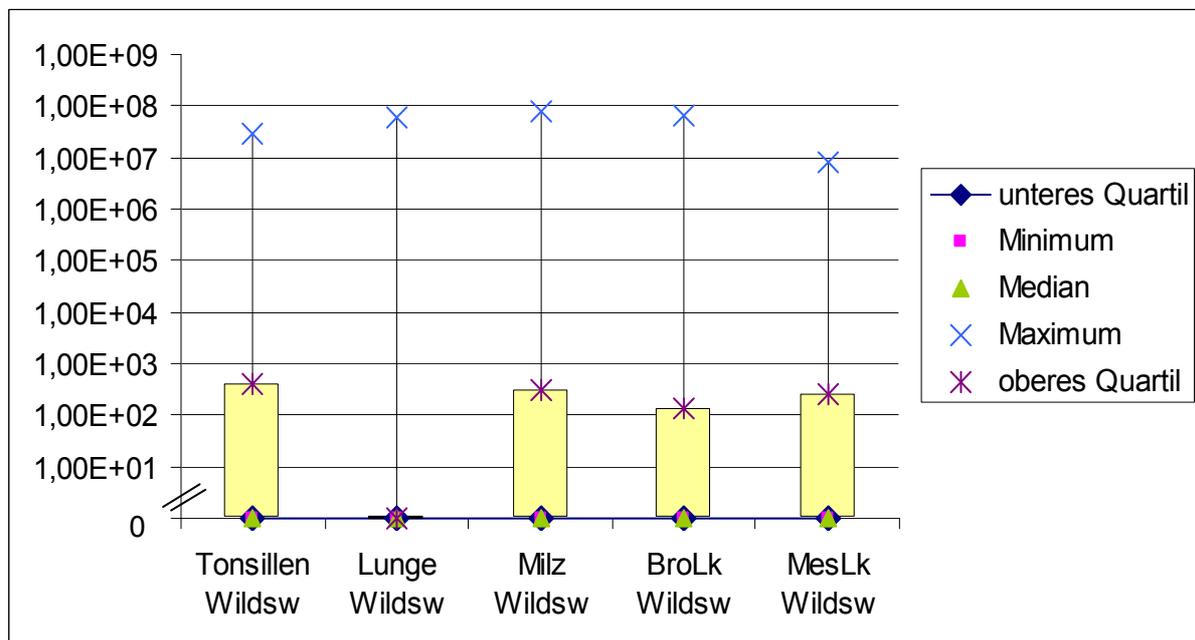
Histo-: keine Lymphozytendepletion und Histozytose diagnostiziert;

PMWS +: Befunde, die zu einer Erkrankung an PMWS passen;

PMWS -: Befunde, die nicht zu einer Erkrankung an PMWS passen;

#### 4.1.4. Ergebnisse der Real-time-PCR der Wildschweine

Die Ergebnisse der Real-time-PCR der Wildschweine, durchgeführt und Ergebnisse freundlicherweise zur Verfügung gestellt von der Klinik für Wiederkäuer und Schweine, Professur für Schweine, sind in den Abbildungen 7 und 8 zusammengefasst.



**Abbildung 7:** Ergebnisse der anhand der Real-time-PCR ermittelten PCV2-DNA-Kopien-Anzahl pro  $\mu\text{g}$  isolierter DNA in den Geweben von allen untersuchten Wildschweinen

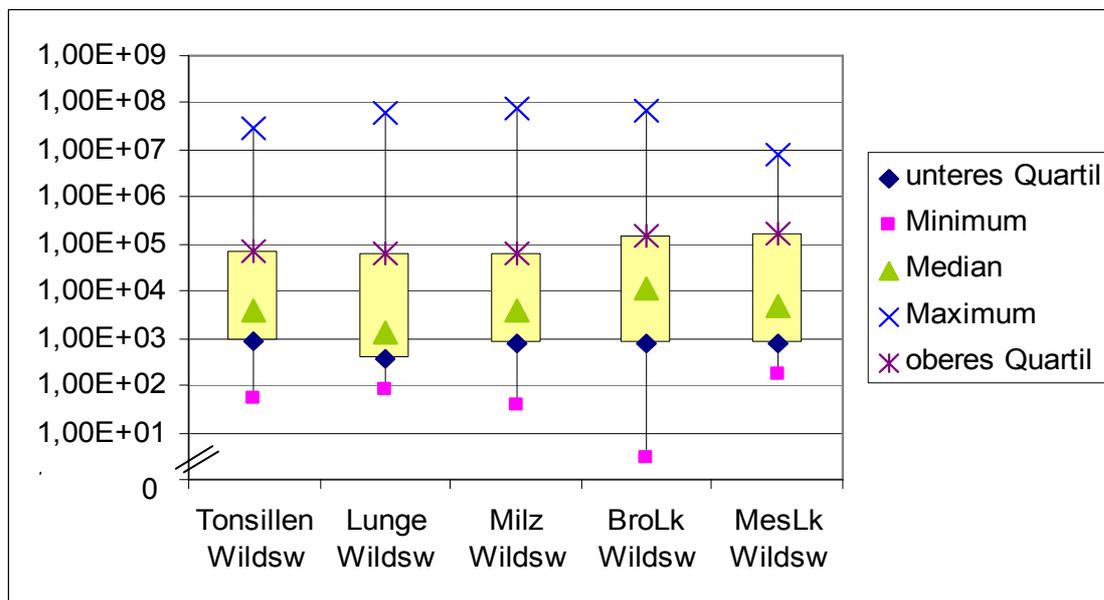
Unteres Quartil: Die kleinsten 25 % der Datenwerte sind kleiner oder gleich diesem Wert

Oberes Quartil: Die größten 25 % der Datenwerte sind größer oder gleich diesem Wert

BroLk: Bronchiallymphknoten; MesLk: Mesenteriallymphknoten;

In 170 Wildschweinen war in keinem der untersuchten Gewebe PCV2 mittels Real-time-PCR feststellbar, wohingegen bei 146 Tieren in mindestens einem Organ das Virus nachgewiesen werden konnte. Für die Untersuchung stand von 40 Tieren kein Material zur Verfügung.

In Abbildung 8 wurden die Ergebnisse der 146 Wildschweine, die in mindestens einem Organ PCV2 enthielten, zusammengefasst.



**Abbildung 8:** Ergebnisse der anhand der Real-time-PCR ermittelten PCV2-DNA-Kopien-Anzahl pro µg isolierter DNA in den Geweben der Wildschweine, bei denen in mindestens einem Organ das Virus nachweisbar war

Unteres Quartil: Die kleinsten 25 % der Datenwerte sind kleiner oder gleich diesem Wert

Oberes Quartil: Die größten 25 % der Datenwerte sind größer oder gleich diesem Wert

BroLk: Bronchiallymphknoten; MesLk: Mesenteriallymphknoten;

Von den immunhistologisch positiven Wildschweinen wurden die PCV2-DNA Kopienanzahlen in Tabelle 6 zusammengefasst.

**Tabelle 6:** Signalstärke der Immunhistologie und Ergebnisse der Real-time-PCR der immunhistologisch positiven Wildschweine

Tiernummer	Organ	Signalstärke der IHC	PCV2-DNA-Kopien pro µg isolierter DNA
Wildschwein 10-1-6	BroLk	2	$6,6 \times 10^7$
Wildschwein 10-1-17	BroLk	1	$5,8 \times 10^6$
Wildschwein 11-1-10	BroLk	2	$6,4 \times 10^7$
Wildschwein 11-1-11	BroLk	2	$2,2 \times 10^7$
Wildschwein 11-1-14	BroLk	2	$5,0 \times 10^4$
Wildschwein V 84/06	Lunge	1	$1,8 \times 10^6$
	Milz	1	$3,6 \times 10^6$
	Tonsillen	1	$1,5 \times 10^7$
	MesLk	1	$4,7 \times 10^6$
	BroLk	1	$1,0 \times 10^7$
Wildschwein V 85/06	Lunge	0	$2,3 \times 10^6$
	Milz	1	$4,7 \times 10^6$
	Tonsillen	2	$3,0 \times 10^7$
	MesLk	2	$8,1 \times 10^6$
	BroLk	2	$1,3 \times 10^7$

(Fortsetzung und Legende s. nächste Seite)

**Tabelle 6** (Fortsetzung): Signalstärke der Immunhistologie und Ergebnisse der Real-time-PCR der immunhistologisch positiven Wildschweine

Tiernummer	Organ	Signalstärke der IHC	PCV2-DNA-Kopien pro $\mu\text{g}$ isolierter DNA
Wildschwein V 87/06	Lunge	0	$1,0 \times 10^6$
	Milz	0	$1,5 \times 10^6$
	Tonsillen	1	$1,8 \times 10^7$
	MesLk	1	$6,5 \times 10^6$
	BroLk	0	$4,2 \times 10^6$

BroLk: Bronchiallymphknoten; MesLk: Mesenteriallymphknoten; IHC: Immunhistologie; DNA: Desoxyribonukleinsäure; 0: kein Signal; 1: vereinzelt positive Zellen; 2: viele positive Zellen

#### 4.1.5. Ergebnisse der histologischen Untersuchung der Wildschweine

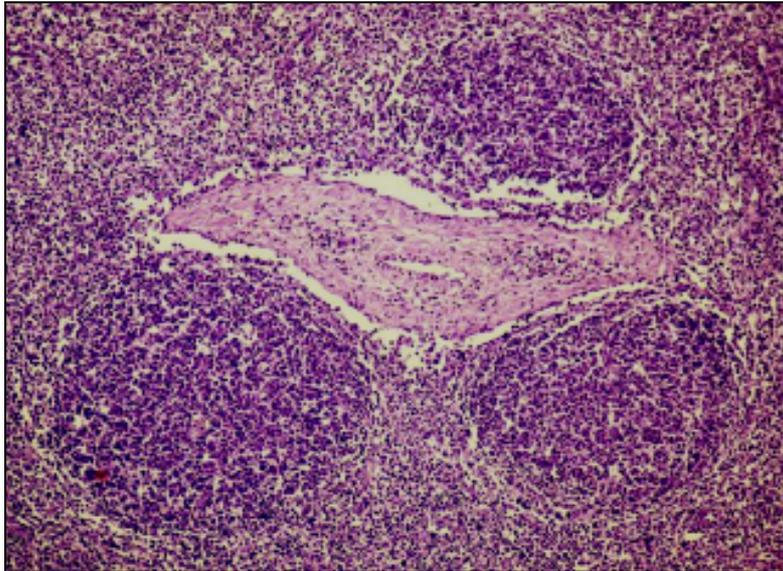
Soweit möglich wurden von jedem Tier die Lunge, die Tonsillen, die Milz sowie die Bronchial- und die Mesenteriallymphknoten histologisch untersucht.

##### 4.1.5.1. Ergebnisse der histologischen Untersuchung der immunhistologisch positiven Wildschweine

Bestimmte in den Bronchiallymphknoten erhobene histologische Befunde der immunhistologisch positiven Wildschweine aus der Jagdsaison 2004/05 wurden in Tabelle 7 zusammengefasst. Es wurden Kriterien dargestellt, die entweder von dem Normalzustand abwichen, oder nach früheren Studien bei PMWS verändert sein sollten.

**Tabelle 7:** Ausgewählte histologische Befunde in den Bronchiallymphknoten der immunhistologisch positiven Wildschweine der Jagdsaison 2004/05

		Tier 10-1-6 (Abb. 9)	Tier 10-1-17	Tier 11-1-10	Tier 11-1-11	Tier 11-1-14
Pathologische Befunde	Gehalt an eosinophilen Granulozyten	normal	normal	<b>hoch</b>	normal	normal
PMWS-typische Läsionen nach Literaturangaben	Follikelanzahl	normal	<b>mäßig</b>	normal	normal	normal
	Mehrkernige Riesenzellen vom Langhanstyp	keine	keine	keine	keine	<b>viele</b>
	Lymphozytengehalt im Keimzentrum	normal	normal	normal	normal	normal
	Histiozytengehalt	normal	normal	normal	normal	normal



**Abbildung 9:** Wildschwein 10-1-6, Bronchiallymphknoten, Follikelanzahl sowie Lymphozyten- und Histiozytengehalt ohne besonderen Befund, HE, Obj. x10

Von den immunhistologisch positiven Wildschweinen aus der Jagdsaison 2006/07 wurden ausgewählte Befunde aus den fünf untersuchten Organen in den Tabellen 8-12 dargestellt.

**Tabelle 8:** Ausgewählte histologische Befunde in der Lunge der immun-histologisch positiven Wildschweine der Jagdsaison 2006/07

	Tier V 84/06	Tier V 85/06	Tier V 87/06
Lungenwürmer	keine	keine	keine
Apoptosen im BALT	keine	<b>mäßig</b>	keine
Mitosen im BALT	<b>mäßig</b>	<b>mäßig</b>	keine
Gehalt an eosinophilen Granulozyten im BALT	<b>hoch</b>	gering	gering
Interstitielle Pneumonie	keine	keine	keine
Mehrkernige Riesenzellen	keine	keine	keine

**Tabelle 9:** Ausgewählte histologische Befunde in der Milz der immun-histologisch positiven Wildschweine der Jagdsaison 2006/07

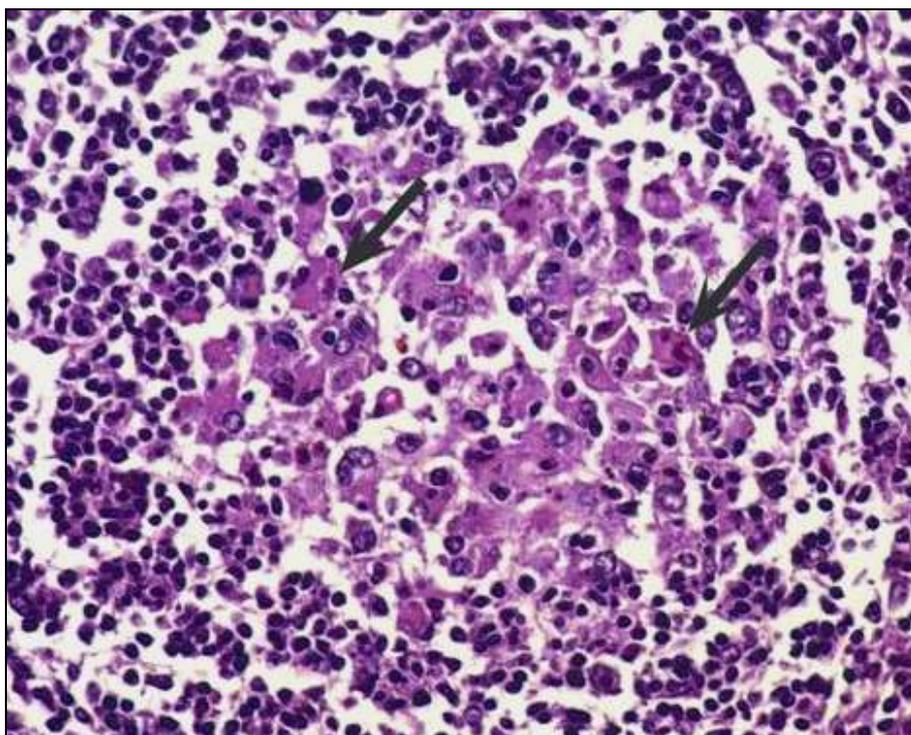
	Tier V 84/06	Tier V 85/06	Tier V 87/06
Anzahl an Follikeln	<b>mäßig</b>	normal	normal
Mehrkernige Riesenzellen	keine	keine	keine
Lymphozytengehalt in der Mantelzone	<b>gering</b>	mäßig	mäßig
Histiozytengehalt	<b>hoch</b>	normal	normal
Apoptosen	gering	<b>mittel</b>	gering
Mitosen	gering	<b>mittel</b>	gering

**Tabelle 10:** Ausgewählte histologische Befunde in den Tonsillen der immun-histologisch positiven Wildschweine der Jagdsaison 2006/07

	Tier V 84/06	Tier V85/06	Tier V 87/06
Anzahl an Follikeln	normal	<b>reduziert</b>	normal
Lymphozytengehalt in der Mantelzone	mäßig	<b>gering</b>	mäßig
Mehrkernige Riesenzellen vom Fremdkörpertyp	keine	<b>vereinzelt</b>	keine
Lymphozytengehalt in dem Keimzentrum	normal	<b>gering</b>	normal
Histiozytengehalt	normal	<b>hoch</b>	normal
Apoptosen	gering	<b>hoch</b>	gering
Mitosen	gering	<b>mittel</b>	<b>mittel</b>

**Tabelle 11:** Ausgewählte histologische Befunde in den Mesenterial-lymphknoten der immunhistologisch positiven Wildschweine der Jagdsaison 2006/07

	Tier V 84/06	Tier V 85/06 (s. Abb. 10 )	Tier V 87/06
Anzahl an Follikeln	<b>mäßig</b>	<b>mäßig</b>	normal
Lymphozytengehalt in der Mantelzone	mäßig	<b>gering</b>	mäßig
Mehrkernige Riesenzellen vom Fremdkörpertyp	keine	<b>viele</b>	keine
Lymphozytengehalt in dem Keimzentrum	normal	<b>gering</b>	normal
Histiozytengehalt	normal	<b>hoch</b>	normal
Apoptosen	gering	<b>hoch</b>	gering
Mitosen	gering	gering	gering



**Abbildung 10:** Wildschwein V 85/06, Mesenteriallymphknoten mit Lymphozytendepletion im Keimzentrum und der Mantelzone, Histiozytose, Einschlusskörperchen (Pfeil), HE, Obj. x40

**Tabelle 12** : Ausgewählte histologische Befunde in den Bronchiallymphknoten der immunhistologisch positiven Wildschweine der Jagdsaison 2006/07

	Tier V 84/06	Tier V 85/06	Tier V 87/06
Anzahl an Follikeln	normal	normal	<b>mäßig</b>
Lymphozytengehalt in der Mantelzone	normal	<b>gering</b>	normal
Gehalt an eosinophilen Granulozyten	<b>hoch</b>	normal	normal
Mehrkernige Riesenzellen vom Fremdkörper- und Langhanstyp	keine	<b>vereinzelt</b>	keine
Lymphozytengehalt in dem Keimzentrum	normal	<b>gering</b>	normal
Histiozytengehalt	normal	<b>hoch</b>	normal
Apoptosen	gering	<b>mittel</b>	gering
Mitosen	gering	gering	gering

#### 4.1.5.2. Ergebnisse der histologischen Untersuchung der Wildschweine in Zusammenhang mit den Ergebnissen der Real-time-PCR

In einem weiteren Schritt wurde untersucht, inwieweit die Ergebnisse der Real-time-PCR mit histopathologischen Veränderungen korrelieren.

Fünf Tiere (WS 1-2-5, WS 11-1-5, V 81/06, V 91/06, V137/06) enthielten weder PCV2-Antigen noch histopathologische Läsionen, die auf eine Erkrankung an PMWS hinweisen würden, jedoch in mindestens einem Gewebe PCV2-Kopienanzahlen von größer  $5 \times 10^6/\mu\text{g}$  DNA (s. Abb. 6).

Weitere 6 Wildschweine (WS 10-1-6, WS 10-1-17, WS 11-1-10, WS11-1-11, WS 11-1-14, V 87/06) zeigten ebenfalls in mindestens einem Gewebe PCV2-Kopienanzahlen von größer  $5 \times 10^6/\mu\text{g}$  DNA und in der Immunhistologie ein Signal, jedoch keine histologischen Befunde, die auf eine Erkrankung an PMWS hinweisen würden.

Zwei Tiere (V 84/06 und V 85/06), die immunhistologisch positiv waren und PMWS-typische histologische Veränderungen zeigten, enthielten auch in mindestens einem Gewebe PCV2-Kopienanzahlen von größer  $5 \times 10^6/\mu\text{g}$  DNA.

Bei dem Wildschwein V 157/06 konnte in den Mesenteriallymphknoten eine Lymphozytendepletion und eine Histiozytose festgestellt werden. Das elf Monate alte Tier wies maximal eine PCV2-DNA-Kopienanzahl von  $2,1 \times 10^5/\mu\text{g}$  DNA auf. Zusätzlich zeigte es einen Befall mit Metastrongyloiden.

Ein Wildschwein (V 92/06) wies bei einer PCV2-DNA-Kopienanzahl von maximal  $2,3 \times 10^3/\mu\text{g}$  DNA eine Histiozytose und eine Lymphozytendepletion in der Mantelzone der Tonsillen auf, wobei die Follikelanzahl in der Tonsille nicht vermindert war.

Bei zwei Tieren (WS 11-1-12 und WS 11-1-15) mit PCV2-DNA-Kopienanzahlen von  $3,6 \times 10^6/\mu\text{g}$  DNA und  $4,6 \times 10^5/\mu\text{g}$  DNA in den Bronchiallymphknoten konnten neben einer Lymphozytendepletion im Follikelzentrum und zwischen den Follikeln zusätzlich eine verminderte Follikelanzahl bzw. eine Reduktion der Lymphozyten in der Mantelzone sowie eine Histiozytose festgestellt werden.

Sechs Wildschweine wiesen in lymphatischen Organen eine Histiozytose auf (V 55/06, V 57/06, V 65/06, V 97/06, V 111/06, WS 10-1-5).

Bei drei dieser Tiere (V 57/06, V 65/06, V 111/06) verlief der Antigen- und der Genomnachweis in allen untersuchten Organen negativ. Somit zeigten diese Wildschweine zwar eine Histiozytose, jedoch ohne Hinweis auf eine Infektion mit PCV2.

Die drei übrigen Wildschweine wiesen zwar in den Geweben, in denen die histologischen Läsionen auftraten, keine PCV2-DNA auf, jedoch konnte in einem der anderen untersuchten Gewebe PCV2-Kopienanzahlen von bis zu  $7,5 \times 10^5/\mu\text{g}$  DNA (V 97/06) beobachtet werden.

Eine Lymphozytendepletion mit Reduktion der Follikelanzahl in dem Bronchiallymphknoten konnte bei einem Tier (WS 1-2-18) beobachtet werden, bei dem in allen untersuchten Geweben kein PCV2-Virusgenom nachgewiesen werden konnte.

Zwei Tiere (WS 11-1-13 und WS 10-1-7) wiesen in den Bronchiallymphknoten eine Lymphozytendepletion im Keimzentrum auf. Bei Wildschwein WS 11-1-13 war in den Bronchiallymphknoten weder PCV2-Antigen noch PCV2-DNA nachweisbar, aber in den Tonsillen konnte das Virus mittels PCR festgestellt werden. Das Wildschwein WS 10-1-7 zeigte in den Bronchiallymphknoten eine PCV2-DNA-Kopienanzahl von  $1,2 \times 10^5/\mu\text{g}$  DNA.

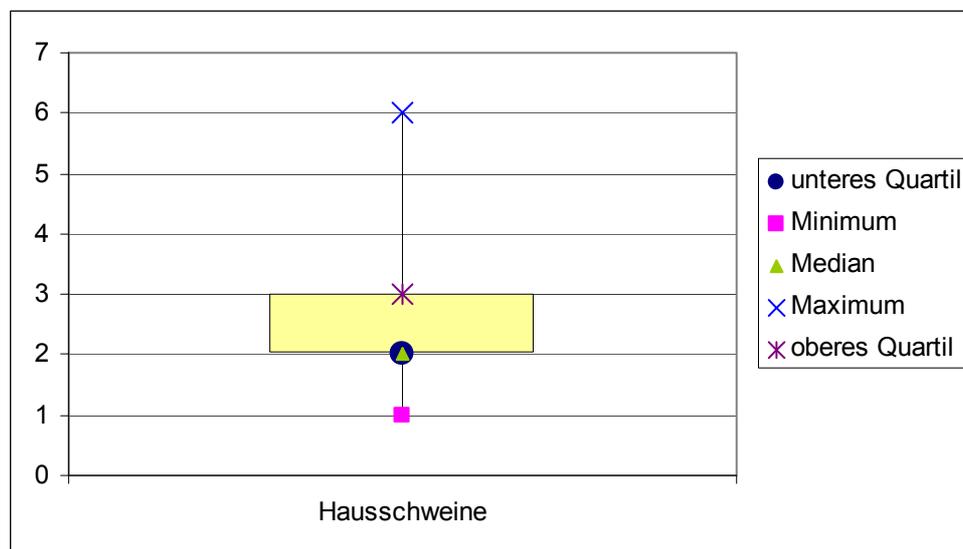
#### **4.1.6. Ergebnisse der Ziehl-Neelsen-Färbung**

In keiner der untersuchten Proben konnten säurefeste Bakterien nachgewiesen werden.

## 4.2. Hausschweine

### 4.2.1. Alter und Gewicht der beprobten Hausschweine

Da PMWS vor allem bei 5-17 Wochen alten Hausschweinen auftritt, wurde ein Großteil der Proben in einer Spanferkelschlachtereie gewonnen. Somit war es möglich, Tiere zu untersuchen, die jünger als das übliche Schlachtalter von 6 Monate waren (siehe Abbildung 11).



**Abbildung 11:** Altersverteilung der Hausschweine in Monaten

Unteres Quartil: Die kleinsten 25 % der Datenwerte sind kleiner oder gleich diesem Wert

Oberes Quartil: Die größten 25 % der Datenwerte sind größer oder gleich diesem Wert

Bei neun der Hausschweine fiel eine Abmagerung auf (siehe Tabelle 13).

**Tabelle 13:** Befunde der neun abgemagerten Hausschweine

Tier- nummer	Alter 1	Gewicht 2	PCR 3	IHC 4	Histologische Befunde 5
1-1-66	2	12	1,94 x 10 <sup>7</sup> bis 7,67 x 10 <sup>7</sup>	A = 2 B = 0 C = 0 D = 2 E = 2	Tonsillen, MesLk, BroLk: PMWS-typische Befunde
1-1-119	2	12	7,58 x 10 <sup>7</sup> bis 9,82 x 10 <sup>8</sup>	A = 2 B = 2 C = 1 D = 3 E = 2	Milz, Tonsillen, MesLk, BroLk: PMWS-typische Befunde
1-1-124	2	12	1,56 x 10 <sup>3</sup> bis 3,60 x 10 <sup>3</sup>	A-E = 0	Keine PMWS-typischen Befunde
1-1-49	2	12	1,74 x 10 <sup>6</sup> bis 4,36 x 10 <sup>8</sup>	A = 3 B = 2 C = 3 D = 3 E = 3	Tonsillen, MesLk, BroLk: PMWS-typische Befunde
1-2-6	2	13	4,97 x 10 <sup>4</sup> bis 1,79 x 10 <sup>6</sup>	A = 2 B = 0 C = 1 D = 0 E = 2	Milz, MesLk: PMWS-typische Befunde
1-1-9	2	18	1,82 x 10 <sup>6</sup> bis 5,48 x 10 <sup>6</sup>	A = 2 B = 0 C = 1 D = 2 E = 1	Tonsillen, BroLk: PMWS-typische Befunde
1-1-13	2	16	6,09 x 10 <sup>7</sup> bis 1,04 x 10 <sup>9</sup>	A-E = 0	Milz: PMWS-typische Befunde

(Fortsetzung und Legende s. nächste Seite)

**Tabelle 13** (Fortsetzung): Befunde der neun abgemagerten Hausschweine

Tier- nummer	Alter 1	Gewicht 2	PCR 3	IHC 4	Histologische Befunde 5
1-2-85	3	20,4	9,27 x 10 <sup>6</sup> bis 1,03 x 10 <sup>8</sup>	A = 2 B = 0 C = 1 D = 2 E = 1	Keine PMWS-typischen Befunde
1-2-90	1	5,9	7,45 x 10 <sup>2</sup> bis 9,87 x 10 <sup>3</sup>	A-E = 0	MesLk: PMWS-typische Befunde

<sup>1</sup>Alter in Monaten; <sup>2</sup>Gewicht in kg; <sup>3</sup>PCR: PCV2-DNA-Kopien pro µg isolierter DNA; <sup>4</sup>IHC: Stärke des immunhistologischen Signals; A: Tonsille, B: Lunge, C: Milz, D: Bronchiallymphknoten; E: Mesenteriallymphknoten; 0: kein positiven Zellen, 1: vereinzelt positive Zellen, 2: viele positive Zellen, 3: sehr viele positive Zellen, MesLk: Mesenteriallymphknoten, BroLk: Bronchiallymphknoten; <sup>5</sup>PMWS-typische Befund: Lymphozytendepletion, Histiozytose

#### 4.2.2. Ergebnisse der immunhistologischen Untersuchung der Hausschweine

238 Hausschweine wiesen in keinem der untersuchten Organe PCV2-Antigen in der immunhistologischen Untersuchung auf. Bei 102 Tieren zeigte sich in mindestens einem Organ eine positives Signal.

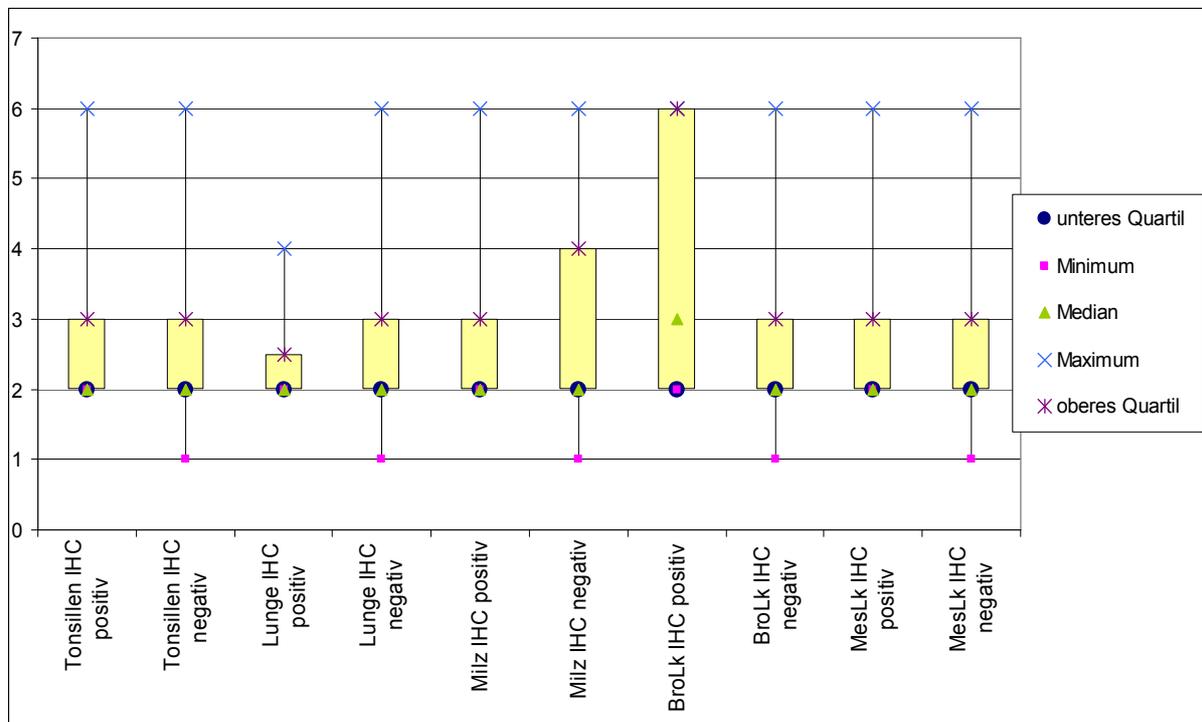
Die immunhistologischen Ergebnisse werden nach Organen geordnet in Tabelle 14 dargestellt.

**Tabelle 14:** Ergebnisse der immunhistologischen Untersuchung der Hausschweine

Organ	Stärke des immunhistologischen Signals	Anzahl der Hausschweine
Tonsillen	0	244
	1	37
	2	35
	3	8
Lunge	0	324
	1	6
	2	7
	3	1
Milz	0	298
	1	27
	2	11
	3	2
BroLk	0	254
	1	41
	2	23
	3	6
MesLk	0	273
	1	34
	2	26
	3	4

BroLk: Bronchiallymphknoten; MesLk: Mesenteriallymphknoten; 0: keine positiven Zellen; 1: vereinzelt positive Zellen; 2: viele positive Zellen; 3: sehr viele positive Zellen

Eine Darstellung der Altersverteilung der immunhistologisch positiven und negativen Hausschweine erfolgt in Abbildung 12.



**Abbildung 12:** Altersverteilung der immunhistologisch positiven und negativen Hausschweine in Monaten

IHC: Immunhistologie; BroLk: Bronchiallymphknoten;

MesLk: Mesenteriallymphknoten;

Unteres Quartil: Die kleinsten 25 % der Datenwerte sind kleiner oder gleich diesem Wert

Oberes Quartil: Die größten 25 % der Datenwerte sind größer oder gleich diesem Wert

Ein Vergleich der immunhistologischen Signale in den verschiedenen Geweben miteinander ergab Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman von 0,43 bis 0,74 (s. Tabelle 15).

Tabelle 15: Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman im Vergleich der immunhistologischen Ergebnisse der untersuchten Gewebe

	Lunge	Milz	BroLk	MesLk
Tonsillen	0,43	0,61	0,66	0,74
Lunge		0,46	0,44	0,43
Milz			0,60	0,69
BroLk				0,74

BroLk: Bronchiallymphknoten, MesLk: Mesenteriallymphknoten

#### 4.2.3. Ergebnisse der histologischen Untersuchung der Hausschweine

Es wurden von den Hausschweinen 338 Lungen, 338 Milzen, 324 Tonsillen, 337 Mesenterial- und 324 Bronchiallymphknoten histologisch ausgewertet. Danach wurde untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten von histologischen Läsionen und dem Antigennachweis bzw. dem Genomnachweis von PCV2 bestand. Dafür wurden zwei Vorgehensweisen verwendet:

1. Untersuchung, ob ein histologisches Merkmal in dem untersuchten Organ vorkam (z. B. mehrkernige Riesenzellen in der Lunge) und gleichzeitig der Nachweis von PCV2 mittels PCR oder IHC in demselben Organ (z. B. dann auch Lunge) erfolgte.
2. Untersuchung, ob ein histologisches Merkmal in dem untersuchten Organ vorkam (z. B. mehrkernige Riesenzellen in der Lunge) und das Tier mit PCV2 infiziert war, unabhängig in welchem Organ der Virusnachweis erfolgte. Das Tier wurde als positiv gewertet, wenn in mindestens einem Organ ein positives immunhistologisches Signal auftrat oder das Tier eine Kopienanzahl von mindestens  $5 \times 10^6/\mu\text{g}$  DNA in der Real-time-PCR aufwies. Das Tier wurde als negativ eingestuft, wenn in allen Organen kein Antigennachweis oder eine PCV2-Kopienanzahl von kleiner  $5 \times 10^6/\mu\text{g}$  DNA erfolgte. Somit wurde das Vorkommen einer bestimmten histologischen Läsion (z. B. mehrkernige Riesenzellen in der Lunge) und die gleichzeitige Infektion des Tieres (z. B.

immunhistologisch positiv in der Milz) unabhängig vom Nachweisort des Virus untersucht.

#### 4.2.3.1. Histologische Befunde unter Berücksichtigung des Antigennachweises mittels Immunhistologie (Daten s. CD im Anhang)

##### 4.2.3.1.1. Histologische und immunhistologische Untersuchung desselben Organs

Die Korrelationen, die sich zwischen der histologischen und der immunhistologischen Untersuchung in demselben Organ ergaben, sind in Tabelle 16 dargestellt.

Tabelle 16: Korrelationen zwischen den Ergebnissen der histologischen und der immunhistologischen Untersuchung desselben Organs

	Tonsillen	Lunge	Milz	BroLk	MesLk
Histiozytose	*	*	*	*	*
Lymphozyten-depletion in den Keimzentren und der Mantelzone	*		*	*	*
Reduktion der Follikelanzahl	*		*		*
Mehrkernige Riesenzellen	*			*	*
Interstitielle Pneumonie		*			

BroLk: Bronchiallymphknoten; MesLk: Mesenteriallymphknoten;

\* :statistisch signifikant ( $p < 0,025$ )

Sowohl in den lymphatischen Organen (Milz, Tonsillen, Mesenterial- und Bronchiallymphknoten) als auch in dem BALT der Lunge bestand ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem vermehrten Vorkommen von Makrophagen im Gewebe und dem Antigennachweis ( $p < 0,0001$ ). So lag in 27 % (3/11 Lunge) bis 45 % (29/64 Mesenteriallymphknoten (MesLk)) der immunhistologisch positiven Organe eine Histiozytose vor. Eine Histiozytose ohne Antigennachweis fiel jedoch in den Geweben nur bei 1 % (4/314 Lunge) bis 6 % (16/273 MesLk) auf.

56 % (5/9 Milz) bis 88 % (15/17 MesLk) der Tiere, die eine Lymphozyten-depletion in den Keimzentren der lymphatischen Organe aufwiesen, zeigten immunhistologisch ein positives Signal in demselben Organ ( $p < 0,0001$ ).

In den lymphatischen Organen wiesen 26 % (21/80 Tonsillen) bis 35 % (14/40 Milz) der Tiere eine positive Immunhistologie und gleichzeitig eine Lymphozytendepletion in der Mantelzone auf ( $p \leq 0,0009$ ). Wohingegen nur bei 4 % (11/273 MesLk) bis 9 % (22/254 Bronchiallymphknoten (BroLk)) der Tiere ohne Antigennachweis eine Depletion der Lymphozyten in der Mantelzone vorlag.

Von 273 bis 298 Hausschweinen, die in den Mesenteriallymphknoten, den Tonsillen bzw. der Milz immunhistologisch negativ waren, wiesen lediglich 2 % (5/273 MesLk) bis 1 % (3/298 Milz) eine Reduktion der Follikelanzahl bzw. der PALS auf. Wohingegen in 80 bis 40 immunhistologisch positiven Geweben bei maximal 14 Tieren eine Reduktion der Follikelanzahl bzw. der PALS vorlagen ( $p \leq 0,0001$ ).

Das Vorhandensein von mehrkernigen Riesenzellen war signifikant unterschiedlich im Bezug auf den Antigennachweis in den Tonsillen, Mesenterial- und Bronchiallymphknoten ( $p \leq 0,0001$ ).

Es konnte ein statistisch signifikanter Zusammenhang ( $p < 0,0001$ ) zwischen dem Antigennachweis und dem Vorliegen von Lymphozyten, Makrophagen und Plasmazellen im Interstitium der Lunge nachgewiesen werden.

#### 4.2.3.1.2. Histologische Untersuchung im Bezug auf das Vorkommen von PCV2-Antigen im Tier (Daten s. CD im Anhang)

Zwischen der histologischen Untersuchung und dem Antigennachweis im Tier ergaben sich statistische Zusammenhänge, die in Tabelle 17 dargestellt sind.

Tabelle 17: Zusammenhänge zwischen den Ergebnissen der histologischen Untersuchung und dem Antigennachweis im Tier

	Tonsillen	Lunge	Milz	BroLk	MesLk
Histiozytose	*		*	*	*
Lymphozyten-depletion in den Keimzentren	*			*	*
Lymphozyten-depletion in der Mantelzone	*		*	*	*
Reduktion der Follikelanzahl	*			*	*
Mehrkernige Riesenzellen					*

BroLk: Bronchiallymphknoten; MesLk: Mesenteriallymphknoten;

\* :statistisch signifikant ( $p < 0,025$ )

Eine statistisch signifikanter Zusammenhang lag zwischen dem Histiozytengehalt und dem PCV2-Antigennachweis vor. So kam in allen lymphatischen Organen bei maximal 6 % (13/235 MesLk) der immunhistologisch negativen Tiere eine Histiozytose vor. Jedoch konnte bei 14 % (14/102 Milz) bis

31 % (32/102 MesLk) der Tiere mit Antigennachweis eine Histiozytose festgestellt werden ( $p < 0,0001$ ).

Eine Lymphozytendepletion in den Keimzentren konnte sowohl in den Tonsillen als auch den Mesenterial- und Bronchiallymphknoten bei positiver Immunhistologie beobachtet werden. So zeigten lediglich sechs, eines und vier der 225, 235 und 224 immunhistologisch negativen Tiere eine Lymphozytendepletion. Jedoch waren 75 % (18/24 Tonsillen) bis 94 % (16/17 MesLk) der Tiere, die eine Depletion der Lymphozyten aufwiesen, auch immunhistologisch positiv ( $p < 0,0001$ ).

Auch ein Zusammenhang zwischen der Lymphozytendepletion in der Mantelzone und dem Antigennachweis konnte in den lymphatischen Organen aufgezeigt werden ( $p \leq 0,0016$ ).

In den Tonsillen und den Lymphknoten konnten bei 15 bis 19 Hausschweinen eine Depletion der Follikel gesehen werden. Von diesen waren 74 % (14/19 MesLk) bis 80 % (12/15 Tonsillen) immunhistologisch positiv. 28 % (88/318 MesLk) der Tiere mit unauffälliger Follikelanzahl waren immunhistologisch positiv ( $p \leq 0,0001$ ).

Wie auch im vorherigen Kapitel beschrieben, waren in den Mesenteriallymphknoten 80 % (16/20) der Tiere, die mehrkernige Riesenzellen zeigten, immunhistologisch positiv ( $p < 0,0001$ ).

#### **4.2.3.2. Assoziation der histologischen Befunde mit dem PCV2-Genomnachweises mittels PCR (Daten s. CD im Anhang)**

Der Genomnachweis wurde als hoch bei den Hausschweinen gewertet, wenn mindestens  $5 \times 10^6$  PCV2-DNA-Kopien pro  $\mu\text{g}$  isolierter DNA vorlagen. Dementsprechend waren die Ergebnisse der Real-time-PCR bei Tieren mit weniger als  $5 \times 10^6$  Kopien als niedrig bewertet worden (Brunborg et al., 2004; Harding et al., 2008; Olvera et al., 2004; Reiner et al., 2010; Rovira et al., 2002).

#### 4.2.3.2.1. Histologische Untersuchung und PCV2-Genomnachweis in demselben Organ

In Tabelle 18 sind die Korrelationen zwischen der histologischen Untersuchung und dem Genomnachweis im selben Organ zusammengefasst.

Tabelle 18: Korrelationen zwischen den Ergebnissen der histologischen Untersuchung und dem Genomnachweis desselben Organs

	Tonsillen	Lunge	Milz	BroLk	MesLk
Histiozytose	*	*	*	*	*
Lymphozyten-depletion in den Keimzentren	*		*	*	*
Lymphozyten-depletion in der Mantelzone			*		*
Reduktion der Follikelanzahl			*		*
Mehrkernige Riesenzellen				*	*

BroLk: Bronchiallymphknoten; MesLk: Mesenteriallymphknoten;

\* :statistisch signifikant ( $p < 0,025$ )

In dem Interstitium der Lunge und in den lymphatischen Organen konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Vorkommen von Makrophagen und PCV2-DNA-Werten festgestellt werden. So lagen bei 62 % (28/45 MesLk) bis 69 % (22/32 BroLk) der Tiere mit einer Histiozytose hohe PCV2-DNA-Kopienanzahlen vor ( $p < 0,0023$ ).

In den lymphatischen Organen zeigten 13 % (6/47 Milz) bis 22 % (19/85 Tonsillen) der Hausschweine mit hohen PCR-Werten eine Lymphozytendepletion in den Keimzentren. Von den Tieren mit niedrigen Kopienanzahlen zeigten maximal 2 % (5/238 Tonsillen) eine Lymphozytenreduktion ( $p \leq 0,0002$ ).

In den Mesenteriallymphknoten und der Milz lagen bei 24 % (19/79) und 28 % (13/47) der Tiere, die hohe PCR-Werte aufwiesen, eine Lymphozytendepletion der Mantelzone vor ( $p \leq 0,0001$ ). Jedoch konnte nur bis maximal 5 % (14/291 Milz) der Tiere mit niedriger Kopienanzahl eine Reduktion der Lymphozyten in der Mantelzone festgestellt werden.

Eine Reduktion der Follikelanzahl konnte in der Milz und in den Mesenteriallymphknoten bei 6 von 47 beziehungsweise 15 von 79 Tieren mit hohen PCR-Werten beobachtet werden ( $p \leq 0,002$ ).

Das Vorkommen von mehrkernigen Riesenzellen in den Lymphknoten ist signifikant zu der PCV2-Kopienanzahl/ $\mu\text{g}$  DNA in diesen ( $p \leq 0,0001$ ). Von 79 bzw. 82 Tieren, die eine Kopienanzahl von mindestens  $5 \times 10^6/\mu\text{g}$  DNA im Mesenterial- bzw. Bronchiallymphknoten aufwiesen, zeigten 23 % (18/79) bzw. 15 % (12/82) mehrkernige Riesenzellen. Von 235 bzw. 234 Tieren, die weniger DNA Kopien als  $5 \times 10^6/\mu\text{g}$  DNA hatten, zeigten nur 2 bzw. 3 Schweine Riesenzellen.

#### **4.2.3.2.2. Histologische Untersuchung und Nachweis des PCV2-Genoms an irgendeiner Stelle im Tier**

Es wurde untersucht, ob Tiere bestimmte histologische Parameter zeigten und dabei in mindestens einem Organ, unabhängig von dem histologisch untersuchten Gewebe, PCV2-DNA-Kopien von mindestens  $5 \times 10^6$  Kopien pro  $\mu\text{g}$  isolierter DNA aufwiesen.

Tabelle 19 zeigt die statistischen Zusammenhänge zwischen den Befunden der histologischen Untersuchung und dem Genomnachweis an irgendeiner Stelle im Tier.

Tabelle 19: Statistischer Zusammenhang zwischen den Ergebnissen der histologischen Untersuchung und dem Genomnachweis im Tier

	Tonsillen	Lunge	Milz	BroLk	MesLk
Histiozytose	*	*		*	*
Lymphozyten-depletion in den Keimzentren	*			*	*
Lymphozyten-depletion in der Mantelzone	*		*		*
Reduktion der Follikelanzahl	*			*	*
Mehrkernige Riesenzellen				*	*

BroLk: Bronchiallymphknoten; MesLk: Mesenteriallymphknoten;

\* :statistisch signifikant ( $p < 0,025$ )

In den Tonsillen, den Mesenterial- und Bronchiallymphknoten und auch im Interstitium der Lunge konnten ein signifikanter Zusammenhang ( $p \leq 0,0002$ ) zwischen dem Makrophagengehalt und den PCV2-PCR-Werten festgestellt werden. So hatten 64 % (29/45 MesLk) bis 81 % (26/32 BroLk) der Tiere, die eine Histiozytose zeigten hohe PCR-Werte, wohingegen bei maximal 8 % (16/214 MesLk) der Tiere mit niedrigem PCV2-DNA-Gehalt eine Histiozytose vorhanden war.

In den Tonsillen und den Mesenterial- sowie Bronchiallymphknoten wiesen lediglich 2 % (3/204), 1 % (2/214) bzw. 2 % (3/204) der Tiere mit niedrigen PCR-Werten eine Lymphozytendepletion in den Keimzentren auf. Dahingegen zeigten

---

18 % (21/120), 12 % (15/123) bzw. 13 % (16/120) der Schweine mit hohen PCR-Werten eine Lymphozytendepletion in den Follikeln ( $p < 0,0001$ ).

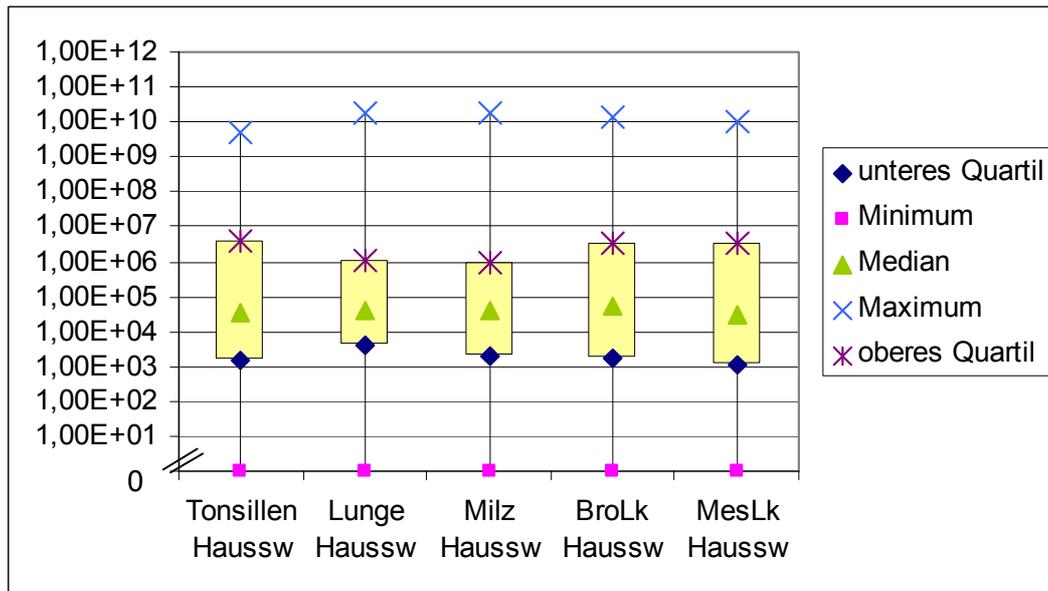
Lediglich 4 % (9/214 MesLk) bis 6 % (13/204 Tonsillen) der Tieren mit niedrigen PCV2-Kopienanzahlen/ $\mu\text{g}$  DNA zeigten eine Lymphozytendepletion in der Mantelzone in den Tonsillen, der Milz bzw. den Mesenteriallymphknoten. Jedoch zeigten 15 % (18/123 Milz) bis 20 % (24/120 Tonsillen) der Haussschweine mit hohen PCV2-Kopienanzahlen/ $\mu\text{g}$  DNA eine Lymphozytendepletion in der Mantelzone ( $p \leq 0,0013$ ).

Eine Reduktion der Follikelanzahl zeigten 11 % (13/120 Tonsillen) bis 13 % (15/120 BroLk) der Tiere mit hohen PCV2-DNA-Werten, wohingegen dies lediglich bei 1 % (2/204 Tonsillen) bis 2 % (4/204 BroLk) der Tiere mit niedrigem PCV2-DNA-Wert in den Tonsillen und Lymphknoten festzustellen war ( $p \leq 0,0003$ ).

80 % (12/15 BroLk) bis 90 % (18/20 MesLk) der Tiere mit mehrkernigen Riesenzellen in den Lymphknoten wiesen mindestens  $5 \times 10^6$  DNA-Kopien des PCV2-Genoms pro  $\mu\text{g}$  isolierter DNA auf ( $p \leq 0,0007$ ).

#### 4.2.4. Ergebnisse der Real-time-PCR bei den Hausschweinen

Die Ergebnisse der Real-time-PCR bei den Hausschweinen sind in Abbildung 13 ersichtlich. In allen untersuchten Hausschweinen konnte in mindestens einem Organ das Virus nachgewiesen werden.



**Abbildung 13:** Ergebnisse der anhand Real-time-PCR ermittelten PCV2-DNA-Kopienanzahl pro  $\mu\text{g}$  isolierter DNA in den untersuchten Geweben der Hausschweine

BroLk: Bronchiallymphknoten; MesLk: Mesenteriallymphknoten

Unteres Quartil: Die kleinsten 25 % der Datenwerte sind kleiner oder gleich diesem Wert

Oberes Quartil: Die größten 25 % der Datenwerte sind größer oder gleich diesem Wert

50 % der Tiere wiesen in allen untersuchten Organen PCV2-DNA-Werte zwischen  $10^3/\mu\text{g}$  DNA und  $10^7/\mu\text{g}$  DNA auf. Alle Mediane der Real-time-PCR lagen zwischen  $3,06$  und  $5,6 \times 10^4/\mu\text{g}$  DNA.

Daraus wird ersichtlich, dass das Virus in allen untersuchten Geweben in ähnlichen Mengen vorlag.

#### 4.2.5. Assoziation der Ergebnisse der Real-time-PCR mit der Immunhistologie bei den Hausschweinen

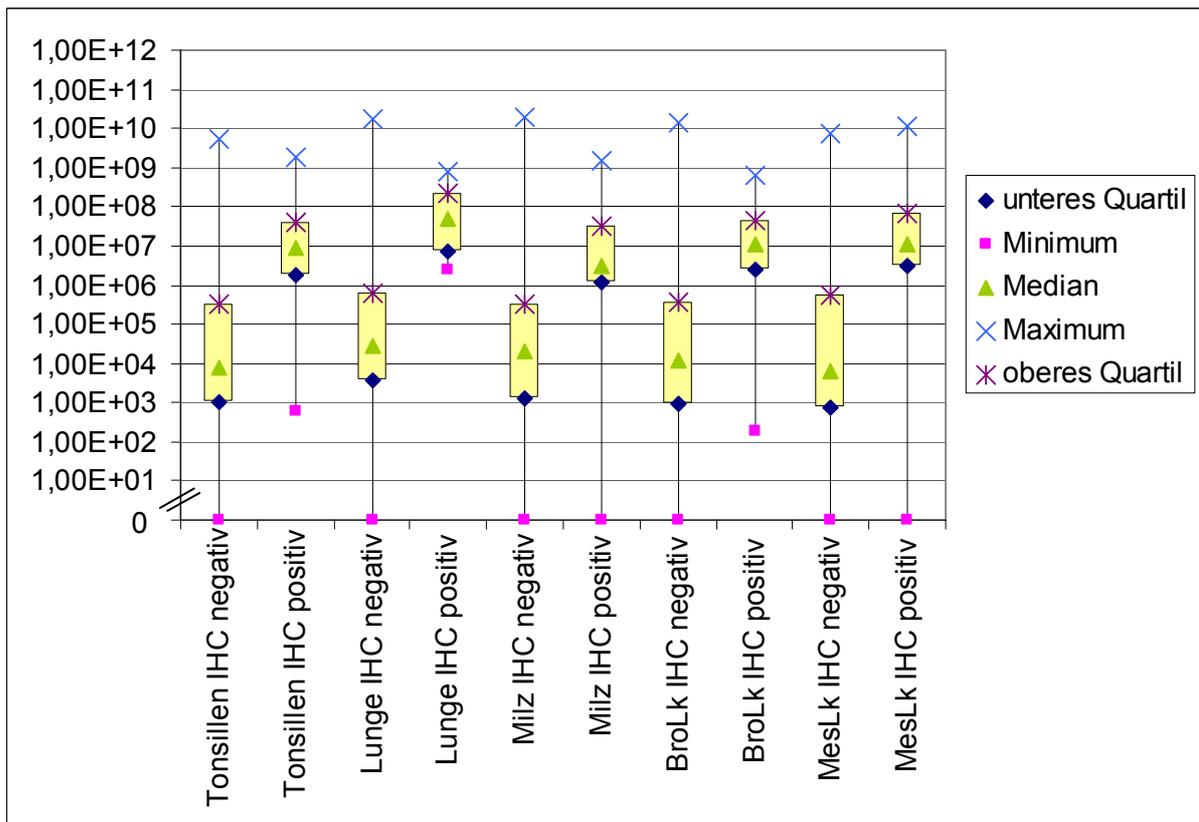
Um festzustellen, ob ein Zusammenhang zwischen den Ergebnissen der Immunhistologie und der Real-time-PCR in den verschiedenen Organen bestand, wurden die Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman berechnet (siehe Tabelle 20). Diese lagen zwischen 0,30 und 0,54 bei einem p-Wert von kleiner 0,0001. Daraus konnte geschlossen werden, dass ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen den beiden Nachweismethoden bestand.

**Tabelle 20:** Statistische Untersuchung auf das Vorliegen eines Zusammenhangs zwischen den Ergebnissen der Immunhistologie und der Real-time-PCR bei den Hausschweinen

Organ	Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman	p-Wert
Tonsillen	0,53	< 0,0001
Lunge	0,30	< 0,0001
Milz	0,38	< 0,0001
Bronchiallymphknoten	0,54	< 0,0001
Mesenteriallymphknoten	0,51	< 0,0001

In den Tonsillen, Bronchial- und Mesenteriallymphknoten konnten Rangkorrelationskoeffizienten von größer 0,50 festgestellt werden.

Ein Vergleich des Gehaltes an PCV2-DNA in Hausschweinen mit oder ohne immunhistologischem PCV2-Antigen-Nachweis ist in Abbildung 14 dargestellt.



**Abbildung 14:** Virusgehalte in immunhistologisch positiven und negativen Geweben bei Hausschweinen

IHC: Immunhistologie; BroLk: Bronchiallymphknoten;

MesLk: Mesenteriallymphknoten

Unteres Quartil: Die kleinsten 25 % der Datenwerte sind kleiner oder gleich diesem Wert

Oberes Quartil: Die größten 25 % der Datenwerte sind größer oder gleich diesem Wert

75 % der Antigen aufweisenden Tiere enthielten in allen Geweben PCV2-DNA-Gehalte von größer  $1,2 \times 10^6/\mu\text{g}$  DNA, wohingegen bei den immunhistologisch negativen Tieren auffiel, dass nur 25 % der Tiere PCV2-DNA-Gehalte von über  $10^6/\mu\text{g}$  DNA und 50 % der Tiere Werte von  $10^3$  bis  $10^6/\mu\text{g}$  DNA enthielten. Überraschenderweise waren die Maxima in den immunhistologisch negativen Hausschweinen jedoch immer höher als bei immunhistologisch positiven Tieren.

Hundertvierundzwanzig Hausschweine wiesen in mindestens einem Organ eine Mindest-Kopienanzahl der PCV2-DNA von  $5 \times 10^6/\mu\text{g}$  DNA auf. Von diesen konnte bei 83 Tieren ein und bei 41 Tieren kein Signal in der immunhistologischen Untersuchung festgestellt werden. Von den Tieren mit einer Kopienanzahl von kleiner  $5 \times 10^6/\mu\text{g}$  DNA ( $n = 216$ ) in der PCR-Untersuchung zeigten 197 in der Immunhistologie ebenfalls kein Antigen. Bei 19 Tieren konnte dagegen ein immunhistologisches Signal festgestellt werden.

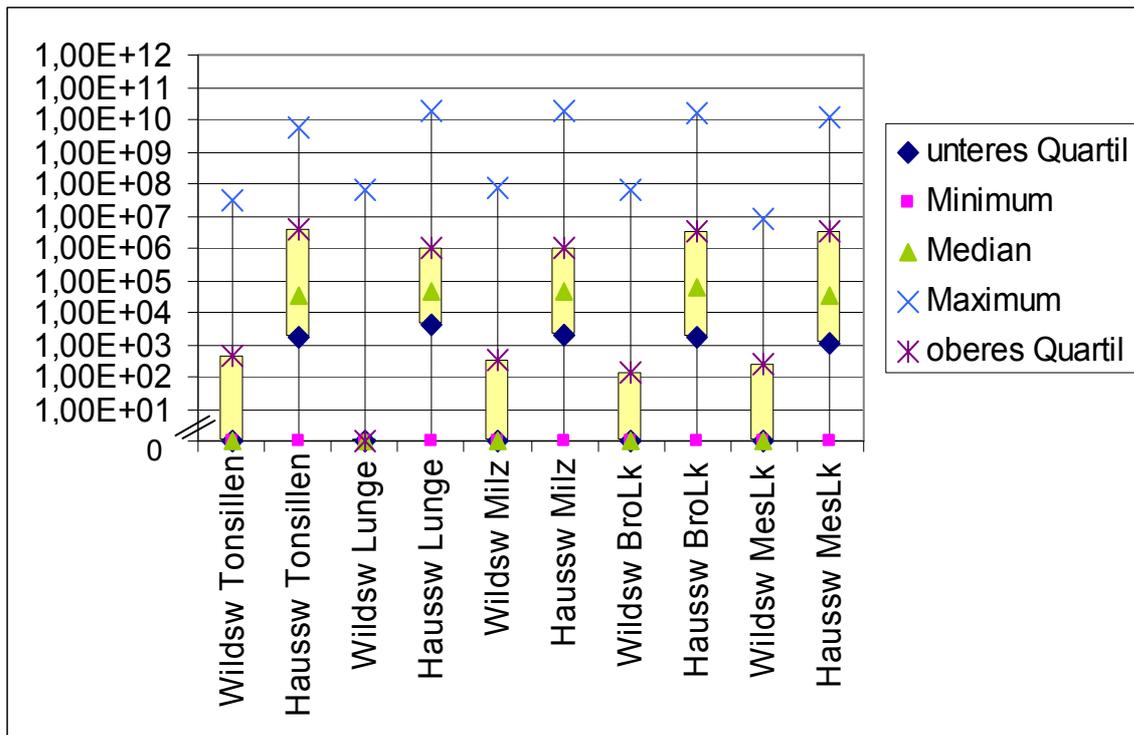
#### **4.2.6. Ergebnisse der Ziehl-Neelsen-Färbung**

Es konnten mittels der Ziehl-Neelsen-Färbung keine säurefesten Bakterien in den Geweben der Hausschweine nachgewiesen werden.

### 4.3. Vergleich der PCR-Werte zwischen Wild- und Hausschweinen

Ein Vergleich der mittels Real-time-PCR ermittelten PCV2-Virusgenommengen der Wild- und Hausschweine ergab einen statistisch hochsignifikanten Unterschied innerhalb der untersuchten Gewebe zwischen den Wild- und den Hausschweinen ( $p < 0,0001$ ).

Die Wildschweine hatten in allen Geweben deutlich niedrigere DNA-Gehalte als die Hausschweine (siehe Abbildung 15).



**Abbildung 15:** Vergleich der PCV2-DNA Kopienanzahl in den untersuchten Geweben beim Wild- und Hausschwein

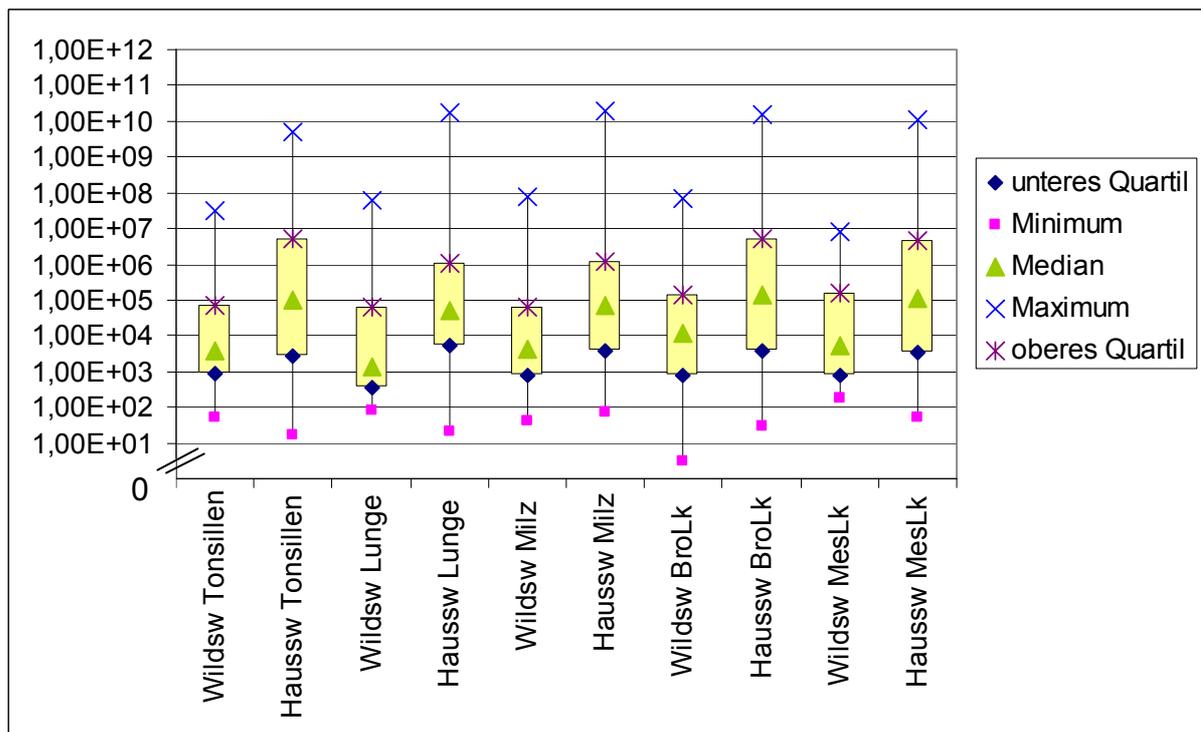
Wildsw: Wildschwein; Haussw: Hausschwein;

BroLK: Bronchiallymphknoten; MesLk: Mesenteriallymphknoten

Unteres Quartil: Die kleinsten 25 % der Datenwerte sind kleiner oder gleich diesem Wert

Oberes Quartil: Die größten 25 % der Datenwerte sind größer oder gleich diesem Wert

Ein Unterschied zwischen den Wild- und Hausschweinen blieb sichtbar, jedoch nicht mehr so deutlich ausgeprägt, wenn lediglich Wildschweine, bei denen in mindestens einem Organ das Virus nachweisbar war, mit den Hausschweinen verglichen wurden (siehe Abbildung 16).



**Abbildung 16:** Vergleich der PCV2-DNA Kopienanzahl in den untersuchten Geweben bei Wildschweinen, bei denen in mindestens einem Organ Virus nachweisbar war, und Hausschweinen

Wildsw: Wildschwein; Haussw: Hausschwein;

BroLk: Bronchiallymphknoten; MesLk: Mesenteriallymphknoten

Unteres Quartil: Die kleinsten 25 % der Datenwerte sind kleiner oder gleich diesem Wert

Oberes Quartil: Die größten 25 % der Datenwerte sind größer oder gleich diesem Wert

## **5. Diskussion**

### **5.1. Wildschweine**

Für die Diagnose PMWS werden typische klinische (Abmagerung und reduzierte Gewichtszunahme eventuell in Verbindung mit Dyspnoe und Ikterus) und pathologisch-histologische Befunde (Lymphozytendepletion und Makrophageninfiltration vor allem in den lymphatischen Organen) sowie der Nachweis von PCV2 benötigt (Allan and Ellis, 2000; Harding and Clark, 1997; Harding, 2007; Kim et al., 2002; Nielsen et al., 2008; 1997; Segales et al., 2000; Sorden, 2000).

Aufgrund von Arbeiten von Harding et al. (2008), Olvera et al. (2004), Brunborg et al. (2004) und Rovira et al. (2002), die bei an PMWS-erkrankten Tieren hohe PCV2-Kopienanzahlen fanden, vermuteten diese einen Schwellenwert, ab dem es zu einer Erkrankung an PMWS kommt.

In der vorliegenden Arbeit wurde dieser dementsprechend mit  $5 \times 10^6$  PCV2-DNA-Kopien/ $\mu\text{g}$  DNA festgelegt (Reiner et al., 2010).

Eine Gegenüberstellung der Ergebnisse von Wild- und Hausschweinen unter Berücksichtigung verschiedener, zwischen beiden Gruppen unterschiedlicher Parameter (z. B. Alter, Besatzdichte) erfolgt in Kapitel 5.3.

#### **5.1.1. Wildschweine mit Abmagerung**

Lediglich drei der Wildschweine (V 2/06, V 92/06 und V 123/06) wiesen ein reduziertes Körpergewicht auf. Alle drei Tiere waren immunhistologisch negativ und die PCV2-DNA-Kopienanzahl lag in allen Geweben unter dem Schwellenwert von  $5 \times 10^6/\mu\text{g}$  DNA. Die Milz, die Mesenterial- und die Bronchiallymphknoten wiesen einen physiologischen Gehalt an Lymphozyten

und Histozyten auf. Auch die übrigen histologischen Parameter waren in diesen Organen ohne besonderen Befund.

Lediglich bei einem fünfjährigen Tier (V 92/06) konnten in den Tonsillen eine Histozytose sowie eine Lymphozytendepletion der Mantelzone festgestellt werden. Damit zeigte dieses Wildschwein ein reduziertes Körpergewicht und histologische Veränderungen, die auf eine Erkrankung an PMWS hinweisen.

Die PCR-Werte lagen bei  $2,3 \times 10^3$  PCV2-Kopienanzahlen/ $\mu\text{g}$  DNA in der Tonsille, bei  $2,1 \times 10^2$ / $\mu\text{g}$  DNA in der Lunge, bei 0/ $\mu\text{g}$  DNA in der Milz, bei  $8,6 \times 10^1$ / $\mu\text{g}$  DNA in den Bronchial- und bei  $1,9 \times 10^2$ / $\mu\text{g}$  DNA in den Mesenteriallymphknoten.

Aufgrund der histologischen Befunde, dem für Wildschweine überdurchschnittlich hohen PCV2-DNA-Gehalt in der Tonsille und der Abmagerung ist eine Erkrankung an PMWS wahrscheinlich. Ungewöhnlich ist das hohe Alter des Tieres.

Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass eine Abmagerung alleine bei Wildschweinen nicht mit einer Erkrankung an PMWS korreliert ist. Dies bestätigt eine Studie von Lipej et al. (2007). In dieser wurde bei sieben Wildschweinen eine Abmagerung festgestellt, aber es wurden nur in drei Tieren eine Lymphozytendepletion, eine Histozyteninfiltration und PCV2-Nukleinsäure nachgewiesen. Somit wurde von sieben abgemagerten Schweinen nur in drei Tieren PMWS diagnostiziert.

### **5.1.2. Wildschweine mit Metastrongyloiden**

Die 39 Wildschweine mit einem Befall von Metastrongyloiden wiesen maximal  $1,2 \times 10^6$  PCV2-DNA-Kopien/ $\mu\text{g}$  DNA in der Real-time-PCR (und damit eine PCV2-Kopienanzahl unterhalb des Schwellenwertes) und kein Signal in der Immunhistologie auf. Lediglich bei einem Wildschwein (V 157/06) mit Lungenwürmern lagen histologische Läsionen in Form einer Histozytose und einer Lymphozytendepletion in den Mesenteriallymphknoten vor, die zu einer Erkrankung an PMWS passen.

---

Somit scheint ein Befall mit Lungenwürmern nicht begünstigend auf eine Erkrankung an PMWS zu wirken und stellt damit vermutlich auch keinen Kofaktor dar. Auch gibt es keinen Hinweis, dass eine PCV2-Infektion Auswirkungen hinsichtlich eines Befalls mit Metastrongyloiden hat.

### **5.1.3. Wildschweine mit Antigennachweis**

#### **5.1.3.1. Immunhistologisch positive Wildschweine der Jagdsaison 2004/05**

Bei den fünf immunhistologisch positiven Wildschweinen der Jagdsaison 2004/05 fielen in der histologischen Untersuchung in den Bronchiallymphknoten eine mäßige Anzahl an Follikeln ( $n = 1$ ), ein hoher Gehalt der eosinophilen Granulozyten ( $n = 1$ ) und viele mehrkernige Riesenzellen vom Langhanstyp ( $n = 1$ ) in verschiedenen Tieren auf.

Der erhöhte Gehalt an eosinophilen Granulozyten und das Vorkommen von mehrkernigen Riesenzellen im Bronchiallymphknoten könnte auf einen möglichen Befall mit Metastrongyloiden zurückzuführen sein, deren Larven über die Lymphbahnen aus dem Darmtrakt in die Lunge wandern (Caswell and Williams, 2007a). Jedoch standen keine Lungenproben zur histopathologischen Untersuchung zur Verfügung.

Schwere Infektionen können bei chronischem Verlauf zu einer Follikeldepletion führen. Somit könnte sich die reduzierte Follikelanzahl ohne eine Lymphozytendepletion oder eine Histiozytose durch eine chronische Erkrankung anderer Genese erklären lassen.

Bei keinem der fünf Tiere war eine für PMWS sprechende Lymphozytendepletion und Histiozytose vorhanden.

In diesen fünf Wildschweinen lagen folglich immunhistologisch nachweisbares PCV2-Antigen und in mindestens einem Organ ein hoher Gehalt an PCV2-Virus-Genom vor. Jedoch führte dies nicht zu einer Abmagerung oder histologisch erfassbaren, den PMWS zuzuordnenden Läsionen.

Somit ergaben die Untersuchungen, dass von den 186 Wildschweinen aus der Jagdsaison 2004/05 fünf Tiere zwar PCV2-Antigen aufwiesen und damit mit PCV2 infiziert waren, aber keine Veränderungen aufwiesen, die zu PMWS

passen. Dabei ist einschränkend zu beachten, dass lediglich die Bronchiallymphknoten zur histologischen Untersuchung vorlagen.

#### **5.1.3.2. Immunhistologisch positive Wildschweine der Jagdsaison 2006/07**

Die drei immunhistologisch positiven Wildschweine der Jagdsaison 2006/07 wiesen mit  $1,0 \times 10^6$  bis  $3,0 \times 10^7$  PCV2-DNA-Kopien pro  $\mu\text{g}$  isolierter DNA im Vergleich zu den immunhistologisch negativen Wildschweinen höhere PCR-Werte in den Geweben auf (siehe Abbildung 7).

Das Wildschwein V 85/06 zeigte PMWS-typische histologische Befunde. Es wies eine Lymphozytendepletion und einen hohen Histozytengehalt in den Tonsillen, den Mesenterial- und den Bronchiallymphknoten auf.

Zusätzlich zeigte dieses Wildschwein eine reduzierte Follikelanzahl und vereinzelt mehrkernige Riesenzellen vom Fremdkörpertyp in den Tonsillen. In Mesenterial- und Bronchiallymphknoten konnten mehrkernige Riesenzellen vom Fremdkörpertyp und im Bronchiallymphknoten zusätzlich vom Langhanstyp festgestellt werden.

Aufgrund der histologischen Befunde, dem PCV2-Antigen- und dem PCV2-Virusgenomnachweis lag bei diesem 12 Monate alten Tier vermutlich eine Erkrankung an PMWS vor.

Eines der anderen beiden Antigen-aufweisenden Wildschweine (V 84/06) zeigte histologische Befunde, die ebenfalls bei einer Erkrankung an PMWS vorkommen können. So konnte eine mäßige Follikelanzahl in den Mesenteriallymphknoten, eine Lymphozytendepletion der Mantelzone und mäßige Follikelanzahl in der Milz sowie eine Histozytose in der Milz festgestellt werden. Die erhöhte Mitoserate im BALT und die eosinophilen Granulozyten in der Lunge sowie im Bronchiallymphknoten könnten durch einen Befall mit Metastrongyloiden hervorgerufen worden sein. Zwar wurden bei der mikroskopischen Untersuchung der Lunge weder Parasitenanschnitte noch Parasiteneier gefunden, jedoch ist lediglich der positive Befund beweisend.

Aufgrund der Histiocytose, der Lymphozytendepletion der Mantelzone und der mäßigen Follikelanzahl in der Milz passen die Befunde zu einer Erkrankung des 10 Monate alten Tieres an PMWS.

Die histologischen Befunde, der Nachweis von hohen Mengen an PCV2-Virus ( $1,8 \times 10^6/\mu\text{g}$  DNA bis  $3,0 \times 10^7/\mu\text{g}$  DNA) und der Antigennachweis sprechen nicht nur für eine Infektion mit PCV2, sondern zusätzlich für eine Erkrankung dieser beiden Wildschweine an PMWS.

Beide Tiere zeigten keine Abmagerung. Eine ausführliche Untersuchung der Tierkörper konnte allerdings nicht durchgeführt werden, so dass die Tiere auf weitere makroskopische Anzeichen für eine Erkrankung an PMWS wie vergrößerte Lymphknoten und Anämie nicht untersucht wurden. Weiterhin ist zu beachten, dass die Tiere geschossen und nicht tot aufgefunden wurden. Eventuell war der Krankheitsverlauf noch nicht so weit fortgeschritten, dass er zu einer Abmagerung führte. So kommt es nach Lipej et al. (2005) erst im späteren Krankheitsverlauf zu Abmagerungen.

Das dritte der immunhistologisch positiven Wildschweine (V 87/06) wies lediglich in den Bronchiallymphknoten eine mäßig reduzierte Follikelanzahl auf. Es lagen bei diesem 11 Monate alten Tier in keinem untersuchten Gewebe eine Histiocytose oder eine Lymphozytendepletion vor.

Somit konnte bei diesem Tier kein morphologisches Korrelat zu der bestehenden PCV2-Infektion festgestellt werden. Im Gegensatz zu den anderen beiden immunhistologisch positiven Wildschweinen wies dieses Tier lediglich in den Tonsillen und im Mesenteriallymphknoten ein schwaches immunhistologisches Signal auf. Damit war dieses Tier vermutlich infiziert, jedoch nicht erkrankt an PCV2.

Zusammenfassend ergaben die Untersuchungen, dass von acht PCV2-Antigen aufweisenden Wildschweinen aus den Jahren 2004 bis 2007 lediglich zwei Tiere (V 85/06 und V 84/06) Veränderungen aufwiesen, die auf eine Erkrankung an PMWS hinweisen.

#### **5.1.4. Beurteilung der Real-time-PCR-Ergebnisse bei den Wildschweinen**

Wie die Abbildung 7 zeigt, wurden bei 50 % der Wildschweine in den lymphatischen Geweben und sogar bei 75 % der Wildschweine in der Lunge mittels PCR kein PCV2 nachgewiesen. Nur in 25 % der Wildschweine konnten in den lymphatischen Geweben PCV2-DNA-Werte über  $4,15 \times 10^2/\mu\text{g DNA}$  festgestellt werden.

Die 11 Wildschweine (WS 1-2-5, WS 10-1-6, WS 10-1-17, WS 11-1-5, WS 11-1-10, WS 11-1-11, WS 11-1-14 und V 81/06, V 87/06, V 91/06, V 137/06) mit Werten in der Real-time-PCR über dem Schwellenwert von  $5 \times 10^6/\mu\text{g DNA}$  jedoch ohne PMWS-typische histologische Läsionen können als PCV2-infiziert, aber nicht an PCV2-erkrankt eingestuft werden.

Die Tiere V 84/06 und V 85/06 mit PCV2-Kopienanzahlen von größer  $5 \times 10^6$  in mindestens einem untersuchten Gewebe werden aufgrund des Nachweises von Virusantigenen und Virusgenom sowie der histologischen Befunde als an PCV2-erkrankt eingestuft.

#### **5.1.5. Vergleich der Ergebnisse der Immunhistologie und der Real-time-PCR unter Berücksichtigung der pathohistologischen Befunde der Wildschweine**

Wenn mittels Immunhistologie Antigen in den Wildschweinen nachweisbar war (siehe Tabelle 6), lagen bis auf eine Ausnahme auch PCV2-DNA-Kopien von mehr als  $10^6$  pro  $\mu\text{g}$  isolierter DNA in dem Gewebe vor. Lediglich in einem Bronchiallymphknoten konnte trotz eines immunhistologischen Signals von 2 nur  $5,0 \times 10^4$  Kopien/ $\mu\text{g DNA}$  ermittelt werden, jedoch waren in der Milz dieses Tieres Kopienanzahlen von  $1,57 \times 10^7/\mu\text{g DNA}$  nachweisbar.

Die immunhistologischen Ergebnisse und die Werte in der Real-time-PCR stimmten demzufolge weitgehend überein.

Bei fünf Tieren (WS 1-2-5, WS 11-1-5, V 81/06, V 91/06, V 137/06) lagen die Ergebnisse der Real-time-PCR über dem Schwellenwert von  $5 \times 10^6/\mu\text{g}$  DNA, jedoch war kein Antigen nachweisbar. Alle fünf Tiere wiesen keine histologischen Läsionen auf.

Durch die Verwendung eines Schwellenwertes von  $5 \times 10^6/\mu\text{g}$  DNA zeigten die hier gewonnenen Erkenntnisse, dass die Gefahr von falsch positiven Ergebnissen bestand, da von 13 Wildschweinen mit PCV2-Werten über dem Schwellenwert lediglich 2 Tiere histologische Läsionen aufwiesen und vermutlich an PMWS erkrankt waren. Die mögliche Konsequenz, deshalb den Schwellenwert bei Wildschweinen höher anzulegen, bleibt zweifelhaft, denn vier Wildschweine, die Befunde aufwiesen, die auf eine Erkrankung an PMWS hinweisen, lagen unterhalb des bisherigen Schwellenwerts. Damit wäre die einzige Möglichkeit, falsch positive Ergebnisse durch alleinige Verwendung von einer Real-time-PCR oder falsch negativer Ergebnisse durch alleinige Verwendung von einer Immunhistologie zu vermeiden, beide Nachweisverfahren eventuell ohne Schwellenwert bei der Real-time-PCR zusammen mit einer ausführlichen pathohistologischen Untersuchung anzuwenden. Dies entspricht der von Sorden (2000) aufgestellten Regel, dass lediglich der Nachweis des Virus zusammen mit histologischen und makroskopischen Läsionen zu der Diagnose PMWS führen kann.

#### **5.1.6. Beurteilung der Wildschweine, die weder PCV2-Antigen, noch mehr als $5 \times 10^6$ PCV2-Kopien pro $\mu\text{g}$ isolierter DNA aufwiesen**

Von den 13 Wildschweinen, bei denen weder PCV2-Virusgehalte über dem Schwellenwert von  $5 \times 10^6/\mu\text{g}$  DNA noch PCV2-Antigen vorlagen, waren vermutlich vier Wildschweine (V 157/06, V 92/06, WS 11-1-12 und WS 11-1-15) an PMWS erkrankt.

Bei ersterem (V 157/06) waren in der mikroskopischen Untersuchung eine Lymphozytendepletion und eine Histiozytose im Mesenteriallymphknoten vorhanden. Das elf Monate alte Tier wies eine für Wildschweine hohe Anzahl von  $2,1 \times 10^5$  PCV2-DNA-Kopien im Mesenteriallymphknoten auf. Aufgrund der

PMWS-typischen histologischen Befunde und des Nachweises von für Wildschweine hohen Mengen an Virus kann das Tier aus Baden-Württemberg als vermutlich an PMWS erkrankt eingestuft werden. Zusätzlich war ein Befall mit Metastrongyloiden vorhanden.

In dem Wildschwein V 92/06 fielen in den Tonsillen eine Histiozytose und eine Lymphozytendepletion in der Mantelzone auf. Die übrigen Gewebe wiesen keine PMWS-typischen histologischen Befunde auf. Das Ergebnis der Real-time-PCR betrug  $2,3 \times 10^3$  PCV2-DNA-Kopien/ $\mu\text{g}$  DNA in den Tonsillen und wies damit eine höhere PCV2-DNA-Kopienanzahl als 75 % der übrigen Wildschweine in den Tonsillen auf. Auffallend waren das mit 5 Jahren hohe Alter des Tieres und die Abmagerung. Weiterhin ist zu bemerken, dass in den übrigen untersuchten Organen PCV2-DNA-Gehalte bis zu  $2,1 \times 10^2/\mu\text{g}$  DNA lediglich festgestellt werden konnte. Aufgrund der Abmagerung, der histologischen Befunde und des Virusnachweises mittels Real-time-PCR ist von einer Erkrankung dieses Tieres aus Nordrhein-Westfalen an PMWS auszugehen, wobei das hohe Alter und der insgesamt niedrige PCV2-Gehalt überraschend sind. Eine Erklärungsmöglichkeit wäre, dass eine weitere Grunderkrankung bestand, die als Kofaktor fungierte. Dadurch könnte auch eine geringe PCV2-Infektion zu einer Erkrankung an PMWS bei diesem alten Tier geführt haben.

Die Tiere WS 11-1-12 und WS 11-1-15, welche eine Lymphozytendepletion in und zwischen den Keimzentren und einen Follikelschwund bzw. eine Lymphozytendepletion in der Mantelzone der Bronchiallymphknoten sowie eine Histiozytose aufwiesen, sind aufgrund der histologischen Befunden vermutlich als an PMWS erkrankt einzustufen.

Dies wurde durch hohe PCR-Werte ( $3,6 \times 10^6/\mu\text{g}$  DNA und  $4,6 \times 10^5/\mu\text{g}$  DNA in den Bronchiallymphknoten) bestätigt, die jedoch unter dem Hausschwein-Schwellenwert von  $5 \times 10^6/\mu\text{g}$  DNA lagen. Bei beiden Tieren mit einem Alter von acht und fünf Monaten aus Brandenburg war allerdings keine immunhistologische Reaktion sichtbar.

---

Bei dem 37 Monate alten Wildschwein WS 10-1-7 bleibt unklar, ob die Lymphozytendepletion im Follikelzentrum der Bronchiallymphknoten auf einer Erkrankung an PCV2 beruht. Dieses Tier wies im Bronchiallymphknoten Werte von  $1,2 \times 10^5$  Kopien pro  $\mu\text{g}$  DNA auf, in der Tonsille und der Lunge konnte kein Virusgenom nachgewiesen werden. Es fand sich keine Histiozytose in dem untersuchten Gewebe. Von diesem Tier lag lediglich der Bronchiallymphknoten zur histologischen Untersuchung vor. Eventuell lag eine schwache Ausprägung der Erkrankung vor. Als mögliche Ursache für die Lymphozytendepletion ist auch ein anderer chronischer Krankheitsprozess in Betracht zu ziehen.

Ob die Wildschweine, die zwar eine Histiozytose oder eine Lymphozytendepletion in einem Gewebe zeigten, aber nur in einem anderen untersuchten Gewebe Virus enthielten, an PMWS erkrankt waren, bleibt sehr fraglich. Es lag zwar eine Infektion mit PCV2 vor, jedoch konnte nur eine Histiozytose oder eine Lymphozytendepletion beobachtet werden.

Die Tiere, die histologische Läsionen wie eine Lymphozytendepletion oder eine Histiozytose zeigten, aber in keinem der untersuchten Gewebe PCV2-Antigen oder Virus-DNA enthielten, müssen als nicht mit PCV2 infiziert und damit als nicht an PMWS erkrankt eingestuft werden. So fanden auch Nielsen et al. (2008) eine Lymphozytendepletion und Histiozytose in Tieren mit wenig oder keinem PCV2-Virusnachweis. Die in der histologischen Untersuchung erhobenen Befunde könnten auch differentialdiagnostisch durch das porcine Respiratorische und Reproduktive Syndrom Virus (PRRSV) verursacht worden sein. Bei dieser Erkrankung kommt es zunächst zu Nekrosen und Lymphozytendepletionen in den Keimzentren der Lymphknoten, die im späteren Krankheitsverlauf mit Lymphoblasten angefüllt werden. Weiterhin können ebenfalls mehrkernige Riesenzellen im Lymphgewebe vorhanden sein. Im Gegensatz zu PMWS ist bei PRRSV eine folliculäre Hyperplasie beschrieben worden (Caswell and Williams, 2007b; Zimmerman et al., 2006).

Wie auch bei PMWS können eine Lymphozytendepletion und eine Hyperplasie der Histiozyten bei einer Erkrankung an klassischer Schweinepest,

hervorgerufen durch eine Infektion mit schwachvirulentem Hog cholera Virus, beobachtet werden (Narita et al., 2000).

Bei einer Infektion mit *Bacillus anthracis* kann durch die Füllung der Milzsinus mit Erythrozyten der Eindruck von einem Follikelschwund entstehen. Hierbei sind die Follikel zusätzlich hypozellulär. Da Schweine jedoch relativ resistent gegen Anthrax sind, bleibt die Infektion meist auf den Halsbereich und den Darm beschränkt. Häufig kommt es lediglich in den regionalen Lymphknoten zu Blutungen und Nekrose um die gekapselten Bacillen (Taylor, 2006; Valli, 2007).

#### **5.1.7. Alter der Wildschweine mit PMWS**

Die sechs Wildschweine (WS 11-1-15, WS 11-1-12, V 84/06, V 157/06, V85/06, V 92/06), bei denen eine Erkrankung an PMWS vermutlich vorlag, waren 5, 8, 10, 11, 12 und 60 Monate alt. Das Alter der ersten fünf Tiere entspricht annähernd den Angaben aus der Literatur. Danach war ein an PMWS erkranktes deutsches Wildschwein 10 Monate (Schulze et al., 2003) und ein spanisches Tier 6 Monate alt gewesen (Vicente et al., 2004). Zu Berücksichtigen ist, dass lediglich 25 % der untersuchten Wildschweine 1 bis 5 Monate alt waren. Dennoch kann gezeigt werden, dass es Wildschweine mit PMWS-Veränderungen gibt, die älter als die erkrankten Hausschweine sind, die in der Regel in einem Alter von 5-17 Wochen oder 2-3 Wochen nach dem Absetzen erkranken. Überraschenderweise konnte bei einem 60 Monate alten Tier histologische Läsionen, Abmagerung und PCV2-Virus nachgewiesen werden. Warum ein solch altes Tier an PMWS erkrankte, bleibt fraglich. Eventuell lag zusätzlich eine andere Grunderkrankung vor, die durch eine Immunstimulation zu einer Erkrankung an PMWS des alten Tieres führte.

### 5.1.8. PMWS bei Wildschweinen

Die meisten der bisherigen Studien, die das Vorkommen von PMWS bei Wildschweinen untersuchten, nutzten lediglich einen Nukleinsäurenachweis mittels PCR. Nur in wenigen Arbeiten wurde von einer geringen Stückzahl zusätzlich eine histologische und immunhistologische Untersuchung durchgeführt. Hierbei wiesen nur wenige Tiere histologische Läsionen auf, die auf eine Erkrankung an PMWS hindeuteten. So fand eine italienische Untersuchung in 16 Wildschweinen lediglich ein Tier, welches histologische Läsionen und immunhistologisch nachweisbares PCV2-Antigen aufwies (Petrini et al., 2009). In einer spanischen Studie wurde nur bei einem von 56 pathohistologisch untersuchten Wildschweinen PMWS festgestellt (Vicente et al., 2004). Eines von 8 kroatischen Wildschweinen schien an PMWS erkrankt zu sein. Weitere drei Schweine wiesen milde PMWS-typische histologische Läsionen auf. Dies deuteten die Autoren als subklinische Infektion oder als beginnende oder späte Phase der Erkrankung (Lipej et al., 2007). Diese hohe Zahl ist eventuell darin begründet, dass alle acht Tiere tot aufgefunden und nicht gejagt worden waren und aus einem umzäunten Gehege stammten, in dem intensives Management mit Zufütterung und Impfungen durchgeführt wurde, Gegebenheiten welche als Kofaktoren angesehen werden. Ein weibliches und ein männliches Wildschweine in Griechenland wurden aufgrund der histologischen Befunde, des Nachweises von PCV2 im Gewebe und bei einem Tier zusätzlicher klinischer Befunde als an PMWS-erkrankt eingestuft (Sofia et al., 2008).

Es darf in trockenen Gebieten nicht außer acht gelassen werden, dass die Tiere sich konzentriert um Wasserstellen aufhalten (Ruiz-Fons et al., 2008) und damit dort andere epidemiologische Bedingungen vorliegen als in hiesigen Gebieten.

Somit stellte die vorliegende Arbeit die größte histologische Untersuchung über das Vorkommen von PMWS bei Wildschweinen bisher dar. Die niedrige Erkrankungsrate (nur bei sechs Tieren lag eine Erkrankung an PMWS vor (siehe Abbildung 6)) könnte dadurch begründet sein, dass die Tiere geschossen und nicht tot aufgefunden worden waren. Zusätzlich handelt es sich bei allen Tieren um frei lebende Schweine und nicht um Gatterwild.

## 5.2. Hausschweine

### 5.2.1. Abmagerung bei den Hausschweinen

In sieben der neun abgemagerten Hausschweine konnten PMWS-typische histologische Läsionen (Lymphozytendepletion, Histiozytose bzw. Reduktion der Follikelanzahl) festgestellt werden. Zwei Tiere waren histologisch ohne besonderen Befund.

Eines der histologisch unauffälligen, abgemagerten Tiere (HS 1-1-124) zeigte kein immunhistologisches Signal und eine PCV2-DNA-Kopieanzahl von maximal  $3,6 \times 10^3/\mu\text{g}$  DNA in den untersuchten Geweben. Bei diesem Tier wurde die Abmagerung infolgedessen vermutlich nicht durch eine Erkrankung an PMWS ausgelöst.

In dem zweiten abgemagerten Hausschwein (HS 1-2-85) ohne histologische Läsionen konnten PCV2-DNA-Kopienanzahlen bis  $10^8/\mu\text{g}$  DNA und PCV2-Antigen nachgewiesen werden. Da die Infektion mit PCV2 jedoch keine histologisch erkennbaren Läsionen in den Geweben verursachte, ist es fraglich, ob die Infektion zu der Abmagerung führte.

Von den sieben Tieren mit histologischen Läsionen konnten in sechs Tieren (HS 1-1-66, HS 1-1-119, HS 1-1-49, HS 1-2-6, HS 1-1-9, HS 1-1-13) PCV2-DNA-Kopienanzahlen über dem Schwellenwert von  $5 \times 10^6/\mu\text{g}$  DNA oder Antigen nachgewiesen werden. Diese Tiere wiesen Befunde auf, die für eine Erkrankung an PMWS sprechen und zeigten vermutlich in diesem Zusammenhang eine Abmagerung.

Nur bei einem der Hausschweine (HS 1-2-90) mit histologischen Läsionen konnten PCV2-DNA-Kopienanzahlen von maximal  $9,87 \times 10^3/\mu\text{g}$  DNA und kein Antigen nachgewiesen werden. PMWS wird vor allem bei Tieren ab fünf Wochen festgestellt. Da dieses Tier erst einen Monat alt war, könnte der geringe Virusgehalt eine beginnende Erkrankung anzeigen. Unüblich wäre jedoch eine Abmagerung zu Beginn der Erkrankung. Daher ist es unwahrscheinlich, dass die

Infektion mit PCV2 der alleinige Auslöser für die Abmagerung bei diesem Tier war.

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Arbeit festgestellt werden, dass neun Tiere eine Abmagerung aufwiesen, von denen bei sechs Hausschweinen im Alter von 2 Monaten eine Erkrankung an PMWS vermutlich als auslösende Ursache vorlag.

### **5.2.2. Altersverteilung der immunhistologischen Ergebnisse der Hausschweine**

Bei der Beurteilung der Altersverteilung (siehe Abbildung 12) immunhistologisch positiver und negativer Hausschweine ist bemerkenswert, dass PCV2-Antigen erst bei Tieren nachweisbar war, die älter als 2 Monate waren.

Im Gegensatz zu den übrigen untersuchten Organen, bei denen 50 % der immunhistologisch positiven Tiere 2 oder 3 Monaten alt waren, wiesen noch viele Tiere im Alter von 6 Monaten in den Bronchiallymphknoten PCV2-Antigen auf, obwohl das Lungengewebe negativ war.

### **5.2.3. Vergleich der Ergebnisse der Immunhistologie in den verschiedenen untersuchten Geweben**

Bei einem Vergleich des immunhistologischen Signals in den verschiedenen Geweben fiel auf, dass häufig die lymphatischen Organe ein Signal aufwiesen, ohne dass in der Lunge ein Antigennachweis möglich war. Der umgekehrte Fall kam nur äußerst selten vor.

Dies verdeutlicht, dass bei einer Erkrankung an PMWS eine alleinige immunhistologische Untersuchung der Lunge zu falsch negativen Ergebnissen führen kann. Dementsprechend wiesen im Vergleich der Lunge mit den lymphatischen Organen die Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman Werte von 0,43 bis 0,46 auf (siehe Tabelle 15), was auf einen mäßigen Zusammenhang hindeutet. Wohingegen die lymphatischen Organe

untereinander Werte von 0,60 bis 0,74 aufwiesen, was auf einen stärkeren Zusammenhang hinweist.

Im Vergleich der lymphatischen Organe untereinander kann in der Milz seltener das Antigen nachgewiesen werden als in den Tonsillen und den Lymphknoten (siehe Tabelle 14).

Dies kann eventuell durch den Infektionsweg erklärt werden. Nach einer oronasalen Infektion erfolgt die Virusreplikation am stärksten in dem lymphatischen Gewebe, das der Eintrittsstelle am nächsten ist. Dies sind in der vorliegenden Arbeit die Tonsillen. Dies steht in Übereinstimmung mit einer früheren Arbeit, bei der ebenfalls das lymphatische Gewebe, das der Infektionsstelle am nächsten ist, die höchsten Virusgehalte zeigte (Yu et al., 2007). Überraschenderweise wiesen in der vorliegenden Arbeit aber auch viele Tiere in den Bronchial- und Mesenteriallymphknoten PCV2-Antigen auf.

#### **5.2.4. Diskussion der Ergebnisse des Antigen- und DNA-Nachweises sowie der histologischen Läsionen**

Es konnte in allen untersuchten lymphatischen Geweben ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Antigennachweis und dem Vorliegen einer Histiozytose, einer Lymphozytendepletion in den Keimzentren und in den Mantelzonen in demselben Organ festgestellt werden.

Dies entspricht den Ergebnissen früherer Studien, die eine Lymphozytendepletion und eine Histiozytose bei einer Infektion mit PCV2 beobachten konnten (Chianini et al., 2003; Rosell et al., 1999; Segales et al., 2004).

Ähnliche Ergebnisse lieferte der Vergleich des Vorkommens histologischer Läsionen mit dem PCV2-DNA-Nachweis desselben Organs. Auch hier konnten in einigen untersuchten Geweben signifikante Zusammenhänge zu der Histiozytose und der Lymphozytendepletion in den Keimzentren und in der Mantelzone gesehen werden. Im Gegensatz zur Immunhistologie konnte kein statistisch signifikanter Zusammenhang der Werte der Real-time-PCR mit einer

---

Lymphozytendepletion in der Mantelzone in den Tonsillen oder in den Bronchiallymphknoten gezeigt werden.

Beim Vergleich der histologischen Befunde in der Milz fiel auf, dass mehr statistisch signifikante Läsionen beim gleichzeitigen Antigen-/Virusnachweis im Organ vorkamen, als bei der Untersuchung des Tierstatus.

Dies ist eventuell darin begründet, dass ein oronasaler Infektionsweg vorliegt, durch den es erst später zu einer Infektion der Milz kommt. Bei der Untersuchung des Tierstatus wurde die Milz bei Tieren auf Läsionen untersucht, die zwar PCV2 in den Lymphknoten und den Tonsillen aufweisen und damit positiv waren, aber eventuell keine Virusvermehrung in die Milz erfolgt war, wodurch dort keine Läsionen vorhanden sind. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit lautet, dass es sich bei einer Erkrankung an PCV2 nicht um einen systemischen Prozess handelt. Dann müsste ein Vergleich des PCV2-Organstatus klarere Ergebnisse liefern, als bei Betrachtung des ganzen Tieres als Einheit.

Beide Hypothesen erklären, warum der Vergleich des PCV2-Gehaltes in einem Organ mit den dort festzustellenden Läsionen mehr statistische Zusammenhänge in der Milz brachte.

Interstitielle Pneumonien werden auch in früheren Studien bei einer Erkrankung an PMWS beschrieben (Quintana et al., 2001; Segales et al., 1997) und konnten auch in der vorliegenden Arbeit festgestellt werden. So bestand ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Vorliegen von Plasmazellen, Lymphozyten und Makrophagen im Interstitium und dem PCV2-Antigennachweis in der Lunge.

Überraschenderweise schien eine PCV2-Infektion keinen eindeutigen Einfluss auf die Follikelstruktur in den lymphatischen Geweben zu haben. Nach Chianini et al. (2003) kann die Reduktion oder das völlige Fehlen von Follikeln erst beim Vorkommen einer deutlichen Lymphozytendepletion und einer hochgradigen Histiozytose beobachtet werden. Eventuell befanden sich viele Hausschweine nicht im Stadium einer schweren Erkrankung, so dass keine Veränderung in der Follikelstruktur vorlag.

---

Eine statistische Korrelation des Auftretens von mehrkernigen Riesenzellen mit einer Antigendarstellung oder einem PCV2-Genomnachweis konnte in der vorliegenden Arbeit nicht in allen Organen dargestellt werden. Dies steht im Einklang mit einer Studie von Bolin et al. (2001) in der ebenfalls wenig mehrkernige Riesenzellen bei der histologischen Untersuchung beobachtet werden konnten.

### **5.2.5. PMWS bei Hausschweinen**

In 20,3 % (n = 69) der Hausschweine konnten in Form einer Lymphozytendepletion, Histiozytose und eines PCV2-Nachweis mittels Real-time-PCR oder eines Antigennachweis in den lymphatischen Organen Befunde, die zu Veränderungen bei PMWS passen, festgestellt werden. Damit konnte ein ähnlicher Wert wie in einer früheren Studie ermittelt werden, in der eine Morbidität von 5 % - 50 % in betroffenen Herden angegeben wurde (Morozov et al., 1998).

### **5.2.6. Assoziation der Ergebnisse der IHC und der Real-time-PCR bei Hausschweinen**

Hausschweine, bei denen PCV2-Antigen nachweisbar war, zeigten deutlich höhere PCV2-Kopienanzahlen/ $\mu\text{g}$  DNA als immunhistologisch negative Tiere.

Die Abbildung 14 zeigt deutlich, dass 75 % der Hausschweine mit PCV2-Antigennachweis einen PCV2-DNA-Gehalt von größer  $1,2 \times 10^6/\mu\text{g}$  DNA aufwiesen. 75 % der Hausschweine ohne immunhistologisches Signal wiesen Kopienanzahlen von maximal  $6,2 \times 10^5/\mu\text{g}$  DNA auf.

Alle Hausschweine, die in der Lunge PCV2-Antigen aufzeigten, hatten Virusgenome von mehr als  $10^6/\mu\text{g}$  DNA in dieser. Dies lässt vermuten, dass erst bei hohen Virusgehalten in der Lunge ein Nachweis von PCV2-Antigen möglich ist.

### 5.3. Vergleich Wildschweine mit Hausschweinen

Nicht nur die Virusmenge (siehe Abbildung 15), auch die Erkrankungshäufigkeit an PMWS ist bei Wildschweinen niedriger. Dies könnte sich zum einen dadurch erklären lassen, dass die untersuchten Wildschweine älter als die Hausschweine waren und alle Wildschweine geschossen und nicht tot oder krank aufgefunden wurden. Zum anderen ließe es sich durch die unterschiedlichen Lebensbedingungen erklären, denn bei dem Vorkommen von PMWS beim Hausschwein wird immer noch über Kofaktoren diskutiert. Einen solchen stellen unter anderem die Haltungsbedingungen dar. Dass durch eine Überbelegung und schlechte Luftqualität die Krankheit häufiger und stärker auftreten kann, wurde bereits bei den ersten Beschreibungen von PMWS diskutiert (Harding and Clark, 1997). Zu einem ähnlichen Schluss kommen neben einer Studie aus Rumänien (Cadaru et al., 2010) auch spanische Arbeiten, in denen bei intensiv gehaltenen Wildschweinen höhere Antikörpertiter nachgewiesen werden konnten als bei freilebenden Tieren (Boadella et al., 2011; Ruiz-Fons et al., 2006; Vicente et al., 2004).

Die Haltung als Kofaktor könnte auch in der vorliegenden Arbeit eine Rolle spielen, da die untersuchten Wildschweine in einer wesentlich geringeren Belegungsdichte, ohne Impfungen und mit Frischluft lebten.

Dies erklärt auch, warum in früheren Studien, bei denen in Gattern lebende Wildschweine untersucht wurden, mehr erkrankte Wildschweine vorlagen als bei den hier untersuchten freilebenden Wildschweinen (Ellis et al., 2003).

Da bei den untersuchten Wildschweinen mit PCV2-Infektion nur sehr selten PMWS-typische histologische Läsionen auftraten, scheint auch für das Wildschwein wie für das Hausschwein zu gelten, dass eine Infektion mit PCV2 nicht zwangsläufig zu einer Erkrankung an PMWS führt. Mit der Ausnahme des einen älteren Tieres (V 92/06) (Mittelwert  $8,4 \times 10^2/\mu\text{g}$  DNA) konnten bei den übrigen fünf erkrankten Wildschweinen Mittelwerte der PCV2-Kopienanzahlen aus allen untersuchten Geweben von  $7,7 \times 10^4$  bis  $1,5 \times 10^7/\mu\text{g}$  DNA ermittelt

werden. Diese Werte waren deutlich über dem Durchschnitt der meisten anderen positiven Wildschweine. Möglicherweise liegt somit auch bei Wildschweinen ein Virusschwellenwert, ab dem eine Erkrankung an PMWS wahrscheinlicher wird, wie bei den Hausschweinen, vor. Dieser scheint sich unter dem Wert der Hausschweine zu befinden. Um jedoch für die Wildschweine einen Schwellenwert ermitteln zu können, waren in dieser Studie nicht genügend an PMWS erkrankte Wildschweine vorhanden.

#### **5.4. Ziehl-Neelsen-Färbung**

In früheren Studien wurden bei Wildschweinen Infektionen mit Mykobakterien diagnostiziert (Bollo et al., 2000; Gortazar et al., 2003). Dabei konnten in den Lymphknoten mehrkernige Riesenzellen vom Langhanstyp nachgewiesen werden. Mittels der Ziehl-Neelsen-Färbung ist es möglich, Mykobakterien darzustellen. Bei keinem in dieser Studie untersuchten Wild- und Hausschwein gelang dies, womit eine Infektion mit Mykobakterien als Ursache für das Vorkommen von mehrkernigen Riesenzellen unwahrscheinlich ist. Dies wird auch durch das histologische Bild bestätigt, da keine geschichteten Granulome mit zentraler Nekrose und einer konzentrischen Schichtung aus Makrophagen, Lymphozyten und Epitheloidzellen vorkamen. Somit könnten die mehrkernigen Riesenzellen z. B. im Rahmen eines Parasitenbefalls als Fremdkörperriesenzellen oder aufgrund einer Infektion mit PCV2 entstanden sein.

## 6. Zusammenfassung

1. Ziel der Arbeit war es, in der bisher größten Studien an Wildschweinen in ganz Deutschland zu untersuchen, ob diese eine Infektion mit PCV2 aufwiesen und ob sie an PMWS erkrankt waren.
2. In der Literaturübersicht wird der Verlauf vom ersten porcinen Circovirus-Nachweis 1974 bis zur ersten klinischen Beschreibung von PMWS 1996 und der bis heute anhaltenden Diskussion um die Rolle von PCV2 bei einer Erkrankung an PMWS dargestellt. Die klinischen und pathologischen Befunde bei dem Auftreten von PMWS bei Hausschweinen werden erläutert. Weiterhin wird der bisherige Wissensstand zum Thema „PCV2 und PMWS beim Wildschwein“ vorgestellt.
3. Es wurden bei 356 Wildschweinen in dem Zeitraum von 2004 bis 2007 bei 37 Jagden soweit möglich die Tonsillen, Bronchial- und Mesenteriallymphknoten, Milz sowie Lunge beprobt. Von 340 Hausschweinen aus ganz Deutschland wurden dieselben Proben gewonnen und mittels HE-gefärbter Schnitte histopathologisch untersucht. Der PCV2-Antigennachweis erfolgte an immunhistologischen Schnitten. Von der Klinik für Wiederkäuer und Schweine, Professur für Schweinekrankheiten, der Justus-Liebig-Universität Giessen wurden die Ergebnisse des PCV2-Nachweises mittels Real-time-PCR freundlicherweise zur Verfügung gestellt.
4. Bei acht Wildschweinen war ein PCV2-Antigennachweis möglich. Diese wiesen in der Real-time-PCR Werte von mindestens  $5 \times 10^6$  Genomkopienanzahlen pro  $\mu\text{g}$  DNA auf. Zusätzlich konnten in zwei der acht Wildschweine PMWS-typische histologische Läsionen festgestellt werden. Vier weitere Tiere zeigten ebenfalls PMWS-typische Befunde, jedoch ohne

einen Antigennachweis und mit Kopienanzahlen von kleiner als  $5 \times 10^6/\mu\text{g}$  DNA. Damit wurde bei sechs von 356 untersuchten Tieren eine Erkrankung an PMWS diagnostiziert. Von den 340 Hausschweinen waren 69 Tiere an PMWS erkrankt.

5. Ein Vergleich zwischen Wild- und Hausschweinen zeigte bei ersteren einen deutlich geringeren PCV2-Gehalt in den untersuchten Geweben. Weiterhin fiel auf, dass in der Wildschweinpopulation eine Erkrankung an PMWS nur selten vorkommt. Somit ist zwar von einer Verbreitung des Virus in Wildschweinen auszugehen, die Tiere zeigen aber sehr geringe Virusmengen in den Geweben und nur wenige Tiere erkranken an PMWS.

## 7. Summary

1. The aim of this up to now biggest study on wild boars was to investigate if infections with PCV2 were existent and if the animals were affected by PMWS in Germany.
2. An overview of the existing literature is given from the first porcine circovirus detection in 1974 to the first clinical report of PMWS in 1996 and the controversy about the role of PCV2 in PMWS. Clinical and pathological features of PMWS in domestic pigs are described. Additionally, the existing knowledge about PCV2 and PMWS in wild boars is presented.
3. From 2004 to 2007, samples of 356 wild boars (if possible tonsils, bronchial and mesentery lymph nodes, spleen and lungs) from 37 hunting grounds were taken. Additionally, similar samples were collected from 340 domestic pigs from slaughterhouses from all over Germany. The specimens were analysed histopathologically in H&E stained sections. Immunohistochemistry was performed to detect PCV2 antigen. The Department of Veterinary Clinical Sciences, Swine Diseases, Justus-Liebig-Universitaet, Giessen, kindly provided the PCV2 results obtained by real-time PCR.
4. Detection of PCV2 antigen by immunohistochemistry was possible in eight wild boars. All of them exhibited a minimum of  $5 \times 10^6$  copy numbers of virus genome per  $\mu\text{g}$  extracted DNA in real-time PCR. In two of the eight wild boars, PMWS- specific histologic lesions could be observed. Four other animals showed PMWS-specific lesions, too. However, in these four animals no antigen was detected and copy numbers smaller than  $5 \times 10^6/\mu\text{g}$  DNA were found. Thus, PMWS was suspected in six of the 356 tested animals.

Regarding the 340 domestic pigs, 69 animals were suffering from PMWS.

5. A comparative assessment of wild boars and domestic pigs revealed a distinctly lower PCV2 amount in the examined tissues in the former group. Furthermore, the occurrence of PMWS in wild boars is rare. While spread of the virus in wild boars seems to be present, virus load in the tissues is very low and only few animals are affected by PMWS.

## 8. Literaturverzeichnis

- Allan, G., Mc Neilly, F., Meehan, B., Kennedy, S., Johnston, D., Ellis, J., Krakowka, S., Fossum, C., Watrang, E., Wallgren, P., 2002, Reproduction of PMWS with a 1993 Swedish isolate of PCV-2. *Vet Rec*, 255-256.
- Allan, G.M., McNeilly, F., Foster, J.C., Adair, B.M., 1994, Infection of leucocyte cell cultures derived from different species with pig circovirus. *Vet Microbiol* 41, 267-279.
- Allan, G.M., McNeilly, F., Kennedy, S., Daft, B., Clarke, E.G., Ellis, J.A., Haines, D.M., Meehan, B.M., Adair, B.M., 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., Mc Neilly, F., Meehan, B.M., Kennedy, S., Mackie, D.P., Ellis, J.A., Clark, E.G., Espuna, E., Saubi, N., Riera, P., Botner, A., Charreyre, C.E., 1999, Isolation and characterisation of circoviruses from pigs with wasting syndromes in Spain, Denmark and Northern Ireland. *Vet Microbiol* 66, 115-123.
- Allan, G.M., Ellis, J.A., 2000, Porcine circoviruses: a review. *J Vet Diagn Invest* 12, 3-14.
- Allan, G.M., McNeilly, F., Ellis, J., Krakowka, S., Botner, A., McCullough, K., Nauwynck, H., Kennedy, S., Meehan, B., Charreyre, C., 2004, PMWS: experimental model and co-infections. *Vet Microbiol* 98, 165-168.
- Becskei, Z., Aleksic-Kovacevic, S., Rusvai, M., Balka, G., Jakab, C., Petrovic, T., Knezevic, M., 2010, Distribution of porcine circovirus 2 cap antigen in the lymphoid tissue of pigs affected by postweaning multisystemic wasting syndrome. *Acta Vet Hung* 58, 483-498.
- Blunt, R., McOrist, S., McKillen, J., McNair, I., Jiang, T., Mellits, K., 2011, House fly vector for porcine circovirus 2b on commercial pig farms. *Vet Microbiol* 149, 452-455.
- Boadella, M., Ruiz-Fons, J.F., Vicente, J., Martin, M., Segales, J., Gortazar, C., 2011, Seroprevalence Evolution of Selected Pathogens in Iberian Wild Boar. *Transbound Emerg Dis*, in press.

- Bolin, S., Stoffregen, W., Nayar, G.P., Hamel, A.L., 2001, Postweaning multisystemic wasting syndrome induced after experimental inoculation of cesarean-derived, colostrum-deprived piglets with type 2 porcine circovirus. *J Vet Diagn Invest* 13, 185-194.
- Bollo, E., Ferroglio, E., Dini, V., Mignone, W., Biolatti, B., Rossi, L., 2000, Detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in lymph nodes of wild boar (*Sus scrofa*) by a target-amplified test system. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 47, 337-342.
- Borba, M.R., Sanches, E.M., Correa, A.M., Spanemberg, A., de Souza Leal, J., Soares, M.P., Guillot, J., Driemeier, D., Ferreira, L., 2011, Immunohistochemical and ultra-structural detection of *Pneumocystis* in wild boars (*Sus scrofa*) co-infected with porcine circovirus type 2 (PCV2) in Southern Brazil. *Med Mycol* 49, 172-175.
- Brunborg, I.M., Moldal, T., Jonassen, C.M., 2004, Quantitation of porcine circovirus type 2 isolated from serum/plasma and tissue samples of healthy pigs and pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome using a TaqMan-based real-time PCR. *J Virol Methods* 122, 171-178.
- Cadar, D., Csagola, A., Spinu, M., Dan, A., Ursu, K., Lorincz, M., Tuboly, T., 2010, Prevalence of porcine circoviruses in Transylvanian wild boars, detected by real-time PCR--short communication. *Acta Vet Hung* 58, 475-481.
- Calsamiglia, M., Segales, J., Quintana, J., Rosell, C., Domingo, M., 2002, Detection of porcine circovirus types 1 and 2 in serum and tissue samples of pigs with and without postweaning multisystemic wasting syndrome. *J Clin Microbiol* 40, 1848-1850.
- Caswell, J.L., Williams, K.J., 2007a, Respiratory system. In: Jubb, Kennedy, Palmer (Eds.), *Pathology of domestic animals*, Vol 2. Saunders Elsevier, 593-594 pp.
- Caswell, J.L., Williams, K.J., 2007b, Respiratory system. In: Jubb, Kennedy, Palmer (Eds.), *Pathology of domestic animals*, Vol 2. Saunders Elsevier, 580-581 pp.
- Chae, C., 2004, Postweaning multisystemic wasting syndrome: a review of aetiology, diagnosis and pathology. *Vet. J.* 168, 41-49.
- Chae, C., 2005, A review of porcine circovirus 2-associated syndromes and diseases. *Vet J* 169, 326-336.

- Chianini, F., Majo, N., Segales, J., Dominguez, J., Domingo, M., 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., Chae, C., 1999, In-situ hybridization for the detection of porcine circovirus in pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *J Comp Pathol* 121, 265-270.
- Corn, J.L., Cumbee, J.C., Barfoot, R., Erickson, G.A., 2009, Pathogen exposure in feral swine populations geographically associated with high densities of transitional swine premises and commercial swine production. *J Wildl Dis* 45, 713-721.
- Csagola, A., Kecskemeti, S., Kardos, G., Kiss, I., Tuboly, T., 2006, Genetic characterization of type 2 porcine circoviruses detected in Hungarian wild boars. *Arch Virol* 151, 495-507.
- Darwich, L., Segales, J., Mateu, E., 2004, Pathogenesis of postweaning multisystemic wasting syndrome caused by Porcine circovirus 2: An immune riddle. *Arch Virol* 149, 857-874.
- Dixon, W.J., 1993, *BMDP Statistical Software Manual, Volume 1 and 2*. University of California Press, Berkeley, Los Angeles, London.
- Drew, T.W., Grierson, S.S., King, D.P., Hicks, D., Done, S., Neser, J.A., Evans, D.P.B., Grimbeek, P., Banks, M., 2004, Genetic similarity between porcine circovirus type 2 isolated from the first reported case of PMWS in South Africa and North American isolates. *Vet Rec* 155, 149-151.
- Dyce, K.M., Sack, W.O., Wensing, C.J.G., 1991, *Anatomie der Haustiere*. Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart, pp. 797-798.
- Ellis, J., Hassard, L., Clark, E., Harding, J., Allan, G., Willson, P., Strokappe, J., Martin, K., McNeilly, F., Meehan, B., Todd, D., Haines, D., 1998, Isolation of circovirus from lesions of pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *Can Vet J* 39, 44-51.
- Ellis, J., Spinato, M., Yong, C., West, K., McNeilly, F., Meehan, B., Kennedy, S., Clark, E., Krakowka, S., Allan, G., 2003, Porcine circovirus 2-associated disease in Eurasian wild boar. *J Vet Diagn Invest* 15, 364-368.

- Exel, B., Steineck, S., Sipos, W., Schuh, M., Schmoll, F., 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 1, 106.
- Fenaux, M., Halbur, P.G., Gill, M., Toth, T.E., Meng, X.J., 2000, Genetic characterization of type 2 porcine circovirus (PCV-2) from pigs with postweaning 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.
- Finlaison, D., Kirkland, P., Luong, R., Ross, A., 2007, Survey of porcine circovirus 2 and postweaning multisystemic wasting syndrome in New South Wales piggeries. Aust Vet J. 85, 304-310.
- Galindo-Cardiel, I., Grau-Roma, L., Perez-Maillo, M., Segales, J., 2011, Characterization of necrotizing lymphadenitis associated with porcine circovirus type 2 infection. J Comp Pathol 144, 63-69.
- Gava, D., Zanella, E., Morés, N., Ciacci-Zanella, J., 2008, Transmission of porcine circovirus 2 (PCV2) by semen and viral distribution in different piglet tissues. Pesq Vet Bras 28, 70-76.
- Gillespie, J., Opriessnig, T., Meng, X.J., Pelzer, K., Buechner-Maxwell, V., 2009, Porcine circovirus type 2 and porcine circovirus-associated disease. J Vet Intern Med 23, 1151-1163.
- Gortazar, C., Vicente, J., Gaviera-Widen, D., 2003, Pathology of bovine tuberculosis in the European wild boar (*Sus scrofa*). Vet Rec 152, 779-780.
- Grau-Roma, L., Crisci, E., Sibila, M., Lopez-Soria, S., Nofrarias, M., Cortey, M., Fraile, L., Olvera, A., Segales, J., 2008, A proposal on porcine circovirus type 2 (PCV2) genotype definition and their relation with postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) occurrence. Vet Microbiol 128, 23-35.
- Grierson, S.S., King, D.P., Sandvik, T., Hicks, D., Spencer, Y., Drew, T.W., Banks, M., 2004, Detection and genetic typing of type 2 porcine circoviruses in archived pig tissues from the UK. Arch Virol 149, 1171-1183.
- große Beilage, E., Brakmann, B., 2004, PMWS in Deutschland. Nutztierpraxis aktuell 10, 26-31.

- 
- Hamel, A.L., Lin, L.L., Nayar, G.P., 1998, Nucleotide sequence of porcine circovirus associated with postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs. *J Virol* 72, 5262-5267.
- Hamel, A.L., Lin, L.L., Sachvie, C., Grudeski, E., Nayar, G.P., 2000, PCR detection and characterization of type-2 porcine circovirus. *Can J Vet Res* 64, 44-52.
- Harding, J., Clark, E., 1997, Recognizing and diagnosing postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *J Swine Health Prod.* 5, 201-203.
- Harding, J., 2007, History of Porcine Circoviral Disease (PCVD) and Current Western Canadian Situation. *Advances in Pork Production* 18, 27-32.
- Harding, J.C., 2004, The clinical expression and emergence of porcine circovirus 2. *Vet Microbiol* 98, 131-135.
- Harding, J.C., Baker, C.D., Tumber, A., McIntosh, K.A., Parker, S.E., Middleton, D.M., Hill, J.E., Ellis, J.A., Krakowka, S., 2008, Porcine circovirus-2 DNA concentration distinguishes wasting from nonwasting pigs and is correlated with lesion distribution, severity, and nucleocapsid staining intensity. *J Vet Diagn Invest* 20, 274-282.
- Harms, P., Halbur, P., Sorden, S., 2002, Three cases of porcine respiratory disease complex associated with porcine circovirus type 2 infection. *J Swine Health Prod.* 10, 27-30.
- Hattermann, K., Roedner, C., Schmitt, C., Finsterbusch, T., Steinfeldt, T., Mankertz, A., 2004, Infection studies on human cell lines with porcine circovirus type 1 and porcine circovirus type 2. *Xenotransplantation* 11, 284-294.
- Hirai, T., Nunoya, T., Ihara, T., Kusanagi, K., Kato, T., Shibuya, K., 2003, Acute hepatitis in a piglet experimentally inoculated with tissue homogenates from pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *J Vet Med Sci* 65, 1041-1045.
- Huang, Y.Y., Walther, I., Martinson, S.A., López, A., Yason, C., Godson, D.L., Clark, E., Simko, E., 2008, Porcine circovirus 2 inclusion bodies in pulmonary and renal epithelial cells. *Vet Pathol* 45, 640-644.
- Jacobsen, B., Krueger, L., Seeliger, F., Bruegmann, M., Segales, J., Baumgaertner, W., 2009, Retrospective study on the occurrence of porcine circovirus 2 infection and associated entities in Northern Germany. *Vet Microbiol* 138, 27-33.

- Jensen, T.K., Vigre, H., Svensmark, B., Bille-Hansen, V., 2006, Distinction between porcine circovirus type 2 enteritis and porcine proliferative enteropathy caused by *Lawsonia intracellularis*. *J Comp Pathol* 135, 176-182.
- Johnson, C.S., Joo, H.S., Direksin, K., Yoon, K.J., Choi, Y.K., 2002, Experimental in utero inoculation of late-term swine fetuses with porcine circovirus type 2. *J Vet Diagn Invest* 14, 507-512.
- Kennedy, S., Moffett, D., McNeilly, F., Meehan, B., Ellis, J., Krakowka, S., Allan, G.M., 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, D., Ha, Y., Lee, Y.H., Chae, S., Lee, K., Han, K., Kim, J., Lee, J.H., Kim, S.H., Hwang, K.K., Chae, C., 2009, Comparative study of in situ hybridization and immunohistochemistry for the detection of porcine circovirus 2 in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *J Vet Med Sci* 71, 1001-1004.
- Kim, D., Ha, Y., Oh, Y., Chae, C., 2011, Prevalence of porcine circovirus types 2a and b in pigs with and without post-weaning multi-systemic wasting syndrome. *Vet J* 188, 115-117.
- Kim, J., Chung, H.K., Jung, T., Cho, W.S., Choi, C., Chae, C., 2002, Postweaning multisystemic wasting syndrome of pigs in Korea: prevalence, microscopic lesions and coexisting microorganisms. *J Vet Med Sci* 64, 57-62.
- Kim, J., Chae, C., 2003, Optimal enhancement of in situ hybridization for the detection of porcine circovirus 2 in formalin-fixed, paraffin-wax-embedded tissues using a combined pretreatment of thermocycler and proteinase K. *Res Vet Sci* 74, 235-240.
- Kim, J., Chae, C., 2004, A comparison of virus isolation, polymerase chain reaction, immunohistochemistry, and in situ hybridization for the detection of porcine circovirus 2 and porcine parvovirus in experimentally and naturally coinfecting pigs. *J Vet Diagn Invest* 16, 45-50.
- Kim, J., Ha, Y., Jung, K., Choi, C., Chae, C., 2004a, Enteritis associated with porcine circovirus 2 in pigs. *Can J Vet Res* 68, 218-221.
- Kiupel, M., Stevenson, G.W., Mittal, S.K., Clark, E.G., Haines, D.M., 1998, Circovirus-like viral associated disease in weaned pigs in Indiana. *Vet Pathol* 35, 303-307.

- Knell, S., Willems, H., Hertrampf, B., Reiner, G., 2005a, Prävalenzen porziner Circoviren in ausgewählten deutschen Wildschweinpopulationen. *Tierärztliche Praxis* 33 (G), 247-253.
- Knell, S., Willems, H., Hertrampf, B., Reiner, G., 2005b, Comparative genetic characterization of Porcine Circovirus type 2 samples from German wild boar populations. *Vet Microbiol.* 109, 169-177.
- Krakowka, S., Ellis, J.A., McNeilly, F., Ringler, S., Rings, D.M., Allan, G., 2001, Activation of the immune system is the pivotal event in the production of wasting disease in pigs infected with porcine circovirus-2 (PCV-2). *Vet Pathol* 38, 31-42.
- Krakowka, S., Allan, G., Ellis, J., Hamberg, A., Charreyre, C., Kaufmann, E., Brooks, C., Meehan, B., 2011, A nine-base nucleotide sequence in the porcine circovirus type 2 (PCV2) nucleocapsid gene determines viral replication and virulence. *Virus Res*, in press.
- Lipej, Z., Segales, J., Toplak, I., Sostaric, B., Roic, B., Lojkic, M., Hostnik, P., Grom, J., Barlic-Maganja, D., Zarkovic, K., Oraic, D., 2005, Postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs in Croatia: detection and characterisation of porcine circovirus type 2 (PCV2). *Acta Vet Hung* 53, 385-396.
- Lipej, Z., Segales, J., Jemersic, L., Olvera, A., Roic, B., Novosel, D., Mihaljevic, Z., Manojlovic, L., 2007, First description of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in wild boar (*Sus scrofa*) in Croatia and phylogenetic analysis of partial PCV2 sequences. *Acta Vet Hung* 55, 389-404.
- Liu, J., Chen, I., Kwang, J., 2005, Characterization of a Previously Unidentified Viral Protein in Porcine Circovirus Type 2-Infected Cells and Its Role in Virus-Induced Apoptosis. *J Virol* 79, 8262-8274.
- Liu, Q., Wang, L., Willson, P., Babiuk, L.A., 2000, Quantitative, competitive PCR analysis of porcine circovirus DNA in serum from pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *J Clin Microbiol* 38, 3474-3477.
- Liu, Q., Wang, L., Willson, P., O'Connor, B., Keenlside, J., Chirino-Trejo, M., Melendez, R., Babiuk, L., 2002, Seroprevalence of porcine circovirus type 2 in swine populations in Canada and Costa Rica. *Can J Vet Res* 66, 225-231.
- Lorincz, M., Csagola, A., Biksi, I., Szeredi, L., Dan, A., Tuboly, T., 2010, Detection of porcine circovirus in rodents - short communication. *Acta Vet Hung* 58, 265-268.

- 
- Maldonado, J., Segales, J., Calsamiglia, M., Llopart, D., Sibila, M., Lapus, Z., Riera, P., Artigas, C., 2004, Postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in the Philippines: porcine circovirus type 2 (PCV2) detection and characterization. *J Vet Med Sci* 66, 533-537.
- Mandrioli, L., Sarli, G., Panarese, S., Baldoni, S., Marcato, P.S., 2004, Apoptosis and proliferative activity in lymph node reaction in postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Vet Immunol Immunopathol* 97, 25-37.
- Mandrioli, L., Sarli, G., Zengarini, M., Panarese, S., Marcato, P.S., 2006, Immunohistochemical MHC-II and Interleukin 2-R (CD25) Expression in Lymph Nodes of Pigs with Spontaneous Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome (PMWS). *Vet Pathol* 43, 993-997.
- Mankertz, A., Domingo, M., Folch, J.M., LeCann, P., Jestin, A., Segales, J., Chmielewicz, B., Plana-Duran, J., Soike, D., 2000a, Characterisation of PCV-2 isolates from Spain, Germany and France. *Virus Res* 66, 65-77.
- Mankertz, A., Hattermann, K., Ehlers, B., Soike, D., 2000b, Cloning and sequencing of columbid circovirus (coCV), a new circovirus from pigeons. *Arch Virol* 145, 2469-2479.
- McIntosh, K.A., Tumber, A., Harding, J.C., Krakowka, S., Ellis, J.A., Hill, J.E., 2009, Development and validation of a SYBR green real-time PCR for the quantification of porcine circovirus type 2 in serum, buffy coat, feces, and multiple tissues. *Vet Microbiol* 133, 23-33.
- McNeilly, F., Kennedy, S., Moffett, D., Meehan, B.M., Foster, J.C., Clarke, E.G., Ellis, J.A., Haines, D.M., Adair, B.M., Allan, G.M., 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., McNair, I., Mackie, D.P., Meehan, B.M., Kennedy, S., Moffett, D., Ellis, J., Krakowka, S., Allan, G.M., 2001, Production, characterisation and applications of monoclonal antibodies to porcine circovirus 2. *Arch Virol* 146, 909-922.
- Meehan, B.M., Creelan, J.L., McNulty, M.S., Todd, D., 1997, Sequence of porcine circovirus DNA: affinities with plant circoviruses. *J Gen Virol* 78, 221-227.

- Meehan, B.M., McNeilly, F., Todd, D., Kennedy, S., Jewhurst, V.A., Ellis, J.A., Hassard, L.E., Clark, E.G., Haines, D.M., Allan, G.M., 1998, Characterization of novel circovirus DNAs associated with wasting syndromes in pigs. *J Gen Virol* 79, 2171-2179.
- Morozov, I., Sirinarumitr, T., Sorden, S.D., Halbur, P.G., Morgan, M.K., Yoon, K.J., Paul, P.S., 1998, Detection of a novel strain of porcine circovirus in pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *J Clin Microbiol* 36, 2535-2541.
- Narita, M., Kawashima, K., Kimura, K., Mikami, O., Shibahara, T., Yamada, S., Sakoda, Y., 2000, Comparative immunohistopathology in pigs infected with highly virulent or less virulent strains of hog cholera virus. *Vet Pathol* 37, 402-408.
- Nawagitgul, P., Morozov, I., Bolin, S.R., Harms, P.A., Sorden, S.D., Paul, P.S., 2000a, Open reading frame 2 of porcine circovirus type 2 encodes a major capsid protein. *J Gen Virol* 81, 2281-2287.
- Nawagitgul, P., Morozov, I., Sirinarumitr, T., Sorden, S.D., Paul, P.S., 2000b, Development of probes to differentiate porcine circovirus types 1 and 2 in vitro by in situ hybridization. *Vet Microbiol* 75, 83-89.
- Nawagitgul, P., Harms, P., Morozov, I., Thacker, B., Sorden, S., Lekcharoensuk, C., Paul, P.S., 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.
- Nayar, G.P., Hamel, A.L., Lin, L., Sachvie, C., Grudeski, E., Spearman, G., 1999, Evidence for circovirus in cattle with respiratory disease and from aborted bovine fetuses. *Can Vet J* 40, 277-278.
- Niagro, F.D., Forsthoefel, A.N., Lawther, R.P., Kamalanathan, L., Ritchie, B.W., Latimer, K.S., Lukert, P.D., 1998, Beak and feather disease virus and porcine circovirus genomes: intermediates between the geminiviruses and plant circoviruses. *Arch Virol* 143, 1723-1744.
- Nickel, R., Schummer, A., Seiferle, E., 1999, *Lehrbuch der Anatomie der Haustiere, Band II Eingeweide, Vol 8*. Parey Buchverlag.
- Nielsen, E.O., Enoe, C., Jorsal, S.E., Barfod, K., Svensmark, B., Bille-Hansen, V., Vigre, H., Botner, A., Baekbo, P., 2008, Postweaning multisystemic wasting

- syndrome in Danish pig herds: productivity, clinical signs and pathology. *Vet Rec* 162, 505-508.
- Olvera, A., Sibila, M., Calsamiglia, M., Segales, J., Domingo, M., 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.
- Opriessnig, T., Thacker, E.L., Yu, S., Fenaux, M., Meng, X.J., Halbur, P.G., 2004, Experimental reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs by dual infection with *Mycoplasma hyopneumoniae* and porcine circovirus type 2. *Vet Pathol* 41, 624-640.
- Opriessnig, T., Meng, X.J., Halbur, P.G., 2007, Porcine circovirus type 2 associated disease: update on current terminology, clinical manifestations, pathogenesis, diagnosis, and intervention strategies. *J Vet Diagn Invest* 19, 591-615.
- Opriessnig, T., Prickett, J.R., Madson, D.M., Shen, H.G., Juhan, N.M., Pogranichniy, R.R., Meng, X.J., Halbur, P.G., 2010, Porcine circovirus type 2 (PCV2)-infection and re-inoculation with homologous or heterologous strains: virological, serological, pathological and clinical effects in growing pigs. *Vet Res* 41, 31.
- Opriessnig, T., Halbur, P.G., 2011, Concurrent infections are important for expression of porcine circovirus associated disease. *Virus Res*, in press.
- Ostanello, F., Caprioli, A., Di Francesco, A., Battilani, M., Sala, G., Sarli, G., Mandrioli, L., McNeilly, F., Allan, G.M., Prosperi, S., 2005, Experimental infection of 3-week-old conventional colostrum-fed pigs with porcine circovirus type 2 and porcine parvovirus. *Vet Microbiol* 108, 179-186.
- Pallares, F.J., Halbur, P.G., Opriessnig, T., Sorden, S.D., Villar, D., Janke, B.H., Yaeger, M.J., Larson, D.J., Schwartz, K.J., Yoon, K.J., Hoffman, L.J., 2002, Porcine circovirus type 2 (PCV-2) coinfections in US field cases of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *J Vet Diagn Invest* 14, 515-519.
- Petrini, S., Barocci, S., Gavaudan, S., Villa, R., Briscolini, S., Sabbatini, M., Mattozzi, C., Barchiesi, F., Salamida, S., Ferrari, M., Paniccia, M., Pezzotti, G., 2009, Detection of porcine circovirus type 2 (PCV2) from wild boars in central Italy. *Eur J Wildl Res* 55, 465-469.
- Pringle, C.R., 1999, Virus taxonomy at the XIth International Congress of Virology, Sydney, Australia, 1999. *Arch Virol* 144, 2065-2070.

- 
- Quintana, J., Segales, J., Rosell, C., Calsamiglia, M., Rodriguez-Arrijoja, G.M., Chianini, F., Folch, J.M., Maldonado, J., Canal, M., Plana-Duran, J., Domingo, M., 2001, Clinical and pathological observations on pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *Vet Rec* 149, 357-361.
- Reiner, G., Bronnert, B., Hohloch, C., Fresen, C., Haack, I., Willems, H., Reinacher, M., 2010, Qualitative and quantitative distribution of PCV2 in wild boars and domestic pigs in Germany. *Vet Microbiol* 145, 1-8.
- Rodriguez-Carino, C., Segales, J., 2009, Ultrastructural findings in lymph nodes from pigs suffering from naturally occurring postweaning multisystemic wasting syndrome. *Vet Pathol* 46, 729-735.
- Rodriguez-Carino, C., Sanchez-Chardi, A., Segales, J., 2010, Subcellular immunolocalization of porcine circovirus type 2 (PCV2) in lymph nodes from pigs with post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *J Comp Pathol* 142, 291-299.
- Rose, N., Opriessnig, T., Grasland, B., Jestin, A., 2012, Epidemiology and transmission of porcine circovirus type 2 (PCV2). *Virus Res* 164, 78-89.
- Rosell, C., Segales, J., Plana-Duran, J., Balasch, M., Rodriguez-Arrijoja, G.M., Kennedy, S., Allan, G.M., McNeilly, F., Latimer, K.S., Domingo, M., 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., Segales, J., Domingo, M., 2000, Hepatitis and staging of hepatic damage in pigs naturally infected with porcine circovirus type 2. *Vet Pathol* 37, 687-692.
- Rovira, A., Balasch, M., Segales, J., Garcia, L., Plana-Duran, J., Rosell, C., Ellerbrok, H., Mankertz, A., Domingo, M., 2002, Experimental inoculation of conventional pigs with porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus 2. *J Virol* 76, 3232-3239.
- Royer, R., Nawagitgul, P., Halbur, P., Paul, P.S., 2001, Susceptibility of porcine circovirus type 2 to commercial and laboratory disinfectants. *J Swine Health and Prod* 9, 281-284.
- Ruiz-Fons, F., Vicente, J., Vidal, D., Hofle, U., Villanua, D., Gauss, C., Segales, J., Almeria, S., Montoro, V., Gortazar, C., 2006, Seroprevalence of six reproductive

- pathogens in European wild boar (*Sus scrofa*) from Spain: the effect on wild boar female reproductive performance. *Theriogenology* 65, 731-743.
- Ruiz-Fons, F., Segales, J., Gortazar, C., 2008, A review of viral diseases of the European wild boar: effects of population dynamics and reservoir role. *Vet J* 176, 158-169.
- Sanchez, R.E., Jr., 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.
- Sarli, G., Mandrioli, L., Panarese, S., Brunetti, B., Segales, J., Dominguez, J., Marcato, P.S., 2008, Characterization of interstitial nephritis in pigs with naturally occurring postweaning multisystemic wasting syndrome. *Vet Pathol* 45, 12-18.
- Schulze, C., Neumann, G., Grütze, I., Engelhardt, A., Mirle, C., Ehlert, F., Hlinak, A., 2003, Porzine Circovirus Typ 2-Infektion bei einem Wildschwein (*Sus scrofa*) im Land Brandenburg. *Dtsch Tierärztl Wochenschr* 110, 426-428.
- Schulze, C., Segales, J., Neumann, G., Hlinak, A., Calsamiglia, M., Domingo, M., 2004, Identification of postweaning multisystemic wasting syndrome in European wild boar (*Sus scrofa*). *Vet Rec* 154, 694-696.
- Segales, J., Sitjar, M., Domingo, M., Dee, S., Del Pozo, M., Noval, R., Sacristan, C., De las Heras, A., Ferro, A., Latimer, K.S., 1997, First report of post-weaning multisystemic wasting syndrome in pigs in Spain. *Vet Rec* 141, 600-601.
- Segales, J., Pastor, J., Cuenca, R., Domingo, M., 2000, Haematological parameters in postweaning multisystemic wasting syndrome-affected pigs. *Vet Rec* 146, 675-676.
- Segales, J., Alonso, F., Rosell, C., Pastor, J., Chianini, F., Campos, E., Lopez-Fuertes, L., Quintana, J., Rodriguez-Arriola, G., Calsamiglia, M., Pujols, J., Dominguez, J., Domingo, M., 2001, Changes in peripheral blood leukocyte populations in pigs with natural postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Vet Immunol Immunopathol* 81, 37-44.
- Segales, J., Rosell, C., Domingo, M., 2004, Pathological findings associated with naturally acquired porcine circovirus type 2 associated disease. *Vet Microbiol* 98, 137-149.

- Segales, J., Olvera, A., Grau-Roma, L., Charreyre, C., Nauwynck, H., Larsen, L., Dupont, K., McCullough, K., Ellis, J., Krakowka, S., Mankertz, A., Fredholm, M., Fossum, C., Timmusk, S., Stockhofe-Zurwieden, N., Beattie, V., Armstrong, D., Grassland, B., Baekbo, P., Allan, G., 2008, PCV-2 genotype definition and nomenclature. *Vet Rec* 162, 867-868.
- Shibahara, T., Sato, K., Ishikawa, Y., Kadota, K., 2000, Porcine circovirus induces B lymphocyte depletion in pigs with wasting disease syndrome. *J Vet Med Sci* 62, 1125-1131.
- Shibata, I., Okuda, Y., Yazawa, S., Ono, M., Sasaki, T., Itagaki, M., Nakajima, N., Okabe, Y., Hidejima, I., 2003, PCR detection of porcine circovirus type 2 DNA in whole blood, serum, oropharyngeal swab, nasal swab, and feces from experimentally infected pigs and field cases. *J Vet Med Sci* 65, 405-408.
- Sofia, M., Billinis, C., Psychas, V., Birtsas, P., Sofianidis, G., Leontides, L., Knowles, N., Spyrou, V., 2008, Detection and genetic characterization of porcine circovirus 2 isolates from the first cases of postweaning multisystemic and wasting syndrome in wild boars in Greece. *J Wildl Dis* 44, 864-870.
- Sorden, S., 2000, Update on porcine circovirus and postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *J Swine Health Prod.* 8, 133-136.
- Stevenson, G.W., Kiupel, M., Mittal, S.K., Kanitz, C.L., 1999, Ultrastructure of porcine circovirus in persistently infected PK-15 cells. *Vet Pathol* 36, 368-378.
- Stubbe, C., 2001, Altersbestimmung am erlegten Stück. *Wildbiologische Erkenntnisse*. Dt. Landwirtschaftsverlag: Schwarzwild. Unsere Jagd. Spezial, 22-27.
- Stubbe, C., 2004, Zeigt her Eure Zähne. *Sauen im Jahreslauf*, Sonderheft Schwarzwild, 78-81.
- Szczotka, A., Stadejek, T., Pejsak, Z., 2011, A comparison of immunohistochemistry and in situ hybridization for the detection of porcine circovirus type 2 in pigs. *Polish J of Vet Sciences* 14, 565-571.
- Taylor, D.J., 2006, Miscellaneous Bacterial Infections. In: Straw, B.E., Zimmermann, J.J., D'Allaire, S., Taylor, D.J. (Eds.), *Diseases of Swine*. Blackwell Publishing, 817-822 pp.

- Tischer, I., Rasch, R., Tochtermann, G., 1974, Characterization of papovavirus-and picornavirus-like particles in permanent pig kidney cell lines. *Zentralbl Bakteriol Orig A* 226, 153-167.
- Tischer, I., Gelderblom, H., Vettermann, W., Koch, M.A., 1982, A very small porcine virus with circular single-stranded DNA. *Nature* 295, 64-66.
- Tischer, I., Miels, W., Wolff, D., Vagt, M., Griem, W., 1986, Studies on epidemiology and pathogenicity of porcine circovirus. *Arch Virol* 91, 271-276.
- Tischer, I., Peters, D., Rasch, R., Pociuli, S., 1987, Replication of porcine circovirus: induction by glucosamine and cell cycle dependence. *Arch Virol* 96, 39-57.
- Tischer, I., Bode, L., Apodaca, J., Timm, H., Peters, D., Rasch, R., Pociuli, S., Gerike, E., 1995, Presence of antibodies reacting with porcine circovirus in sera of humans, mice, and cattle. *Arch Virol* 140, 1427-1439.
- Todd, D., Weston, J., Ball, N.W., Borghmans, B.J., Smyth, J.A., Gelmini, L., Lavazza, A., 2001a, Nucleotide sequence-based identification of a novel circovirus of canaries. *Avian Pathol* 30, 321-325.
- Todd, D., Weston, J.H., Soike, D., Smyth, J.A., 2001b, Genome sequence determinations and analyses of novel circoviruses from goose and pigeon. *Virology* 286, 354-362.
- Toplak, I., Grom, J., Hostnik, P., Barlic-Maganja, D., 2004, Phylogenetic analysis of type 2 porcine circoviruses identified in wild boar in Slovenia. *Vet Rec* 155, 178-180.
- Trible, B.R., Rowland, R.R., 2012, Genetic variation of porcine circovirus type 2 (PCV2) and its relevance to vaccination, pathogenesis and diagnosis. *Virus Res* 164, 68-77.
- Truong, C., Mahe, D., Blanchard, P., Le Dimna, M., Madec, F., Jestin, A., Albina, E., 2001, Identification of an immunorelevant ORF2 epitope from porcine circovirus type 2 as a serological marker for experimental and natural infection. *Arch Virol* 146, 1197-1211.
- Truyen, U., Ritzmann, M., Gerbermann, H., Heinritzi, K., 2000, Kleine DNA-Viren beim Schwein: porzines Parvovirus und porzines Circovirus. *Tierärztliche Praxis* 28, 28-32.
- Valli, V.E.O., 2007, Hematopoietic system. In: Jubb, Kennedy, Palmer (Eds.), *Pathology of domestic animals, Vol 3*. Saunders Elsevier, 294-297 pp.

- Vicente, J., Segales, J., Hofle, U., Balasch, M., Plana-Duran, J., Domingo, M., Gortazar, C., 2004, Epidemiological study on porcine circovirus type 2 (PCV2) infection in the European wild boar (*Sus scrofa*). *Vet Res* 35, 243-253.
- Walker, I.W., Konoby, C.A., Jewhurst, V.A., McNair, I., McNeilly, F., Meehan, B.M., Cottrell, T.S., Ellis, J.A., Allan, G.M., 2000, Development and application of a competitive enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of serum antibodies to porcine circovirus type 2. *J Vet Diagn Invest* 12, 400-405.
- Wallgren, P., Belak, K., Ehlorsson, C.J., Bergstrom, G., Lindberg, M., Fossum, C., Allan, G.M., Robertsson, J.A., 2007, Postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in Sweden from an exotic to an endemic disease. *Vet Q* 29, 122-137.
- West, K.H., Bystrom, J.M., Wojnarowicz, C., Shantz, N., Jacobson, M., Allan, G.M., Haines, D.M., Clark, E.G., Krakowka, S., McNeilly, F., Konoby, C., Martin, K., Ellis, J.A., 1999, Myocarditis and abortion associated with intrauterine infection of sows with porcine circovirus 2. *J Vet Diagn Invest* 11, 530-532.
- Yang, J.S., Song, D.S., Kim, S.Y., Lyoo, K.S., Park, B.K., 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, 369-373.
- Yu, S., Opriessnig, T., Kitikoon, P., Nilubol, D., Halbur, P., Thacker, E., 2007, Porcine circovirus type 2 (PCV2) distribution and replication in tissues and immune cells in early infected pigs. *Vet Immunol Immunopathol* 115, 261-272.
- Zhao, K., Han, F., Zou, Y., Zhu, L., Li, C., Xu, Y., Zhang, C., Tan, F., Wang, J., Tao, S., He, X., Zhou, Z., Tang, X., 2010, Rapid detection of porcine circovirus type 2 using a TaqMan-based real-time PCR. *Viol J* 7, 374.
- Zimmerman, J.J., Benfield, D.A., Murtaugh, M.P., Osorio, F., Stevenson, G.W., Torremorell, M., 2006, Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (porcine arterivirus). In: Straw, B.E., Zimmermann, J.J., D'Allaire, S., Taylor, D.J. (Eds.), *Diseases of Swine*, Vol 9. Blackwell Publishing, 387-417 pp.

## 9. Anhang

### 9.1. Lösungen und Puffer

#### Neutrales gepuffertes Formalin

4 g Natriumdihydrogenphosphat Monohydrat

6,5 g di-Natriumhydrogenphosphat, wasserfrei

100 ml Formalin (37 %)

900 ml Aqua bidest.

Einstellen des pH-Wertes auf pH 7,0 durch weitere Zugabe von Natriumdihydrogenphosphat und di-Natriumhydrogenphosphat

#### Tris-buffered Saline (TBS, pH 7,6)

Stammlösung (10x):

60,57 g Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan

610 ml Aqua bidest.

390 ml 1 N HCl

Der pH-Wert wurde mit 1 N HCl auf 7,6 eingestellt.

Gebrauchslösung:

100 ml Stammlösung

900 ml 0,8 % NaCl in Aqua bidest.

Die Gebrauchslösung hatte einen pH-Wert von 7,8.

**Imidazol/HCl-Puffer 0,1 M (pH 7,1)**

6,81 g Imidazol

Aqua bidest. ad 1000 ml.

Zugeben von 500 ml 0,1 M HCl. Der pH Wert wurde mit 0,1 M HCl eingestellt.

Lösung ca. 1 Woche haltbar.

**3,3' -Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid-Lösung (DAB)**

100 mg DAB in 200 ml 0,1 M Imidazol/HCl-Puffer (pH 7,1) lösen und mischen (Magnetrührer). Filtrieren und unmittelbar vor Gebrauch 70 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30 %) zugeben.

**Kardasewitsch-Lösung**

800 ml 70 % Ethanol

200 ml 25 % Ammoniaklösung

**Papanicolaous Gebrauchslösung**

Papanicolaous Hämatoxylin 1b und Aqua dest. im Verhältnis 1:10 mischen und filtrieren.

## **9.2. Bezugsquellen für Chemikalien**

### **Aqua Quick, Wassertechnik und Regenerierservice GmbH, Schwalbach**

Reinstwasser

### **Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe**

Ammoniaklösung reinst (NH<sub>3</sub>), 5460.1

Ethanol vergällt, K928.2

Formalin säurefrei > 37 %, P733.1

Isopropanol, 9866.4

Methanol, 4627.3

di-Natriumhydrogenphosphat, wasserfrei P030.1

Roti-Histol<sup>®</sup>, 6640.3

### **DakoCytomation, Hamburg**

Glycergel, C0563

### **Dr. K. Hollborn und Söhne GmbH & Co KG, Leipzig**

Carbol-Fuchsin-Lösung

Löffler-Methylenblaulösung

**Engelbrecht, Edermünde**

StarFrost, 11240a

**Hecht, Kiel-Hasse**

Eukitt®

**R. Langenbrinck, Emmendingen**

SuperFrost® Plus Objektträger, 03-0060

**ThermoScientific, Cheshire, UK**

ShandonCoverplate Technology, 72110017

**E. Merck, Darmstadt**

HCl, 1M, 109970

NaCl krist., 106400

NaOH, 1M, 109956

Natriumdihydrogenphosphat, 1063700050

Natriumnitrit, 106549

Neufuchsin, 105226

Papanicolaous Lösung 1b, 109254

2-Amino-2-Methyl-1,3-Propandiol, 801464

Wasserstoffperoxid 30 %, 107210

**Sakura Finetek Germany GmbH, Heppenheim**

Tissue Tec<sup>®</sup>, 4383

**SAV Liquid Production, Flintsbach**

Xylol reinst., 1307

**Sigma-Aldrich Chemie, Seelze**

Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Trizma<sup>®</sup> Base), 93352

3,3'-Diaminobenzidine-tetrahydrochloride (DAB), D5637

Imidazol, 56750

**Vogel GmbH & Co KG, Giessen**

Paraffin, rein (Schmelzpunkt 56-58 °C) Tissue Tek<sup>®</sup> Vacuum Infiltration Processor

---

### 9.3. Liste der verwendeten Abkürzungen

Abb	Abbildung
BALT	Bronchus assoziiertes lymphatisches Gewebe
BFDV	Beak and Feather Disease Virus
bp	Basenpaare
BroLk	Bronchiallymphknoten
bzw.	Beziehungsweise
ca.	Circa
CD	Cluster of differentiation
CoCV	Columbid Circovirus
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EK	Einschlußkörperchen
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FIV	Felines Immundefizienz-Virus
g	Gramm
GCV	Goose Circovirus
HE	Hämatoxylin-Eosin
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
IHC	Immunhistologie
ISH	In situ-Hybridisierung
kg	Kilogramm
MRZ	Mehrkernige Riesenzellen
µm	Mikrometer
MesLk	Mesenteriallymphknoten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
n	Anzahl

---

nm	Nanometer
ORF	Open reading frame
PALS	Periarterielle Lymphozytenscheiden
PCR	Polymerase chain reaction
PCV	Porzines Circovirus
PCV1	Porzines Circovirus 1
PCV2	Porzines Circovirus 2
PCVD	Porcine Circovirus Disease
PCVAD	Porcine Circovirus-associated Disease
PDNS	Porzines Dermatitis und Nephropathie Syndrom
pH	Pondus hydrogenii
PiCV	Pigeon Circovirus
PMWS	Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome
PPV	Porzines Parvovirus
PRDC	Porcine Respiratory Disease Complex
PRRSV	Porzines Reproduktives und Respiratorisches Syndrom Virus
RNA	Ribonukleinsäure
®	Registered trade mark
v. a.	Vor allem
Wildsw	Wildschweine
z. B.	Zum Beispiel
z. T.	Zum Teil

## **Veröffentlichungen mit Bestandteilen der Doktorarbeit**

Reiner, G., Bronnert, B., Hohloch, C., Fresen, C., Haack, I., Willems, H., Reinacher, M., 2010, Qualitative and quantitative distribution of PCV2 in wild boars and domestic pigs in Germany. *Vet Microbiol* 145, 1-8.

Reiner, G., Bronnert, B., Hohloch, C., Reinacher, M., Willems, H., 2011, Distribution of ORF2 and ORF3 genotypes of porcine circovirus type 2 (PCV-2) in wild boars and domestic pigs in Germany. *Vet Microbiol* 148, 372-376.

## **Danken möchte ich**

Meinem Doktorvater Herrn Prof. M. Reinacher für die Bereitstellung des Themas und die freundliche Unterstützung bei der Anfertigung der Dissertation

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die finanzielle Förderung des Projektes (RE 532/7-1 und 1026/6)

Herrn Dr. C. Schulze, Landesamt für Verbraucherschutz und Landwirtschaft, Frankfurt (Oder) für die Überlassung von Paraffinmaterial eines an PMWS-erkrankten Wildschweins

Herrn Prof. G. Reiner für die sehr hilfreiche, institutsübergreifende Unterstützung

Herrn Prof. E. Burkhardt, der mir die Pathologie nahebrachte und ein wunderbarer Lehrer ist

Herrn Dr. W. Hecht, der immer ein offenes Ohr für mich hatte

Den Mitarbeitern des Instituts für Veterinär-Pathologie, der Justus-Liebig-Universität Gießen, insbesondere den Sektionsgehilfen, Sekretärinnen und technischen Angestellten, für vier schöne Jahre

Den Mitarbeitern der Abteilung Pathologie, Laboklin, Bad Kissingen, die mir dank Ihrer sehr freundlichen Aufnahme ein neues Zuhause geschenkt haben

Christina und Britta für das Korrekturlesen der Arbeit

Meinen Freunden, insbesondere Nele, Christina, Kristine, Laura, Jessi und Jojo für die seelische Unterstützung

Von ganzem Herzen meiner Familie, die mir immer zur Seite steht und der diese Arbeit gewidmet ist





*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

VVB LAUFERSWEILER VERLAG  
STAUFBENGRING 15  
D-35396 GIESSEN

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

ISBN: 978-3-8359-5991-0



9 783835 959910