

Untersuchungen zur genetischen Variabilität porciner Circoviren (PCV2) aus geimpften und ungeimpften Herden

Regina Marietta Hofmeister



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

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

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

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

1. Auflage 2016

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 Authors or the Publisher.

1st Edition 2016

© 2016 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

www.doktorverlag.de

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

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

**Untersuchungen zur genetischen Variabilität porciner Circoviren
(PCV2) aus geimpften und ungeimpften Herden**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines

Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Regina Marietta Hofmeister

Tierärztin aus Frankfurt am Main

Gießen, 2016

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

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

Gutachter:

Prof. Dr. Dr. habil. Gerald Reiner

Prof. Dr. Friedemann Weber

Tag der Disputation:

11.03.2016

<< Für Marco >>

Teile der Dissertation wurden veröffentlicht:

Willems, H.; Hofmeister, R.; Reiner, G. (2014): Complete Genome Sequences of Two Porcine Circovirus Type 2 Field Isolates Bearing an Unusual Sequence Duplication in the Rep-Gene. In: *Genome Announcements* 2 (4) S. 00447-14

Reiner, G., Hofmeister, R., Willems, H. (2015): Genetic variability of porcine circovirus 2 (PCV2) field isolates from vaccinated and non-vaccinated pig herds in Germany. In: *Veterinary Microbiology* 180 (1-2) S.41-48

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|----|
| Abbildungsverzeichnis | IV |
| Tabellenverzeichnis | VI |
| Abkürzungsverzeichnis | IX |
| 1 Einleitung | 1 |
| 2 Literaturübersicht | 3 |
| 2.1 Porzine Circoviren | 3 |
| 2.1.1 Geschichte | 3 |
| 2.1.2 Taxonomie | 3 |
| 2.1.3 Nomenklatur | 4 |
| 2.1.4 Genomische Organisation | 7 |
| 2.1.5 Offene Leserahmen | 9 |
| 2.1.5.1 ORF1 | 9 |
| 2.1.5.2 ORF2 | 10 |
| 2.1.5.3 ORF3 | 11 |
| 2.1.5.4 ORF4 | 12 |
| 2.1.5.5 Mutationen innerhalb genetischer Elemente des PCV2-Genoms | 12 |
| 2.2 Pathogenese | 15 |
| 2.2.1 Übertragung von PCV2 | 16 |
| 2.2.2 PCV2-Zielzellen | 18 |
| 2.2.3 Kofaktoren | 20 |
| 2.2.4 Genetik | 22 |
| 2.2.5 Immunmodulation | 22 |
| 2.2.6 PCV2-Genotypen | 23 |
| 2.3 PCV2-assoziierte Erkrankungen | 25 |
| 2.3.1 Subklinische PCV2-Infektion | 27 |
| 2.3.2 PCV2-systemische Erkrankung | 28 |
| 2.3.3 PCV2-Atemwegserkrankung | 30 |
| 2.3.4 PCV2-Darmerkrankung | 31 |
| 2.3.5 PCV2-Reproduktionsstörungen | 32 |
| 2.3.6 Porzines Dermatitis und Nephropathie Syndrom (PDNS) | 34 |
| 2.4 PCV2-Immunisierung | 35 |
| 2.4.1 In Deutschland zugelassene kommerzielle PCV2-Vakzinen | 36 |
| 2.4.2 Vakzination der Muttertiere | 37 |

| | | |
|---------|---|----|
| 2.4.3 | Vakzination der Ferkel | 38 |
| 2.4.4 | Effektivität der kommerziellen PCV2-Vakzinen..... | 40 |
| 3 | Material und Methoden | 42 |
| 3.1 | Untersuchungsmaterial..... | 42 |
| 3.1.1 | Geräte und Verbrauchsmaterial | 42 |
| 3.1.2 | Chemikalien und Kits | 42 |
| 3.1.3 | Lösungen und Puffer..... | 43 |
| 3.1.4 | Verwendete Software und Internetadressen | 43 |
| 3.1.4.1 | National Center for Biotechnology Information (NCBI) und BLAST | 43 |
| 3.1.4.2 | OLIGO | 44 |
| 3.1.4.3 | ApE - A plasmid Editor | 44 |
| 3.1.4.4 | ClustalX | 44 |
| 3.1.4.5 | BioEdit - Sequence Alignment Editor..... | 44 |
| 3.1.4.6 | SPSS..... | 44 |
| 3.1.5 | Probenmaterial..... | 45 |
| 3.2 | Untersuchungsmethoden | 46 |
| 3.2.1 | Probenvorbereitung..... | 46 |
| 3.2.2 | Amplifikation des gesamten PCV2-Genom mittels PCR..... | 47 |
| 3.2.2.1 | Primer..... | 47 |
| 3.2.2.2 | Polymerase-Kettenreaktion..... | 48 |
| 3.2.3 | Agarose-Gelelektrophorese | 51 |
| 3.2.4 | Auswertung der PCR-Ergebnisse | 51 |
| 3.2.5 | DNA-Sequenzierung..... | 52 |
| 3.2.6 | Auswertung der DNA-Sequenzen | 52 |
| 3.2.7 | Statistische Auswertung..... | 52 |
| 4 | Ergebnisse | 54 |
| 4.1 | Proben und Betriebe | 54 |
| 4.2 | PCV2-Sequenzen..... | 57 |
| 4.3 | PCV2-Genotypen | 61 |
| 4.4 | ORF3-Genotypen | 62 |
| 4.5 | Virusmenge | 64 |
| 4.6 | Mutationen innerhalb der 62 untersuchten PCV2-Sequenzen | 66 |
| 4.6.1 | Mutationen mit signifikanter Assoziation zu PCV2-Genotyp und Impfstatus. 67 | |
| 4.6.2 | Mutationen mit Assoziation zur Virusmenge..... | 70 |

| | | |
|-------|--|-----|
| 4.6.3 | Zusammenfassung SNP g.1182G>T | 72 |
| 4.7 | Ungewöhnliche Sequenz-Duplikation im Rep-Gen | 74 |
| 5 | Diskussion | 76 |
| 6 | Zusammenfassung | 85 |
| 7 | Summary | 86 |
| 8 | Literaturverzeichnis | 87 |
| 9 | Anhang | 109 |

Abbildungsverzeichnis

| | |
|--|----|
| Abbildung 1: Elektronenmikroskopische Aufnahme von porzinen Circovirus Typ 2 Partikeln nach negativer Färbung eines PK/15-Zellkultur-Lysats..... | 2 |
| Abbildung 2: Beziehung zwischen den PCV2-Genotypen, basierend auf ORF-2-Sequenzvergleichen (Opriessnig 2014d)..... | 6 |
| Abbildung 3: Eine lineare Abbildung des PCV-Genoms zeigt die beiden Hauptleserahmen ORF1 (Rep) und ORF2 (Cap)..... | 8 |
| Abbildung 4: Schema des ringförmigen PCV2-Genoms mit den Leserahmen ORF1-ORF3.... | 9 |
| Abbildung 5: Schematische Darstellung der PCV2-ORF2-Mutante mPCV2b (rBDH) im Vergleich zu den PCV2-Genotypen PCV2a (rCL) und PCV2b (rJF)..... | 14 |
| Abbildung 6: Vorgeschlagene Mechanismen der Immunpathogenese einer PCV2-Infektion bzw. einer PCV2-assoziierten Erkrankung (PCVD) nach Meng 2013. | 25 |
| Abbildung 7: Mittelwerte der PCV2-Virusmenge (logPCV2 DNA-Kopien/ μ g Total-DNA mit Angabe des Standardfehlers) in Proben von Schweinen aus Betrieben mit Historie respiratorischer Störungen. Dargestellt über den Zeitraum erstes Quartal 2008 (200801) bis viertes Quartal 2014 (201404)..... | 55 |
| Abbildung 8: Maximale Virusmenge (logPCV2 DNA-Kopien/ μ g Total-DNA mit Angabe des Standardfehlers) individueller Proben pro Betrieb. Dargestellt über den Zeitraum erstes Quartal 2008 (200801) bis viertes Quartal 2014 (201404). | 56 |
| Abbildung 9: Verteilung der generierten PCV2-Sequenzen (n=62) auf die verschiedenen PCV2-Genomlängen. | 59 |
| Abbildung 10: Verteilung der generierten PCV2-Sequenzen (n=62) in Abhängigkeit des verwendeten Impfstoffes. | 60 |
| Abbildung 11: Verteilung der generierten PCV2-Sequenzen (n=62) auf die verschiedenen PCV2-Genotypen | 61 |
| Abbildung 12: Prozentuale Verteilung der PCV2-Sequenzen (n=62) auf die PCV2-Genotypen in Abhängigkeit des Impfstatus im Zeitraum 2008 bis 2012. | 62 |
| Abbildung 13: Box-Whisker-Plot: Verteilung der Virusmenge in log PCV2-DNA Kopien/ μ g Total-DNA der generierten 62 PCV2-Sequenzen. Der Median liegt bei $2,76 \times 10^5$ PCV2-Kopien/ μ g Total-DNA | 64 |
| Abbildung 14: Lokalisation der SNPs (n=234) im PCV2-Genom mit Frequenz der seltenen Allele (blaue Balken) innerhalb der 62 PCV2-Sequenzen und Positionsangaben der verschiedenen Funktionselemente im PCV2-Genom | 66 |

| | |
|--|----|
| Abbildung 15: SNP g.1182G>T mit Verteilung der PCV2-Sequenzen (n=61) auf die Aminosäuren Leucin und Methionin an Position 185 im Kapsidprotein in Abhängigkeit des PCV2-Genotypen PCV2a oder PCV2b | 68 |
| Abbildung 16: SNP g.1182G>T mit Verteilung der PCV2-Sequenzen (n=61) auf die Aminosäuren Leucin und Methionin an Position 185 im Kapsidprotein in Abhängigkeit des Impfstatus | 69 |
| Abbildung 17: Signifikanzwerte der Assoziation von SNP und Impfstatus (p-Impfung) | 69 |
| Abbildung 18: Signifikanzen der Assoziationen zwischen SNPs und Virusmenge | 70 |
| Abbildung 19: SNP g.1182G>T: Prozentuale Verteilung der generierten PCV2-Sequenzen (n=62) mit den Aminosäuren Leucin und Methionin an Position 185 im Kapsidprotein in Abhängigkeit von der Virusmenge (p = 0,02)..... | 71 |
| Abbildung 20: SNP g.1566C>T: Prozentuale Verteilung der generierten PCV2-Sequenzen (n=62) auf die Aminosäuren Isoleucin und Valin an Position 57 des Kapsidproteins in Abhängigkeit der Virusmenge (p = 0,02)..... | 72 |

Tabellenverzeichnis

| | |
|--|----|
| Tabelle 1: Nach Segalés (2012) einheitliche Terminologie der PCV2-assoziierten Erkrankungen | 26 |
| Tabelle 2: In Deutschland zugelassene Impfstoffe zur PCV2-Immunsierung (Stand der Bundesanzeiger-Veröffentlichung Nr. 398 vom 08.07.2014)..... | 36 |
| Tabelle 3: Verteilung der untersuchten PCV2-positiven Proben aus PCV2-positiven Betrieben im Zeitraum 2008 bis 2012 | 45 |
| Tabelle 4: Verteilung der PCV2-positiven Proben auf die verschiedenen Probenmaterialien | 45 |
| Tabelle 5: Für die PCV2 qPCR verwendeten Primer nach Olvera et. al (2004)..... | 46 |
| Tabelle 6: PCR-Ansatz für die quantitative PCR (qPCR)..... | 46 |
| Tabelle 7: qPCR-Programm zur Quantifizierung der PCV2-Belastung | 47 |
| Tabelle 8: Für die Amplifikation der PCV2-Genomabschnitte A und B verwendeten PCR und Nested-PCR Primer | 48 |
| Tabelle 9: PCR-Ansatz für die erste PCR des PCV2-Genomabschnittes A | 49 |
| Tabelle 10: PCR-Programm für die Amplifikation des PCV2-Genomabschnitt A (erste PCR) | 49 |
| Tabelle 11: PCR-Ansatz für die Nested-PCR des PCV2-Genomabschnittes A | 49 |
| Tabelle 12: PCR-Programm für die Amplifikation des PCV2-Genomabschnittes A (Nested-PCR)..... | 50 |
| Tabelle 13: PCR-Ansatz für die erste PCR des PCV2-Genomabschnittes B | 50 |
| Tabelle 14: PCR-Ansatz für die Nested-PCR des PCV2-Genomabschnittes B..... | 50 |
| Tabelle 15: PCR-Programm der ersten und der Nested-PCR des PCV2-Genomabschnittes B | 51 |
| Tabelle 16: Ergänzung zur Abbildung 7 und Abbildung 8 mit zugrundeliegender Anzahl der beprobten Betriebe (n) jeden Quartals im Zeitraum 2008 bis 2014 unter Angabe des Impfstatus | 55 |
| Tabelle 17: Verteilung der untersuchten PCV2-positiven Proben (n=156) über den Zeitraum 2008 bis 2012 mit Angaben des Sequenzierungsstatus..... | 57 |
| Tabelle 18: Verteilung der 62 generierten kompletten PCV2-Sequenzen aus Proben von geimpften und nicht-geimpften Betrieben..... | 58 |
| Tabelle 19: Verteilung der generierten PCV2-Sequenzen (n=62) auf die verschiedenen Betriebsformen | 59 |

| | |
|--|-----|
| Tabelle 20: Vier Betriebe mit jeweils zwei generierten PCV2-Sequenzen aus verschiedenen Jahren des Untersuchungszeitraumes und Unterschieden im Impfstatus..... | 60 |
| Tabelle 21: Verteilung der PCV2-Sequenzen (n=62) auf die ORF3-Genotypen..... | 62 |
| Tabelle 22: Verteilung der identifizierten ORF3-Genotypen innerhalb der generierten 62 PCV2-Sequenzen in Abhängigkeit vom Impfstatus..... | 63 |
| Tabelle 23: Logarithmen der PCV2-Gehalte (in PCV2-DNA Kopien/ μg Total-DNA) der 62 generierten PCV2-Sequenzen, gemittelt über die innerhalb der 62 PCV2-Sequenzen identifizierten ORF3-Genotypen..... | 63 |
| Tabelle 24: PCV2-Virusmenge in log PCV2-DNA Kopien/ μg Total-DNA der 62 generierten PCV2-Sequenzen, gemittelt über die Impfkategorien..... | 64 |
| Tabelle 25: PCV2-Virusmengen in log PCV2-DNA Kopien/ μg Total-DNA der 9 PCV2a-Sequenzen, gemittelt über die Impfkategorien..... | 65 |
| Tabelle 26: PCV2-Gehalte in log PCV2-DNA Kopien/ μg Total-DNA der 52 PCV2b-Sequenzen, gemittelt über die Impfkategorien..... | 65 |
| Tabelle 27: Verteilung und Auswirkung der identifizierten SNPs innerhalb der 62 PCV2-Sequenzen..... | 67 |
| Tabelle 28: Zusammenhang zwischen der Aminosäuresubstitution an Position 185 (ORF2; nt 1182) und dem Impfstatus, dem PCV2-Genotyp und der Virusmenge in der Probe. Alle 62 PCV2-Sequenzen und alle PCV2-Genotypen wurden mit einbezogen. | 73 |
| Tabelle 29: Zusammenhang zwischen der Aminosäuresubstitution an Position 185 (ORF2, nt 1182) und dem Impfstatus, sowie der Virusmenge in Proben mit Genotyp PCV2b. | 73 |
| Tabelle 30: Sequenz-Duplikation im ORF1 mit Positionsangaben im PCV2-Genom sowie im kodierten Protein. | 75 |
| Tabelle 31: Aminosäuresequenzen (Sequenz 1 bis 4) der Sequenz-Duplikation im Vergleich zur PCV2b-Referenzsequenz (Acc.Nr.: AF055394)...... | 75 |
| Tabelle 32: Im ORF1 lokalisierte SNPs der 62 PCV2-Sequenzen, mit Positionsangaben im PCV2-Genom und im ORF1, sowie der Auflistung der substituierten Nukleotide. Bei vorhandener Aminosäuresubstitution, Angabe der ausgetauschten Aminosäure mit Position im kodierten Protein. Nomenklatur nach den Dunnen und Antonarakis (2001)..... | 109 |
| Tabelle 33: Im ORF2 lokalisierte SNPs der 62 PCV2-Sequenzen mit Positionsangaben im PCV2-Genom und im ORF2, sowie der Auflistung der substituierten Nukleotide. Bei vorhandener Aminosäuresubstitution, Angabe der ausgetauschten Aminosäure mit Position im kodierten Protein. Nomenklatur nach den Dunnen und Antonarakis (2001)..... | 112 |

| | |
|---|-----|
| Tabelle 34: Im ORF3 lokalisierte SNPs der 62 PCV2-Sequenzen mit Positionsangaben im PCV2-Genom und im ORF3, sowie der Auflistung der substituierten Nukleotide. Bei vorhandener Aminosäuresubstitution, Angabe der ausgetauschten Aminosäure mit Position im kodierten Protein. Nomenklatur nach (den Dunnen und Antonarakis 2001)..... | 116 |
| Tabelle 35: Im PCV2-Genom der 62 generierten PCV2-Sequenzen lokalisierte Insertionen | 117 |
| Tabelle 36: Im PCV2-Genom der 62 generierten PCV2-Sequenzen lokalisierte Deletionen. | 117 |
| Tabelle 37: Im PCV2-Genom der 62 generierten PCV2-Sequenzen lokalisierte Insertionen/Deletionen (InDels) mit Positionsangaben im PCV2-Genom und im ORF2. Bei vorhandener Aminosäuresubstitution, Angabe der ausgetauschten Aminosäure mit Position im kodierten Protein. Nomenklatur nach (den Dunnen und Antonarakis 2001)..... | 118 |
| Tabelle 38: Im Rep-Gen (ORF1) identifizierte Sequenzduplikation mit Positionsangaben im PCV2-Genom und im ORF1, sowie der entsprechenden Position im kodierten Protein..... | 119 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-----------------|--|
| aa | Aminosäure |
| Acc.No..... | Accession Number |
| ApE..... | A plasmid Editor |
| aq. bidest..... | Aqua bidest |
| ATPase | Adenosintriphosphatase |
| BAL..... | Bronchoalveoläre Lavage |
| BLAST | Basic Local Alignment Search Tool |
| Bp | Basenpaare |
| bzw..... | beziehungsweise |
| Cap | Kapsidprotein |
| CD4 | Cluster of Differentiation 4; Glykoprotein |
| CD8 | Cluster of Differentiation 8 Glykoprotein |
| C-Terminus..... | Carboxy-Terminus |
| d.h..... | das heißt |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| dNTP | Desoxyribonukleosidtriphosphate |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| EU..... | Europäische Union |
| f.c..... | final concentration, Endkonzentration |
| g | Gramm |
| H1/H2..... | Hexamer 1/2 |
| H3/H4..... | Hexamer 3/4 |
| ICTV..... | International Committee on Taxonomy of Viruses |
| IgG..... | Immunglobulin G |
| InDel..... | Insertion/Deletion |
| Inj | Injektion |
| ISRE | Interferonstimulierendes Response Element |
| kDA..... | Kilodalton |
| KLH..... | Keyhole-Limpet-Hemocyanin |
| LPS..... | Lipopolysaccharide |
| LT | Lebenstag |

| | |
|------------|--|
| M | Molar |
| MLV | modifizierten lebend-attenuierten Vakzine |
| min | Minute |
| mind | mindestens |
| ml | Milliliter |
| mM | Milimolar |
| mPCV2 | mutierte PCV2b-Variante |
| n | Probenumfang |
| n.s | nicht signifikant |
| NCBI | National Center for Biotechnology Information |
| ng | Nanogramm |
| NLS | Kernlokalisierungssignal |
| nm | Nanometer |
| NS | Nukleotid-assoziiert |
| nt | Nukleotid |
| N-Terminus | Amino-Terminus |
| ORF1 | Open Reading Frame 1 |
| ORF2 | Open Reading Frame 2 |
| ORI | Origin of Replikation |
| p.Inj | post Injektion |
| PAM | Porcine Alveolar Macrophages |
| PAMPs | pathogen associated molecular patterns |
| PASC | Pairwise Sequence Comparison |
| PBMC | Peripheral Blood Mononuclear Cells |
| PCR | Polymerase chain reaction, Polymerase Kettenreaktion |
| PCV | Porzines Circovirus |
| PCV1 | Porzines Circovirus Typ 1 |
| PCV2 | Porzines Circovirus Typ 2 |
| PCVAD | Porcine Circovirus Associated Diseases |
| PCVD | Porcine Circovirus Diseases |
| PDNS | porzinen Dermatitis und Nephropathie Syndrom |
| P-Loop | Phosphat-bindende Schleife, Walker-Motiv |
| PMWS | Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome |
| pPirh2 | porzine p53-induzierende RING-H2 Ligase |

| | |
|-------------------|---|
| PRDC | Porcine Respiratory Disease Complex |
| PRRSV | Porcine reproductive and respiratory syndrome Virus |
| qPCR | quantitative Polymerase Kettenreaktion |
| RC..... | Rolling-Circle-Motiv |
| Rep | Replikationsprotein |
| Rep‘ | gespleißte Variante des Replikationsproteins |
| rep-RNA..... | Replikations-assoziierte RNA |
| RGS | Regulator des G-Protein-Signals |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| s | Signifikant |
| SGD | Schweinegesundheitsdienst |
| SIV | Swine Influenza Virus |
| SNP..... | Single Nucleotide Polymorphism |
| SPF | spezifisch pathogen frei |
| <i>spp.</i> | Subspezies |
| TAE | Tris-Acetat-EDTA-Puffer |
| TE | Tris EDTA |
| UV | Ultraviolett |
| V | Volt |
| VE | Vollentsalztes Wasser |
| VF | Verdünnungsfaktor |
| VLP | Virus ähnlichen Partikeln |
| µl..... | Mikroliter |
| µM..... | Mikromolar |

1 Einleitung

Das porcine Circovirus Typ 2 (PCV2) ist weltweit in den Schweinepopulationen verbreitet (Segalés et al. 2005, Abbildung 1). Es ist als primärer Erreger an zahlreichen Krankheitsbildern beteiligt (Allan et al. 1998; Ellis J. et al. 1998; Krakowka et al. 2005). Diese werden im europäischen Raum unter dem Begriff PCVD (Porcine Circovirus Diseases, Segalés et al. 2005) bzw. im nordamerikanischen Raum unter PCVAD (Porcine Circovirus Associated Diseases, Opriessnig et al. 2007) zusammengefasst und führen durch Verluste insbesondere im Flatdeck und der Mast zu hohen ökonomischen Schäden in der Schweineproduktion. Eine ursächliche Therapie der PCVD ist aufgrund der viralen Genese nicht möglich. Als effektive prophylaktische Maßnahmen zur Kontrolle einer PCVD stehen neben der Verbesserung des Hygienemanagements und der Eindämmung von möglichen Koinfektionen (Kixmüller et al. 2008; Segalés et al. 2009) seit 2007 verschiedene PCV2-Impfstoffe zur Verfügung (Andraud et al. 2009, Beach und Meng 2012). Zahlreiche experimentelle Studien und Fälle aus der Praxis belegen die positiven Auswirkungen der aktuellen PCV2-Impfstoffe auf die Tiergesundheit (Beach und Meng 2012; Fraile et al. 2012a; Kim et al. 2011; Martelli et al. 2011; Opriessnig et al. 2010). Wie etwa die Reduzierung des Antibiotikaeinsatzes infolge einer höheren Widerstandsfähigkeit gegenüber Koinfektionen (Kixmüller et al. 2008; Sinha et al. 2010), verbesserte Fruchtbarkeitsleistungen der Sauen (Pejsak et al. 2010) oder eine Senkung der PCV2-bedingten Umweltbelastung (Blunt et al. 2011). In den letzten Jahren werden jedoch vereinzelt PCVD Fälle in PCV2-geimpften Beständen beschrieben (Opriessnig et al. 2014c) und von einigen Forschern mit dem Auftreten einer mutierten PCV2b-Variante in Verbindung gebracht (Chae 2015; Seo et al. 2014; Opriessnig und Langohr 2013; Xiao et al. 2012). Im Rahmen der Bestandsbetreuung verzeichnete der Schweinegesundheitsdienst der Klinik für Wiederkäuer und Schweine, Professur für Schweinekrankheiten der Justus-Liebig-Universität Gießen, in den letzten Jahren einen zunehmenden Anstieg der PCV2-Virusmenge aus Proben PCV2-geimpfter Betriebe. Während sich im Zeitraum 2008 bis einschließlich des dritten Quartals 2011 die Virusmengen der untersuchten Proben reduzierten und gegen Ende dieses Zeitraums kaum noch die Nachweisgrenze erreichten, nahmen die Virusmengen der untersuchten Proben anschließend wieder stetig zu, obwohl die Bestände weiterhin gegen PCV2 geimpft wurden. Ausgehend von diesen Beobachtungen und der Tatsache, dass PCV2 trotz Impfung in den Beständen weiterhin zirkuliert (Kekarainen 2006; Grierson et al. 2004), liegt die Vermutung nahe, dass eine Veränderung in der PCV2-Genomsequenz stattgefunden hat. Möglicherweise sind im Rahmen einer Selektion PCV2-Varianten entstanden, die sich der

Impfung entziehen können. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, mittels vergleichender Sequenzanalyse, Mutationen innerhalb der für Antigenität und Virusreplikation zuständigen Gene des PCV2-Genoms mit möglichen Assoziation zwischen PCV2-Genotyp, Impfstatus und Virusmenge in 62 PCV2-Sequenzen aus geimpften und nicht-geimpften Beständen aus Deutschland zu untersuchen.

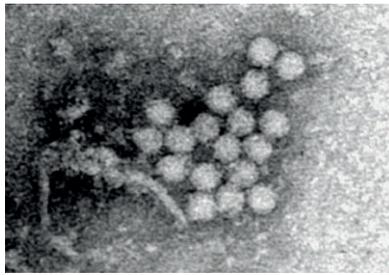


Abbildung 1: Elektronenmikroskopische Aufnahme von porzinen Circovirus Typ 2 Partikeln nach negativer Färbung eines PK/15-Zellkultur-Lysats, welches mit Material von PMWS-erkrankten Schweinen inokuliert wurde (Allan et al. 2000).

2 Literaturübersicht

2.1 Porzine Circoviren

2.1.1 Geschichte

1974 wurde in einer permanenten Schweinenieren-Zelllinie PK-15 (ATCC-CCL 33) eine Papova- und Picornavirus ähnliche Kontaminante entdeckt (Tischer et al. 1974). In weiterführenden Studien stellte sich diese Kontaminante als neues, unbehülltes, zirkulär einzelsträngiges DNA Virus dar. Es wurde als porzines Circovirus (PCV) bezeichnet (Tischer et al. 1982). Serologische Untersuchungen auf PCV Antikörper zeigten die weltweite Verbreitung des Virus in der Schweinepopulation (Dulac 1989, Edwards und Sands 1994, Horner 1991, Tischer et al. 1986, Tischer 1995). Es wurde als apathogen eingestuft, da weder klinischen Symptome oder pathologische Läsionen beschrieben noch durch experimentelle Infektionen induziert werden konnten (Allan 1995, Tischer et al. 1986). 1998 wurden PK-15 PCV ähnliche Viruspartikel aus Gewebeproben an Postweaning Multisystemic Wasting Syndrom (PMWS) erkrankter Schweine aus Nordamerika und Europa isoliert. Die isolierten Viren schienen eng mit der original PK-15 Viruskontaminante verwandt zu sein, wiesen aber antigene Unterschiede auf (Allan et al. 1998; Ellis J. et al. 1998). Bei strukturellen Vergleichen der PK-15 Circoviren mit den Isolaten aus den erkrankten Schweinen, zeigten sich umfangreiche Nukleotid- und Proteinsequenzunterschiede. So wiesen die PMWS-assoziierten Circoviren lediglich eine Nukleotidsequenzhomologie von 68 % zu den PK-15 Circoviren auf (Hamel 1998). Daraufhin wurde die PK-15 PCV Variante als Porzines Circovirus Typ 1 (PCV1) und die PMWS-assoziierte PCV Variante als Porzines Circovirus Typ 2 (PCV2) bezeichnet (Meehan et al. 1998).

2.1.2 Taxonomie

Die porzinen Circoviren sind der Familie *Circoviridae* zuzuordnen (Segalés et al. 2005). Innerhalb der Familie lassen sich zwei Genera basierend auf Genomgröße und Genomorganisation unterscheiden (Segalés et al. 2005). Zusammen mit dem Beak-and-Feather-Disease-Virus und weiteren aviären Circoviren bilden die porzinen Circoviren den Genus *Circovirus*. Vertreter dieses Genus weisen eine Ambisense-Genompolarität auf und sowohl der virale als auch der komplementäre Strang kodieren für virale Proteine (Cheung 2012). Dem

zweiten Genus *Gyrovirus* wird nicht nur das Chicken-Anemia-Virus sondern auch ein neu entdecktes, humanes Gyrovirus zugeordnet (Sauvage et al. 2011). Diese Vertreter verfügen über eine Antisense-Genompolarität und nur der komplementäre positive Strang kodiert für virale Proteine (Cheung 2012). Niagro et al. (1998) zeigten anhand von phylogenetischen Studien eine mögliche Verwandtschaft der *Circoviridae* zu Pflanzenviren der Familien *Geminiviridae* und *Nanoviridae* auf. Nach Sequenzanalysen des Rep-kodierenden Genoms vermuten Gibbs und Weiller (1999), dass sich die Circoviren aus den Nanoviren entwickelten. Ihrer Auffassung nach fand eine Übertragung eines pflanzlichen Nanovirus auf ein Wirbeltier statt. Anschließend kam es innerhalb des Wirbeltieres zu einer Rekombination mit einem einzelsträngigen, tierpathogenen RNA Virus. Als ein weiteres Mitglied der Familie *Circoviridae* wird ein neues Genus *Cyclovirus* vorgeschlagen. Dieses enthält Viren welche im Fäzes von Menschen und Schimpansen identifiziert wurden und über eine Ambisense-Genompolarität verfügen (Blinkova et al. 2009, Li et al. 2010a).

2.1.3 Nomenklatur

Das Internationale Komitee für Virstaxonomie (ICTV) sieht keine Klassifizierung von Virussubtypen vor. So finden sich in der Literatur zahlreiche Vorschläge zur Benennung der Genotypen innerhalb des porcinen Circovirus Typ 2. Daher unterbreiteten die Mitglieder des EU-Konsortiums für porcine Circovirus-Erkrankungen (www.pcvd.net) 2008 einen Vorschlag zur einheitlichen Nomenklatur für die Bezeichnung der PCV2-Genotypen (Segalés et al. 2008). Die Genotyp-Klassifizierung von PCV2-Isolaten erfolgt anhand von paarweisen Sequenzvergleichen (PASC) (Cortey et al. 2011b, Grau-Roma et al. 2008, Segalés et al. 2008, Tribble und Rowland 2012). Dabei wird das Ausmaß der genetischen Veränderung (p-Distanz) ermittelt. Die Anzahl der Basenunterschiede wird durch die Gesamtzahl der Nukleotide geteilt. Im Rahmen phylogenetischer Analysen ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen der Genotyp-Klassifikation basierend auf dem kompletten PCV2-Genom und der solitären ORF2-Sequenz (Olvera et al. 2007). Vorrangig erfolgt die Genotypisierung von PCV2-Isolaten anhand des Vergleiches der ORF2-Sequenzen (Tribble und Rowland 2012). Die PCV2-Isolate gehören unterschiedlichen Genotypen an, wenn die genetische Differenz zwischen den ORF2-Sequenzen mindestens 0,035 beträgt (Segalés et al. 2008). Wird das gesamte PCV2-Genom verglichen, liegt die genetische Differenz bei 0,02 (Grau-Roma et al. 2008). Aktuell lassen sich drei Genotypen innerhalb des porcinen Circovirus Typ 2 unterscheiden, PCV2a, PCV2b und PCV2c (Segalés et al. 2008, Tribble und Rowland 2012).

PCV2a war bis 2003 der vorherrschende Genotyp in der Schweinepopulation weltweit als eine globale Verschiebung des dominierenden Genotypen zu PCV2b einsetzte (Allan et al. 2007, Carman 2006, Cortey et al. 2011a, Dupont et al. 2008, Gagnon et al. 2007, Guo et al. 2010, Jantafong et al. 2011, Li et al. 2010b, Timmusk et al. 2008, Wang et al. 2009, Wiederkehr et al. 2009). Bis dato wurde in Nordamerika und Kanada nur der Genotyp PCV2a nachgewiesen, während in Europa und Asien auch PCV2b identifiziert wurde (Dupont et al. 2008; Triple und Rowland 2012). Das Auftreten des Genotyps PCV2b ist möglicherweise mit einem Anstieg schwerer PCVD Fällen in Kanada und Nordamerika assoziiert (Carman 2006, Carman et al. 2008, Triple und Rowland 2012). PCV2c wurde nur in archiviertem Material gesunder Schweine aus den 1980igern in Dänemark gefunden (Dupont et al. 2008). Lediglich drei Isolate konnten diesem Genotypen bis jetzt zugeordnet werden (Segalés et al. 2008). 2009 berichteten Wang et al. (2009) von der Existenz zweier weiterer PCV2-Genotypen, PCV2d und PCV2e. Wang et al. (2009) verglichen komplette PCV2-Sequenzen, legten aber ihren Analysen weder die von Grau-Roma et al. (2008) definierte genetische Differenz zugrunde noch wendeten sie das PASC (Pairwise Sequence Comparison) zur Definition eines eigenen Schwellenwertes an (Cortey et al. 2011b). Auch in der Schweinepopulation Thailands wurde der Genotyp PCV2e identifiziert, die Ergebnisse basierten aber lediglich auf zehn PCV2-Isolaten (Jantafong et al. 2011). Es zeigten sich keine neuen Genotypen als Cortey et al. (2011b) die Sequenzanalysen von Wang et al. (2009) zusammen mit weiteren 200 ORF2-Sequenzen sowie kompletten PCV2-Genomsequenzen, basierend auf den genetischen Differenzen von Segalés et al. (2008) und Grau-Roma et al. (2008), wiederholten. Des Weiteren sind Wangs Sequenzen (Wang et al., 2009) nahezu identisch mit bereits 2007 von Olvera et al. analysierten Sequenzen (Cortey et al. 2011b).

In den USA (2012) und in Südkorea (2013) wurde eine mutierte PCV2b-Variante (mPCV2) in Fällen klinischer PCVD nachgewiesen und mit Impfdurchbrüchen in Verbindung gebracht (Chae 2015, Seo et al. 2014, Opriessnig et al. 2013b, Xiao et al. 2012). Diese Virusvariante weist mehrere solitäre Aminosäuremutationen im gesamten Kapsidprotein auf und wird durch eine Mutation des Stopkodons im ORF2 von 233 auf 234 Aminosäuren erweitert (Chae 2015, Guo et al. 2010, Guo et al. 2011, Guo et al. 2012). Bereits schon früher wurde diese Mutation des ORF2-Stopkodons in PCV2-Isolaten aus Europa und Asien beschrieben (Chae 2015). So wies Grierson et al. (2004) diese Veränderung 2003 in einem PCV2-Isolat aus PCVD Fällen in den Niederlanden nach. In Deutschland wurde sie 2005 in PCV2-Isolaten von Wildschweinen identifiziert (Knell et al. 2005). Während Olvera et al. (2007) diese Veränderung der ORF2-

Sequenz bei phylogenetischen Analyse anhand von im September 2005 in der NCBI Datenbank vorhanden kompletten PCV2-Genomsequenzen beschrieb und als Cluster 1C bezeichnete. Auch in China wurde die Mutation im Stopkodon des ORF2 nachgewiesen (Guo et al. 2010, Li et al. 2010b, Wang et al. 2009). Sequenzanalysen anhand von Daten aus der NCBI Genbank ergaben, dass die mutierte PCV2-Variante seit etwa 2006 vermehrt in China zirkulierte und sich sogar bis in das Jahr 2002 zurückverfolgen ließ (Opriessnig et al. 2014a, Wang et al. 2009). In einigen Arealen Chinas scheint das mPCV2 die konventionelle Virusvariante PCV2b verdrängt zu haben (Opriessnig et al. 2014b, Wei et al. 2013). Nach Opriessnig et al. (2014a) und Chae (2015) handelt es sich bei dem von Wang et al. (2009) beschriebenen Genotypen PCV2d um das mutierte PCV2b-Isolat (mPCV2) (Abbildung 2).

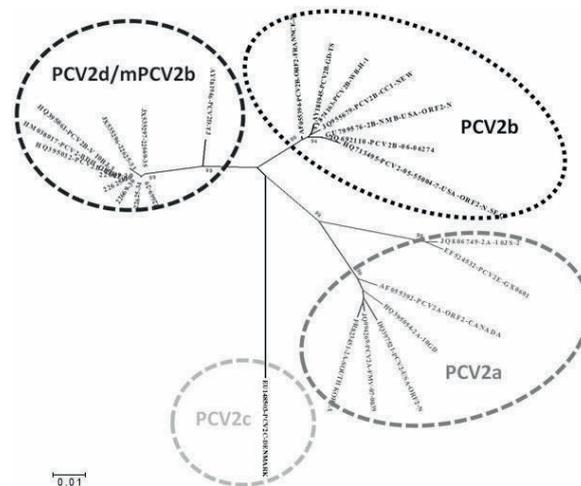


Abbildung 2: Beziehung zwischen den PCV2-Genotypen, basierend auf ORF-2-Sequenzvergleichen (Opriessnig 2014d).

Auch von rekombinanten Virusvarianten bestehend aus ORF1 von PCV1 und ORF2 von PCV2a (Gagnon et al. 2010) bzw. ORF1 von PCV2a und ORF2 von PCV2b (Hesse et al. 2008) wird berichtet. Gagnon et al. (2010) schlug für seine entdeckte Virusvariante die Genotypbezeichnung PCV1/2a vor. Ob es sich hierbei um einen weiteren PCV2-Genotypen handelt, ist stark umstritten. Zum einen wurden nur drei Fälle identifiziert und zum anderen besteht eine starke Ähnlichkeit zu einem chimären inaktivierten Impfstamm (Suvaxyn, Firma Zoetis; Gagnon et al. 2010, Gillespie et al. 2008). Um zu überprüfen, ob dieses Isolat möglicherweise vom Suvaxyn-Impfstamm abstammt, nahm die Firma Zoetis die Vakzine vorübergehend vom Markt. 2011 wurde die Vakzine in einer Neuformulierung wieder eingeführt (Chae 2012, Fraile et al. 2012 b). Es finden sich weitere Berichte über das natürliche Auftreten von rekombinanten PCV2-Isolaten *in vivo* (Cheung 2009, Kim et al. 2009, Lefebvre

et al. 2009, Ma et al. 2007) bzw. *in vitro* (Guo et al. 2011) sowie über die gleichzeitige Infektion mit verschiedenen PCV2-Genotypen in ein und demselben Tier (Hesse et al. 2008, Horlen 2007).

2.1.4 Genomische Organisation

Mit einer Partikelgröße von 17 nm handelt es sich um die kleinsten der bisher bekannten Viren (Hamel 1998, Tischer et al. 1982). Das zirkulär geschlossene, einzelsträngige DNA-Genom setzt sich aus 1759 (PCV1) bzw. aus 1767-1768 Nukleotiden (PCV2) zusammen (Meehan et al. 1998). Die Sequenzhomologie innerhalb der PCV1- bzw. PCV2-Isolate beträgt > 90 %, während die Homologie zwischen den PCV1- und PCV2-Isolaten nur 68-76 % beträgt (Cheung 2003c). Das Genom ist auf das allernötigste reduziert, dem Replizieren und Verpacken der viralen Information (Finsterbusch und Mankertz 2009). Diese Funktion übernehmen die Hauptleserahmen ORF1 und ORF2, zwei der insgesamt elf offenen Leserahmen (Hamel 1998, Abbildung 4). Durch die Ambisense-Polarität des Genoms sind die offenen Leserahmen in zueinander entgegengesetzter Leserichtung angeordnet und erzeugen zwei intergenische Regionen (Mankertz et al. 2004). Eine kürzere zwischen den 3'-Enden von ORF1 und ORF2 sowie eine längere zwischen den 5'-Enden. Letztere Region beinhaltet den Ursprung der viralen Replikation (ORI) (Finsterbusch und Mankertz 2009). Der Replikationsursprung wird durch eine Stammschleifenstruktur charakterisiert (Mankertz 1997). Beide PCV-Genome haben nahezu identische Stammschleifenmotive (Hamel 1998, Abbildung 3). Der Stamm besteht aus einer Basenpaarung von elf Basenpaaren, die ein Palindrom bilden (5'GAAGTGCGCTG3'). Die Schleife besteht aus zwölf (PCV1) bzw. zehn Nukleotiden (PCV2) und beinhaltet an ihrem Scheitelpunkt eine konservierte Sequenz. Hamel (1998), Mankertz (1997; 2003; 2004), Meehan et al. (1997) und Ramamoorthy et al. (2009) bezeichneten diese Struktur als Nonanukleotid [5'(T/A)AGTATTAC3'], während Cheung (2012) sie als Oktanukleotid (5'AGTATTAC3') benannte. Das konservierte Oktanukleotid ist essentiell für die Virusreplikation und enthält essentielle als auch nicht-essentielle Nukleotide. Bei einem Austausch von essentiellen Nukleotiden findet keine Replikation statt, wohingegen ein Austausch von nicht-essentiellen Nukleotiden zu keiner Beeinträchtigung führt. Die nicht-essentiellen Nukleotide befinden sich an Position 2 und 5 des Oktanukleotids (AxTAXTAC) (Cheung 2012). Am rechten Arm der Stammschleifenstruktur befindet sich eine sechs Basenpaar lange, viermalig direkt wiederholende Sequenz (5'CGGCAG3'), die als H1/H2 und H3/H4 bezeichnet wird (Cheung 2012, Mankertz et al. 2004). Unterbrochen werden die Hexamere von sich ebenfalls

wiederholende Pentameren (5'CACCT3'; Mankertz et al. 2003). Die vier Hexamere dienen als Bindungsstellen für die Rep-Gen-Produkte *in vitro* (Steinfeldt et al. 2001). Laut Mankertz (2002) wird die Repression des Rep-Promotors durch die Bindung des Rep-Proteins an die Hexamere H1/H2 vermittelt, während eine Bindung an H3/H4 jedoch nicht erforderlich ist. Daher bezeichneten Mankertz et al. (2004) den rechten Arm der Stammschleife zusammen mit H1/H2 als minimale Bindungsstelle. Innerhalb der Promotorregion des Rep-Gens identifizierte Mankertz (2002) ein Interferonstimulierendes Response Element (ISRE). Es wurde vermutet, dass dieses Element (5'AAAAGTGAAAGA3', Genomposition 1742-1753 nt) eine Verbindung zwischen der Aktivierung des Abwehr- und Immunsystems und der Aktivierung der Replikation von PCV2 in der Wirtszelle darstellt (Reiner und Willems H. 2008). Ramamoorthy et al. (2009) konnten nachweisen, dass ISRE die Interferon vermittelnde Verstärkung der PCV2-Replikation *in vitro* beeinflusst wenn es in einem intakten Virus vorhanden war und sprachen ihm eine wichtige Rolle in der viralen Pathogenese zu (Ramamoorthy et al. 2011).

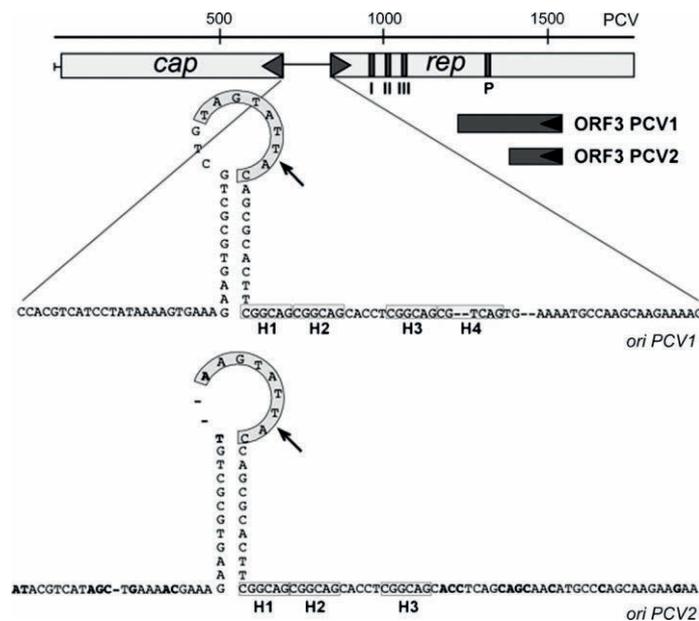


Abbildung 3: Eine lineare Abbildung des PCV-Genoms zeigt die beiden Hauptleserahmen ORF1 (Rep) und ORF2 (Cap). Innerhalb des Rep-Gens sind die drei RCR-Motive (I-III) sowie die dNTP-Bindungsdomäne (P) eingezeichnet. Die unterschiedlichen ORF3 Längen von PCV1 und PCV2 sind im grauen Kästchen angezeigt. Der untere Teil zeigt einen Vergleich der Replikationsursprünge (ORI) von PCV1 und PCV2 mit der Stammschleifenstruktur. Die konservierte Nonamersequenz wird in einer grauen Box angezeigt. Die Strangbruchstelle wird durch einen Pfeil gekennzeichnet. Die sich wiederholenden Hexamere 1-4 sind durch offene Felder markiert (Finsterbusch und Mankertz 2009).

2.1.5 Offene Leserahmen

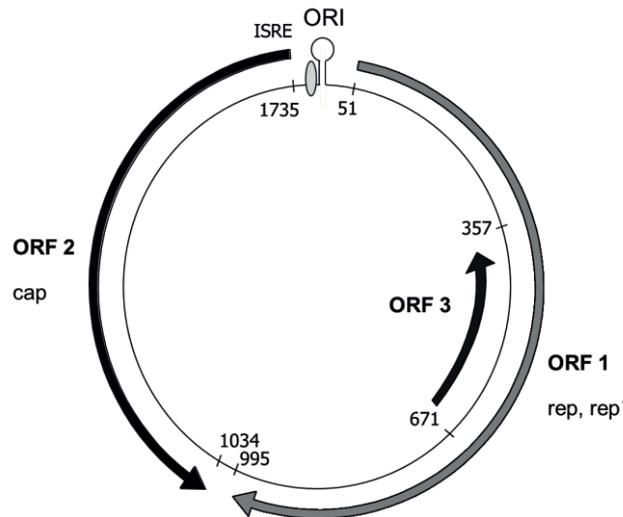


Abbildung 4: Schema des ringförmigen PCV2-Genoms mit den Leserahmen ORF1-ORF3. ISRE: Interferon stimuliertes Response Element; ORI: Origin of Replication; rep, rep': Replikationsgene; cap: Kapsidgen (Reiner 2008)

2.1.5.1 ORF1

Der ORF1 (Nukleotide: 51-995; Hamel 1998) ist auf dem viralen DNA-Strang im Uhrzeigersinn angeordnet und kodiert für acht RNA-Produkte, die durch alternatives Spleißen entstehen. Es sind fünf Rep-RNA (*Rep*, *Rep'*, *Rep3a*, *Rep3b*, *Rep3c*) und drei NS-RNA (*NS515*, *NS672*, *NS0*; Cheung 2003c). Für die Virusreplikation essentiell sind nur *Rep* und *Rep'* (Cheung 2004, Cheung 2003b) sowie die translatierten Proteine Rep und Rep' (Mankertz 1998, Mankertz und Hillenbrand 2001). Unklar ist, ob die sogenannten minor-RNAs (*Rep3a*, *Rep3b*, *Rep3c*, *NS462*, *NS642*, *NS515*, *NS672*, *NS0*) Proteine kodieren und welche Funktion sie im Lebenszyklus der porcinen Circoviren übernehmen (Cheung 2012; 2003c). Das Rep-Protein wird vom gesamten ORF1 kodiert und weist eine Aminosäurelänge von 314 aa und 35,8 kDA auf (Cheung 2003c, Hamel 1998). Es beinhaltet drei konservierte Motive, die typisch für die enzymatisch initiierte Replikation im Rolling-Circle-Modus sind sowie eine Phosphatbindende Schleife (P-Loop) für Bindungsprozesse während der Nukleinsäuresynthese (dNTP Bindungsprozesse) (Mankertz et al. 2004). Der P-Loop ist eine Helikasedomäne, die ATPase-Aktivität in Gegenwart von zweiwertigen Ionen aufweist (Cheung 2012, Steinfeldt et al. 2007). Die Funktion des Motivs RC-I ist unbekannt, RC-II ist für die Koordination zweiwertiger Ionen

zuständig. RC-III enthält einen Tyrosinrest zur Bildung eines Einschnittes an der Oktanukleotidsequenz des ORI sowie zur Erzeugung einer kovalente Bindungsstelle am 5'-Ende der verschobenen DNA. Mutationsstudien zeigen, dass RC-I, -II und -III essentiell für die ORI-Spaltung und die PCV-Replikation in Zellkulturen sind. Während der P-Loop zwar nicht essentiell für die ORI-Spaltung *in vitro* aber unverzichtbar für die DNA-Replikation in Zellkulturen ist (Cheung 2012, Steinfeldt et al. 2007). Das Rep'-Protein wird von einer gespleißten RNA des ORF1 translatiert und ist 178 Aminosäuren lang (Cheung 2003c). Es enthält die Motive RC-I, -II und -III, jedoch nicht den P-Loop (Cheung 2012). Rep und Rep' beinhalten beide in ihrem identischen N-Terminus drei Kernlokalisierungssignale (NLS). NLS-1 und NLS-2 vermitteln die Kernakkumulation während NLS-3 als Verstärker des Kernimports von Rep und Rep' fungiert (Finsterbusch und Mankertz 2009).

2.1.5.2 ORF2

Der ORF2 (Nukleotide 1735-1034, Hamel 1998) ist auf dem komplementären Strang lokalisiert und gegen den Uhrzeigersinn ausgerichtet. Er kodiert das Hauptstrukturprotein (Cap) welches aus 233 bzw. 234 Aminosäuren (Cheung 2003a, Mankertz et al. 2004) besteht und eine Molekülmasse von 30 kDA besitzt (Nawagitgul et al. 2000). Das Kapsidprotein von PCV1 und PCV2 weist eine Sequenzhomologie von 67 % auf (Cheung 2003c). Bei Betrachtung im Elektronenmikroskop offenbart sich, dass sich das Strukturprotein nach Expression in Bakterien- und Insektenzellen zu Virus-ähnlichen Partikeln (VLP) verbindet (Nawagitgul et al. 2000). Das Strukturprotein wirkt sich über variable Sequenzabschnitte, sogenannte immunogene Epitope, auf die Antigenität, die Wirtsimmunität und den Zelltropismus aus (Olvera et al. 2007). Mahe et al. (2000) lokalisierten die variablen Bereiche an den Aminosäurepositionen 65-87, 113-139 und 193-207. Lekcharoensuk et al. (2004) ergänzten die Aminosäurepositionen 47-63, 165-200 und die letzten vier Aminosäuren am C-Terminus des ORF2. Als spezifisch für das PCV2-Kapsidprotein identifizierten Truong et al. (2001) die Epitope 69-83 und 117-131. Bei phylogenetischen Analysen mehrerer PCV2-Isolate, beteiligt an verschieden stark ausgeprägten Fällen von PCVD, fanden Larochelle et al. (2002) drei hoch variable Bereiche in der Aminosäuresequenz des ORF2 an Position 59-80, 121-136 und 180-191. Die zwei erstgenannten überschneiden sich mit den immunogenen Bereichen von Mahe et al. (2000). Eine mögliche Verbindung zwischen Veränderungen der Kapsidproteinsequenz und der Pathogenität verschiedener PCV2-Isolaten wird vermutet (Fenaux et al. 2004b, Krakowka et al. 2012, Larochelle et al. 2002). Cheung et al. (2007) beschrieben zwei im Kapsidprotein

lokalisierte Aminosäuremotive, die entweder mit dem PCV2-Genotypen 2a oder 2b assoziiert sind. Auch die Motive überschneiden sich zum Teil mit den immunogenen Bereichen von Mahe et al. (2000). Motiv-1 setzt sich aus sechs Aminosäuren an Position 86-91 und Motiv-2 aus vier Aminosäuren an Position 190, 191, 206 und 210 zusammen (Cheung 2009). Die Signatur für PCV2a-Motiv-1a lautet T_NKI_SI (1487-1473 nt) und für Motiv-2a SRKD. Entsprechend für PCV2b lautet Motiv-1b S_NPR_SV (1486-1472 nt) und Motiv-2b AGIE (Cheung et al. 2007, Grau-Roma et al. 2008, Timmusk et al. 2008). PCV2-Isolate mit Motiv-2b zeigten eine höhere Anreicherung von viralem Protein im Kern der infizierten Wirtszelle und eine bessere Replikation im Vergleich zu PCV2-Isolaten mit Motiv-2a (Cheung und Greenlee 2011). Finsterbusch et al. (2009) und Timmusk et al. (2006) entdeckten Interaktionen des Kapsidproteins mit dem Rep-Protein sowie mit einer geringen Anzahl zelluläre Proteine. Die Cap-Rep-Bindung dient womöglich dem Transport von Rep und Rep' aus dem Zytoplasma in den Zellkern zur Regulation der DNA-Replikation (Lin et al. 2009, Timmusk et al. 2006). Das Kapsidprotein verfügt über einen Arginin-reichen N-Terminus (Mankertz et al. 2004), der an der Bindung viraler DNA beteiligt zu sein scheint (Finsterbusch und Mankertz 2009). Laut Cheung und Bolin (2002) sowie Liu et al. (2001) fungieren einundvierzig Aminosäuren des N-Terminus als Kernlokalisierungssignal, insbesondere die Bereiche der Aminosäuren 12-18 und 34-41 scheinen für eine optimale Kernlokalisation verantwortlich zu sein.

2.1.5.3 ORF3

Der ORF3 (Nukleotide 671-357; Hamel 1998) ist auf dem komplementären Strang lokalisiert, gegen den Uhrzeigersinn ausgerichtet und überlappt komplett mit dem ORF1. Das kodierte Protein setzt sich aus 104 Aminosäuren zusammen und verfügt über ein Molekulargewicht von 11,9 kDA (Hamel 1998). Zwischen dem ORF3-Protein von PCV2 und PCV1 besteht lediglich eine Aminosäuresequenzhomologie von 61,5 % (Liu et al. 2005, Hamel 1998). In PCV2-Sequenzanalysen zeigt sich das ORF3-Protein hoch konserviert und weist eine Aminosäureidentität von > 94,5 % auf (Liu et al. 2005). Es ist vorherrschend im Zellkern und nur zu einem geringen Anteil im Zytoplasma der Wirtszellen lokalisiert (Liu et al. 2005). Timmusk et al. (2009) wies eine Interaktion des PCV2-ORF3-Proteins mit einem Regulator des G-Protein-Signals (RGS), dem porzinen RGS16, nach. Es scheint an der Translokation des ORF3-Proteins in den Zellkern beteiligt zu sein. Das ORF3-Protein von PCV2 ist nicht essentiell für die Virusreplikation *in vitro* (Liu et al. 2005) und *in vivo* (Liu et al. 2006). Es ist jedoch an der Virus-induzierten Apoptose über die Aktivierung von Caspase-8 und Caspase-3

beteiligt (Liu et al. 2005). Zudem wirkt es nicht nur über die Caspase-Aktivierungskaskade sondern auch über eine spezifische und direkte Bindung an die porcine p53-induzierende-RING-H2-Ligase (pPirh2) an der Induktion der Apoptose infizierter Zellen mit (Liu et al. 2007). Die Bindung des ORF3-Proteins an pPirh2 hemmt dessen zytoplasmatische Stabilisation, dies führt wiederum zu einer Steigerung der Expression des Tumorsuppressorgens p53 und infolge dessen zur Apoptose der Zellen (Liu et al. 2007). Karuppanan et al. (2010) identifizierte die Aminosäurepositionen 20-65 des ORF3-Proteins als essentiell für die Bindung an pPirh2.

2.1.5.4 ORF4

Der ORF4 kodiert für ein Protein, das nicht essentiell für die PCV2-Virusreplikation ist aber eine Rolle bei der Unterdrückung der Caspaseaktivität und der Regulierung der CD4- und CD8-T-Lymphozyten während einer PCV2-Infektion spielt (He et al. 2013). Der ORF4 (nt 565 - nt 386) ist innerhalb des ORF3 lokalisiert und in die gleiche Richtung orientiert (Hamel 1998). Das kodierte Peptid weist eine Länge von 59 Aminosäuren und ein Molekulargewicht von 5,6 kDA auf (He et al. 2013). He et al. (2013) vermuten eine Zusammenarbeit von ORF3 und ORF4 in Bezug auf die Apoptose-Aktivität.

2.1.5.5 Mutationen innerhalb genetischer Elemente des PCV2-Genoms

Sequenzvariationen der verschiedenen genetischen Elemente des PCV2-Genoms wird eine mögliche Beeinflussung der viralen Pathogenese mit Auswirkungen auf Virusmenge, Immunogenität und Antigenität zugesprochen. Mutationen des im Replikationsursprung des PCV2-Genoms lokalisierten Interferon-stimulierenden-Elements zeigten keine signifikante Auswirkung auf die Virusreplikation *in vitro* (Ramamoorthy et al. 2009) jedoch *in vivo* (Ramamoorthy et al. 2011). Eine mutationsbedingte negative Beeinflussung der Widerstandsfähigkeit des Virus gegenüber dem Wirtsimmunsystem scheint eine mögliche Erklärung für diesen Unterschied zu sein (Ramamoorthy et al. 2011).

Hua et al. (2013) sehen in der ORF1-kodierten-Repsequenz einen möglichen Beitrag zur PCV2-Pathogenität *in vivo*. Es wird vermutet, dass sich Veränderungen der Rep-Sequenz über eine Beeinflussung des viralen Replikationsvermögens auf die Virulenz der PCV2-Isolate auswirken (Hua et al. 2013). Sinha et al. (2012) führten die *in vitro* Unterschiede in der PCV2-Replikation

in Alveolarmakrophagen (PAMs) auf die PCV2a-ORF1-Sequenz zurück, wobei eine Beeinflussung der Ergebnisse durch eine gleichzeitige PRRSV-Infektion nicht völlig ausgeschlossen wurde.

Variationen in der ORF2-kodierten Kapsidprotein-Sequenz, insbesondere im Bereich immunogener Epitope, werden Auswirkungen auf die Antigenität der PCV2-Isolate zugeschrieben (Fenaux et al. 2004b, Krakowka et al. 2012, Laroche et al. 2002). In einer Viruspassagestudie mit einem PCV2a-Isolat traten zwei Aminosäuremutationen auf, wobei eine davon (R191S) in einer immunogenen Region (Lekcharoensuk et al. 2004) lokalisiert war (Fenaux et al. 2004b). Es wurde vermutet, dass beide Mutationen zu einer Konformationsänderung des Kapsidproteins führten. Bei der 30. Passage wurde an der Proteinposition 110 (nt 328) ein Prolin gegen ein Arginin ausgetauscht, bei der 120. Passage an Proteinposition 191 (nt 573) ein Arginin gegen ein Serin. Im Verlauf der Studie zeigte sich, dass diese Mutationen zwar zu einer verbesserten Virusreplikation *in vitro* aber zu einer Virulenzabschwächung *in vivo* führten (Fenaux et al. 2004b). Auch Krakowka et al. (2012) zeigten in einer retrospektiven Studie, dass Mutationen innerhalb des zweiten immunogenen Epitops des ORF2 (Aminosäuren 113-139; Mahe et al. 2000) das Virulenzpotential von PCV2-Isolaten verändern können. Die abgeleitete Aminosäuresequenz (Aminosäuren 133-135) eines neun Basenpaar langen Segments (nt 1331-1339) führt zu einer Konformationsänderung des Nukleokapsids von hydrophil zu hydrophob. Infolge dessen verändert sich die Virulenz der Isolate von vormals apathogen zu pathogen (Krakowka et al. 2012).

Eine in Asien und Europa sporadisch auftretende PCV2b-ORF2-Mutante (mPCV2) (Chae 2015, Opriessnig und Langohr 2013, Xiao et al. 2012) verfügt im Vergleich zu den Hauptgenotypen PCV2a und PCV2b scheinbar über eine gesteigerte Virulenz *in vivo* (Guo et al. 2012). Punktmutationen von T zu C an Nukleotidposition 1033 und von A zu T an Nukleotidposition 1035 des PCV2-Genoms resultieren in einer Änderung des Stopkodons (UAA) des ORF2 zu einem Lysin-Kodon (AAG) (Abbildung 5). Gleichzeitig verschiebt sich das Stopkodon (UAA) von den Nukleotidpositionen 1033-1035 auf die Nukleotidpositionen 1030-1032 (UAG) und führt somit zu einer Verlängerung des Proteins um eine Aminosäure (Chae 2015, Guo et al. 2011). Die Kapsidproteinsequenz erweiterte sich um ein zusätzliches Lysin (K) von 233 auf 234 Aminosäuren (Chae 2015, Opriessnig et al. 2014a, Guo et al. 2012). Während Guo et al. (2012) bei einer Challenge-Studie an 30 Tage alten, konventionellen Ferkeln (20 Tiere) von einer Virulenzsteigerung des mPCV2b *in vivo* im Vergleich zu PCV2a

und PCV2b berichtete. Konnte Opriessnig et al. (2014a) keine signifikanten Virulenzunterschiede zwischen PCV2a, PCV2b und mPCV2 in einer Studie an zwei Wochen alten, naiven Ferkeln, feststellen.

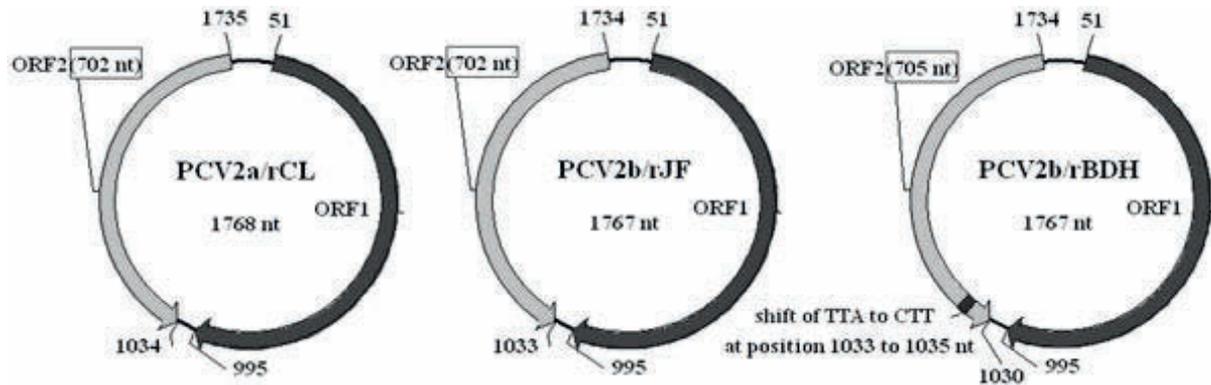


Abbildung 5: Schematische Darstellung der PCV2-ORF2-Mutante mPCV2b (rBDH) im Vergleich zu den PCV2-Genotypen PCV2a (rCL) und PCV2b (rJF) unter Berücksichtigung der Punktmutationen von T zu C an Nukleotidposition 1033 und von A zu T an Nukleotidposition 1035 des PCV2-Genoms (Guo et al. 2012).

Karuppanan et al. (2009) und Liu et al. (2006) beschrieben einen Zusammenhang zwischen dem ORF3-kodierten Apoptose-induzierenden-Protein und der viralen Pathogenese. Nach Liu et al. (2006) führte eine fehlende ORF3-Expression zu einer signifikanten Reduzierung der PCV2-vermittelnden Apoptose in Zellkulturen. Hierbei verglichen Liu et al. (2006) in einer Studie an acht Wochen alten Mäusen unveränderte PCV2-Isolate (Wild Typ) und PCV2-Isolate mit unterdrücktem ORF3-Protein auf PCVD-typische Gewebsläsionen sowie auf die Höhe der induzierten Virus- und Antigenmengen. Im Gegensatz zu den unveränderten PCV2-Isolaten zeigten sich bei den PCV2-Isolaten mit unterdrücktem ORF3-Protein geringere Virus- und Antigenmenge im Gewebe sowie keine offensichtlichen pathologischen Läsionen. Laut Karuppanan et al. (2009) waren PCV2-Isolate mit unterdrücktem ORF3-Protein *in vivo* abgeschwächt, da sie eine geringere Virusmenge und keine pathologischen Läsionen in Schweinen induzierten. So belegten Karuppanan et al. (2009) eine Abschwächung der Pathogenität bei unterdrücktem ORF3-Protein in SPF-Ferkeln sowie eine milde Virämie und das Fehlen von pathologischen Läsionen im Vergleich zu unveränderten PCV2-Varianten. Die Ergebnisse von Karuppanan et al. (2009) und Liu et al. (2006) sind in Hinblick auf ihre Gültigkeit allerdings nicht ganz eindeutig. Die Erkenntnisse von Liu et al. (2006) basieren auf einem Maus-Modell, obwohl zum einen Mäuse nicht der natürliche Wirt von PCV2 sind und

zum anderen das Maus-Modell laut Opriessnig et al. (2009c) nur begrenzt zur Untersuchung der PCV2-Pathogenese herangezogen werden kann (Juhan et al. 2010). Die Ergebnisse von Karuppanan et al. (2009) basieren auf einer Studie (12 Tiere) ohne Kontrollgruppe (Juhan et al. 2010). Des Weiteren stehen die Ergebnisse von Chaiyakul et al. (2010) und Juhan et al. (2010) den Ergebnissen von Karuppanan (2009) und Liu (2006) entgegen. Juhan et al. (2010) konnten in einer kombinierten *in vitro* und *in vivo* Studie in PK-15 Zellkulturen sowie an drei Wochen alten konventionellen Ferkeln die Ergebnisse von Karuppanan et al. (2009) und Liu et al. (2006) nicht nachvollziehen. Zwar führte bei Juhan et al. (2010) die Unterdrückung des ORF3-Proteins im Vergleich zu den unveränderten PCV2-Isolaten zu einer verzögerten Serokonversion und zu einer geringeren Virusmenge im Serum der Ferkel. Aber es konnten keine signifikanten Unterschiede im Schweregrad der pathologischen Läsionen oder der PCV2-spezifischen Antigenmenge gefunden werden. In einer Zellkulturstudie verglichen Chaiyakul et al. (2010) die Zytotoxizität des PCV2/ORF3-Proteins mit der des PCV1/ORF3-Proteins. Hierbei zeigte das PCV1/ORF3-Protein eine höhere Rate an Apoptose-bedingten Zelltod und wirkte gegenüber einer größeren Anzahl an unterschiedlichen Zelltypen toxisch. Nach Meinung Chaiyakul et al. (2010) wurde die PCV2-Pathogenität entweder nicht oder nicht alleine durch das ORF3-Protein bestimmt. Inwieweit das ORF3-Protein über die Regulation der Apoptose-Aktivität tatsächlich eine Rolle in der viralen Pathogenese spielt, ist bis heute nicht eindeutig geklärt und wird kontrovers diskutiert (Meng 2013).

2.2 Pathogenese

Wenig ist bis heute bekannt über die Pathogenese der PCV2-Infektion oder welche Zellen die initiale Virusreplikation *in vivo* unterstützen (Meng 2013, Opriessnig et al. 2007, Abbildung 6). Obwohl das PCV2 serologisch weltweit ubiquitär in der Schweinepopulation verbreitet ist (Segalés et al. 2005), entwickelt nur ein kleiner Teil der infizierten Tiere eine klinische Erkrankung (Meng 2013, Opriessnig et al. 2007). So führt eine alleinige PCV2-Infektion nur bei 1,9 % der Fälle zu einer klinischen PCVD (Pallares et al. 2002).

Opriessnig et al. (2008b), Pogranichniy et al. (2000) und Rovira et al. (2002) beschrieben eine PCV2-Virämie erstmals am siebten Tag nach Infektion, mit einem Peak etwa zwischen vierzehn und einundzwanzig Tagen nach Infektion. Unter natürlichen Bedingungen werden die maternalen Antikörper während der Aufzuchtphase abgebaut, gefolgt von einer aktiven Serokonversion (Blanchard 2003, Larochelle et al. 2003, Rodriguez-Arrijoja 2002, Segalés et al. 2005). Diese tritt etwa im Alter von sieben bis zwölf Wochen auf, wobei Antikörper zuletzt

bis mindestens zu einem Alter von 28 Wochen nachweisbar sind (Allan und Ellis 2000, Rodriguez-Arriola 2002, Segalés et al. 2005). Dagegen wurde bei experimentell infizierte Tiere eine Serokonversion gegen PCV2 zwischen 14 und 28 Tage nach Infektion beschrieben (Pogranichniy et al. 2000, Rovira et al. 2002).

Oft wird die Entstehung einer klinischen PCVD durch eine gleichzeitige bakterielle oder virale Infektion beschleunigt, der Schweregrad der Symptome verstärkt und die Krankheitsdauer verlängert (Opriessnig und Halbur 2012). Auch in der Genetik des Wirtes sowie in einer Immunstimulation werden mögliche Einflüsse auf die Entwicklung des Krankheitsgeschehens gesehen (Opriessnig et al. 2007, Meng 2013). Im Falle einer klinisch manifesten PCVD werden stets eine Lymphozytendepletion sowie eine Lymphopenie des peripheren Blutes beschrieben (Allan und Ellis 2000, Opriessnig et al. 2007). Die Lymphozyten werden in den angegriffenen lymphatischen Geweben durch Makrophagen und Dendritische Zellen ersetzt (Histiozytose) (Meng 2013, Opriessnig et al. 2007). Mithilfe genetischer Analysen und Sequenzvergleichen von PCV2-Isolaten versuchte man die Unterschiede in der klinischen Manifestation einer PCVD zu ergründen (Opriessnig et al. 2007).

2.2.1 Übertragung von PCV2

PCV2 wird sowohl horizontal als auch vertikal mit zahlreiche Körperflüssigkeiten übertragen (Beach und Meng 2012). Der effizienteste Infektionsweg stellt die horizontale Übertragung via direkten Kontakt mit infektiösen Atmungs- und Verdauungssekreten sowie Harn und Kot dar (Rose et al. 2012). Während Shibata et al. (2003) hierbei der oro-nasalen Übertragung die größte Bedeutung zuwies, sahen Yang et al. (2003) und Jensen et al. (2006) diese in der oro-fäkalen Übertragung. Infektiöse Viruspartikel wurden nicht nur in Serum, Tonsillen, Speichel, Nasen-, Augen- und Bronchialsekreten (Krakowka et al. 2000, Segalés et al. 2005, Shibata et al. 2003) beschrieben sondern auch in Kolostrum, Milch und Samen jeweils nach Feldinfektion (Gerber et al. 2011) oder bei experimentell (Ha et al. 2009) PCV2-infizierten Sauen und Ebern nachgewiesen (Larochelle et al. 2000, Park et al. 2009, Shibata et al. 2006). Ha et al. (2010) belegten die Übertragung von PCV2 und die Reproduktion von PMWS in neugeborenen, naiven Ferkeln durch die Verfütterung von Kolostrum und Milch PCV2-infizierter Sauen.

Die Dauer der Virusausscheidung wurde bei natürlicher Infektion der Schweine mit bis zu 209 Tagen nach Abferkeln (Patterson et al. 2011a) bzw. mit bis zu 69 Tagen nach experimenteller Infektion (Patterson et al. 2011b) angegeben. Bei natürlich infizierten Ebern wurde die

phasenweise Virusausscheidung über den Samen mit 27,3 Wochen angegeben (McIntosh et al. 2006), während Madson et al. (2008) bei experimentell infizierten Ebern eine Virusausscheidung von bis zu 90 Tagen nach Infektion beschrieben. Des Weiteren wurde die Induktion von PCV2-bedingten Reproduktionsstörungen durch die Insemination naiver Sauen mit Samen hoher PCV2-Mengen nachgewiesen (Madson et al. 2009a). Jedoch erschien die PCV2-Übertragung über den Samen Dosis-abhängig zu sein. Da eine PCV2-Infektion naiver Sauen mit Samen niedrigen PCV2-Gehaltes fehlschlug (Madson et al. 2009b).

Aufgrund der verschiedenen Übertragungswege des porcinen Circovirus Typ 2 erscheint auch die Umweltbelastung mit PCV2 ein wichtiger Faktor für die Herdengesundheit zu sein (Beach und Meng 2012). Eine PCV2-Übertragung mit dem Wind, wie bei Rathkjen (2003) beschrieben, konnten Rose et al. (2012) nicht ausschließen. Jedoch war die Wahrscheinlichkeit einer Übertragung streng durch die Distanz zwischen infektiösem und anfälligem Tier limitiert (Rose et al. 2012). Hierdurch erklärt sich eine potentielle Gefahr für Gebiete mit hoher Schweinedichte (Verreault et al. 2010). Verreault et al. (2010) belegten eine hohe Konzentration an PCV2-DNA in Staubpartikeln von bis zu 10^7 Genomkopien/m³ Luft. Die Staubbelastung variierte jedoch von Betrieb zu Betrieb. Blunt et al. (2011) wiesen in Stubenfliegen (*Musca domestica*) aus Schweinebetrieben PCV2-DNA nach. Zwar bestehe in der Übertragung von adulten Fliegen zwischen den Betrieben eine mögliche Gefahr der Einschleppung von PCV2 in Schweinebestände. Jedoch sei es wahrscheinlicher, dass die Fliegen einen mechanischen Vektor der PCV2-Übertragung darstellen und eher als Messgröße für die Umweltbelastung verwendet werden können (Blunt et al. 2011). Des Weiteren war eine Betrieb-zu-Betrieb-Übertragung auch durch die Einführung infizierter Tiere (Albina et al. 2001, Bolin et al. 2001) oder durch die Verwendung infizierten Samens (Madson und Opriessnig 2011) möglich. Auch konnten sich Schweine durch den Verzehr von rohem Fleisch virämischer Tiere infizieren (Opriessnig et al. 2009d).

Die vertikale Infektionsroute ist unter Feldbedingungen schwer zu beurteilen, spielt aber eine entscheidende Rolle bei der Virusübertragung zwischen und innerhalb einer Herde (Rose et al. 2012). Intrauterin infizierte Ferkel können virämisch geboren werden und einen Beitrag zur horizontalen PCV2-Übertragung in der Aufzucht leisten (Madson und Opriessnig 2011).

2.2.2 PCV2-Zielzellen

Da das porcine Circovirus für die Replikation auf die zellulären Polymerasen seines Wirtes während der S-Phase der Mitose angewiesen ist, bevorzugt es schnell teilende Zellen und Gewebe (Tischer 1987). Eine PCV2-Infektion kann sowohl pränatal zu unterschiedlichen embryonalen oder fötalen Entwicklungsstadien erfolgen als auch postnatal zu verschiedenen Altersstufen (Nauwynck et al. 2012). Basierend auf diesem Hintergrund ist eine Variation der Zielzellen in Abhängigkeit des Entwicklungsstatus bzw. des Alters des Tieres nicht verwunderlich. Während Gilpin et al. (2003) und Vincent et al. (2003) den Makrophagen und Dendritischen Zellen keine signifikante Rolle in der PCV2-Replikation zusprachen. Und die nachgewiesenen hohen Virusgehalte innerhalb dieser Zellen auf eine Anreicherung von PCV2-Antigen infolge einer Phagozytose und nicht auf eine aktive Virusreplikation zurückführten. Schilderten Hamberg et al. (2007), Mateusen et al. (2004), Pérez-Martín et al. (2007), Rodríguez-Cariño et al. (2010), Sanchez et al. (2001), Sanchez et al. (2003), Sanchez et al. (2004) und Yu et al. (2007), dass vor allem Makrophagen aber auch endotheliale und epitheliale Zellen die Virusreplikation sehr wahrscheinlich unterstützten. So wiesen Mateusen et al. (2004) eine PCV2-Replikation in *in vivo*-produzierten Zona-pellucida freien Morulae und Blastozysten nach, wobei deren Anfälligkeit mit ihrem Entwicklungsstatus stieg. Sanchez et al. (2003) beschrieben eine Änderung der PCV2-Zielzellen im Verlauf der fötalen Entwicklung. Von Kardiomyozyten, Hepatozyten und Makrophagen zur alleinigen Bevorzugung der Makrophagen postnatal (Sanchez et al. 2003). Hamberg et al. (2007) und Rodríguez-Cariño et al. (2010) wiesen eine PCV2-Replikation innerhalb von Histiozyten und Makrophagen des Thymus und der Lymphknoten, sowie in Dendritischen Zellen der Lymphknoten nach. Vincent et al. (2003) belegten eine PCV2-Persistenz in Dendritischen Zellen *in vitro* ohne Reduktion der Infektiosität oder der Virusmenge. Aufgrund der Migrationsfähigkeit der Dendritischen Zellen wurde darin eine Möglichkeit für das porcine Circovirus gesehen, sich im Wirt zu verbreiten (Vincent et al. 2003). Auch Pérez-Martín et al. (2007) identifizierten PCV2-Replikationsprodukte in Makrophagen, in den Epithelzellen der Tonsillen, Bronchien, Bronchiolen und den Magendrüsen sowie in Hepatozyten und Pneumozyten. Des Weiteren sah Rodríguez-Cariño et al. (2010; 2011) in den Mitochondrien eine mögliche bedeutende Komponente für die Virusreplikation. Die Untersuchungen von Lefebvre et al. (2008), Lin et al. (2008) und Yu et al. (2007) charakterisierten die Virusreplikation in PCV2-infizierten, mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs). Hierbei konnte Lefebvre et al. (2008) im Gegensatz zu Yu et al. (2007) keine PCV2-Replikation in PMBC abstammenden Monozyten

nachweisen. Wahrscheinlich stellt die Virusreplikation in zirkulierenden, aktivierten T-Lymphozyten die zentrale Rolle in der Entstehung von PCVD dar (Yu et al., 2007; Opriessnig et al. 2007; Meng 2013). So erklärt sich auch das typisch pathologisch-histologische Bild mit Histiozytose und Lymphozytopenie (Übersicht bei Reiner et al., 2008).

Im Rahmen der PCV2-Infektion werden die Circoviren von Makrophagen und T-Lymphozyten aufgenommen (Gilpin et al. 2003, Yu et al. 2007). Während Vincent et al. (2005) in dieser Phase der Infektion eine verminderte γ -Interferon-Produktion beschrieben, wiesen Darwich et al. (2008) und Hasslung (2005) innerhalb dieser Phase eine gesteigerte Interleukin-10-Antwort nach. Diese Prozesse stellen womöglich die Grundlage der Immunevasion und Persistenz des PCV2 dar (Reiner et al. 2008). Die Proliferation der PCV2-infizierten Lymphozyten wird durch die Stimulation des Immunsystems mit anderen infektiösen (Viren, Bakterien, Parasiten) oder nicht-infektiösen (Stallluft, Staub, Impfung) Faktoren induziert (Meng 2013, Opriessnig und Halbur 2012). Bedingt durch die Aktivierung des Immunsystems erfolgt die Expression von Interferon- γ , welches die wichtigste replikationsinduzierende Komponente des ISRE im PCV2-Genom darstellt (Mankertz et al. 2004). Folge ist eine gesteigerte PCV2-Replikation mit Anstieg der Virusmenge im betroffenen Gewebe (Harms et al. 2001, Krakowka et al. 2001, Rovira et al. 2002), sowie eine veränderte Immunzell-Subpopulation (Segalès et al. 2001a). Die Lymphozytendepletion verursacht eine massive Zytokin-Freisetzung mit Überstimulierung der Abwehrzellen. Aufgrund der starken Chemotaxis kommt es zur überschießenden Einwanderung von Histiocyten in das infizierte Gewebe (Histiozytose) und deren überschießende Vermehrung (Riesenzellen) mit nachfolgendem Funktionsverlust des betroffenen Gewebes (Segalés et al. 2005). Neben dem eintretenden Funktionsverlust der betroffenen Organe kommt es bei den erkrankten Tieren letztlich zur Immunsuppression (Segalès et al. 2004a).

Auf welchem Weg das PCV2 in die Zielzellen gelangt, ist noch nicht vollständig geklärt. Erste Ansätze lieferten Misinzo (2005; 2006; 2009) und Nauwynck et al. (2012). *In vitro* Untersuchungen einer porzinen Monozyten-Zelllinie zeigten, dass PCV2 vorrangig diese Zellen über eine Clathrin-vermittelnde Endozytose infizierte und dabei ein saures Milieu bevorzugte (Misinzo 2005). Die Internalisation von Epithelzellen erfolgte über einen Dynamin- und Cholesterin-unabhängigen, aber Aktin und GTPase-abhängigen Weg. Jedoch würde auf eine Clathrin-vermittelnde Endozytose in die Epithelzellen keine vollständige Virusreplikation folgen (Misinzo et al. 2009). Als PCV2-Bindungsrezeptoren identifizierten Misinzo et al.

(2006) Chondroitinsulfat-B und Heparinsulfat. Diese befinden sich an den extrazellulären Domänen von in der Plasmamembran verankerten Glykoproteinen (Nauwynck et al. 2012). Wobei Nauwynck et al. (2012) vermuten, dass die Chondroitinsulfat-B und Heparinsulfat präsentierenden Glykoproteine nicht nur die Bindung sondern auch die Internalisierung in die Zelle vermitteln.

2.2.3 Kofaktoren

Das porcine Circovirus Typ 2 ist zwar der primäre Erreger einer PCVD (Allan et al. 1998, Ellis J. et al. 1998, Krakowka et al. 2005), jedoch führte eine alleinige Infektion selten zu einer klinischen Erkrankung (Pallares et al. 2002). Es bedarf einer Aktivierung der PCV2-infizierten Wirtsimmunen durch Antigenkontakt (z.B. Viren, Bakterien, Lipopolysaccharide, Parasiten) oder durch immunmodulatorischer Einflüsse (Impfung, Medikamente, Stallklima) um die PCV2-Replikation zu starten (Kyriakis et al. 2002, Opriessnig und Halbur 2012, Reiner et al. 2008). Über die Bindung eines pathogenspezifischen, konservierten molekularen Musters (pathogen associated molecular patterns, PAMPs) an die entsprechenden Toll-like-Rezeptoren wird die spezifische Interleukin-Expression induziert und die Aktivierung der unspezifischen und spezifischen Abwehrmechanismen initiiert (Reiner et al. 2008).

Die Entstehung, der Verlauf und der Schweregrad einer klinischen PCVD werden durch zahlreiche infektiöse und nicht-infektiöse Faktoren beeinflusst (Meng 2013, Opriessnig und Halbur 2012). Wobei Opriessnig und Halbur (2012) annahmen, dass die Kofaktoren von Region zu Region und von Herde zu Herde variieren, aber über ähnliche Mechanismen eine Verstärkung der PCVD verursachen. Zahlreichen viralen, bakteriellen und parasitären Pathogenen, wie dem porcinen Parvovirus (Allan et al. 1999, Ellis et al. 2000, Kennedy et al. 2000, Krakowka et al. 2000), dem Pseudorabies-Virus (Rodriguez-Arrioja et al. 1999), dem Torque-Teno-Sus-Virus (Kekarainen 2006), *Lawsonia intracellularis* (Jensen et al. 2006, Segalés et al. 2001), *Salmonella ssp.* (Opriessnig et al. 2011a) sowie *Pneumocystis spp.* (Sanches et al. 2006) oder *Cryptosporidium parvum* (Nunez et al. 2003) werden eine mögliche Rolle in der Pathogenese einer PCVD zugesprochen (Opriessnig und Halbur 2012). Im Rahmen dieser Arbeit werden nur die am häufigsten isolierten Kofaktoren ausführlicher beschrieben.

Als die überwiegend bei einer PCV2-Infektion vorkommenden Kofaktoren werden das PRRSV, das Swine-Influenza-Virus (SIV) und *Mycoplasma hyopneumoniae* genannt (Dorr 2007, Opriessnig und Halbur 2012, Ramamoorthy et al. 2009). Nach einer Studie von

Pogranichniy et al. (2002) erhöhte die kombinierte Infektion von PRRSV und PCV2 das Risiko einer klinischen PCVD um ein vielfaches. In einer experimentellen Studie an Ferkeln, denen das Kolostrum vorenthalten wurden, verglichen Allan et al. (2000) die Höhe der Virusreplikation und die Virusverteilung im Gewebe bei solitärer und kombinierter Infektion von PCV2 und PRRSV. Die kombinierte PCV2-PRRSV-Infektion veranlasste eine signifikante Erhöhung der PCV2-Antigenmenge in den betroffenen Geweben im Vergleich zur solitären PCV2-Infektion. Dagegen wurde keine Erhöhung der PRRSV-Antigenmenge in den betroffenen Geweben oder eine Steigerung der PRRSV-Virusreplikation bei kombinierter PCV2-PRRSV-Infektion im Vergleich zur solitären PRRSV-Infektion nachgewiesen (Allan et al. 2000). Bei Untersuchungen an drei Wochen alten, per Kaiserschnitt entwickelten und ohne Kolostrum aufgezogenen Ferkeln, zeigte sich durch Koinfektion von PRRSV und PCV2 eine Steigerung des Krankheitsverlaufes und des Schweregrades der Läsionen (Harms et al. 2001). Auch Rovira et al. (2002) belegten in einer Studie an 5 Wochen alten konventionellen Ferkeln eine gesteigerte PCV2-Virusreplikation, erhöhte PCV2-Virusmengen in den betroffenen Geweben sowie einen höheren Schweregrad der mikroskopischen Läsionen bei kombinierter PCV2-PRRSV-Infektion im Vergleich zur solitären PCV2-Infektion. Um in dieser Studie, die natürliche PRRSV-PCV2-Infektionssituation in konventionellen Betrieben nachzuempfinden, wurde den Ferkeln das PRRSV 7 Tage vor der zusätzlichen PCV2-Infektion verabreicht. Die ausschlaggebende Rolle des beobachteten Synergismus von PCV2 und PRRSV sahen Allan et al. (2000) im gemeinsam bevorzugten Zielzelltyp (Monozyten/Makrophagen) beider Viren. Auch Ramamoorthy et al. (2009) und Opriessnig und Halbur (2012) nehmen basierend auf den beschriebenen Ergebnissen an, dass PRRSV und PCV2 synergistisch zusammen agieren und gemeinsam eine PCVD induzieren.

Einen Beleg für die synergistische Wirkung von PCV2 und PRRSV sahen Chang et al. (2005) in den Ergebnissen ihrer Studie. In der *in vitro* PCV2-PRRSV-Koinfektion-Studie an Alveolarmakrophagen wiesen Chang et al. (2005) nach, dass PCV2 ein potentieller Interferon- α -Initiator jedoch kein kompetenter Tumornekrosefaktor- α -Initiator (TNF- α) war. Für das PRRSV verhielt es sich genau umgekehrt und das PRRSV wies zusätzlich einen hohen zytopathischen Effekt auf. Bei PCV2-PRRSV-Koinfektion veranlasste die PCV2-assoziierte Interferon- α -Bildung, die Reduktion des PRRSV-assoziierten zytopathischen Effekts, während der Anstieg der pulmonalen Gewebsläsionen auf eine gesteigerte PRRSV-assoziierte TNF- α -Bildung zurückgeführt wurde. In den kombinierten Effekte von TNF- α und INF- α bei einer gemeinsamen PCV2-PRRSV-Infektion sahen Chang et al. (2005) die mögliche Ursache der interstitiellen Pneumonie von PMWS-erkrankten Schweinen.

Der häufige Nachweis einer kombinierten SIV-PCV2-Infektion beim Porcinen Respiratory Disease Complex (PRDC) führte zur Vermutung, dass auch das SIV und das PCV2 synergistisch agieren könnten (Dorr 2007, Harms et al. 2002, Pallares et al. 2002).

Neben den viralen Pathogenen wird auch oft das Bakterium *Mycoplasma hyopneumoniae* als Kofaktor bei einer PCV2-bedingten Lungenerkrankung aufgeführt. *M. hyopneumoniae* verstärkte hierbei die PCV2-assoziierten mikro- und makroskopischen Läsionen im Lungen- und in den lymphatischen Geweben und erhöhte signifikant die Virusmenge innerhalb dieser Läsionen (Krakowka S 2007, Opriessnig et al. 2004). Des Weiteren steigerte es die Inzidenz einer klinischen PCVD innerhalb der Schweinepopulation (Opriessnig et al. 2004). Nach Meng (2013) sind weiterführende Studien zur Klärung nötig, ob die Immunsuppression infolge einer PCV2-Infektion Schweine für eine Koinfektion anfälliger werden lässt oder ob die Begleiterreger eine PCV2-Infektion und die Entwicklung einer PCVD fördern.

2.2.4 Genetik

López-Soria et al. (2011) und Opriessnig et al. (2006a, 2009a) beschreiben genetische Unterschiede ausgewählter Schweinerassen in der Anfälligkeit für eine PCV2-Infektion und der Entwicklung einer PCVD. Schweine des Landrasse-Typs erschienen prädisponierter für PCV2-bedingte Läsionen bzw. eine PCV2-assoziierte Erkrankung im Vergleich zu Tieren der Rasse Duroc oder Large White (Opriessnig et al. 2006a). Unter experimentellen Bedingungen wiesen Landrasse-Schweine im Vergleich zu Schweinen der Rasse Pietrain einen signifikant höheren Schweregrad an lymphatischen Läsionen auf. Und Schweine aus einer Kreuzung von Large White und Duroc zeigten eine höhere Anfälligkeit für eine PCV2-Infektion als reinrassigen Pietrain (Opriessnig et al. 2009a). Einen genetischen Einfluss auf den klinischen Verlauf von PMWS unter Feldbedingungen belegten López-Soria et al. (2011). Meng (2013) empfiehlt weiterführende Studien zur Klärung der genetischen Resistenz oder Anfälligkeit gegen eine PCV2-Infektion. Nicht nur für eine verbesserte Kontrolle einer PCV2-Infektion oder PCVD sondern auch um möglicherweise PCV2-resistente Schweinerassen zu generieren (Meng 2013).

2.2.5 Immunmodulation

Die Entwicklung einer klinischen PCVD scheint ebenfalls wesentlich durch verschiedene Einflüsse auf das Immunsystem gefördert zu werden (Opriessnig et al. 2007, Ramamoorthy et

al. 2009). So kann eine externe Stimulation des Immunsystems durch Adjuvanten wie Freund's Adjuvant oder Keyhole-Limpet-Hemocyanin (KLH) erfolgen. Jedoch können auch Impfungen und Koinfektionen eine klinische PCVD verschärfen (Opriessnig et al. 2007, Ramamoorthy et al. 2009). In der Studie von Hoogland (2006) wurde der Einfluss unterschiedlicher Adjuvanten auf den Verlauf der Infektion am 35. Tag nach PCV2-Exposition verglichen. Schweine, die mit Öl-in-Wasser-Adjuvanten geimpft wurden, zeigten eine verlängerte Dauer der PCV2-Virämie, eine erhöhte Menge an Viruspartikeln in Serum und Gewebe sowie einen höheren Schweregrad der Lymphozytendepletion, als die Schweine, welche mit wässrigen und Aluminiumhydroxidhaltigen Produkten geimpft wurden (Hoogland 2006). Neben der Art des verwendeten adjuvanten Impfstoffes beeinflusste auch der Zeitpunkt der Impfung und das Alter der Tiere bei PCV2-Infektion, die Entwicklung einer klinischen PCVD (Opriessnig et al. 2006b). Auch von einer Steigerung der Virusreplikation *in vitro* infolge der Stimulation von PBMC mit Concanavalin A wurde berichtet (Yu et al. 2007).

Nicht nur immunstimulierende, sondern auch immunsuppressive Effekte zeigten Auswirkungen auf die Entwicklung einer PCVD (Opriessnig et al. 2007). Zwei Studien (Kawashima et al. 2003, Krakowka et al. 2002) belegten, dass eine Unterdrückung der zellvermittelnden Immunität eine Rolle bei der Entstehung einer PCVD spielen könnte. In der Studie von Krakowka et al. (2002) führte eine Cyclosporin Behandlung, jedoch nicht die Kortikosteroid Behandlung, zu einer erhöhten PCV2-Replikation im Gewebe und förderte die Ausbreitung von PCV2 in den Hepatozyten. Interessanterweise waren keine typischen PCVD Entzündungsreaktionen vorhanden, obwohl das betroffene Gewebe hohe PCV2-Titer aufwies (Krakowka et al. 2002). Kawashima et al. (2003) wiesen nach, dass eine Dexamethason Therapie die PCV2-Infektion von lymphatischen Geweben beeinflusste. In dieser Studie wurden acht Tage alte, PCV2-infizierte Ferkel Dexamethason verabreicht. Im Vergleich zu den unbehandelten Ferkeln, entwickelten die behandelten Tiere eine granulomatöse Lymphadenitis (Kawashima et al. 2003).

2.2.6 PCV2-Genotypen

Der Anstieg schwerer PCVD Fälle 2005 in Kanada und Nordamerika, wurde von einigen Wissenschaftlern im Zusammenhang mit dem Auftreten des bis dato dort nicht vorkommenden Genotyps PCV2b gesehen. Man vermutete, dass es sich hierbei um eine virulentere Virusvariante handelte (Carman et al. 2008, Gagnon et al. 2007). Andere sahen in der hohen Prävalenz von PCV2a zum Zeitpunkt als PCV2b in Kanada und Nordamerika auftrat und der

daraus resultierenden möglichen Koinfektion, eine Erklärung für den Anstieg schwerer PCVD Fälle (Gerber et al. 2013, Khaiseb et al. 2011). Auch Dupont et al. (2008) ging nach den Ergebnissen seiner Studie von einem möglichen Pathogenitätsunterschied der Genotypen PCV2a und PCV2b aus. 2006 beschrieb Opriessnig noch einen deutlichen Virulenzunterschied der verschiedenen Genotyp-Isolate im SPF-Schweinemodell, zwei Jahre später konnte kein Unterschied zwischen PCV2a und PCV2b festgestellt werden (Opriessnig et al. 2008c). In derselben Studie wurden jedoch Virulenzunterschiede zwischen den Isolaten innerhalb eines Genotyps belegt. Auch in einer Studie mit gnotobiotischen Tieren (Lager et al. 2007), einer retrospektiven Studie (Allan et al. 2007) und bei phylogenetischen Analysen (Olvera et al. 2007) wurde kein Unterschied zwischen den zwei Genotypen nachgewiesen. Harding et al. (2010) zeigte, dass PCV2b nicht virulenter ist als PCV2a, aber eine gleichzeitige Infektion von PCV2a und PCV2b einen höheren Schweregrad der Läsionen und eine stärkere Krankheitsausprägung zur Folge hatte. Die beobachtete Verbesserung der Virusreplikation bei einer gleichzeitigen Infektion mit PCV2a und PCV2b *in vivo* (Khaiseb et al. 2011) und *in vitro* (Guo et al. 2011) unterstützt die Ergebnisse von Harding et al. (2010). Laut Allemandou et al. (2011) stellen die von Cheung et al. (2007) identifizierten PCV2-Genotyp-spezifischen Elemente Motiv-1a und Motiv-1b sowie die flankierenden Sequenzen dieser Elemente im Kapsid eine wichtige Virulenzdeterminante *in vitro* und *in vivo* dar. Die Motive sind im Kapsidprotein an Aminosäureposition 86-89 lokalisiert und überschneiden sich teilweise mit den von Mahe et al. (2000) beschriebenen immunogenen Epitopen. Man verglich zwei mutierte PCV2-Isolate, bei denen die Genotyp-spezifischen Elemente untereinander ausgetauscht wurden, mit zwei unveränderten PCV2-Isolaten. Es zeigte sich, dass sich die Virulenz des PCV2b/Motiv-1a Isolats nicht abschwächte, während sich die Virulenz des PCV2a/Motiv-1b Isolats im Vergleich zu den unveränderten Isolaten drastisch reduzierte (Allemandou et al. 2011). Triple und Rowland (2012) dagegen berichteten, dass sich diese Genotyp-spezifischen Motive zwar zur schnellen Differenzierung der PCV2-Genotypen eignen, ihnen jedoch keine Verwendung als Virulenzdeterminante nachgewiesen werden konnte. Rekombinante Virusisolate bestehend aus ORF1 von PCV2b und ORF2 von PCV2a, scheinen wiederum eine gesteigerte Virulenz im Vergleich zu den solitären Genotyp-Isolaten aufzuweisen (Guo et al. 2011).

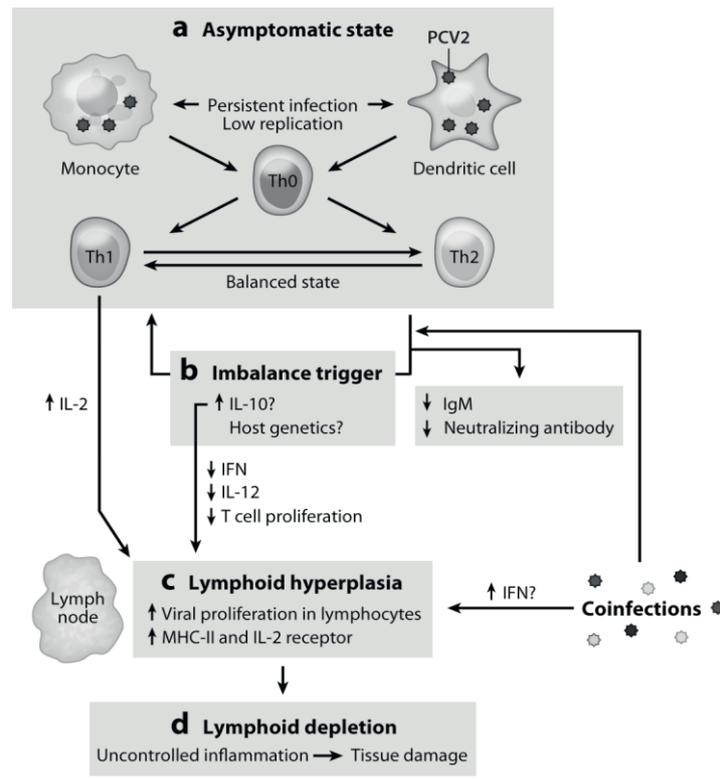


Abbildung 6: Vorgeschlagene Mechanismen der Immunpathogenese einer PCV2-Infektion bzw. einer PCV2-assoziierten Erkrankung (PCVD) nach Meng 2013. (a) Im asymptomatischen Zustand wird PCV2 von Immunzellen, wie dendritische Zellen und Monozyten internalisiert und kann im Wirt mit einer minimalen oder keiner Replikation, sowie mit einer begrenzten aber ausgeglichenen Th1 / Th2-Antwort koexistieren. (b) Das Auftreten von PCVD wird möglicherweise durch eine Störung der Zytokin-Balance, evtl. im Zusammenhang mit einem potentiellen genetischen Faktor ausgelöst. (c) Pathogenese von PCV2 in den Lymphknoten und anderen lymphatischen Organen. (d) Eine massive Entzündungsreaktion und Lymphozytendepletion führt zu Gewebeschäden und klinischen Manifestation einer PCVD.

2.3 PCV2-assoziierte Erkrankungen

PCV2 ist als infektiöses Agens an einer Vielzahl von klinischen Erkrankungen beteiligt. In Europa werden diese Krankheitsbilder seit 2002 unter dem Sammelbegriff PCVD (Porcine Circovirus Diseases; Segalés et al. 2005) bzw. im nordamerikanischen Raum seit 2006 unter PCVAD (Porcine Circovirus Associated Diseases; Opriessnig et al. 2007) zusammengefasst (Segalés 2012). Über die Jahre wurden zahlreiche Krankheitsbilder den PCV2-assoziierten Erkrankungen zugeordnet, wobei eine zum Teil verwirrende und unregelmäßig in der Literatur verwendete Terminologie entstanden ist (Segalés 2012). Allen PCV2-assoziierten

Erkrankungen gemeinsam ist der Nachweis von PCV2-DNA bzw. -Antigen in den Geweben mit pathologischen Läsionen in Kombination mit einer Lymphozytopenie und Histiozytose in den lymphatischen Geweben (Meng 2013, Pallares et al. 2002). Daher schlug Segalés (2012) basierend auf der anfänglichen Nomenklatur von Opriessnig et al. (2007) eine einheitliche Bezeichnung für die unter dem Oberbegriff PCVD geführten Krankheitsbilder vor (Tabelle 1). Als die häufigste Form einer PCV2-Manifestation beschreibt Segalés (2012) die subklinische Infektion, welche nicht in Tabelle 1 aufgeführt wird. Das porcine Dermatitis und Nephropathie Syndrom (PDNS) ist eine Immunkomplexvermittelnde Erkrankung (Segalés 2012), die durch verschiedene Antigene induziert werden kann (Drolet et al. 1999), unter anderem auch durch PCV2 (Rosell 2000a, Segalés et al. 2005, Wellenberg et al. 2004). Im Vordergrund stehen eindeutig die Immunkomplex-vermittelten und Komplement-potenzierten Nekrosen von Epithelzellen auch innerhalb der Glomerula. PDNS ist daher nicht eingebunden in den Krankheitskomplex der PCVD (Segalés, 2012).

Der kongenitale Tremor Typ A2 wurde anfangs auch zu den PCV2-assoziierten Erkrankungen gezählt (Stevenson et al. 2001). Spätere Untersuchungen zeigten jedoch keinen Zusammenhang zwischen dieser Erkrankung und einer PCV2-Infektion (Ha et al. 2005, Kennedy et al. 2003).

Tabelle 1: Nach Segalés (2012) einheitliche Terminologie der PCV2-assoziierten Erkrankungen

| Vorgeschlagene Bezeichnung laut Segalés (2012) | Ersetzte Bezeichnung |
|--|--|
| PCV2-systemische Erkrankung (PCV2-SD) | Postweaning Multisystemic Wasting Disease (PMWS); PCV2-assoziierte systemische Infektion |
| PCV2-Atemwegserkrankung (PCV2-LD) | PCV2-assoziierte respiratorische Erkrankung; Porcine Respiratory Disease Complex (PRDC); Proliferative nekrotisierende Pneumonie (PNP) |
| PCV2-Darmerkrankung (PCV2-ED) | PCV2-assoziierte Enteritis |
| PCV2-Reproduktionsstörungen (PCV2-RD) | PCV2-assoziierte Reproduktionsstörungen |

2.3.1 Subklinische PCV2-Infektion

Die wirtschaftlich größte Bedeutung wird zwar der systemischen PCVD zugesprochen (Baekbo et al. 2012). Jedoch nimmt Segalés (2012) an, dass die subklinische PCV2-Infektion eine weitaus größere wirtschaftliche Rolle innehat als bislang vermutet. Da sich die negativen Einflüsse einer subklinischen PCV2-Infektion auf die Produktionsparameter erst nach Anwendung der PCV2-Vakzinen offenbaren. Noch ist nicht vollständig geklärt unter welchen Bedingungen ein PCV2-infiziertes Tier eine subklinische Infektion oder eine klinische PCVD entwickelt (Segalés 2012).

Retrospektive serologische Studien zeigten, dass das PCV2 schon weltweit in der Schweinepopulation verbreitet war bevor die ersten klinischen Fälle in Erscheinung traten. So wiesen Jacobsen et al. (2009) erstmals PCV2-DNA in archiviertem Material eines Schweins aus Deutschland rückwirkend für das Jahr 1962 nach, während Nachweise pathologischer Läsionen einer klinischen PCV2-Infektion erst ab 1985 erfolgten (Jacobsen et al. 2009, Rodriguez-Arriola et al. 2003, Segalés 2012).

Bei einer subklinischen PCV2-Infektion sinkt die durchschnittliche tägliche Gewichtszunahme ohne offensichtliche klinische Symptome der Tiere. Makroskopisch werden keine Läsionen beschrieben. Mikroskopisch sind keine oder nur eine minimale Lymphozytendepletion mit granulomatöser Entzündung der Lymphgewebe zu beobachten. Es lassen sich nur geringe PCV2-DNA-Gehalte in lymphatischen Geweben nachweisen (Segalés 2012). Eine PCV2-Infektion beeinflusst nachteilig die Immunantwort des Wirtes (Díaz et al. 2012, Kekarainen et al. 2010). Basierend auf diesem Hintergrund bestehen verschiedene Meinungen über die Effekte einer subklinischen PCV2-Infektion auf den Erfolg von Impfungen. Nach den Ergebnissen von Opriessnig et al. (2006c) wirkte sich eine subklinische PCV2-Infektion negativ auf den Erfolg einer PRRSV-Impfung aus. Während in der experimentellen Studie von Díaz et al. (2012) keine nachteiligen Effekte auf die erfolgreiche Ausbildung einer schützenden Immunität durch eine Impfung gegen Aujeszky'sche Krankheit festgestellt wurden. In der experimentellen Studie von Young (2011) zeigte sich ein positiver Effekt einer PCV2-Impfung in Bezug auf die tägliche Gewichtszunahme, den Body Kondition Score und das endgültige Schlachtgewicht von subklinisch PCV2-infizierten Tieren.

2.3.2 PCV2-systemische Erkrankung

Das Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome (PMWS) ist die bedeutendste Erkrankung der PCVD (Baekbo et al. 2012) und das erste Krankheitsbild, welches mit einer PCV2-Infektion in Verbindung gebracht wurde (Opriessnig et al. 2007). Es wurde erstmals 1991 in einer einzigen Herde in Saskatchewan/Kanada beschrieben (Ellis et al. 1998). Bevorzugt betroffen sind Absatzferkel im Alter von acht bis sechzehn Wochen (Segalés und Domingo 2002) meist zwei bis drei Wochen nach der Einnistung zur Mast (Harding 1997). Nach einer Studie von Segalés und Cortey (2010) betrug das durchschnittliche Alter erkrankter Tiere 2,75 Monate, wobei kein Tier unter 4 Wochen erkrankte. Der Nachweis einer PMWS-Erkrankung bei einem 6 Monate sowie einem unter 4 Wochen alten Tier, wurden in der Studie als Ausnahmen angesehen (Segalés und Cortey 2010). Dennoch scheint sich das Eintrittsalter der Krankheit nach hinten verschoben zu haben. In den letzten Jahren wird PMWS vermehrt bei Tieren in einem Alter zwischen der 10. und 16. Lebenswoche diagnostiziert. Die Morbidität liegt zwischen 4 und 30 %, während sich die Mortalität in einem Bereich zwischen 4 und 20 % bewegt (Segalés und Domingo 2002). Die charakteristischen Symptome sind fortschreitender Gewichtsverlust, Atemnot, Blässe und Durchfall, seltener tritt Ikterus auf (Ellis J. et al. 1998, Harding 1997, Opriessnig et al. 2007, Segalés und Domingo 2002, Rosell 1999).

Makroskopische Hinweise auf PMWS sind in der frühen Phase der systemischen Erkrankung vergrößerte, oberflächige Lymphknoten. Insbesondere die Inguinal-, Submandibulären-, Mediastinalen- und Mesenteriallymphknoten sind betroffen (Rosell 1999). Im fortgeschrittenen Stadium finden sich dagegen normal große oder atrophische Lymphknoten (Segalés et al. 2004) sowie ein atrophierter Thymus (Darwich et al. 2003a). Die Lungen sind vergrößert, nicht kollabiert und gummiartig verfestigt (Rosell 1999). Bei gleichzeitiger bakterieller Infektion weisen die Lungen zusätzlich eine marmorierte Oberfläche (kranio-ventrale Bronchopneumonie) auf und in der Pars oesophagea des Magens können Ulzerationen auftreten (Segalés et al. 2004). Nach Segalés et al. (2000) könnten innere Blutungen infolge der Magenulzerationen für die Todesfälle und die Hautblässe verantwortlich sein, jedoch konnte Darwich et al. (2003b) in zahlreichen PMWS-Fällen eine Anämie ohne Magenulzerationen nachweisen. Tiere mit Ikterus zeigten eine gelblich-orange gefärbte Leber (Rosell et al. 2000). In anderen Fällen war die Leber entweder vergrößert oder atrophisch, blass mit einer feingranulierten Oberfläche (Segalés et al. 2004). Die Nierenrinde kann Veränderungen in Form

von multiplen blassen Herden aufzeigen (Segalés et al. 2004) und auch im Gehirn können sich Läsionen aufgrund einer Vaskulitis finden (Correa et al. 2007, Seeliger et al. 2007).

Für die Diagnose PMWS sind die makroskopischen Läsionen zu unspezifisch (Segalés et al. 2004). Nahezu eindeutig für das Vorliegen einer PMWS-Erkrankung ist dagegen der Nachweis von histopathologischen Läsionen in lymphatischem Gewebe. Es handelt sich dabei um einen variablen Grad an Lymphozytendepletion mit Verlust der folliculären Struktur. In Kombination mit einer multifokalen bis diffusen, gering bis hochgradige Infiltration von Histiocyten und/oder mehrkernigen Riesenzellen. Auch der Nachweis von scharf begrenzten, sphärischen, basophilen PCV2-Einschlusskörperchen im Zytoplasma der histiozytären Zellen ist ein spezifischer Hinweis auf eine PMWS-Erkrankung (Rosell 1999, Segalés 1997, Segalés und Domingo 2002).

In den nicht-kollabierten Lungen ist histopathologisch am häufigsten eine subakute, interstitielle Pneumonie zu beobachten. In einigen Fällen ist es möglich, große Histiocyten und vielkernigen Riesenzellen in den verdickten interalveolären Wänden und/oder innerhalb der Alveolen nachzuweisen. In chronischen Fällen kann eine Bronchiolitis fibrosa obliterans vorhanden sein (Segalés et al. 2004). Einige Tiere weisen zudem eine schwere subakute bis chronisch interstitielle Nephritis auf (Segalés et al. 2004). Die Veränderungen in der Leber reichen von einer lymphohistozytären entzündlichen Infiltration der Portalzonen bis zu massiven Veränderungen in Form einer generalisierten, perilobulären Fibrose mit Strukturverlust der Leberplatten und Untergang der Leberzellen. In dieser Phase der Erkrankung zeigen die Tiere einen Ikterus (Segalés et al. 2004). Eine Vier-Phasen-Klassifikation der Leberläsionen von PMWS erkrankten Tieren haben Rosell et al. (2000) basierend auf der Intensität und der Verteilung der Veränderungen entwickelt.

Die endgültige Feststellung einer PMWS-Erkrankung eines Tieres bzw. einer Herde erfolgt erst durch das Zusammenspiel von drei definierten Kriterien: (a) Das Vorliegen von passenden klinischen Symptomen, sowie (b) von charakteristischen histopathologischen Läsionen in lymphatischen Geweben und (c) der Nachweis von PCV2-Antigen oder -DNA innerhalb der mikroskopischen Läsionen (Sorden 2000). Denn weder die makroskopischen noch die mikroskopischen Läsionen stehen solitär für eine PMWS-Erkrankung.

2.3.3 PCV2-Atemwegserkrankung

Segalés (2012) fasste mit dem Oberbegriff PCV2-bedingte Atemwegserkrankung eine weitere bedeutende klinische Manifestation der PCV2-assoziierten Erkrankungen zusammen (Tabelle 1). So kann eine PCVD als Teil des Porcine Respiratory Disease Complex (PRDC) auftreten (Opriessnig et al. 2007). Bei diesem Krankheitsbild handelt es sich um einen Atemwegsinfekt unter der Beteiligung von zahlreichen bakteriellen und viralen Erregern. Vorrangig zeigen Tiere im Alter von sechzehn bis zweiundzwanzig Wochen (Chae 2005, Kim et al. 2003), respektive acht bis sechsundzwanzig Wochen (Opriessnig et al. 2007), die charakteristischen Symptome von verlangsamtem Wachstum, verminderte Futterverwertung, Lethargie, Appetitlosigkeit, Fieber sowie Husten und Atemnot (Kim et al. 2003, Chae 2005). Die dominierend, isolierten Begleiterregern sind das Porcine-Reproductive-and-Respiratory-Syndrom-Virus (PRRSV), das Swine-Influenza-Virus (SIV) sowie die Bakterien *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Actinobacillus pleuropneumoniae* und *Pastareulla multocida* (Chae 2005, Kim et al. 2003). Der konsequente Nachweis von PCV2 in Fällen von PRDC bei gleichzeitiger geringer Prävalenz der anderen bakteriellen und viralen Erreger führte zur Annahme, dass PCV2 eine entscheidende Rolle im PRDC einnimmt (Chae 2005, Kim et al. 2003). Hierbei interagiert das PCV2 mit verschiedenen respiratorischen Pathogenen, bevorzugt mit dem PRRS-Virus (Chae 2005). Schon Allan et al. (2000) und Harms et al. (2001) vermuteten einen Synergismus zwischen diesen beiden Viren. Da eine Koinfektion von PRRSV und PCV2 die respiratorischen Symptome und pulmonalen Läsionen verstärkte (Harms et al. 2001).

Mikroskopisch ist eine lymphohistiozytäre bis granulomatöse, bronchointerstitiale Pneumonie mit peribronchialer und peribronchioläre Fibrose in der Lamina propria des Atmungstraktes zu beobachten (Kim et al. 2003, Opriessnig et al. 2007, Segalés et al. 2004). Wobei die Alveolarsepten durch Infiltration von Makrophagen und in geringerer Anzahl von Lymphozyten und Plasmazellen verdickt erscheinen. Des Weiteren sind die Alveolarsepten mit hypertrophen Typ 2 Pneumozyten ausgekleidet und die Alveolarräume mit nekrotischem Zellmaterial verlegt (milde bis schwere nekrotisierend-ulzerative Bronchiolitis). Zudem lassen sich PCV2-Partikel in den interstitialen Makrophagen nachweisen (Kim et al. 2003).

Die Symptome von PMWS und PRDC gleichen bzw. überschneiden sich stark, wodurch sich eine Differenzierung der Krankheitsbilder schwierig gestaltet. Für die Diagnose PRDC müssen daher folgende vier Kriterien erfüllt sein: (1) charakteristische respiratorische Symptome, vor

allem eine lange andauernde, antibiotikaresistente Dyspnoe, (2) charakteristische mikroskopische Läsionen im Lungengewebe, (3) Nachweis von PCV2-Partikeln innerhalb der Läsionen und (4) das Fehlen von charakteristischen PMWS-bedingten Läsionen in lymphatischen Geweben (Chae 2005, Segalés 2012). Das Vorhandensein einzelner Kriterien ist nicht ausreichend für die Diagnose PRDC. Das heißt, werden PRDC-charakteristische mikroskopische Läsionen im Lungengewebe, sowie charakteristische PMWS-assoziierte Läsionen in lymphatischen Geweben nachgewiesen, lautet die Diagnose: PMWS (Chae 2005, Segalés 2012). Die klinischen Symptome einer PCV2-bedingten PRDC sind jedoch zu unspezifisch und zu variable. Daher gilt als diagnostisches Hauptkriterium der Nachweis von PCV2-DNA bzw. -Antigen mittels in-situ-Hybridisierung oder Immunohistochemie (Kim et al. 2003) bei gleichzeitigem Nachweis einer bronchointerstitialen Pneumonie, einschließlich peribronchialer und peribroncholärer Fibrose (Chae 2005).

2.3.4 PCV2-Darmerkrankung

Eine weitere mögliche Manifestation der PCVD und manchmal sogar die einzige in einem Betrieb ist Durchfall (Opriessnig et al. 2011a). Die Fälle einer PCV2-bedingten Darmerkrankung sind selten (Kim 2004) nehmen jedoch an Bedeutung zu (Opriessnig et al. 2007). Bevorzugt betroffen sind Tiere im Alter von acht bis sechzehn Wochen (Opriessnig et al. 2007), respektive fünf bis zehn Wochen (Chae 2005). Initial wird gelblicher, mit fortschreitender Erkrankung schwarzer Durchfall beschrieben, der auf keine Antibiotikatherapie anspricht (Chae 2005). Die klinischen Symptome ähneln stark einer durch *Lawsonia intracellularis* verursachten subakuten bis chronischen Ileitis (Jensen et al. 2006). Es wurde sowohl von Enteritiden mit alleiniger PCV2-Infektion (Jensen et al. 2006, Opriessnig et al. 2011a) als auch von Koinfektion mit anderen intestinalen Pathogenen berichtet (Jensen et al. 2006, Kim 2004, Nunez et al. 2003, Opriessnig et al. 2011a, Segalés et al. 2001). In der Studie von Kim (2004) führte die Kombination aus PCV2- und *Salmonella typhimurium*-Infektion zu schwereren und länger anhaltenden Durchfällen. Während in der experimentellen Studie von Opriessnig et al. (2011a) keine signifikanten Unterschiede im Schweregrad der mikroskopischen Läsionen oder in der Höhe an PCV2-Antigen bei Koinfektion von PCV2 und Salmonellen bzw. Lawsonien nachgewiesen wurden.

Makroskopisch zeigt sich eine katarralische Enteritis mit oder ohne mesenterialen Ödemen, eine Verdickung der intestinalen Mukosa des gesamten Darmtraktes und eine Vergrößerung

der Mesenteriallymphknoten (Kim 2004, Opriessnig et al. 2007, Segalés et al. 2004, Segalés 2012). Histopathologisch wird eine granulomatöse Entzündung mit Histiozytose und Lymphozytendepletion der Peyerschen Platten im Dünn- und Dickdarm beschrieben (Kim 2004, Segalés et al. 2004). Hierbei finden sich PCV2-positive Zellen in der Submukosa, der Lamina propria, dem Kryptenepithel und dem lymphatischen Gewebe (Jensen et al. 2006). Als weitere für das Krankheitsbild typische Beobachtung werden intrazytoplasmatische Einschlusskörperchen angeführt. Diese werden hauptsächlich in Histiozyten und mehrkernigen Riesenzelle in Form von großen, multiplen, basophilen oder amphophilen, traubenartigen, intrazytoplasmatischen Einschlüssen aufgefunden (Chae 2005, Jensen et al. 2006, Kim 2004). In den histopathologischen Veränderungen lassen sich moderate bis hohe Mengen an PCV2-Antigen nachweisen (Opriessnig et al. 2007, Segalés 2012).

Da sich auch die PCV2-bedingte Darmerkrankung klinisch schwer von anderen intestinalen Erkrankungen sowie der systemischen PCV2-Infektion differenzieren lässt, generierte Kim (2004) drei Diagnosekriterien. Demnach liegt eine PCV2-bedingte Darmerkrankung vor, wenn 1) Durchfall vorliegt, 2) charakteristische Läsionen in den Peyerschen Platten vorhanden sind, jedoch nicht in anderen Lymphknoten und 3) PCV2-DNA oder -Antigen in den Läsionen nachweisbar ist. Auch hier gilt, für die Diagnose PCV2-Darmerkrankung müssen alle drei Kriterien gemeinsam erfüllt sein (Kim 2004). Sobald lymphatische Läsionen in anderen Gewebe nachweisbar sind, handelt es sich um eine systemische PCV2-Infektion (Segalés 2012).

2.3.5 PCV2-Reproduktionsstörungen

Seit den ersten Berichten über PCV2-bedingte Reproduktionsstörungen in Kanada (O'Connor et al. 2001, West et al. 1999) und Dänemark (Ladekjaer-Mikkelsen et al. 2001) gewann dieses Krankheitsbild immer mehr an Bedeutung (Opriessnig et al. 2007, Segalés et al. 2005). Es betrifft vorrangig neu zusammengestellte Gruppen mit hohem Jungsauenanteil oder PCV2-seronegative Herden (Opriessnig et al. 2007, Segalés 2012). Unterdessen sind PCV2-assoziierte Reproduktionsstörungen im Feld selten zu beobachten (Pensaert 2004). Die Ursache hierfür vermuten Segalés et al. (2005, 2012) in der hohen PCV2-Seroprävalenz der adulten Schweine, die zu einer PCV2-Immunität der Zuchtherden führt und diese nicht anfällig für die Erkrankung werden lässt.

Das klinische Erscheinungsbild umfasst eine gesteigerte Rate an Aborten, Totgeburten und fötaler Mumifikation in der mittleren bis späten Trächtigkeitsphase (Brunborg et al. 2007, Kim et al. 2004, Ladekjaer-Mikkelsen et al. 2001, Madson et al. 2009a, O'Connor et al. 2001, West et al. 1999) sowie erhöhte Saugferkelverluste (Opriessnig et al. 2007, Segalés 2012). Während in der experimentellen Studie von Sanchez et al. (2001) die fötale, intramuskuläre Inokulation von PCV2 am 57., 75. und 92. Trächtigkeitstag nur bei Föten des 57. Trächtigkeitstages pathologische Veränderungen (Ödeme, Hepatomegalie und Leberstauung) induzierte, beschrieben Johnson et al. (2002) PCV2-bedingte Reproduktionsstörungen auch bei Föten in der späten Trächtigkeitsphase. In dieser experimentellen Studie führte die fötale, intramuskuläre Inokulation von PCV2 am 86., 92. und 93. Trächtigkeitstag zu Totgeburten, Mumien und zu früh geborenen Ferkeln gleichzeitig mit klinisch normalen Ferkeln (Johnson et al. 2002). Laut Mateusen et al. (2004) sind Schweineembryonen besonders anfällig für eine PCV2-Infektion, wobei ihre Anfälligkeit mit ihrem Entwicklungsstatus steigt. So zeigte sich bei einem kleinen Teil der Embryonen keine negativen Auswirkungen auf die embryonale Entwicklung, wenn die PCV2-Exposition vor dem 21. Trächtigkeitstag lag (Mateusen et al. 2007). Das fötale Herz ist scheinbar der primäre Ort der PCV2-Replikation, da Sanchez et al. (2001) in den Kardiomyozyten die höchsten PCV2-Titer und -Antigengehalte nachwiesen. Makroskopisch zeigten die mumifizierten bzw. ödematösen Föten eine Lebervergrößerung und -stauung, kardiale Hypertrophie mit multifokalen Bereichen myokardialer Verfärbung (O'Connor et al. 2001, Segalés et al. 2005, West et al. 1999) sowie Aszites, Hydrothorax und Hydroperikard (Segalés 2012). Als charakteristische, histopathologische Läsion dieser Erkrankung wird eine nicht-eitrige bis nekrotisierende bzw. fibrinöse Myokarditis mit diffus moderater Infiltration von Lymphozyten und Makrophagen beschrieben (Mikami et al. 2005, O'Connor et al. 2001, West et al. 1999). Des Weiteren waren eine chronische, passive Stauungsleber sowie eine milde Pneumonie mit Infiltration von mononukleären Zellen in die Alveolarräume zu beobachten (Kim et al. 2004, O'Connor et al. 2001, Segalés 2012, West et al. 1999).

Die Diagnose der PCV2-Reproduktionsstörung basiert laut Segalés et al. (2005) unter Berücksichtigung der klinischen Symptome und pathologischen Läsionen auf drei Kriterien: 1) Aborte und Totgeburten in der späten Trächtigkeitsphase, mit offensichtlicher Hypertrophie des fetalen Herzens, 2) charakteristische Läsionen im Herzen, wie eine extensive fibrinöse und/oder nekrotisierende Myokarditis und 3) hohe PCV2-Gehalte in den myokardialen Läsionen und anderen fetalen Geweben.

2.3.6 Porzines Dermatitis und Nephropathie Syndrom (PDNS)

Beim porzinen Dermatitis und Nephropathie Syndrom handelt es sich um eine Immunkomplex-medierte systemische Vaskulitis mit ausgeprägtem Tropismus zur Haut und den Nieren, die Schweine aller Altersklassen betrifft (Drolet et al. 1999). Zahlreichen infektiösen Erregern wird eine potentiell wichtige Rolle in der Ätiologie von PDNS zugesprochen. Typisch für eine Immunkomplex-vermittelte Erkrankung kann kein spezifischer Erreger als alleiniges oder primäres kausales Agens erwartet werden (Drolet 1999). Grundsätzlich können alle Antigene, die aufgrund ungleicher Verteilung zwischen Antigen und Antikörper zu Immunkomplexen führen, PDNS auslösen. Das gilt insbesondere für PCV2 (Rosell 2000; Wellenberg et al., 2004), PRRSV (Choi und Chae 2001, Drolet et al. 1999, Segalés et al. 1998, Thibault et al. 1998), *Streptococcus* ssp. (Drolet et al. 1999) und *Pasteurella multocida* (Lainson et al. 2002, Thomson et al. 2001). Die Erkrankung kann auch durch Lipopolysaccharide (LPS) gram-negativer Bakterien entstehen (Duran 1997, Drolet et al. 1999) sowie durch eine Vielzahl an Faktoren, wie Medikamenten, Chemikalien, Futtermittelallergenen und endogene Antigene (Drolet et al. 1999).

Das Krankheitsbild betrifft Schweine aller Altersklassen (Drolet et al. 1999), wobei die Mortalität bis zu 100 % bei über drei Monate alten Tieren und bis zu 50 % bei jüngeren Tieren betragen kann (Segalés et al. 1998). Charakteristische Symptome des Porzinen Dermatitis und Nephropathie Syndrom sind akut auftretende, erhabene Hautläsionen, die sich vorrangig an den Hinterbeinen und der Perianalregion bilden gelegentlich auch generalisiert über das gesamte Tier verteilen. Die Veränderungen beginnen als solitäre, rot-lila gefärbte, Makula bzw. Papeln und gehen zu multifokalen rot-lila schorfigen Herden mit schwarzen Krusten über (Drolet et al. 1999, Opriessnig et al. 2007). Nach zwei bis drei Wochen verblassen die Hautläsionen allmählich und hinterlassen manchmal Narben (Drolet et al. 1999). Des Weiteren wurden ventrokaudale Unterhautödeme, Blässe, Dyspnoe oder Tachypnoe, fortschreitender Gewichtsverlust, Anorexie und Lethargie sowie kein oder nur geringes Fieber beschrieben (Drolet et al. 1999, Opriessnig et al. 2007, Rosell 2000, Wellenberg et al. 2004). Bei schweren Krankheitsverläufen starben die Tiere innerhalb weniger Tage nach dem Auftreten erster Symptome. Überlebende Tiere neigten jedoch etwa sieben bis zehn Tage nach Beginn der Erkrankung wieder an Gewicht zuzulegen (Segalés et al. 1998).

Typische makroskopische Veränderungen sind bilateral vergrößerte, blasse, wachsartige Nieren mit petechialen Blutungen in der Rinde und Ödeme im Nierenbecken (Opriessnig et al. 2007, Segalés et al. 2004). Des Weiteren finden sich Infarkte in der Milz und auch die

Lymphknoten können vergrößert und rötlich verfärbt sein (Segalés et al. 1998). Hierbei stellen sich die lymphatischen Läsionen mikroskopisch ähnlich zu PMWS-bedingten lymphatischen Veränderungen dar (Rosell 2000). Generell zeigen sich mikroskopisch eine systemische Vaskulitis mit dermaler und epidermaler Nekrose sowie eine nekrotisierende und fibrinöse Glomerulonephritis. Diese Veränderungen deuten auf eine Überempfindlichkeitsreaktion Typ 3 hin, hervorgerufen durch Ablagerungen von Antigen-Antikörper-Aggregaten oder Immunkomplexe in den betroffenen Geweben (Opriessnig et al. 2007).

Die Diagnose PDNS basiert nicht auf dem Nachweis von PCV2-DNA oder –Antigen, sondern auf zwei Hauptkriterien: 1) das Vorhandensein von hämorrhagischen und nekrotisierenden Hautveränderungen, vorrangig an den Hinterläufen und der Perianalregion, sowie geschwollene und blasse Nieren mit generalisierten kortikalen Petechien. 2) das Vorhandensein einer systemisch nekrotisierenden Vaskulitis und einer nekrotisierenden, fibrinösen Glomerulonephritis (Segalés und Domingo 2002).

2.4 PCV2-Immunisierung

Neben der Verbesserung des Hygienemanagements und der Eindämmung von möglichen Koinfektionen (Kixmöller et al. 2008, Segalés et al. 2009, Madec 1999) ist die PCV2-Impfung eine weitere effektive prophylaktische Maßnahme zur Kontrolle der PCVD (Andraud et al. 2009, Beach und Meng 2012). Momentan stehen auf dem internationalen Markt fünf PCV2-Vakzinen zur Verfügung (Circovac, Merial; CircoFLEX, Boehringer Ingelheim; Circumvent und Porcilis PCV, MSD; Suvaxyn PCV bzw. Foster PCV, Zoetis; Chae 2012). Circumvent und Porcilis PCV sind verschiedene Präparate derselben Vakzine, wobei Circumvent in Nordamerika und Porcilis PCV in Europa erhältlich ist. 2008 wurde in Kanada ein chimäres PCV1/2-Isolat aus Gewebeproben akut an PRRSV-erkrankter, PCV2-geimpfter Schweine isoliert (Gagnon et al. 2010). Um zu überprüfen, ob dieses Isolat möglicherweise vom Suvaxyn-Impfstamm abstammt, nahm Zoetis die Vakzine vorübergehend vom Markt. 2011 wurde eine Neuformulierung der Vakzine unter dem neuen Markennamen Foster PCV für Nordamerika und unter dem bereits bekannten Markennamen Suvaxyn PCV für Europa wieder eingeführt (Chae 2012, Fraile et al. 2012b).

2.4.1 In Deutschland zugelassene kommerzielle PCV2-Vakzinen

In Deutschland sind drei Ferkelimpfstoffe (CircoFLEX, Porcilis PCV, Suvaxyn PCV) sowie ein für Muttertiere und für Ferkel anwendbarer Impfstoff (Circovac) zur PCV2-Immunsierung zugelassen (Tabelle 2) Es handelt sich bei allen vier Impfstoffen um inaktivierte Vakzinen (Totimpfstoffe), d.h. der Impfvirus ist nicht in der Lage Zellen zu infizieren und sich zu replizieren. Die Impfstoffe basieren alle auf dem PCV2-Genotyp PCV2a (Beach und Meng 2012), unterscheiden sich jedoch anhand des zugrundeliegenden aktiven Partikels, des Adjuvant, der Impfdosis, des Impfzeitpunktes, sowie in Beginn und Dauer der induzierten Immunität. So verhelfen sie zu einer gezielten Anpassung an die individuelle, betriebliche Situation.

Tabelle 2: In Deutschland zugelassene Impfstoffe zur PCV2-Immunsierung (Stand der Bundesanzeiger-Veröffentlichung Nr. 398 vom 08.07.2014)

| Impfstoff | Ingelvac CircoFlex | Porcilis PCV | Suvaxyn PCV | Circovac |
|-------------------------|----------------------|--|---|--|
| aktiver Partikel | PCV2 ORF2-Protein | PCV2 ORF2-Protein | Inaktiviertes, rekombinantes PCV1/2-Virus | Inaktiviertes PCV2 |
| Adjuvans | Carbomer | D,L- α -Tocopherolacetat, dünnflüssiges Paraffin | Sulfolipo-Cyclodextrin, Squalan | Dünnflüssiges Paraffin |
| Impfdosis | 1 ml | 2 ml | 2 ml | 2 ml (Sauen), 0,5 ml (Ferkel) |
| Zugelassene Zieltierart | Ferkel | Ferkel | Ferkel | Ferkel, (Jung)Sauen |
| Impfzeitpunkt | ab 14. LT | a) ab 21. LT b) 1.Inj. 3.LT 2.Inj. 2-3 Wochen später | ab 21. LT | ab 21.LT |
| Beginn Immunität | 2 Wochen p. Inj. | 2 Wochen p. Inj. | 3 Wochen p. Inj. | Ferkel (aktiv): 2 Wochen p. Inj. |
| Dauer Immunität | mind. 17 Wochen | 22 Wochen | 19 Wochen | Ferkel (passiv): bis zu 5 Wochen ¹ Ferkel (aktiv): mind. 14 Wochen |
| EU Zulassung | 02/2008 | 01/2009 | 07/2009 | 2007 (Sau) 2010 (Ferkel) |
| Firma | Boehringer Ingelheim | MSD | Zoetis | Merial |

¹nach Kolostrum Aufnahme; LT = Lebenstag; ml = Milliliter; mind. = mindestens; p.Inj.= post Injection;

a) One-Shot b) Two-Shot

2.4.2 Vakzination der Muttertiere

Die PCV2-Vakzine der Firma Merial (Circovac) beruht auf einem inaktivierten, kompletten PCV2-Isolat und war anfänglich 2007 nur als Muttertiervakzine zugelassen bis 2010 auch die Zulassung als Ferkelimpfstoff erfolgte. Die Impfdosis reduzierte sich dabei von 2 ml (Jungsauen, Sauen) auf 0,5 ml (Ferkel) (Fraile et al. 2012a). Es entstand im Vergleich zu den anderen Vakzinen (Ferkel Impfdosis 1 ml, CircoFlex bzw. 2 ml Porcillis PCV und Suvaxyn PCV, Tabelle 2) ein wirtschaftlicher Vorteil, da mit derselben Impfstoffmenge eine größere Anzahl an Ferkeln immunisiert werden kann. Entscheidend ist jedoch, in welcher Produktionsphase Probleme mit PCVD auftreten. Im Falle von Reproduktionsstörungen und/oder hohen Saugferkelverlusten empfiehlt sich der Einsatz als Muttertiervakzine. Liegen die Probleme in einer späteren Produktionsphase empfiehlt sich die Anwendung als Ferkelvakzine.

Im Rahmen der passiven Immunisierung werden die Muttertiere vor dem Abferkeln geimpft und die Ferkel über die Aufnahme von impfinduzierten, maternalen IgG-Antikörpern durch das Kolostrum passiv immunisiert und mindesten fünf Wochen lang geschützt. Im Falle der Grundimmunisierung erhalten die Jungsauen eine Injektion gefolgt von einer zweiten Injektion 3 bis 4 Wochen später, mindestens 2 Wochen vor dem Belegen. Eine weitere Injektion wird mindestens 2 Wochen vor dem Abferkeln verabreicht. Die Sauen erhalten eine Injektion gefolgt von einer zweiten Injektion 3 bis 4 Wochen später, mindestens 2 Wochen vor dem Abferkeln. Als Wiederholungsimpfung erfolgt eine Injektion während jeder Trächtigkeit mindestens 2 bis 4 Wochen vor dem Abferkeln (Herstellerangaben). Zu den Vorteilen der passiven Immunisierung zählen der ab dem ersten Lebenstag wirkende Impfschutz der Ferkel sowie die positiven Auswirkungen auf die Fruchtbarkeitsleistung der geimpften Sauen. So zeigen geimpfte Sauen im Vergleich zu nicht-geimpften Muttertieren mehr lebendgeborene und abgesetzte Ferkel pro Wurf sowie höhere Absetzgewichte der Ferkel sowohl bei einer akuten systemischen PCV2-Infektion (Pejsak et al. 2010) als auch bei einer subklinischen PCV2-Infektion (Fraile et al. 2012b, Kurmann et al. 2011). Nachteile der passiven Immunisierung ergeben sich aus der Wirkungsweise des Verfahrens. So ist die optimale Effektivität der Impfung limitiert über die ausreichende Kolostrumaufnahme der Ferkel in den ersten 24 Stunden sowie der Halbwertszeit der passiv erworbenen Antikörper (Opriessnig et al. 2010) und den daraus resultierenden, zeitlich begrenzten Impfschutz der Ferkel (McKeown et al. 2005, Opriessnig et al. 2008b).

Durch die gleichzeitige Zulassung als Sauen- und Ferkelvakzine ermöglicht der Circovac-Impfstoff eine Kombination von aktiver und passiver Immunisierung. Hierbei erfolgt die Ferkelimpfung als einmalige Injektion ab einem Alter von 3 Wochen. Mit der Frage, ob sich die simultane Anwendung derselben Vakzine bei Muttertier und Nachkommen auf die Impfeffektivität auswirkt, setzten sich Fraile et al. (2012b), Opriessnig et al. (2010) und Pejsak et al. (2010) auseinander. In der experimentellen Studie von Opriessnig et al. (2010) zeigten sich keine negativen Auswirkungen auf die Impfeffektivität durch eine kombinierte Anwendung ein und desselben Impfstoffes bei Muttertier und Nachkommen. Pejsak et al. (2010) untersuchte die Wirksamkeit verschiedener PCV2-Impfprotokolle (solitäre Muttertier- oder Ferkelimpfung sowie kombinierte Impfung) in einem Betrieb mit akutem PMWS-Ausbruch. Unter allen drei Protokollen verbesserten sich die Produktionsparameter, jedoch die höchsten täglichen Gewichtszunahmen erreichte die Gruppe der kombinierten Impfung. Unabhängig des maternalen Antikörpertiters zum Zeitpunkt der Impfung wies Fraile (2012b) eine signifikante Steigerung der täglichen Gewichtszunahme und eine signifikante Reduzierung des Prozentsatzes an PCV2-infizierten Tieren nach. Jedoch zeigten die Ferkel eine spätere Serokonversion im Vergleich zu Ferkeln nicht-geimpfter Sauen (Fraile 2012b).

Die Auswirkungen der Anwesenheit von maternalen Antikörpern zum Zeitpunkt der Ferkelimpfung auf die Ausbildung einer schützenden Immunität werden kontrovers diskutiert. In den Studien von Fachinger et al. (2008) und Kekarainen et al. (2010) führte die Gegenwart maternaler Antikörper bei PCV2-Impfung der Ferkel zu keiner Beeinträchtigung der aktiven Immunisierung. Dagegen berichteten Fort et al. (2009), Fraile et al. (2012a, 2012b) und Martelli et al. (2011) von einer Störung bei der Entwicklung einer aktiven humoralen Abwehr nach PCV2-Impfung durch die maternale Antikörper. Erfolgt eine aktive Immunisierung während der Refraktärzeit wird keine oder nur eine unzureichende Immunität ausgebildet, da die Impfantigene von den maternalen Antikörpern neutralisiert werden. Eine Ferkelimpfung sollte daher erst nach dem 21. Lebenstag erfolgen.

2.4.3 Vakzination der Ferkel

Ziel der aktiven Immunisierung der Ferkel ist der Aufbau einer langanhaltenden Immunität gegen PCV2, möglichst bis zum Ende der Mast. Hierzu stehen derzeit in Deutschland neben Circovac (s.o.) drei weitere unterschiedliche Vakzinen zur Verfügung. Die Vakzine Suvaxyn PCV der Firma Zoetis basiert auf der inaktivierten Form des chimären PCV1/2-Isolats (Fenaux et al. 2004a, Opriessnig et al. 2007). Durch Klonierung des pathogenen PCV2-ORF2-Gens in

das Virusgenom des apathogenen PCV1 wird das rekombinante Isolat erstellt. Das ORF2-Gen des PCV1 wird hierbei durch das immunogene PCV2-ORF2-Gen ersetzt. Eine Attenuierung des PCV1/2-Klons erfolgte nach Infektion von SPF-Schweinen in denen eine humorale Immunantwort gegen das immunogene ORF2-Kapsidprotein hervorgerufen wird (Fenaux et al. 2003, 2004a).

Die Ferkelimpfstoffe der Firmen Boehringer Ingelheim (Ingelvac CircoFLEX) und MSD (Porcilis PCV) basieren auf einer Untereinheit des PCV2-Kapsidproteins (Tabelle 2). Es verfügt über immunogene Bereiche (siehe 2.1.5.2; Mahe et al. 2000) und ist dadurch in der Lage eine schützende Immunantwort zu induzieren (Blanchard et al. 2003). Die Herstellung der immunogenen ORF2-Untereinheit erfolgt in einem Baculovirus-Expressionssystem (Chae 2012). Hierbei wird das ORF2-Protein mithilfe eines Plasmidvektors in das Genom eines Baculovirus integriert und Zellen einer Insektenzelllinie aus den Ovarien von *Spodoptera frugiperda* (Nachtfalter, Familie Eulenfalter) mit diesem rekombinanten Virusgenom infiziert. Im Anschluss an die erfolgreiche Synthese der immunogenen ORF2-Untereinheit erfolgt die Reinigung und Inaktivierung des rekombinanten Proteins (Chae 2012), welches sich morphologisch nicht vom ursprünglichen PCV2-Partikel unterscheidet (Fort et al. 2008). Die Vakzine Ingelvac CircoFLEX (Boehringer Ingelheim) ist mit dem Impfstoff Ingelvac MycoFLEX (ebenfalls Boehringer Ingelheim) mischbar. So können die Ferkel in einem Arbeitsschritt sowohl gegen PCV2 als auch gegen *Mycoplasma hyopneumoniae* immunisiert werden. Bei Anwendung der Impfmischung ist zu beachten, dass sich der Impfzeitpunkt um eine Woche später auf die 3. Lebenswoche verschiebt und sich die Impfdosis auf 2 ml pro Tier erhöht (Tabelle 2).

Während die Vakzinen CircoFlex und Suvaxyn als einmalige Injektion (sogenannter One-Shot) bei Ferkeln ab einem Alter von 2 Wochen (CircoFlex), respektive 3 Wochen (Suvaxyn) zugelassen sind, kann die Vakzine Porcilis PCV (MSD) als einmalige Injektion (One Shot) oder als zweimalige Injektion (sogenannter Two-Shot) eingesetzt werden. Um das passende Impfschema anzuwenden, ist laut Hersteller der maternale PCV2-Antikörperspiegel im Serum zu berücksichtigen und gegebenenfalls durch entsprechende diagnostische Maßnahmen zu bestimmen. Bei einem niedrigen bis mittleren maternalen PCV2-Antikörpertiter wird eine einmalige Injektion von 2 ml Impfstoff bei Tieren ab einem Alter von drei Wochen empfohlen. Liegt ein hoher maternaler PCV2-Antikörpertiter vor wird eine zweimalige Injektion von 2 ml

Impfstoff empfohlen. Hierbei erfolgt die erste Injektion ab einem Alter von drei bis fünf Tagen gefolgt von einer zweiten Injektion etwa drei bis vier Wochen später (Tabelle 2).

Die vier in Deutschland erhältlichen Vakzinen (Tabelle 2) decken über ihre Variationen in Beginn und Dauer der induzierten Immunität unterschiedliche Produktionszeiträume ab. Die Wahl der geeigneten Vakzine richtet sich daher nach der individuellen betrieblichen Situation. Der Impfstoff Circovac bietet im Rahmen der passiven Immunisierung einen Schutz der Ferkel von der Geburt bis etwa zur fünften Lebenswoche. Bei aktiver Immunisierung kann die Impfung ab der zweiten Lebenswoche (CircoFLEX, Boehringer Ingelheim) bzw. ab der dritten Lebenswoche (Circovac, Merial; Suvaxyn, Zoetis und Porcilis PCV, MSD) erfolgen. Die Tiere verfügen über eine Immunität von der fünften bis mindestens zur 17. Lebenswoche (Circovac), respektive von der vierten bis mindestens zur 19. Lebenswoche (CircoFLEX). Bei Anwendung der Vakzine Suvaxyn weisen die Tiere eine Immunität von der sechsten bis etwa 22. Lebenswoche auf und bei Verwendung von Porcilis PCV ab der fünften bis etwa zur 25. Lebenswoche. Demnach ist der Impfstoff Circovac (Merial) nicht nur für Ferkelerzeuger mit Saugferkelverlusten interessant sondern auch für Betriebe, die unter einem hohen Erregerdruck und einer frühen Infektion der Ferkel leiden. Die Impfstoffe der Firmen Boehringer Ingelheim, Zoetis und MSD sind für Betriebe mit PCV2-bedingten Probleme in Aufzucht und Mast geeignet, wobei sich insbesondere die Vakzinen Porcilis PCV und Suvaxyn aufgrund ihrer relativ langen Immunität für Betriebe mit Problemen in der späten Mastphase anbieten.

2.4.4 Effektivität der kommerziellen PCV2-Vakzinen

Die Wirksamkeit der kommerziell erhältlichen Impfstoffe wurde in zahlreichen Studien belegt. Sie bewirken eine Reduktion der Mortalität, der lymphatischen Läsionen sowie der klinischen Symptome insbesondere der Gewichtsabnahme und des Kümmerens der Tiere infolge einer PCV2-Infektion (Beach und Meng 2012, Fachinger et al. 2008, Fraile et al. 2012a, Horlen et al. 2008, Kixmüller et al. 2008, Kim et al. 2011, Lyoo et al. 2011, Martelli et al. 2011, Opriessnig et al. 2008a, Opriessnig et al. 2009b, Pejsak et al. 2010, Segalés et al. 2009). Des Weiteren verringert eine PCV2-Impfung die Virämie, sowie die Viruslast im Blut und den lymphatischen Geweben (Fachinger et al. 2008, Fort et al. 2008, 2009, Fraile et al. 2012a, Hemann et al. 2012, Kixmüller et al. 2008, Lyoo et al. 2011, Martelli et al. 2011, Opriessnig et al. 2009b, 2010, Segalés et al. 2009, Shen et al. 2010). Gleichfalls wurde nicht nur die Ausscheidung von infektiösen PCV2-Partikeln über das Nasensekret und die Fäzes reduziert

(Fort et al. 2008) sondern auch die Dauer der Virusausscheidung über den Samen verkürzt (Opriessnig et al. 2011b, Seo et al. 2011). Auch zeigten PCV2-geimpfte Tiere im Vergleich zu unbehandelten Tieren eine höhere Widerstandsfähigkeit gegenüber Koinfektionen (Kixmüller et al. 2008). So beeinträchtigte selbst eine akute PRRSV-Infektion zum Zeitpunkt der PCV2-Impfung nicht deren Wirksamkeit (Sinha et al. 2010). Eine PCV2-Impfung senkt scheinbar auch die PCV2-bedingte Umweltbelastung eines Betriebes (Blunt et al. 2011). So konnten Blunt et al. (2011) in PCVD-betroffenen Betrieben PCV2-Partikel in Hausfliegen nachweisen. Im darauffolgend Jahr nach Einführung von PCV2-Impfprogrammen jedoch nicht mehr.

Opriessnig et al. (2009b) verglichen in einer Challenge-Studie die ein- bzw. zweimalige Anwendung der Vakzinen Suvaxyn PCV, Circumvent (= Porcilis PCV) und CircoFLEX auf mögliche Unterschiede in der Ausbildung einer stabilen Immunität. Die Virämie reduzierte sich um 78,5 % bei einmaliger Injektion und um 97,1 % bei zweimaliger Injektion. Auch die mikroskopischen lymphatischen Läsionen wurden um 78,7 % respektive 81,8 % im Vergleich zur nicht-geimpften positiven Kontrollgruppe reduziert. In der Studie wird der Impfstoff Suvaxyn PCV auch als zweimalige Injektion angewendet. Es zeigten sich jedoch keine signifikanten Unterschiede in der Effektivität der Vakzine bei ein- bzw. zweimaligen Verabreichung. So erzeugte Suvaxyn PCV im Vergleich zu den anderen Vakzinen in beiden Gruppen die höchsten Titer an neutralisierenden Antikörper (Opriessnig et al. 2009b). Es ergaben sich auch keine signifikanten Unterschiede in der Impfwirksamkeit aus einer intradermalen oder intramuskulären Impfstoffapplikation (Opriessnig et al. 2008a). Seo et al. (2013) überprüfte die Effektivität der Impfstoffe Suvaxyn PCV, CircoFLEX und Circovac auf die Höhe der Virusmenge im Samen und Serum sowie der Dauer der Virusausscheidung über den Samen. Alle drei Impfprotokolle reduzierten signifikant die Viruslast im Samen und Serum der Tiere, jedoch zeigten sich signifikante Unterschiede in der Dauer der Virusausscheidung. Mit Suvaxyn PCV-geimpfte Eber wiesen im Vergleich zu den CircoFLEX-geimpften Tieren eine signifikant geringere Viruslast am 21. Tag nach Infektion mit einem PCV2b-Isolat auf. Auch zeigten die Suvaxyn PCV-geimpften Eber am 28. Tag nach PCV2-Infektion eine signifikant geringere Viruslast im Vergleich zu den Circovac- und den CircoFLEX-geimpften Tiere.

3 Material und Methoden

3.1 Untersuchungsmaterial

3.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterial

Geldokumentationssystem: Bio Doc Analyze, Whatman Biometra, Göttingen

Thermocycler: T-Gradient und T-Personal, Whatman Biometra, Göttingen

Photometer: Ultrospec 1100 pro, Amersham Biosciences Freiburg (zur Messung der Primerkonzentrationen) und Nano Drop 1000, NanoDrop Technologies Inc., Wilmington, USA (zur Messung genomischer DNA)

Pipetten: Biohit GmbH, Rosbach v. d. Höhe und Roth, Karlsruhe

Mikrotiterplatte: SuperPlate 96-well PCR Plate Semi-Skirted, Thermo Scientific, St-Leon-Rot

Klebefolien: Adhesive PCR Foil Seals, Biozym, Hessisch Oldendorf

Reaktionsgefäße (0,2 ml; 0,5 ml; 1,5 ml; 2,0 ml): Roth, Karlsruhe

Pipettenspitzen: Roth, Karlsruhe

3.1.2 Chemikalien und Kits

Agarose NEE0, Roth, Karlsruhe

EDTA, Roth, Karlsruhe

Essigsäure, Roth, Karlsruhe

Ethidiumbromid, Roth, Karlsruhe

Midori Green Advance, Biozym, Hessisch Oldendorf

Primer, Biomers GmbH, Ulm

Tris, Roth, Karlsruhe

Multiplex Mastermix Kit, Quiagen GmbH, Hilden

3.1.3 Lösungen und Puffer

| | |
|---------------------------------|--|
| 1 x TE-Puffer: | 10 mM Tris 1 mM EDTA |
| 50 x TAE-Elektrophorese Puffer: | 2 M Tris 1 M Essigsäure 50 mM EDTA |
| Einwaage für 1000 ml: | 42,28 g Tris 60,05 g Essigsäure 18,61 g EDTA ad 1000 ml mit VE-Wasser |
| 10x Auftragspuffer: | 0,3 % Orange G 25 % Saccharose |
| Einwaage für 10 ml: | 0,03 g Orange G 2,5 g Saccharose ad 10 ml mit aq. bidest. |

3.1.4 Verwendete Software und Internetadressen

3.1.4.1 National Center for Biotechnology Information (NCBI) und BLAST

Die PCV2-Sequenzen zur Entwicklung der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Primer sowie die PCV2-Referenzsequenzen für die PCV2-Genotypen stammen aus der Datenbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Mithilfe des zur Datenbank gehörenden Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) wurden die PCV2-Sequenzen aus der vorliegenden Arbeit mit allen in der Datenbank verfügbaren kompletten Genomsequenzen verglichen.

3.1.4.2 OLIGO

Mithilfe der OLIGO Primer Analyse Software (Version 4.0, Copyright 1989-1991 by Wojciech Rychlik) wurden die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Primer erstellt.

3.1.4.3 ApE - A plasmid Editor

Mit der frei erhältlichen Software von Wayne Davis (University of Utah, Version 1.17; <http://biologylabs.utah.edu/jorgensen/wayned/ape/>) wurden die sequenzierten Amplifikate der PCV2-Genomabschnitte A und B in Form ihrer Chromatogramme eingelesen, überprüft und gegebenenfalls editiert. Über ein nachfolgendes Alignment der Genomabschnitte A und B wurden die Sequenzen anhand ihrer überlappenden Bereiche zu einer PCV2-Komplettsequenz zusammengefügt.

3.1.4.4 ClustalX

Das frei erhältliche Programm ClustalX (Version 2.0, Conway Institute UCD, Dublin, www.clustal.org) wurde zum Vergleich der mit ApE zusammengeführten PCV2-Genomsequenzen eingesetzt, um Insertionen, Deletionen und Polymorphismen zu verifizieren.

3.1.4.5 BioEdit - Sequence Alignment Editor

Das Programm BioEdit (Version 7.0.5.3, Tom Hall) dient wie ClustalX dem Vergleich von Sequenzen verfügt jedoch über eine größere Anzahl an Bearbeitungstools. Es wurde zur genauen Lokalisation von Polymorphismen im PCV2-Genom bzw. in der Aminosäuresequenz eingesetzt.

3.1.4.6 SPSS

Für die statistische Auswertung der Daten wurde die IBM Software SPSS (Version 20, IBM München) verwendet.

3.1.5 Probenmaterial

Im Rahmen des Schweinegesundheitsdienstes der Klinik für Wiederkäuer und Schweine, Professur für Schweinekrankheiten der Justus-Liebig-Universität Gießen, wurden im Zeitraum 2008 bis Ende 2014 PCV2-positive Proben aus verschiedenen Betrieben gesammelt. Für diese Arbeit wurde anhand der beim Bestandsbesuch erstellten Anamnesebögen eine Vorauswahl in die Gruppen „geimpft“ und „nicht-geimpft“ getroffen. Insgesamt wurden 156 PCV2-positive Proben aus 79 PCV2-positiven Betrieben aus dem Zeitraum 2008 bis 2012 in die Untersuchung einbezogen (Tabelle 3). Die Anzahl der Proben pro Betrieb schwankte von einer bis maximal acht Probe(n). Die einzelnen Probenmaterialien sind in Tabelle 4 aufgeführt.

Tabelle 3: Verteilung der untersuchten PCV2-positiven Proben aus PCV2-positiven Betrieben im Zeitraum 2008 bis 2012

| Jahr | Anzahl der untersuchten PCV2-positive Proben | Anzahl der PCV2-positiven Betriebe |
|--------|--|------------------------------------|
| 2008 | 16 | 12 |
| 2009 | 83 | 29 |
| 2010 | 12 | 10 |
| 2011 | 12 | 7 |
| 2012 | 33 | 21 |
| Gesamt | 156 | 79 |

Tabelle 4: Verteilung der PCV2-positiven Proben auf die verschiedenen Probenmaterialien

| Probenmaterial | Anzahl der untersuchten PCV2-positive Proben | Prozentualer Anteil der PCV2-positiven Proben |
|------------------|--|---|
| Organpool | 8 | 5,13 |
| Vollblut | 8 | 5,13 |
| Tupfer | 1 | 0,64 |
| Lunge | 62 | 39,74 |
| Serum | 55 | 35,26 |
| BAL ¹ | 18 | 11,54 |
| Plazenta | 1 | 0,64 |
| Ileocaecalklappe | 3 | 1,92 |
| Gesamt | 156 | 100 |

¹Bronchoalveoläre Lavage

3.2 Untersuchungsmethoden

3.2.1 Probenvorbereitung

Die Extraktion, Quantifizierung und Einlagerung der viralen DNA aus dem Probenmaterial wurde bereits im Rahmen der Diagnostik des Schweinegesundheitsdienstes der Klinik für Wiederkäuer und Schweine, Professur für Schweinekrankheiten der Justus-Liebig-Universität Gießen durchgeführt. Die Bestimmung der Virusmenge erfolgte mittels quantitativer PCR (qPCR) auf einem 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Die PCV2-Konzentration wurde als log₁₀ PCV2-Genome/μg extrahierte DNA angegeben. Die qPCR-Primer, die Zusammensetzung des PCR-Ansatzes und das angewendete PCR-Programm sind aus Tabelle 5, Tabelle 6 und Tabelle 7 ersichtlich.

Tabelle 5: Für die PCV2 qPCR verwendeten Primer nach Olvera et. al (2004)

| Primer | Sequenz (5'-3') | PCV2 Genom- Position (nt) | Größe (Bp) |
|--------|--|------------------------------------|------------|
| PCV2 F | CCA GGA GGG CGT TGT GAC T | 1535–1553 | |
| PCV2 R | CGC TAC CGT TGG AGA AGG AA | 1633–1614 | 98 |
| PCV2 S | 6-Fam-AAT GGC ATC TTC AAC ACC CGC CTC T-Tamra | 1589–1609 | |

Tabelle 6: PCR-Ansatz für die quantitative PCR (qPCR)

| Reagenzien | Volumen (μl) |
|--------------------------------------|--------------|
| 2x Absolute Blue QPCR Low ROX Mix | 12,5 |
| Primermix (PCV2F/PCV2R f.c.* 1,8 μM) | 9 |
| PCV2 S (f.c.* 0,2 μM) | 1 |
| Matrizen-DNA | 2,5 |
| Gesamtvolumen pro PCR-Cup | 25 |

*f.c. final concentration (Endkonzentration)

Tabelle 7: qPCR-Programm zur Quantifizierung der PCV2-Belastung

| Schritt | Temperatur °C | Dauer | Anzahl Zyklen |
|---|---------------|--------|---------------|
| Initiale Aktivierung der Polymerase und Denaturierung | 95 | 15 min | |
| Denaturierung | 94 | 30 sec | 40x |
| Annealing und Extension | 60 | 1 min | |
| Pause | 4 | ∞ | |

3.2.2 Amplifikation des gesamten PCV2-Genom mittels PCR

3.2.2.1 Primer

Das PCV2-Genom wurde in zwei Abschnitten A (824 Bp) und B (1173 Bp) amplifiziert. Die verwendeten Primer (Tabelle 8) wurden anhand von zwei bekannten PCV2-Genomsequenzen (GenBank Accession Number AY-191947 und FJ-905467) aus der NCBI Datenbank erstellt. Die Optimierung der Primer hinsichtlich Dimer- und Schleifenbildung, sowie die Ermittlung der zu erwartenden Amplifikatgröße und der voraussichtlichen optimalen Annealingtemperatur erfolgte mithilfe des Programmes OLIGO 4.0. Laut Herstellerangaben wurden die als Lyophilisate gelieferten Primer in dem angegebenen Volumen mit 1 x TE-Puffer gelöst und anschließend ihre Konzentration photometrisch bestimmt. Hierzu wurden 5 µl der jeweiligen Primerlösung mit 395 µl 1 x TE-Puffer verdünnt und die Extinktion der Lösung bei 260 nm und 320 nm photometrisch gemessen. Abschließend erfolgte die Konzentrationsbestimmung der Primerlösung anhand folgender Formel:

$$c = \frac{E}{((15200 * \#A) + (7500 * \#C) + (12010 * \#G) + (840 * \#T)) * d} * VF$$

c = Konzentration der Primerlösung in µmol/l (µM)

E = korrigierter Extinktionswert ($E_{260nm} - E_{320nm}$)

#X = Nukleotid Anzahl im jeweiligen Primer

d = Schichtdicke der Küvette (hier d = 1cm)

VF = Verdünnungsfaktor (hier VF = 80)

Unter Verwendung von 1 x TE-Puffer wurde aus den einzelnen Primer-Originallösungen eine 20 µM Primermix-Stammlösung aus Vorwärts- und Rückwärtsprimer angesetzt. Diese wurden zur Amplifikation der Genomabschnitte mit 1 x TE-Puffer auf eine 4 µM Gebrauchslösung verdünnt. Alle Primerlösungen wurden bei -20°C gelagert.

Tabelle 8: Für die Amplifikation der PCV2-Genomabschnitte A und B verwendeten PCR und Nested-PCR Primer

| PCV2 Genom Abschnitt | Primer | Sequenz (5'-3') | PCV2 Genom- Position (nt)* | Größe (Bp) |
|----------------------------|----------------------|---|-------------------------------------|---------------|
| A | PCV2AF | GCAGCACCTCGGCAGCACCTC | 21 - 41 | |
| | PCV2ANR | GAGGAGTACCATTCCAACGGGGTCTG | 844 - 819 | 824 |
| | PCV2ANF ³ | CGGCAGCACCTCAGCAGCAAC | 30 - 50 | |
| | PCV2AR ³ | TTCCAACGGGGTCTGATTGCTGG | 833 - 811 | 804 |
| B | PCV2BF | TGGTK ¹ GTTATTGATGACTTTTATGG | 682 - 706 | |
| | PCV2BR | GTTGGGGTCCGCTTCTTC | 87 - 70 | 1174 |
| | PCV2BNF ³ | CCS ¹ TGGGATGATCTACTGAGACT | 714 - 736 | |
| | PCV2BNR ³ | GGGTCCGCTTCTTCCATTC | 83 - 65 | 1137 |

¹K = G/T; ²S = G/C; ³Primer für Nested-PCR

*Positionsangaben laut NCBI GenBank Eintrag Accession number AF055394 (PCV2b-Referenzsequenz)

3.2.2.2 Polymerase-Kettenreaktion

Die Annealing-Temperatur der jeweiligen Primerpaare wurde optimiert. Beim PCV2-Genomabschnitt A erwies sich für das Primerpaar PCVAF/PCV2ANR (Tabelle 10) eine Temperatur von 62°C und für das Primerpaar PCV2ANF/PCV2AR (Tabelle 12) eine Temperatur von 64°C als optimal. Beim PCV2-Genomabschnitt B (Tabelle 15) betrug die optimale Annealing-Temperatur für beide Primerpaare (PCV2BF/PCV2BR und PCV2BNF/PCV2BNR) 61°C.

Für den PCV2-Genomabschnitt A wurde immer eine Nested-PCR durchgeführt (Tabelle 9 und Tabelle 11), da die amplifizierte DNA-Menge sonst nicht für eine anschließende Sequenzierung ausreichte. Für den Abschnitt B wurde eine Nested-PCR (Tabelle 14) nur bei Proben durchgeführt, die sich nach der ersten PCR in der Gelelektrophorese-Auswertung als negativ

darstellten. Die PCR-Ansätze sind in Tabelle 9, Tabelle 11, Tabelle 13 und Tabelle 14, die PCR-Programme in Tabelle 10, Tabelle 12 und Tabelle 15 aufgeführt.

Tabelle 9: PCR-Ansatz für die erste PCR des PCV2-Genomabschnittes A

| Reagenzien | Menge (μl) |
|-----------------------------------|-------------------------|
| 2x Multiplex Mastermix | 5 |
| Primermix | 1 |
| PCV2AF/PCV2ANR (4 μM) | 3 |
| RNase-freies Wasser | 1 |
| Extrahierte DNA | 1 |
| Gesamtvolumen pro PCR-Cup | 10 |

Tabelle 10: PCR-Programm für die Amplifikation des PCV2-Genomabschnitt A (erste PCR)

| Schritt | Temperatur $^{\circ}\text{C}$ | Zeit | Zyklusanzahl |
|---|-------------------------------|--------------|--------------|
| Denaturierung und initiale Aktivierung der Polymerase | 95 | 15 min | 1x |
| Denaturierung | 95 | 30 sec | 20x |
| Annealing | 62 | 1 min 30 sec | |
| Elongation | 72 | 1 min | |
| Finale Elongation | 72 | 10 min | 1x |
| Pause | 4 | ∞ | |

Tabelle 11: PCR-Ansatz für die Nested-PCR des PCV2-Genomabschnitts A

| Reagenzien | Menge (μl) |
|---|-------------------------|
| 2x Multiplex Mastermix | 15 |
| Primermix | 3 |
| PCV2ANF/PCV2AR (4 μM) | 9 |
| RNase-freies Wasser | 3 |
| PCR-Produkt aus der ersten PCR (Tabelle 9 und Tabelle 10) | 3 |
| Gesamtvolumen pro PCR Cup | 30 |

Tabelle 12: PCR-Programm für die Amplifikation des PCV2-Genomabschnittes A (Nested-PCR)

| Schritt | Temperatur °C | Zeit | Zyklusanzahl |
|---|---------------|--------------|--------------|
| Denaturierung und initiale Aktivierung der Polymerase | 95 | 15 min | 1x |
| Denaturierung | 95 | 30 sec | 35x |
| Annealing | 64 | 1 min 30 sec | |
| Elongation | 72 | 1 min | |
| Finale Elongation | 72 | 10 min | 1x |
| Pause | 4 | ∞ | |

Tabelle 13: PCR-Ansatz für die erste PCR des PCV2-Genomabschnittes B

| Reagenzien | Menge (µl) |
|---------------------------|------------|
| 2x Multiplex Mastermix | 15 |
| Primermix | 3 |
| PCV2BF/PCV2BR (4 µM) | 9 |
| RNase-freies Wasser | 3 |
| Extrahierte DNA | 3 |
| Gesamtvolumen pro PCR-Cup | 30 |

Tabelle 14: PCR-Ansatz für die Nested-PCR des PCV2-Genomabschnittes B

| Reagenzien | Menge (µl) |
|--|------------|
| 2x Multiplex Mastermix | 15 |
| Primermix | 3 |
| PCV2BNF/PCV2BNR (4 µM) | 9 |
| RNase-freies Wasser | 3 |
| PCR-Produkt aus der ersten PCR (Tabelle 13 und Tabelle 15) | 3 |
| Gesamtvolumen pro PCR-Cup | 30 |

Tabelle 15: PCR-Programm der ersten und der Nested-PCR des PCV2-Genomabschnittes B

| Schritt | Temperatur °C | Zeit | Zyklusanzahl |
|---|---------------|--------------|--------------|
| Denaturierung und initiale Aktivierung der Polymerase | 95 | 15 min | 1x |
| Denaturierung | 95 | 30 sec | 35x |
| Annealing | 61 | 1 min 30 sec | |
| Elongation | 72 | 1 min | |
| Finale Elongation | 72 | 10 min | 1x |
| Pause | 4 | ∞ | |

3.2.3 Agarose-Gelelektrophorese

Auf einer Terasaki-Platte wurde entsprechend der Anzahl an PCR-Proben jeweils 1 µl Auftragspuffer vorgelegt. Anschließend wurden 4 µl des jeweiligen PCR-Produkts zugegeben und durch Auf- und Abziehen in der Pipette miteinander vermischt. Die PCR-Produkte wurden elektrophoretisch auf einem 1,5%igen Agarosegel mit Midori Green Advance (0,4 µg/ml) als DNA-Farbstoff aufgetrennt. Dazu wurde das Gel in der Elektrophorese-Kammer mit 1 x TAE-Laufpuffer überschichtet und je 4 µl der mit Auftragspuffer vermischten PCR-Probe in die Taschen des Geles pipettiert. Die Elektrophorese wurde bei 120 V für 20 min durchgeführt. Abschließend wurde die DNA in einer Geldokumentationskammer unter UV-Licht (365 nm) sichtbar gemacht, digital aufgenommen und das Gelbild in einen Rechner übertragen und ausgewertet.

3.2.4 Auswertung der PCR-Ergebnisse

Eine Probe galt als positiv und für die Sequenzierung verwendbar, wenn sich eine deutliche Bande auf einheitlicher Höhe darstellen ließ. Als negativ galt eine Probe, wenn keine oder nur eine undeutliche Bande zu erkennen war. Handelte es sich hierbei um eine Probe von PCV2-Genomabschnitt A, wurde die PCR wiederholt. Waren es Proben von PCV2-Genomabschnitt B, wurde eine Nested-PCR durchgeführt. Auf den Einsatz einer Positiv- und einer Negativkontrolle wurde verzichtet, da die Proben im Rahmen der Diagnostik auf PCV2 voruntersucht waren und nur PCV2-positive Proben in die vorliegende Arbeit einbezogen wurden. Bis zur anschließenden Sequenzierung wurden die PCR-Produkte bei -20°C gelagert.

3.2.5 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung der PCR-Produkte führte die Firma LGC Genomics, Berlin durch. Dazu wurden jeweils 15 µl PCR-Produkt in eine 96er-Mikrotiterplatte pipettiert und in eine korrespondierende Mikrotiterplatte 15 µl Sequenzierungsprimer mit einer Konzentration von 5 µM. Als Sequenzierungsprimer diente für den Abschnitt A PCV2ANR (Tabelle 8). Bei Abschnitt B war die Wahl des Sequenzierungsprimer abhängig davon, ob eine Nested-PCR durchgeführt wurde. War dies der Fall diente PCV2BNF als Sequenzierungsprimer, ansonsten PCV2BF (Tabelle 8).

3.2.6 Auswertung der DNA-Sequenzen

Die Chromatogramme der PCV2-Sequenzen der Abschnitte A und B wurden mithilfe des Programmes ApE analysiert und gegebenenfalls editiert. Beide Abschnitte wurden über die sich überlappenden Bereiche zu einer vollständigen PCV2-Genomsequenz zusammengefügt. Die Auswertung und Genotypisierung der Sequenzen erfolgte mithilfe der Programme BioEdit und ClustalX. Für die Zuordnung der Sequenzen zu den PCV2-Genotypen wurden die Referenzsequenzen (PCV2a, Acc.No. AF055392; PCV2b, Acc.No. AF055394 und PCV2c, Acc.No.EU148503; Segalés et al. 2008, Cortey et al. 2011b, Triple und Rowland 2012) aus der Genbank verwendet.

3.2.7 Statistische Auswertung

Die statistische Analyse wurde mit dem Programm IBM-SPSS Version 20 (IBM, München) durchgeführt. Eine allgemeine Betrachtung der Daten erfolgte mit der „Deskriptiven Analyse“. Häufigkeiten von Faktoren und Genvarianten mit möglicher Assoziation zu Impfstatus und Virusmenge wurden mit Kreuztabellen dargestellt und verglichen. Mögliche Bedeutungen der verschiedenen Verteilungen wurden mit dem Chi-Quadrat-Test geprüft. Bei Zellen mit weniger als 5 Fällen wurde der exakte Test nach Fischer angewendet.

Unterschiede der gemittelten Viruslasten wurden mit Hilfe der einfaktoriellen Varianzanalyse („Oneway“ ANOVA) ermittelt. Vor der Berechnung mit ANOVA wurden die Viruslasten logarithmiert um eine Normalverteilung zu erhalten. Mögliche Effekte einzelner Genvarianten wurden mittels einfaktorieller Varianzanalyse („Oneway“ ANOVA) berechnet. Als statistische Signifikanzgrenze wurde ein p-Wert von $\leq 0,05$ festgelegt. Unter Berücksichtigung von Mehrfachtests wurden nur SNPs in die Analysen mit einbezogen, wenn sie 1) zu

Aminosäureaustausch führten, 2) die Häufigkeit der seltenen Allele höher als 2 war und 3) die Korrelation zwischen verschiedenen SNPs unter 0,8 lag. Eine Bonferroni-Korrektur wurde für die restlichen 16 SNPs (ORF1 und ORF2) und 12 SNPs (nur ORF2) angewendet. Das Signifikanzniveau (0,05) wurde jeweils auf 0,0084 (ORF1 und ORF2) und 0,0063 (nur ORF2) reduziert.

4 Ergebnisse

Trotz nachgewiesener Effektivität der seit 2007 auf dem Markt befindlichen PCV2-Impfstoffe, wurden in den letzten Jahren vereinzelt PCVD-Fällen in PCV2-geimpften Beständen beschrieben. Im Rahmen der vorgelegten Arbeit wurde die These potentieller Veränderungen in der PCV2-Genomsequenz infolge der flächendeckenden Impfmaßnahmen mit möglicher Assoziation zu PCV2-Genotyp, Impfstatus und Virusmenge nachfolgend anhand von Proben aus geimpften und nicht-geimpften Betrieben aus Deutschland überprüft.

Die Höhe der PCV2-Belastung der einzelnen Proben wurde bereits im Rahmen der Diagnostik des Schweinegesundheitsdienstes (SGD) der Klinik für Wiederkäuer und Schweine, Professur für Schweinekrankheiten der Justus-Liebig-Universität Gießen ermittelt (Abschnitt 3.2.1). Die weitere Auswertung der Virusmenge erfolgte im Rahmen der vorgelegten Dissertation.

Zunächst wurden die vom Schweinegesundheitsdienst gesammelten Proben aus 237 geimpften und nicht-geimpften Betrieben verwendet, um zeitliche Veränderungen der PCV2-Belastung innerhalb der Betriebe zwischen 2008 und 2014 darzustellen. Anschließend wurden die PCV2-positiven Proben auf mögliche Veränderungen in der PCV2-Genomsequenz mit potentieller Assoziation zu PCV2-Genotyp, Impfstatus und Virusmenge ausgewertet.

4.1 Proben und Betriebe

Die Analysen basieren auf einer Ausgangsmenge von 237 Betrieben, mit $8,5 \pm 2,3$ Betrieben pro Quartal. Aus diesen Betrieben stammen insgesamt 2156 Proben von individuellen Schweinen mit 80 ± 63 Proben pro Quartal. Nach erfolgreicher Einführung der PCV2-Impfung im Jahr 2008 lässt sich eine kontinuierliche Abnahme der Virusmenge ab 2009, sowohl bei Proben aus geimpften als auch aus nicht-geimpften Betrieben beobachten (Abbildung 7). Im Zeitraum erstes Quartal 2010 bis drittes Quartal 2011 blieben die Virusmengen der Betriebe, insbesondere der geimpften Bestände, meist unterhalb der Nachweisgrenze (Werte in der Abb.7 und Abb.8 als 0 dargestellt). Ab dem dritten Quartal 2011 stammten die Proben vorrangig aus PCV2-geimpften Betrieben. Zeitgleich lässt sich ein langsamer jedoch stetiger Anstieg der Virusmengen aus Proben geimpfter Betriebe darstellen. Aus Abbildung 8 geht hervor, dass innerhalb dieser Betriebe regelmäßig Virusmengen über dem klinisch relevanten Niveau von 10^5 bis 10^6 PCV2 DNA-Kopien/ μg Total-DNA erreicht wurden.

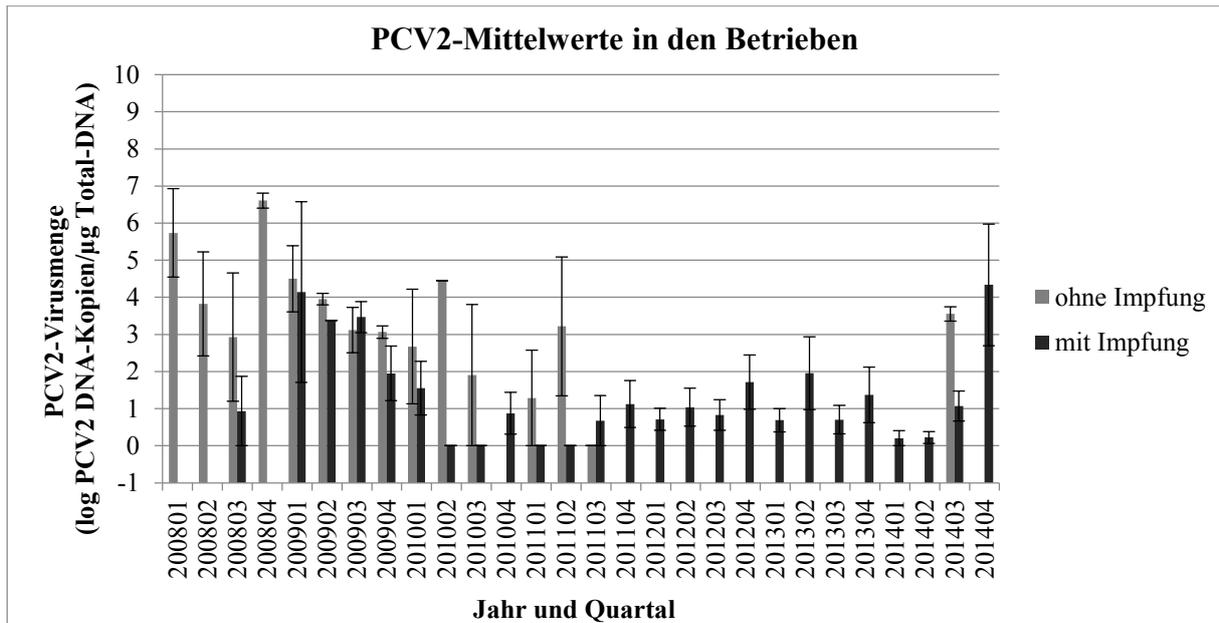


Abbildung 7: Mittelwerte der PCV2-Virusmenge (logPCV2 DNA-Kopien/μg Total-DNA mit Angabe des Standardfehlers) in Proben von Schweinen aus Betrieben mit Historie respiratorischer Störungen. Dargestellt über den Zeitraum erstes Quartal 2008 (200801) bis viertes Quartal 2014 (201404). Die y-Achse schneidet die x-Achse bei -1, um einen sichtbaren Unterschied zwischen Fällen mit einer Virusmenge unterhalb der Nachweisgrenze (0) und Fällen, in denen keine Proben vorhanden waren (kein Balken), zu liefern.

Tabelle 16: Ergänzung zur Abbildung 7 und Abbildung 8 mit zugrundeliegender Anzahl der beprobten Betriebe (n) jeden Quartals im Zeitraum 2008 bis 2014 unter Angabe des Impfstatus

| Jahr | Quartal | Anzahl (n) Betriebe | |
|------|---------|---------------------|---------|
| | | nicht-geimpft | geimpft |
| 2008 | 1 | 6 | |
| | 2 | 4 | |
| | 3 | 3 | 3 |
| | 4 | 2 | |
| 2009 | 1 | 8 | 3 |
| | 2 | 4 | 1 |
| | 3 | 11 | 4 |
| | 4 | 3 | 6 |
| 2010 | 1 | 4 | 6 |
| | 2 | 1 | 2 |
| | 3 | 2 | 2 |
| | 4 | | 6 |
| 2011 | 1 | 4 | 7 |
| | 2 | 4 | 2 |
| | 3 | 1 | 5 |
| | 4 | | 8 |

| Jahr | Quartal | Anzahl (n) Betriebe | |
|--------|---------|---------------------|---------|
| | | nicht-geimpft | geimpft |
| 2012 | 1 | | 21 |
| | 2 | | 16 |
| | 3 | | 11 |
| | 4 | | 10 |
| 2013 | 1 | | 16 |
| | 2 | | 6 |
| | 3 | | 9 |
| | 4 | | 7 |
| 2014 | 1 | | 7 |
| | 2 | | 11 |
| | 3 | 3 | 6 |
| | 4 | | 2 |
| Gesamt | | 60 | 177 |

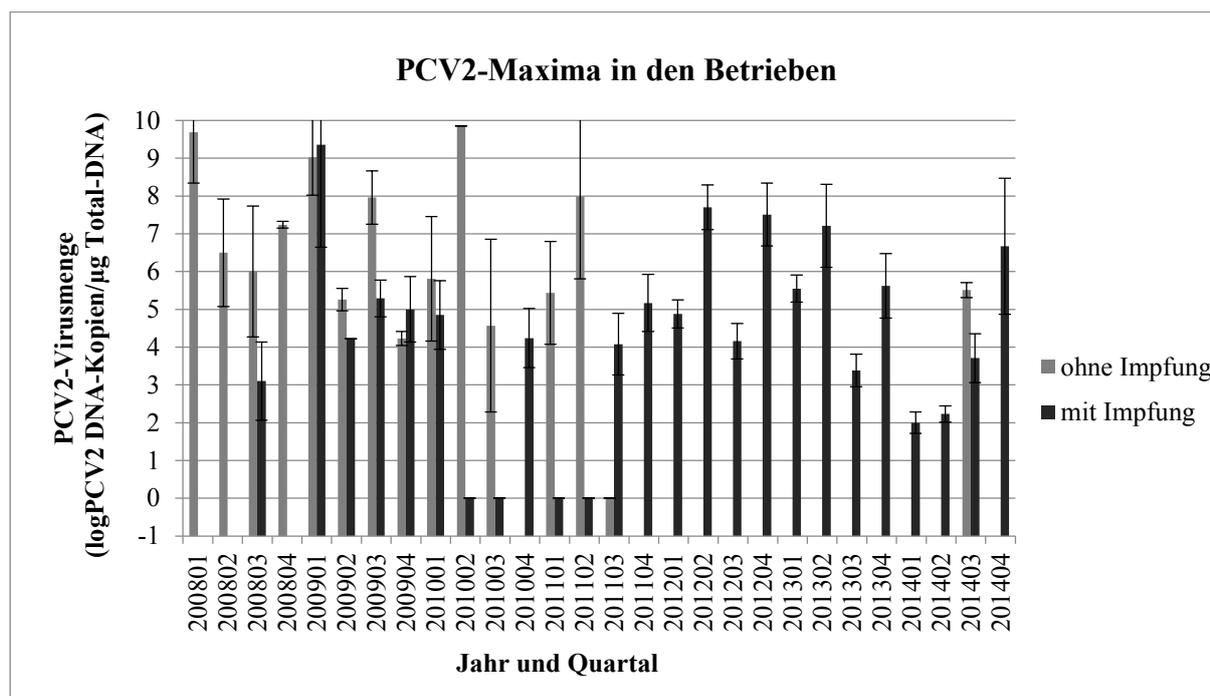


Abbildung 8: Maximale Virusmenge (logPCV2 DNA-Kopien/μg Total-DNA mit Angabe des Standardfehlers) individueller Proben pro Betrieb. Dargestellt über den Zeitraum erstes Quartal 2008 (200801) bis viertes Quartal 2014 (201404). Die y-Achse schneidet die x-Achse bei -1, um einen sichtbaren Unterschied zwischen Fällen mit einer Virusmenge unterhalb der Nachweisgrenze (-1 bis 0) und Fällen, in denen keine Proben vorhanden waren (kein Balken), zu liefern.

4.2 PCV2-Sequenzen

Von den insgesamt in die Untersuchung einbezogenen 156 PCV2-positiven Proben konnten nach erfolgreicher Amplifikation mittels PCR 91 PCV2-positive Proben zur Sequenzierung an LGC Genomics (Berlin) geschickt werden (Tabelle 17). Es wurden 62 komplette PCV2-Genomsequenzen aus den Proben von 54 verschiedenen PCV2-positiven Betrieben generiert. Hierbei stammten 26 Proben aus geimpften Betriebe und 28 Proben aus nicht-geimpften Betrieben (Tabelle 18).

Tabelle 17: Verteilung der untersuchten PCV2-positiven Proben (n=156) über den Zeitraum 2008 bis 2012 mit Angaben des Sequenzierungsstatus

| Jahr | untersuchte PCV2-positive Proben ¹ | ingesandte PCV2-positive Proben ² | generierte PCV2-Sequenzen |
|--------|---|--|---------------------------|
| 2008 | 16 | 16 | 12 |
| 2009 | 83 | 35 | 22 |
| 2010 | 12 | 8 | 5 |
| 2011 | 12 | 9 | 8 |
| 2012 | 33 | 23 | 15 |
| Gesamt | 156 | 91 | 62 |

¹Proben bereits im Rahmen der Diagnostik des SGD als PCV2-positiv identifiziert

²ingesandt = Proben zur Sequenzierung an LGC Genomics (Berlin) weitergeleitet

Tabelle 18: Verteilung der 62 generierten kompletten PCV2-Sequenzen aus Proben von geimpften und nicht-geimpften Betrieben

| Jahr | PCV2 Sequenzen | Betriebe | | |
|------|-------------------|----------|-------------------|---------|
| | | Gesamt | nicht- geimpft | geimpft |
| 2008 | 12 | 10 | 8 | 2 |
| 2009 | 22 | 18 | 12 | 6 |
| 2010 | 5 | 5 | 3 | 2 |
| 2011 | 8 | 7 | 2 | 5 |
| 2012 | 15 | 14 | 3 | 11 |
| | 62 | 54 | 28 | 26 |

Mehrheitlich wiesen die untersuchten 62 PCV2-Sequenzen eine Genomlänge von 1767 (69,3 %) und 1768 Basen (16,1 %) auf (Abbildung 9). Es wurden auch vier Sequenzen mit 1766 (6,5 %), weitere vier Sequenzen mit 1769 (6,5 %) und eine Sequenz mit 1770 (1,6 %) Basen isoliert. Die Unterschiede in der Genomlänge der einzelnen PCV2-Isolate sind in der intergenischen Region lokalisiert. Zwei der vier PCV2-Isolate mit einer Genomlänge von 1766 Basen wiesen eine Deletion an Position 1004 auf (g.1004delT Tabelle 36), während die anderen zwei PCV2-Isolate an Position 999 nt des Genoms eine Deletion aufwiesen (g.999delT, Tabelle 36). Drei der vier PCV2-Isolate mit einer Genomlänge von 1769 Basen beinhalteten eine Insertion an Genomposition 996 nt (g.996_997insAG, Tabelle 31). Während das vierte PCV2-Isolat an Genomposition 1041 nt (g.1041-1042insT, Tabelle 35) eine Insertion aufwies. Das PCV2-Isolat mit einer Genomlänge von 1770 Basen zeigte eine Insertion an Genomposition 996 nt (g.996_997insAG) und an Genomposition 3 nt (g.3_4insC, Tabelle 35).

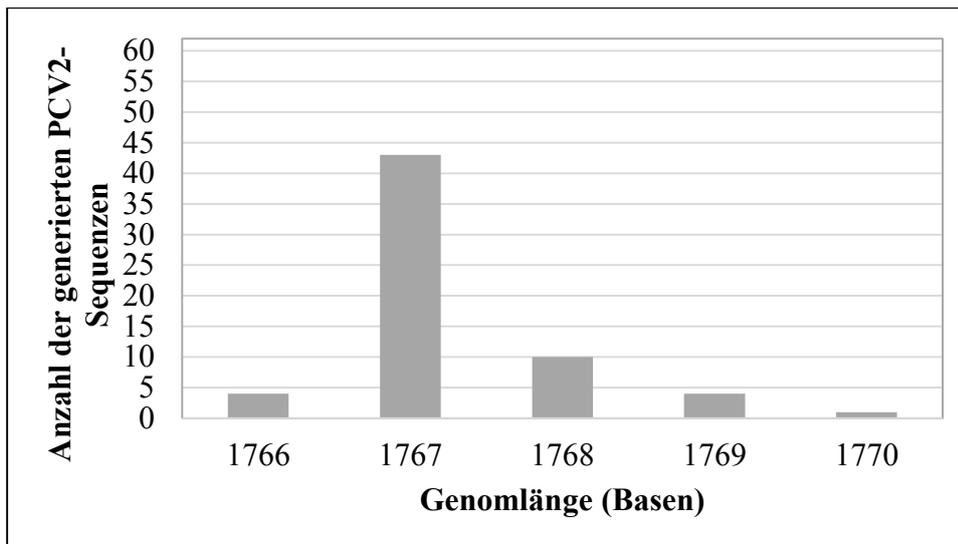


Abbildung 9: Verteilung der generierten PCV2-Sequenzen (n=62) auf die verschiedenen PCV2-Genomlängen.

Die Anzahl der erzeugten PCV2-Sequenzen pro Betrieb beläuft sich im Zeitraum 2008 bis 2012 auf eine bis maximal zwei Sequenz(en). Hierbei stammte eine Hälfte der generierten PCV2-Sequenzen aus Mastbetrieben (50 %), während sich die andere Hälfte auf Ferkelerzeuger (27,4 %) und geschlossene Systeme (22,6 %) verteilte (Tabelle 19). Von vier Betrieben konnten jeweils zwei PCV2-Sequenzen aus unterschiedlichen Jahren generiert werden, mit Ausnahme von Betrieb Nr. 2 jeweils vor und nach Impfstart im Betrieb (Tabelle 20).

Tabelle 19: Verteilung der generierten PCV2-Sequenzen (n=62) auf die verschiedenen Betriebsformen

| Betriebsform | PCV2-Sequenzen | Prozentualer Anteil der PCV2-Sequenzen |
|----------------------|----------------|--|
| Mast | 31 | 50,0 |
| Ferkelerzeuger | 17 | 27,4 |
| geschlossenes System | 14 | 22,6 |
| Gesamt | 62 | 100 |

Tabelle 20: Vier Betriebe mit jeweils zwei generierten PCV2-Sequenzen aus verschiedenen Jahren des Untersuchungszeitraumes und Unterschieden im Impfstatus.

| Betrieb | Jahr | Impfstatus ¹ |
|---------|------|-------------------------|
| 2 | 2008 | 1 |
| | 2011 | 1 |
| 3 | 2008 | 0 |
| | 2011 | 1 |
| 24 | 2009 | 0 |
| | 2012 | 1 |
| 33 | 2009 | 0 |
| | 2012 | 1 |

¹0=nicht-geimpft, 1=geimpft

In den Betrieben erfolgte die PCV2-Immunisierung vorrangig mithilfe des PCV2-Impfstoffes Ingelvac Circoflex (33,3 %). Zu geringeren Anteilen wurden die PCV2-Impfstoffe Porcillis PCV (3 %) und Circovac (4,5 %) eingesetzt (Abbildung 10). Im untersuchten Material wurde der PCV2-Impfstoff Suvaxyn PCV nicht verwendet. Von zwei Sequenzen war der verwendete Impfstoff unbekannt. Zur Vollständigkeit sind auch die PCV2-Sequenzen aus der Kategorie „nicht-geimpft“ in Abbildung 10 mit aufgeführt.

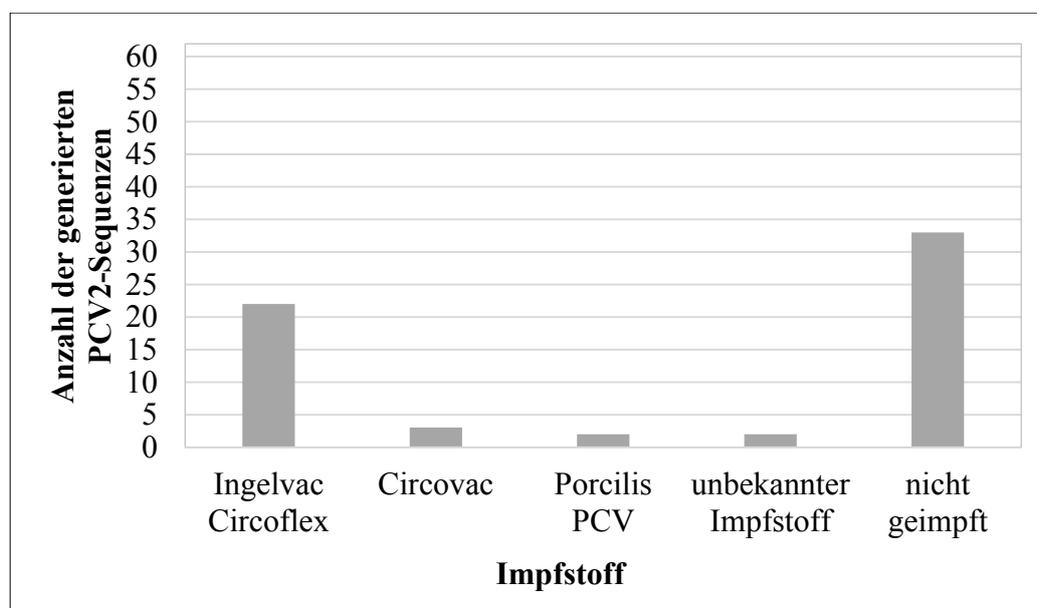


Abbildung 10: Verteilung der generierten PCV2-Sequenzen (n=62) in Abhängigkeit des verwendeten Impfstoffes.

4.3 PCV2-Genotypen

Die Zuordnung der 62 PCV2-Sequenzen zu den entsprechenden PCV2-Genotypen erfolgte wie unter Abschnitt 3.2.6 beschrieben. Im untersuchten Material wurde vorrangig der Genotyp PCV2b (83,9 %) identifiziert, gefolgt von Genotyp PCV2a (14,5 %). Eine Sequenz aus der Kategorie „geimpft“ wurde als Genotyp mPCV2b (1,6 %) identifiziert (Abbildung 11).

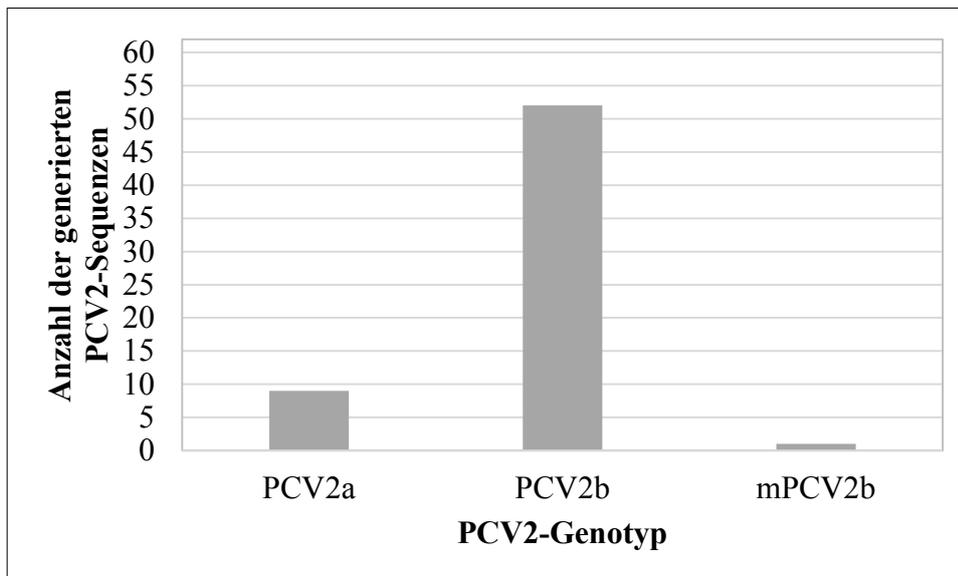


Abbildung 11: Verteilung der generierten PCV2-Sequenzen (n=62) auf die verschiedenen PCV2-Genotypen

Eine signifikante Reduzierung ($p = 0,025$) des Genotyps PCV2a in geimpften Beständen ließ sich bei Vergleichen der PCV2-Genotypen (PCV2a, PCV2b) in Abhängigkeit vom Impfstatus nachweisen. Während sich der Anteil des Genotyps PCV2a von 24,2 % auf 3,6 % in geimpften Beständen verringerte, stieg zeitgleich der Anteil des Genotyps PCV2b von 75,8 % (nicht-geimpft) auf 96,4 % (geimpft) an. 89 % der PCV2a-Sequenzen (8 von 9) wurden in nicht-geimpften Beständen nachgewiesen. Lediglich eine PCV2a-Sequenz (11 %) aus dem Jahr 2012 wurde in einem geimpften Bestand nachgewiesen. Während die Verteilung der PCV2b-Sequenzen nahezu ausgeglichen zwischen nicht-geimpften Beständen (48 %) und geimpften Beständen (52 %) war. Es bestand keine signifikante Assoziation ($p = 0,116$) zum Jahr der Isolation (Abbildung 12). Der Genotyp mPCV2b wurde in einem geimpften Bestand aus dem Jahr 2011 nachgewiesen.

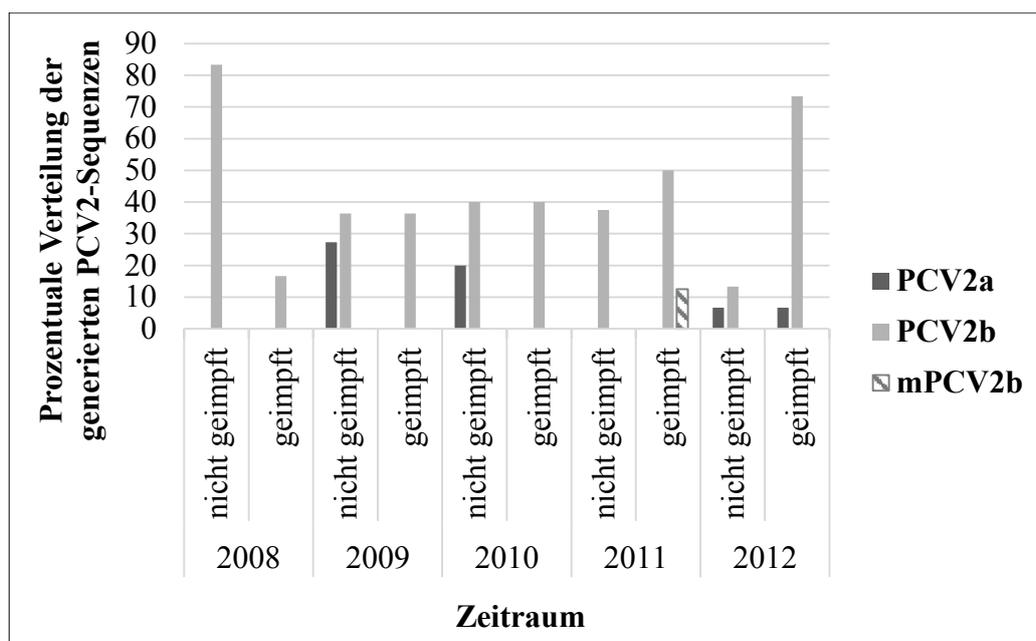


Abbildung 12: Prozentuale Verteilung der PCV2-Sequenzen (n=62) auf die PCV2-Genotypen in Abhängigkeit des Impfstatus im Zeitraum 2008 bis 2012.

4.4 ORF3-Genotypen

Von 19 potentiellen ORF3-Genotypen wurden im untersuchten Material die ORF3-Genotypen 1 bis 4, sowie 7, 10 und 19 identifiziert (Tabelle 21). Die ORF3-Genotypen 1 und 3 herrschten über das gesamte Material vor. Kein signifikanter Zusammenhang ließ sich bei der Betrachtung der identifizierten ORF3-Genotypen über den Untersuchungszeitraum 2008 bis 2012 darstellen.

Tabelle 21: Verteilung der PCV2-Sequenzen (n=62) auf die ORF3-Genotypen

| ORF3-Genotyp ¹ | ORF3-Teilsequenz (5' - 3') | Anzahl der PCV2- Sequenzen | Prozentualer Anteil der PCV2-Sequenzen |
|---------------------------|-------------------------------|-------------------------------|---|
| 1 | GAT GGA GTA | 21 | 33,8 |
| 2 | GAT GGA ATG | 2 | 3,2 |
| 3 | GAT CGA GTG | 24 | 38,7 |
| 4 | GAT TGA GTG | 3 | 4,8 |
| 7 | GAT AGA ATG | 1 | 1,6 |
| 10 | TAT TGA GTG | 8 | 12,9 |
| 19 | GAT TGA ATG | 3 | 4,8 |

¹ORF3-Genotypen nach (Reiner et al. 2011)

Die ORF3-Genotypen 1 und 3 verteilten sich nahezu gleich auf Proben beider Impfkategorien, während der ORF3-Genotyp 7 nur in Proben aus geimpften Beständen und der ORF3-Genotyp 19 nur in Proben aus nicht-geimpften Beständen nachgewiesen wurde (Tabelle 22). Ein signifikanter Zusammenhang ($p = 0,162$) zwischen der Verteilung der ORF3-Genotypen innerhalb der 62 PCV2-Sequenzen in Abhängigkeit vom Impfstatus ließ sich nicht darstellen.

Tabelle 22: Verteilung der identifizierten ORF3-Genotypen innerhalb der generierten 62 PCV2-Sequenzen in Abhängigkeit vom Impfstatus

| ORF3 Genotyp | PCV2-Sequenzen | | |
|--------------|----------------|---------------|---------|
| | Gesamt | nicht-geimpft | geimpft |
| 1 | 21 | 9 | 12 |
| 2 | 2 | 1 | 1 |
| 3 | 24 | 11 | 13 |
| 4 | 3 | 2 | 1 |
| 7 | 1 | 0 | 1 |
| 10 | 8 | 7 | 1 |
| 19 | 3 | 3 | 0 |
| Gesamt | 62 | 33 | 29 |

Weiterhin bestand keine signifikante Assoziation ($p = 0,66$) zwischen den identifizierten ORF3-Genotypen innerhalb der 62 generierten PCV2-Sequenzen und der Virusmenge (Tabelle 23).

Tabelle 23: Logarithmen der PCV2-Gehalte (in PCV2-DNA Kopien/ μg Total-DNA) der 62 generierten PCV2-Sequenzen, gemittelt über die innerhalb der 62 PCV2-Sequenzen identifizierten ORF3-Genotypen

| ORF3 - Genotyp | Anzahl der PCV2-Sequenzen | Mittelwert log Virusmenge \pm Standardabweichung |
|----------------|---------------------------|--|
| 1 | 21 | 4,73 \pm 2,34 |
| 2 | 2 | 6,03 \pm 0,44 |
| 3 | 24 | 5,75 \pm 1,79 |
| 4 | 3 | 4,39 \pm 1,65 |
| 7 | 1 | 5,3 |
| 10 | 8 | 3,71 \pm 1,76 |
| 19 | 3 | 7,30 \pm 0,66 |
| Gesamt | 62 | 5,15 \pm 2,05 |

4.5 Virusmenge

Die Verteilung der Virusmenge der generierten 62 PCV2-Sequenzen wird im Box-Whisker-Plot (Abbildung 13) dargestellt. Die Virusmenge war nahezu normalverteilt. 20 % der PCV2-Sequenzen zeigten eine Virusmenge unter $9,88 \times 10^3$ PCV2-Kopien/ μg Total-DNA, jeweils 25 % lagen zwischen $9,88 \times 10^3$ und $2,76 \times 10^5$ sowie $2,76 \times 10^5$ und $3,58 \times 10^6$ PCV2-Kopien/ μg Total-DNA. Weitere 20 % der Sequenzen wiesen Werte zwischen $3,58 \times 10^6$ und $2,3 \times 10^9$ PCV2-Kopien/ μg Total-DNA auf. Der Median lag bei $2,76 \times 10^5$ PCV2-Kopien/ μg Total-DNA.

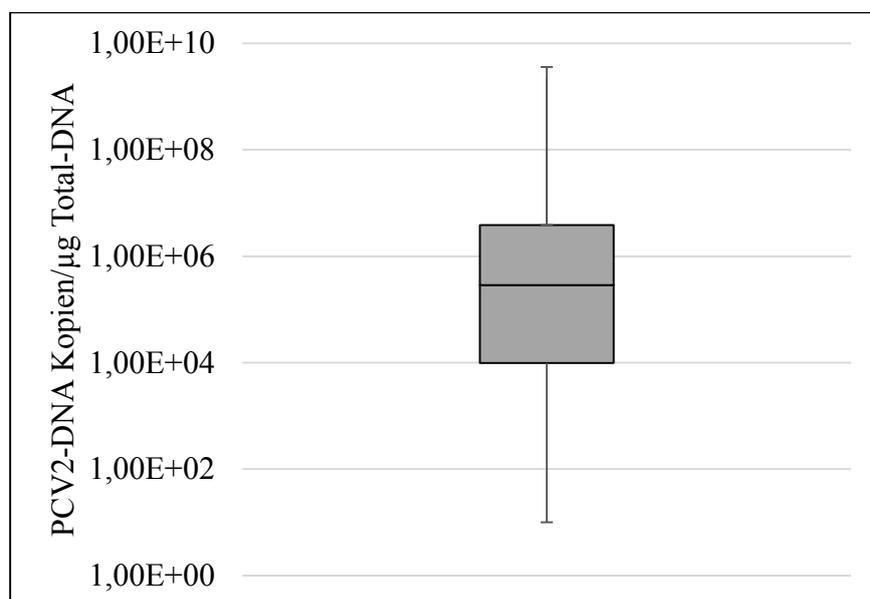


Abbildung 13: Box-Whisker-Plot: Verteilung der Virusmenge in log PCV2-DNA Kopien/ μg Total-DNA der generierten 62 PCV2-Sequenzen. Der Median liegt bei $2,76 \times 10^5$ PCV2-Kopien/ μg Total-DNA

Bei Vergleichen der Virusmengen in Abhängigkeit vom Impfstatus der 62 generierten PCV2-Sequenzen (Tabelle 24), zeigte sich kein signifikanter Unterschied ($p = 0,51$).

Tabelle 24: PCV2-Virusmenge in log PCV2-DNA Kopien/ μg Total-DNA der 62 generierten PCV2-Sequenzen, gemittelt über die Impfkategorien

| Kategorie | PCV2-Sequenzen | Mittelwert Virusmenge +/- Standardabweichung |
|---------------|----------------|---|
| nicht-geimpft | 33 | $4,99 \pm 2,19$ |
| geimpft | 29 | $5,34 \pm 1,90$ |

Es bestand ein signifikanter Zusammenhang ($p = 0,011$) zwischen der Virusmenge und den PCV2-Genotypen (Tabelle 25 und Tabelle 26). Proben des Genotyps PCV2b wiesen eine signifikant höhere Erregermenge pro μg DNA im Vergleich zur Proben des Genotyps PCV2a auf. Wobei sich jedoch keine signifikante Assoziation zwischen der Höhe der Virusmenge und dem Impfstatus innerhalb der Genotypen PCV2a ($p = 0,773$) oder PCV2b ($p = 0,819$) nachweisen ließ (Tabelle 25 und Tabelle 26). Der Genotyp mPCV2b wurde von einer weiteren Betrachtung ausgeschlossen, da nur eine Sequenz im untersuchten Material vorlag. Daher reduzierte sich die Anzahl der generierten PCV2-Sequenzen auf 61. Des Weiteren ergab sich kein signifikanter Zusammenhang bei der Auswertung der Faktoren Betriebsform, Betriebsgröße, zur PCV2-Immunsierung verwendeter Impfstoff und untersuchtes Probenmaterial in Bezug zur Virusmenge (Daten nicht dargestellt).

Tabelle 25: PCV2-Virusmengen in log PCV2-DNA Kopien/ μg Total-DNA der 9 PCV2a-Sequenzen, gemittelt über die Impfkategorien

| Impfstatus | PCV2a-Sequenzen | Mittelwert Virusmengen +/- Standardabweichung |
|---------------|-----------------|--|
| nicht-geimpft | 8 | 3,69 \pm 1,76 |
| geimpft | 1 | 3,13 |
| Gesamt | 9 | 3,63 \pm 1,66 |

Tabelle 26: PCV2-Gehalte in log PCV2-DNA Kopien/ μg Total-DNA der 52 PCV2b-Sequenzen, gemittelt über die Impfkategorien

| Impfstatus | Anzahl der PCV2b-Sequenzen | Mittelwert Virusmengen +/- Standardabweichung |
|---------------|----------------------------|--|
| nicht-geimpft | 25 | 5,41 \pm 2,18 |
| geimpft | 27 | 5,53 \pm 1,82 |
| Gesamt | 52 | 5,48 \pm 1,98 |

4.6 Mutationen innerhalb der 62 untersuchten PCV2-Sequenzen

Innerhalb der 62 generierten PCV2-Sequenzen wurden 259 Polymorphismen identifiziert, davon 234 Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs), 2 Deletionen, 3 Insertionen, 16 Deletionen/Insertionen (InDels) und 4 Duplikationen (Abbildung 14 und im Anhang: Tabelle 32 bis Tabelle 38). Von den 234 SNPs wiesen 191 SNPs zwei Allele, 17 SNPs drei Allele und 3 SNPs vier Allele auf. Insgesamt handelt es sich um 131 Transitionen (A ↔ G, C ↔ T) und 103 Transversionen (G ↔ T, G ↔ C, A ↔ T, A ↔ C). Der Basenaustausch für T/C, G/A, G/T, G/C, A/T und A/C betrug 31 %, 25 %, 17 %, 13 %, 9 % und 5 %.

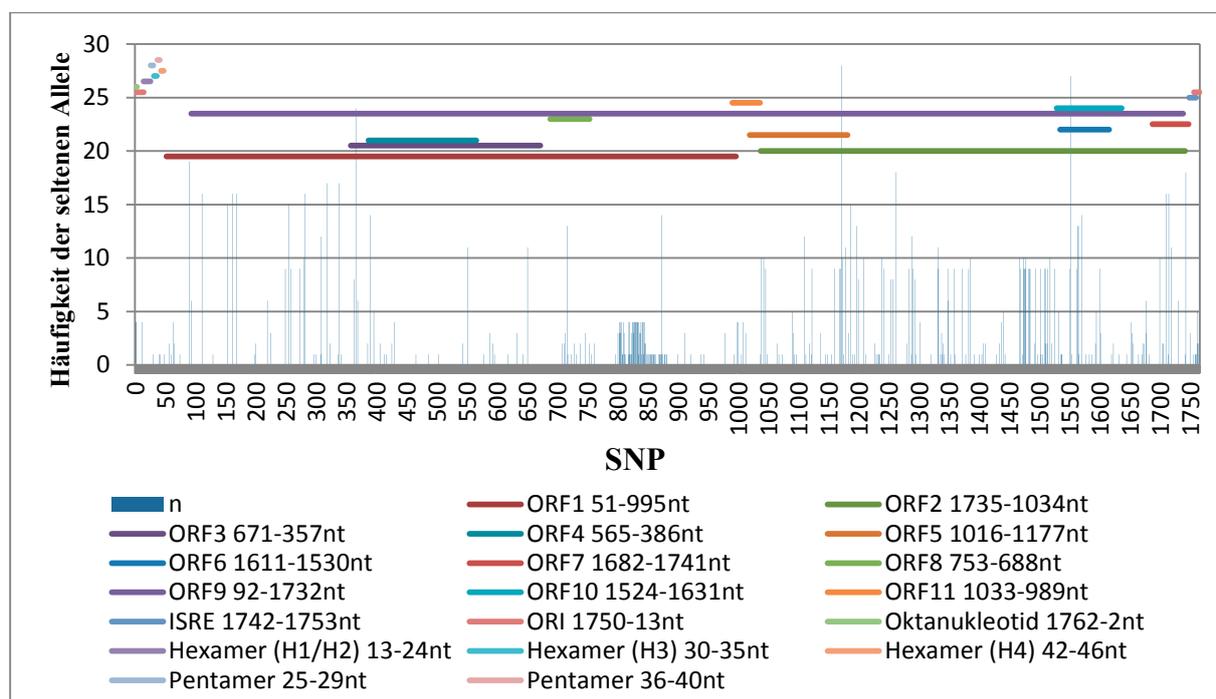


Abbildung 14: Lokalisation der SNPs (n=234) im PCV2-Genom mit Frequenz der seltenen Allele (blaue Balken) innerhalb der 62 PCV2-Sequenzen und Positionsangaben der verschiedenen Funktionselemente im PCV2-Genom

Die Verteilung der 234 SNPs auf die Funktionselemente ORF1 bis ORF3 ist aus Tabelle 27 ersichtlich. 153 SNPs kodierten die 3. Position im Basentriplett und konnten als stille Mutation keinen Aminosäureaustausch bewirken. 52 % der SNPs waren im ORF2 (n=127), 37 % im ORF1 (n=91) und 11 % im ORF3 (n=27) lokalisiert. Hiervon waren 48 (ORF2) und 25 (ORF1) sogenannte nicht-synonyme SPNs und veranlassten eine Aminosäuresubstitution im Kapsidprotein bzw. im Rep-Protein. Weitere 12 Aminosäuresubstitutionen im Kapsidprotein traten infolge von Insertionen/Deletionen (InDels) auf (Tabelle 37). Im ORF3 veranlassten alle

19 nicht-synonymen SNPs eine Aminosäuresubstitution im Protein. Des Weiteren waren 80 der 234 SNPs nur bei einer von 62 Sequenzen bzw. 33 SNPs bei zwei von 62 Sequenzen vertreten. Beide Gruppen wurden von einer weiteren Betrachtung ausgeschlossen.

Tabelle 27: Verteilung und Auswirkung der identifizierten SNPs innerhalb der 62 PCV2-Sequenzen

| Lokalisation der SNPs im PCV2-Genom | Anzahl synonymer SNPs | Anzahl nicht-synonymer SNPs | Gesamt |
|-------------------------------------|-----------------------|-----------------------------|--------|
| ORF1 | 66 | 25 | 91 |
| ORF2 | 79 | 48 | 127 |
| ORF3 | 8 | 19 | 27 |
| Gesamt | 153 | 92 | 218* |

* ohne die SNPs des ORF3, welcher in gegenläufiger Orientierung innerhalb des ORF1 lokalisiert ist.

4.6.1 Mutationen mit signifikanter Assoziation zu PCV2-Genotyp und Impfstatus

19 der 48 nicht-synonymen SNPs sowie 6 Indels, die im ORF2 zu einem Aminosäureaustausch führten (Tabelle 27), wurden von weiterführenden Analysen ausgeschlossen, da weniger als 3 Sequenzen diese Polymorphismen enthielten, um Fehlinterpretationen zu vermeiden. Von den verbliebenen 35 Polymorphismen wiesen 23 eine hohe Korrelation ($\geq 0,8$) zueinander auf und wurden gleichfalls von weiterführenden Betrachtungen ausgeschlossen. Die restlichen 12 SNPs im ORF2 wurden mit einer statistischen Signifikanzgrenze von $p \leq 0,0063$ (Bonferroni) überprüft. Auch das PCV2-Isolat mit Genotyp mPCV2b wurde von weiteren Analysen ausgeschlossen, daher reduziert sich die Anzahl der Sequenzen nachfolgend auf 61.

Nach Bonferroni-Korrektur blieb ein SNP an Nukleotidposition 1182 des PCV2-Genoms signifikant. Der SNP g.1182G>T führte zur Substitution von Cytosin (75,8 %) zu Adenin (24,2 %) an Nukleotidposition 553 des ORF2 (c.553C>A) und somit zur Substitution von Leucin zu Methionin im Protein an Aminosäureposition 185 (p.185L>M). Im untersuchten Material stellte sich ein signifikanter Zusammenhang des SNPs zu den PCV2-Genotypen dar ($p < 0,001$). Alle PCV2-Sequenzen des Genotyps PCV2a wiesen die Aminosäure Methionin an Position 185 des Kapsidproteins auf. Während der überwiegende Teil der PCV2-Sequenzen des Genotyps

PCV2b an der Position 185 des Kapsidproteins die Aminosäure Leucin (88,5 %) besaß und lediglich 11,5 % der PCV2b-Sequenzen die Aminosäure Methionin aufwiesen (Abbildung 15).

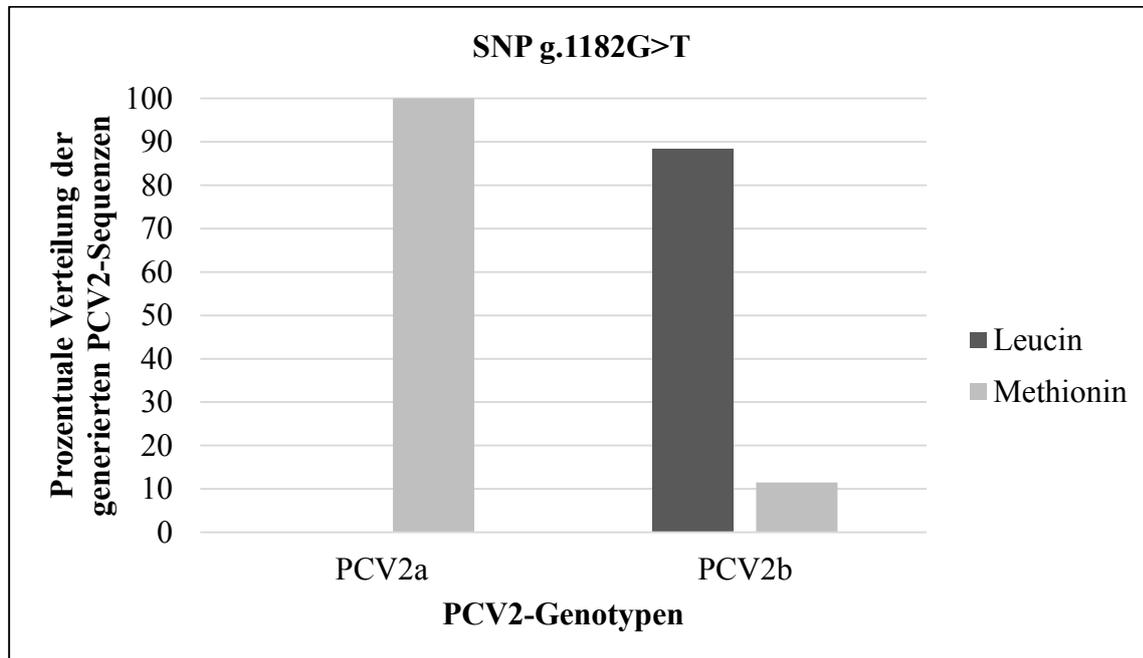


Abbildung 15: SNP g.1182G>T mit Verteilung der PCV2-Sequenzen (n=61) auf die Aminosäuren Leucin und Methionin an Position 185 im Kapsidprotein in Abhängigkeit des PCV2-Genotypen PCV2a oder PCV2b

Des Weiteren stellte sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem SNP g.1182G>T und dem Impfstatus der 61 generierten PCV2-Sequenzen dar ($p = 0,03$). Die Sequenzen der nicht-geimpften Proben wiesen an der Position 185 des Kapsidproteins die Aminosäure Methionin zu 39,4 % und die Aminosäure Leucin zu 60,6 % auf. Während die Sequenzen der geimpften Proben an entsprechender Proteinposition die Aminosäure Methionin zu 7,1 % und die Aminosäure Leucin zu 92,9 % aufzeigten (Abbildung 16 und Abbildung 17).

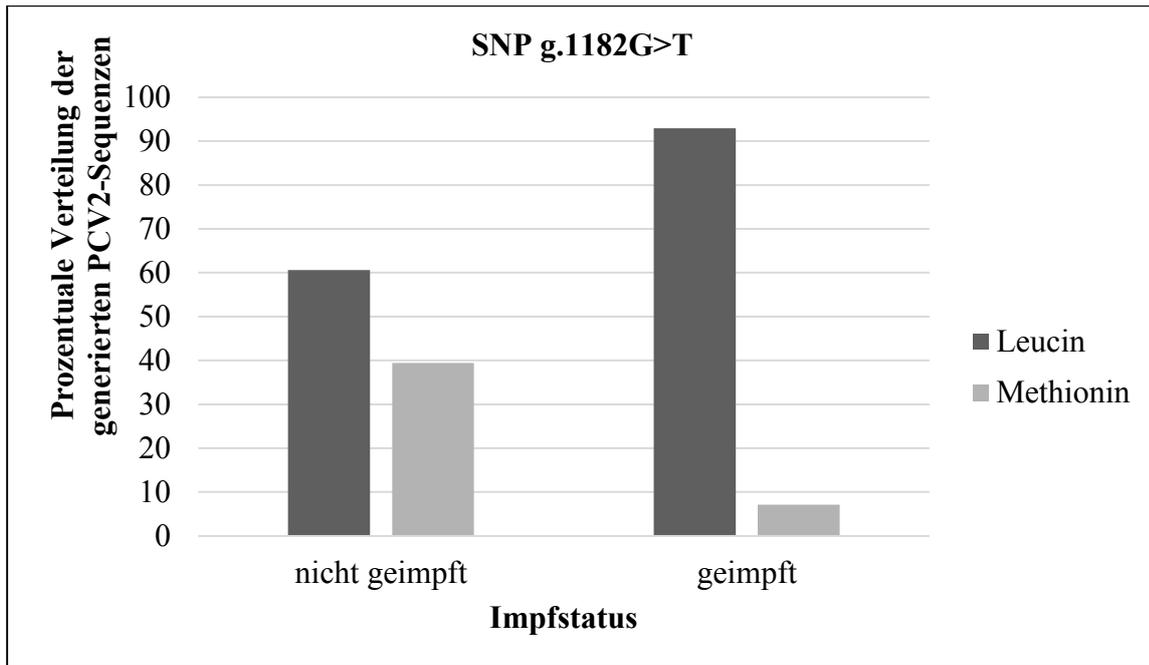


Abbildung 16: SNP g.1182G>T mit Verteilung der PCV2-Sequenzen (n=61) auf die Aminosäuren Leucin und Methionin an Position 185 im Kapsidprotein in Abhängigkeit des Impfstatus

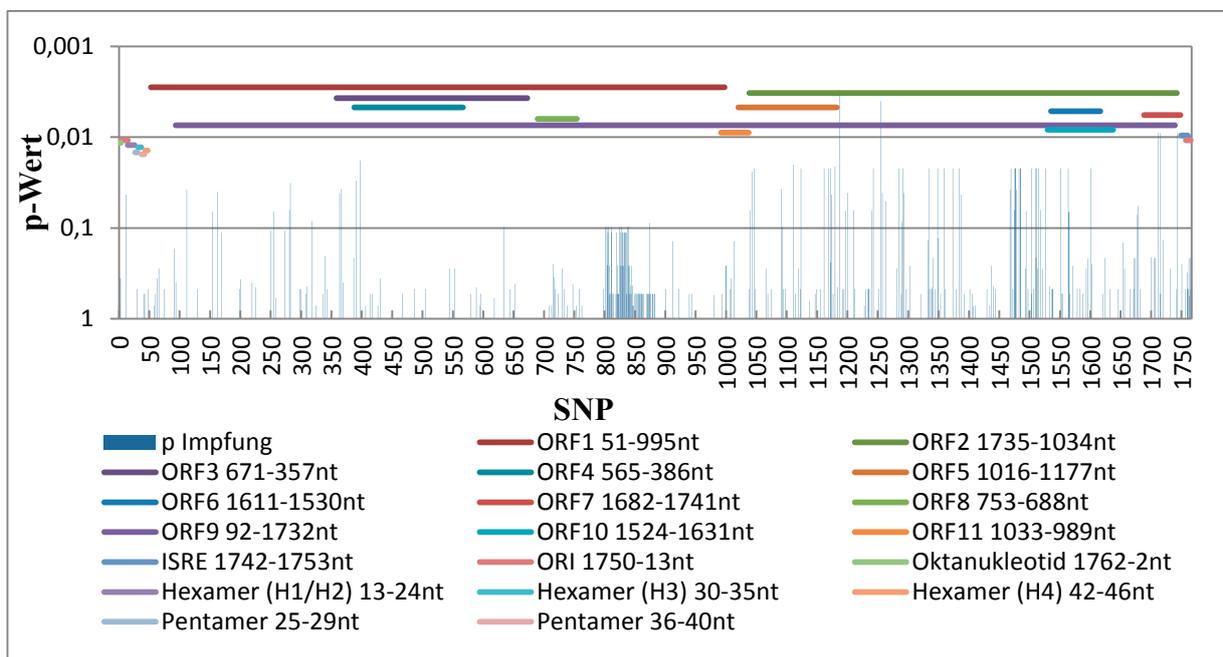


Abbildung 17: Signifikanzwerte der Assoziation von SNP und Impfstatus (p-Impfung)

4.6.2 Mutationen mit Assoziation zur Virusmenge

Von den 234 im Virusgenom der 62 PCV2-Sequenzen identifizierten SNPs (Tabelle 27) wurden alle SNPs, die keine Aminosäuresubstitution veranlassten und die eine Korrelation von $\geq 0,8$ aufwiesen, von weiterführenden statistischen Analysen ausgeschlossen. Die Signifikanzgrenze betrug nach Bonferroni-Korrektur $p \leq 0,0084$. Es blieben insgesamt 16 SNPs übrig. Im ORF3 wiesen lediglich zwei SNPs, g.587T>C (nt 85 im ORF3) und g.551T>G (nt 121 im ORF3), eine entsprechende Anzahl des seltenen Allels auf, die für eine statistische Analyse zugänglich war. Allerdings waren beide SNPs weder mit der Virusmenge noch mit dem Impfstatus assoziiert.

Für die SNPs g.64A>G (nt 14 im ORF1), g.543T>A (nt 493 im ORF1), g.1284T>G (nt 451 im ORF2), g.1469C>A (nt 266 im ORF2) und g.1508A>G (nt 277 im ORF2) konnte eine signifikante Assoziation ($p < 0,001$) zur Virusmenge dargestellt werden (Abbildung 18). Aufgrund hoher Korrelation zueinander (0,6 bis 0,9) konnte jedoch nicht abgeleitet werden mit welchem SNPs diese Assoziation verknüpft war. Bei zwei weiteren SNPs (g.1182G>T und g.1566C>T) bestand jedoch ein signifikanter Einzelzusammenhang zur Virusmenge ($p = 0,005$).

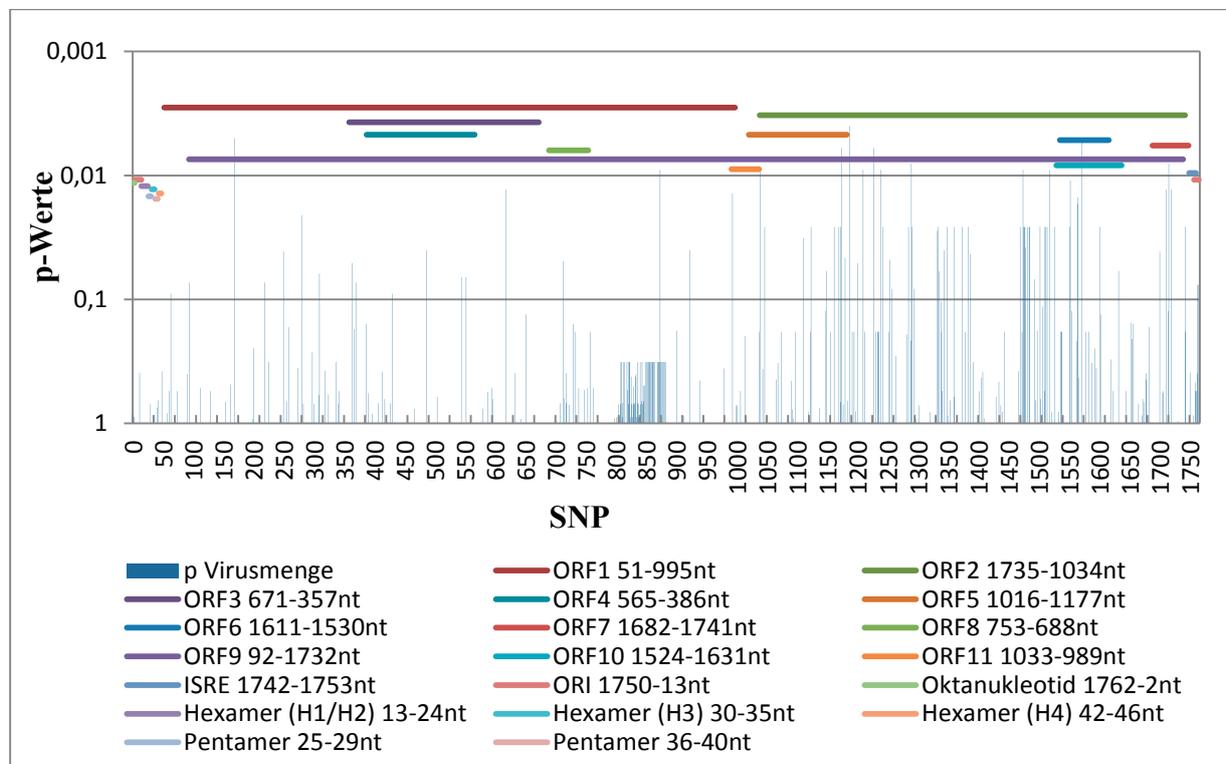


Abbildung 18: Signifikanzen der Assoziationen zwischen SNPs und Virusmenge

Der SNP g.1182G>T ist im ORF2 lokalisiert und verursacht die Substitution von Cytosin (75,8 %) zu Adenin (24,2 %) an Nukleotidposition 553 des ORF2 (c.553C>A) und somit die Substitution von Leucin zu Methionin im Protein an Aminosäureposition 185 (p.185L>M). Von den generierten 62 PCV2-Sequenzen, die an Proteinposition 185 ein Methionin besaßen, wiesen 40 % eine Virusmenge $\geq 10^4$ PCV2-Kopien/ μg Total-DNA und 60 % eine Virusmenge $\leq 10^3$ PCV2-Kopien/ μg Total-DNA auf. Während von den generierten PCV2-Sequenzen, die an Proteinposition 185 ein Leucin besaßen, 83 % eine Virusmenge $\geq 10^4$ PCV2-Kopien/ μg Total-DNA und lediglich 17 % eine Virusmenge $\leq 10^3$ PCV2-Kopien/ μg Total-DNA aufwiesen (Abbildung 19).

Die Einteilung der Virusmenge erfolgte in Anlehnung an den Zusammenhang zwischen Virusgehalt und klinischen PCVD nach (Segalés et al. 2005). Demnach gilt:

$\geq 10^7$ PCV2-DNA Kopien/ μl DNA-Probe: „Virusmenge“ mit PCVD korreliert

10^{4-5} PCV2-DNA Kopien/ μl DNA-Probe: „Virusmenge“ mit dem Verdacht auf PCVD korreliert

$\leq 10^3$ PCV2-DNA Kopien/ μl DNA-Probe: „Virusmenge“ nicht mit PCVD korreliert

Testergebnis negativ: Infektion nicht nachweisbar

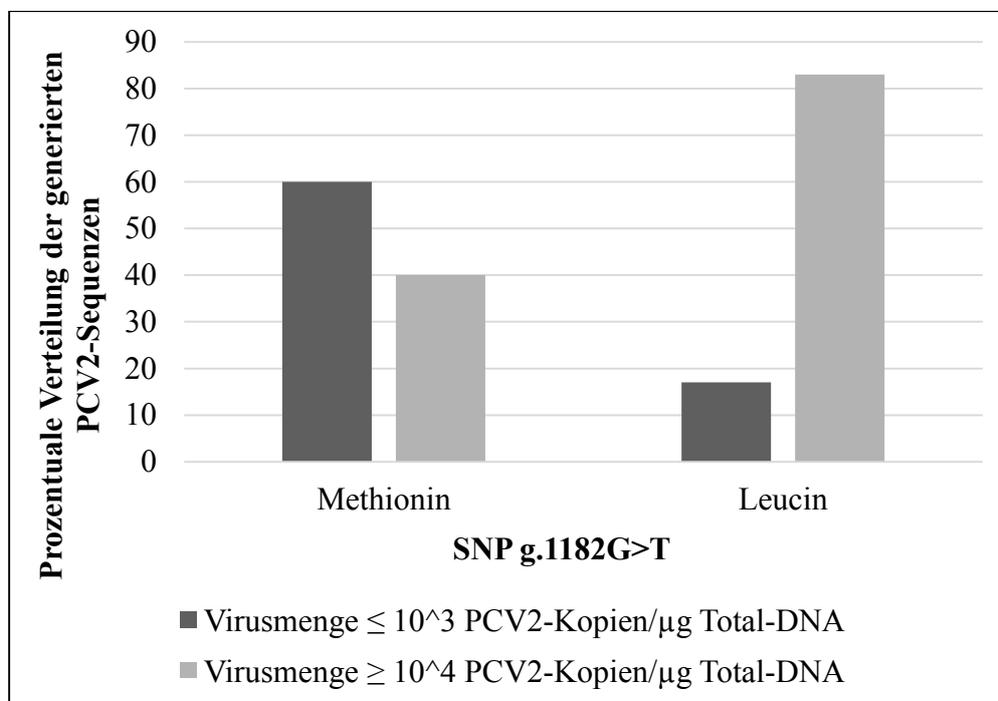


Abbildung 19: SNP g.1182G>T: Prozentuale Verteilung der generierten PCV2-Sequenzen (n=62) mit den Aminosäuren Leucin und Methionin an Position 185 im Kapsidprotein in Abhängigkeit von der Virusmenge (p = 0,02).

Der SNP g.1566C>T führte zur Substitution von Guanin (22,6 %) zu Adenin (77,4 %) an Nukleotidposition 169 des ORF2 (g.169G>A) und somit zur Substitution von Isoleucin zu Valin im Protein an Aminosäureposition 57 (c.57I>V). Von den generierten PCV2-Sequenzen, die an Proteinposition 57 ein Isoleucin besaßen, wiesen 81,25 % eine Virusmenge $\geq 10^4$ PCV2-Kopien/ μ g Total-DNA und 18,75 % eine Virusmenge $\leq 10^3$ PCV2-Kopien/ μ g Total-DNA auf. Während von den generierten PCV2-Sequenzen, die an Proteinposition 57 ein Valin besaßen, 42,86 % eine Virusmenge $\geq 10^4$ PCV2-Kopien/ μ g Total-DNA und 57,14 % eine Virusmenge $\leq 10^3$ PCV2-Kopien/ μ g Total-DNA aufwiesen (Abbildung 20).

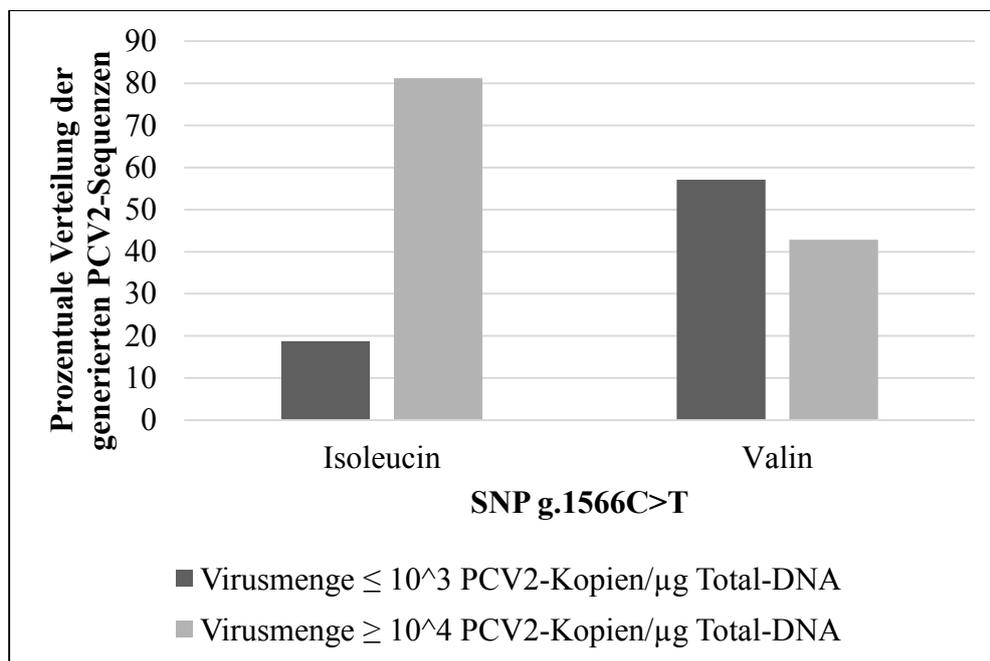


Abbildung 20: SNP g.1566C>T: Prozentuale Verteilung der generierten PCV2-Sequenzen (n=62) auf die Aminosäuren Isoleucin und Valin an Position 57 des Kapsidproteins in Abhängigkeit der Virusmenge (p = 0,02).

4.6.3 Zusammenfassung SNP g.1182G>T

Die Aminosäuresubstitution des SNPs g.1182G>T (ORF2, nt 1182) an Proteinposition 185 (p.185L>M) des Kapsidproteins zeigte auch nach Bonferroni-Korrektur eine signifikante Assoziation zur Virusmenge, zum Impfstatus und zum PCV2-Genotyp (Tabelle 28). Die Korrelation zur Virusmenge und zum Impfstatus (Tabelle 29) blieb sowohl basierend auf allen 62 PCV2-Sequenzen als auch basierend auf den PCV2b-Sequenzen signifikant (p = 0,045). Die Frequenz der Aminosäuresubstitution an Position 185 scheint durch den Impfstatus beeinflusst zu werden. Für diese Annahme spricht die Verteilung der Varianten in geimpften und nicht-

geimpften Herden sowie die Virusmengen der entsprechenden Proben. Die Anzahl der PCV2a- und mPCV2b-Sequenzen war leider zu gering, um beide Genotypen für sich allein zu betrachten.

Tabelle 28: Zusammenhang zwischen der Aminosäuresubstitution an Position 185 (ORF2; nt 1182) und dem Impfstatus, dem PCV2-Genotyp und der Virusmenge in der Probe. Alle 62 PCV2-Sequenzen und alle PCV2-Genotypen wurden mit einbezogen.

| | Impfstatus | | PCV2-Genotyp | | | logPCV2 | |
|------------------|---------------|---------|--------------|--------|-------|------------|---------------------|
| | nicht-geimpft | geimpft | 2a | 2b | m2b | Mittelwert | Standard Abweichung |
| Anzahl Sequenzen | 33 | 29 | 9 | 52 | 1 | 62 | 62 |
| Leucin | 60,6 %* | 93,1 % | 0 % | 88,5 % | 100 % | 5,60 | 1,65 |
| Methionin | 39,4 % | 6,9 % | 100 % | 11,5 % | 0 % | 3,76 | 2,58 |
| Signifikanz | 0,002 | | < 0,001 | | | 0,002 | |

*: Prozentualer Anteil der Aminosäure Leucin in Proben nicht-geimpfter Bestände.

Tabelle 29: Zusammenhang zwischen der Aminosäuresubstitution an Position 185 (ORF2, nt 1182) und dem Impfstatus, sowie der Virusmenge in Proben mit Genotyp PCV2b.

| | Impfstatus | | logPCV2 | |
|------------------|---------------|---------|------------|---------------------|
| | nicht-geimpft | geimpft | Mittelwert | Standard Abweichung |
| Anzahl Sequenzen | 25 | 27 | 52 | 52 |
| Leucin | 80,0 %* | 96,3 % | 5,68 | 1,60 |
| Methionin | 20,0 % | 3,7 % | 3,96 | 3,76 |
| Signifikanz | (0,079) | | 0,045 | |

*: Prozentualer Anteil der Aminosäure Leucin in Proben nicht-geimpfter Bestände

4.7 Ungewöhnliche Sequenz-Duplikation im Rep-Gen

In der Genomsequenz von vier PCV2-Isolaten wurde eine ungewöhnliche Sequenz-Duplikation im ORF1 entdeckt (Willems et al. 2014). Hierbei wurde ein Sequenzabschnitt (nt 41-85 bzw. nt 10-83 im PCV2-Genom), der den Bereich zwischen dem Replikationsursprung und dem Beginn des ORF1 abdeckt unter Deletion der Standardsequenz wiederholt (Tabelle 30). Zwei der vier PCV2-Isolate stammten aus demselben Betrieb. Drei der vier PCV2-Isolate wurden aus Proben aus dem Jahr 2009 und ein Isolat aus einer Probe aus dem Jahr 2012 isoliert. Drei PCV2-Sequenzen wurden aus Lungengewebe geimpfter Schweine isoliert, eine PCV2-Sequenz stammte aus Lungengewebe eines nicht-geimpften Tieres. Drei PCV2-Isolate wiesen eine Genomlänge von 1767 nt auf, ein Isolat eine solche von 1768 nt. Alle gehören dem PCV2-Genotyp PCV2b an. Die Sequenzidentität zum PCV2b-Referenzstamm beträgt 97,6 %. Auch die Nukleotid- und Aminosäuresequenz von ORF2 und ORF3 ist sehr ähnlich, sie liegt zwischen 98,2 % und 99,3 %. Aufgrund der Sequenz-Duplikation beläuft sich die ORF1 Identität der Nukleotidsequenz lediglich auf 96,5 % und die der Aminosäuresequenz auf 94,5 bis 95,2 % im Vergleich zum PCV2b-Referenzstamm. Bei drei der vier PCV2-Isolate war die Sequenzduplikation nahezu identisch (Tabelle 31). Hierbei wurden an Position 750 des ORF1 7 Nukleotide, die direkt vor dem ORF1 liegen und zum Teil das Hexamer H4 (CAGCAG) des Replikationsursprunges beinhalten, sowie die ersten 40 Nukleotide des ORF1 unter Deletion der entsprechenden Nukleotide wiederholt. Beim vierten PCV2-Isolat wurden an Position 753 des ORF1 insgesamt 78 Nukleotide wiederholt. Hierbei umfasste die Duplikation 41 Nukleotide, die direkt vor dem ORF1 lokalisiert sind und alle vier Hexamere und die zwei Pentamere (CACCT) des Replikationsursprunges, sowie die ersten 37 Nukleotide des ORF1 beinhalten.

Tabelle 30: Sequenz-Duplikation im ORF1 mit Positionsangaben im PCV2-Genom sowie im kodierten Protein.

| Ursprünglicher Sequenzabschnitt im PCV2-Genom (nt) | | Duplizierter Sequenzabschnitt im PCV2-Genom (nt) | | Position der Duplikation im ORF1 (nt) | | Position der Duplikation im Protein (aa) | | Anzahl PCV2 Sequenzen | PCV 2a | PCV 2b |
|--|-----|--|-----|---------------------------------------|-----|--|-----|-----------------------|--------|--------|
| von | bis | von | Bis | von | bis | von | bis | | | |
| 41 ^a | 85 | 800 | 846 | 750 | 791 | 251 | 265 | 3 | 0 | 3 |
| 10 ^b | 83 | 803 | 880 | 753 | 828 | 252 | 277 | 1 | 0 | 1 |

^a Duplikation in Sequenz 1 bis Sequenz 3; ^b Duplikation in Sequenz 4

Tabelle 31: Aminosäuresequenzen (Sequenz 1 bis 4) der Sequenz-Duplikation im Vergleich zur PCV2b-Referenzsequenz (Acc.No.: AF055394).

| | Aminosäuresequenz |
|-----------------------|-----------------------------|
| PCV2b-Referenzsequenz | ILITSNQTPLEWYSSTAVPAVEALYRR |
| Sequenz1 | SNMPSKKNGRSGPHQT |
| Sequenz2 | SNMPSKKNGRSGPHQT |
| Sequenz3 | SNMPSKKNGRSGPLLA |
| Sequenz4 | FGSGTSAAPQQQHAQQKEWKKRTQQ |

5 Diskussion

Zur Verbesserung der Tiergesundheit in der Schweineproduktion stehen seit 2007 verschiedene PCV2-Vakzinen auf dem internationalen Markt zur Verfügung. Trotz nachgewiesener Effektivität der PCV2a-basierenden Impfstoffe (Seo et al. 2013, Opriessnig et al. 2009b) bietet die Impfung keine sterile Immunität und geimpfte Tiere können sich weiterhin mit dem Virus infizieren (Kekarainen et al. 2010). In den letzten Jahren verzeichnete die Klinik für Wiederkäuer und Schweine, Professur für Schweinekrankheiten der Justus-Liebig-Universität Gießen, einen stetigen Anstieg der PCV2-Virusmengen in Proben aus PCV2-geimpften Beständen. Während sich im Zeitraum 2008 bis einschließlich des dritten Quartals 2011 die Virusmenge der untersuchten Proben reduzierte und sogar gegen Ende des genannten Zeitraums kaum die Nachweisgrenze erreichte, begann die Viruslast der untersuchten Proben von da an wieder zu steigen, obwohl die Bestände weiterhin gegen PCV2 geimpft wurden. Als mögliche Ursachen der zunehmenden Virusmengen werden Mängel in der Betriebshygiene und der Impfstoffanwendung (Opriessnig et al. 2009b) sowie eine etwaige selektionsbedingte, antigene Anpassung des porzinen Circovirus Typ 2 infolge der flächendeckenden Impfmaßnahmen (Guo et al. 2012, Opriessnig et al. 2014b) diskutiert. Ausgehend von den hohen Mutationsraten des PCV2 (Firth et al. 2009), den flächendeckenden PCV2-Impfmaßnahmen und der aktuellen Prävalenz des Genotyps PCV2b bestehen Bedenken, dass unter dem impfbedingten Selektionsdruck Virusvarianten gefördert worden sein könnten, die sich der induzierten Immunität der aktuellen PCV2a-basierenden Vakzinen entziehen können (Chae 2015, Guo et al. 2012, Opriessnig et al. 2014b, Seo et al. 2014, Shen et al. 2012, Xiao et al. 2012). So fordern Lv et al. (2014) mehr Forschung, um die Wirkung des Impfdrucks auf die dominierenden PCV2b-Prävalenz und der möglichen Entstehung von Impfstoff-Escape-Mutanten bewerten zu können.

Bereits bekannt sind die für Antigenität und Virusreplikation verantwortlichen Gene im PCV2-Genom (Cheung 2012, 2003a, 2003b, Lin et al. 2009, Mankertz und Hillenbrand 2001, Mankertz et al. 1998, Nawagitgul et al. 2000, Triple et al. 2011, Truong et al. 2001) und die für die Immunogenität relevanten Epitope des Kapsidproteins (Laroche et al. 2002, Lekcharoensuk et al. 2004, Mahe et al. 2000). Sequenzvariationen im ORF1 und ORF2 des PCV2-Genoms mit Auswirkungen auf die kodierten Proteine könnten über Beeinflussung der Virusreplikation und der Antigenität der Virus-Isolate (Grau-Roma et al. 2008, Olvera et al. 2007, Saha et al. 2012b, Shen et al. 2012) mögliche Ansatzpunkte für die zunehmenden

Virusmengen in geimpften Beständen bilden. Auf dieser Basis sollte die vorliegende Dissertation mittels vergleichender Sequenzanalyse, Mutationen innerhalb der für Antigenität und Virusreplikation zuständigen Gene des PCV2-Genoms mit möglicher Assoziation zu PCV2-Genotyp, Impfstatus und Virusmenge in 62 PCV2-Sequenzen aus geimpften und nicht-geimpften deutschen Beständen untersuchen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen den Verdacht eines Trends des PCV2 sich der Impfung zu entziehen. So stiegen nicht nur die Virusmengen der untersuchten Proben seit dem dritten Quartal 2011 zunehmend an, es ließ sich auch kein signifikanter Unterschied der Virusmengen zwischen Proben der Kategorie „geimpft“ und „nicht-geimpft“ nachweisen. Die Virusmengen der Kategorie „geimpft“ waren sogar geringfügig höher als die der Kategorie „nicht-geimpft“. Es kann nicht nachgewiesen werden, welcher Teil des beobachteten stetigen Anstiegs der Virusmenge auf eine selektive Anpassung des Virus oder auf eine weniger strikte Einhaltung des Hygienemanagements nach erfolgreicher Einführung der PCV2-Impfung zurück zu führen ist. Obwohl in der vorliegenden Arbeit keine Beweise für eine Vernachlässigung des 20-Punkte-Plans von Madec (Madec, 1999) nach Einführung der PCV2-Impfung vorlagen, könnte dieser Aspekt sehr wohl zur Erhöhung der Virusmenge in geimpften Beständen beigetragen haben.

Die 62 PCV2-Isolate wiesen 58 verschiedene Sequenzen und eine hohe Rate an genetischer Variabilität auf. Auch auf der abgeleiteten Aminosäureebene, einschließlich aller wichtigen Sequenzabschnitte des PCV2-Genoms. Daher konnte im untersuchten Material der vorliegenden Studie keine bestimmte Sequenz mit der Impfung in Verbindung gebracht werden. Auch Kekarainen et al. (2014) beschrieben in ihrer Studie einen hohen Grad an Sequenzvariationen, sogar innerhalb einzelner Betriebe. So wiesen die Proben aus nicht-geimpften Herden im Vergleich zu den Proben aus geimpften Herden eine höhere Mutationsrate in Bezug auf das gesamten PCV2-Genom und das ORF2 auf, während für das ORF1 keine deutlichen Unterschiede der Mutationsrate zwischen geimpften und nicht-geimpften Proben nachgewiesen wurden (Kekarainen et al. 2014). Unterschiede zeigten sich erst bei spezieller Betrachtung von synonymen und nicht-synonymen SNPs. Die nicht-geimpften Proben wiesen eine höhere Anzahl an synonymen SNPs auf, während die geimpften Proben eine vierfach höhere Anzahl an nicht-synonymen SNPs aufzeigten. Im gesamten untersuchten Material belief sich die Anzahl der nicht-synonymen SNPs innerhalb des ORF1 auf 7 % (nicht-geimpfte Proben) bzw. 29% (geimpfte Proben), respektive für ORF2 auf 43% (nicht-geimpfte Proben)

und 47 % (geimpfte Proben). Jedoch waren diese Unterschiede statistisch nicht signifikant (Kekarainen et al. 2014). In der vorliegenden Studie entsprachen von den 25 SNPs in ORF1 mit Aminosäuresubstitution nur 2 (p.34E>D; p.105I>M) den von Kekarainen et al (2014) beschrieben und mit Next-Generation-Sequencing (NGS) gefundenen 7 SNPs mit Aminosäureaustausch. Dies ist ein weiterer Beweis für die immense Variabilität innerhalb der PCV2-Sequenzen.

Die vorherrschende PCV2-Genomlänge von 1767 bzw. 1768 Basenpaaren (Cheung 2012, Meehan et al. 1998, Olvera et al. 2007) zeigte sich auch in den Sequenzen der vorliegenden Untersuchung. Gleichfalls konnte die aktuell dominierende Prävalenz des Genotyps PCV2b (Cortey et al. 2011a, Guo et al. 2010, Li et al. 2010b) innerhalb der untersuchten PCV2-Sequenzen bestätigt werden. Laut Opriessnig et al. (2014c) und Wei et al. (2013) scheint die Prävalenz der mutierten Virusvariante mPCV2b in China und Nordamerika zuzunehmen. Im untersuchten Material der vorliegenden Arbeit war nur ein mPCV2b-Isolat vertreten. Es stammte von einem PCV2-geimpften, an der respiratorischen Form der PCVD erkrankten Absatzferkel aus dem Jahr 2011. Eddicks et al. (2015) konnten über den Zeitraum 2013 bis 2014 in 7 deutschen, routinemäßig PCV2-geimpften Betrieben mit klinischen PCVD Fällen, mPCV2b-Isolate nachweisen. Die deutschen mPCV2b-Isolate zeigten eine Nukleotidsequenzidentität von 99,6 - 99,8 % (8 Isolate) bzw. 99,0 - 99,1 % (4 Isolate) zu dem bereits in China und USA beschriebenen mPCV2-Isolat (BDH GenBank No. HM038017) (Guo 2010, Opriessnig 2013b). Des Weiteren bestand eine Nukleotidsequenzidentität von 96,5 - 97,1 % zu einem bereits 2005 beschriebenen Virusisolat aus der deutschen Wildschweinpopulation (Knell 2005). Basierend auf der hohen Sequenzhomologie zu den aktuellen mPCV2-Isolaten aus Asien und Nordamerika folgern Eddicks et al. (2015), dass die deutschen mPCV2-Isolate ihren Ursprung außerhalb Deutschlands oder Europa haben und es sich nicht um de facto neu entstandene Virusisolate handelt.

In der vorliegenden Arbeit stammte der überwiegende Teil der PCV2-positiven Proben aus Lungengewebe und Serum. Dies lässt sich mit einer vorrangig oronasalen PCV2-Übertragung (Shibata 2003) und Virusreplikation im lymphatischen Gewebe nahe des Infektionsortes sowie anschließender Virämie über das Blut (Yu et al. 2007) erklären. Yu et al. (2007) wiesen in ihrer Studie an intranasal infizierten Schweinen die höchsten PCV2-Gehalte in den Bronchiallymphknoten nach. Gleichzeitig korrelierte die PCV2-Virusmenge im Serum mit der Menge an viraler DNA im getesteten Gewebe. Zum anderen handelt sich um Proben, die im Rahmen der Diagnostik einer möglichen PCV2-assoziierten Erkrankung gewonnen wurden.

Die Bestimmung der PCV2-Viruslast im Serum mittels quantitativer PCR ist eine wesentliche Methode zur Ermittlung des Schweregrades einer PCV2-assoziierten Erkrankung, da die Virusmenge positiv mit dem Schweregrad einer PCVD korreliert (Segalés et al. 2005). Während der alleinige serologische Nachweis von PCV2-Antikörpern aufgrund des ubiquitären Vorkommens von PCV2 innerhalb der Schweinepopulation zur Diagnose einer PCVD unzureichend ist (Segalés et al. 2005).

Im untersuchten Material der vorliegenden Arbeit bestand ein signifikanter Zusammenhang zwischen PCV2-Genotyp und Virusmenge. Proben mit Genotyp PCV2b wiesen eine signifikant höhere Virusmenge pro μg DNA auf als Proben mit Genotyp PCV2a. Wider Erwarten wurde kein signifikanter Unterschied der Virusmengen in Abhängigkeit des Impfstatus der 62 PCV2-Sequenzen ermittelt. Die Virusmengen der PCV2-Sequenzen aus Proben geimpfter Bestände, lagen sogar geringfügig höher. Das Ergebnis überrascht, da für die PCV2-Sequenzen aus Proben geimpfter Bestände eine deutlich geringere Virusmenge im Vergleich zu denjenigen aus ungeimpften Betrieben erwartet wurde. Denn zahlreiche experimentelle Studien und Fälle aus der Praxis belegen, dass eine PCV2-Impfung unabhängig vom verwendeten Impfstoff, die Virusmenge und die Virämie deutlich reduzierte (Beach und Meng 2012, Beach et al. 2010, Chae 2012, Fenaux et al. 2004a, Fort et al. 2009, 2008, Kixmüller et al. 2008, Opriessnig et al. 2011c, 2008b, Segalés et al. 2009). Anhand der vorliegenden Daten zeichnet sich der Trend ab, dass eine PCV2-Impfung den Genotyp PCV2a scheinbar verdrängte. So wurde im untersuchten Material bis auf eine Ausnahme nur der Genotyp PCV2b in Proben geimpfter Bestände nachgewiesen. Die Beobachtung wird durch die Ergebnisse von Shen et al. (2012) und Opriessnig et al. (2013) unterstützt. So wiesen Shen et al. (2012) den Genotyp PCV2a nur im Serum nicht-geimpfter Tiere nach, während der Genotyp PCV2b im Serum der geimpften Tiere sowie der an PCVD erkrankter Tiere, vorherrschte (Shen et al. 2012). Als möglichen Grund vermuteten Shen et al. (2012) Rekombinationen oder Mutationen innerhalb des ORF2. Diese Befunde wurden durch Saha et al (2012b) unterstützt. In der vorliegenden Arbeit finden sich deutliche Hinweise für einen Übergang von PCV2a zu PCV2b bei mindestens sechs PCV2-Sequenzen, die als PCV2b klassifiziert wurden. Während der ORF1 dieser Sequenzen enger mit dem ORF1 des PCV2a übereinstimmt, ist der ORF2 hoch homolog zum ORF2 des PCV2b. Diese Beobachtung zeigt möglicherweise ein Rekombinationsereignis zwischen PCV2a und PCV2b mit dem Hinterlassen des PCV2a/ORF1 in einer PCV2b-Sequenz an. Laut Opriessnig et al. (2013a) waren die aktuellen kommerziellen Impfstoffe zwar in der Lage, die klinischen Symptome einer PCVD und die Prävalenz von PCV2a zu reduzieren, scheinbar jedoch nicht

wesentlich die Prävalenz von PCV2b zu minimieren. Gerber et al. (2013) führte an, dass möglicherweise der auf PCV2a-basierende Impfschutz bei einer gesteigerten Virusreplikation infolge einer kombinierten PCV2a/PCV2b-Infektion nicht ausreichend war. Diese Annahme wird durch die Ergebnisse von Opriessnig et al. (2014b) erhärtet. Obwohl die kommerziellen, PCV2a-basierenden Impfstoffe auch gegen die mutierte Virusvariante mPCV2b effektiv waren (Opriessnig et al. 2014c), entwickelten mit PCV2b/mPCV2-koinfizierte Schweine infolge einer gesteigerten Virusreplikation eine klinische PCVD (Opriessnig et al. 2014b). Eine Auswertung der Daten im Sinne der Annahme von Gerber et al. (2013) und Opriessnig et al. (2014b) war nicht möglich, da im untersuchten Material der vorliegenden Studie keine PCV2a/PCV2b-Mischinfektion festgestellt wurde.

Sequenzvariationen verschiedener genetischer Elemente des PCV2-Genoms wird eine mögliche Beeinflussung der viralen Pathogenese mit Auswirkungen auf Virusmenge, Immunogenität und Antigenität zugesprochen. So beschrieben Juhan et al. (2010), Karuppannan et al. (2009) und Liu et al. (2006) einen Zusammenhang zwischen dem ORF3-kodierten Apoptose-induzierenden Protein und der Virusmenge. Der ORF3 liegt innerhalb des ORF1, jedoch in gegenläufiger Orientierung (Liu et al. 2005). Karuppannan et al. (2010) identifizierte die Aminosäurepositionen 20 bis 65 des ORF3-Proteins als bedeutenden Bereich für Wechselwirkungen des PCV2 zur Apoptoseregulation der Wirtszelle. In dieser Region wurden in der vorliegenden Arbeit 6 nicht-synonyme SNPs identifiziert, wovon lediglich zwei an den Positionen 587 und 551 unsere Kriterien für die Einbeziehung in die statistische Analyse erfüllten. Jedoch waren beide weder mit der Virusmenge noch mit dem Impfstatus assoziiert. Die ORF3-Genotypen 1 und 3 scheinen eine vorherrschende Prävalenz in der Schweinepopulation zu haben (Reiner et al. 2011). In der Studie von Reiner et al. (2011) wurde der ORF3-Genotyp 4 nur bei Wildschweinen und der Genotyp 7 nur in asiatischen PCV2-Sequenzen von Hausschweinen nachgewiesen. Anhand der Daten im untersuchten Material der vorliegenden Arbeit scheint sich die Prävalenz der ORF3-Genotyps 1 und 3 zu bestätigen. Eine signifikante Assoziation der verschiedenen ORF3-Genotypen mit der Virusmenge oder dem Impfstatus ließ sich nicht nachweisen. Dieser Umstand könnte allerdings auch auf die relativ geringe Anzahl an einzelnen ORF3-Genotypen in der vorliegenden Studie zurückzuführen sein. Der ORF4 (nt 565-386) ist innerhalb des ORF3 lokalisiert und in die gleiche Richtung orientiert (Olvera et al., 2007). Die Analyse der Sequenzvariationen des ORF4 ergaben die gleichen Ergebnisse wie für den ORF3.

Der ORF1 kodiert die Proteine Rep und Rep', welche für die Virusreplikation essentiell sind (Cheung 2003b) und wichtige Funktionen bei der zellvermittelten Immunität und in der Entwicklung einer PCVD übernehmen (Fort et al. 2010). In der vorliegenden Untersuchung wurde im Rep-Gen der PCV2-Isolate eine Sequenz-Duplikation (nt 800-846 bzw. nt 803-880 im PCV2 Genom) nachgewiesen (Willems et al. 2014). Die Sequenz-Duplikation veranlasste eine einzigartige Änderung der Aminosäurekomposition des Rep-Proteins an Position 251 ohne dabei die Proteinlänge zu modifizieren oder die Konformation des Rep-Proteins zu verändern. Insgesamt vier der 62 Sequenzen wiesen diese Duplikation auf, wobei sie nur in den PCV2b-Sequenzen, jedoch nicht in den PCV2a-Sequenzen vorkam. Mankertz et al. (2003) beschrieb an der Aminosäureposition 256-258 eine potentielle Glykosylierungsstelle, die hier jedoch durch die nachgewiesene Substitution verloren geht. Ein Zusammenhang zur Virusmenge oder dem Impfstatus konnte aufgrund der geringen Fallzahlen für die Duplikation nicht untersucht werden. Des Weiteren scheint der Bereich der Duplikation auch nicht essentiell für die Virusreplikation zu sein. Insgesamt führten 25 im ORF1 identifizierte SNPs zu einer Aminosäuresubstitution. Wovon drei Polymorphismen (p.275Y>T, p.165W>R und p.5K>R) eine signifikante Assoziation zur Virusmenge aufwiesen. Jedoch konnte die ätiologische Grundlage dieser Beziehung und der dominierende SNP aus diesen drei hoch korrelierten variablen Positionen nicht detektiert werden.

Der ORF2 kodiert das Kapsidprotein, welches sich über hoch variable Bereiche (immunogene Epitope) auf die Antigenität, die Wirtsimmunität und den Zelltropismus auswirkt (Olvera et al. 2007). In der vorliegenden Arbeit wurden im ORF2 47 SNPs identifiziert, die zu einer Aminosäuresubstitution führten. Drei dieser SNPs waren in einer der von Larochelle et al. (2002), Lekcharoensuk et al. (2004) und Mahe et al. (2000) beschriebenen immunogenen Region lokalisiert: p.185L>M (g.1182G>T), p.76I>T (g.1508A>G) und p.57V>I (g.1566C>T). Die Aminosäure-Eigenschaften der drei substituierten SNPs unterscheiden sich zwar nur minimal doch sie könnten Veränderungen der immunogenen Epitope bewirken mit Auswirkungen auf die Effizienz der PCV2-Impfung. Eine Beobachtung, die diese Annahme unterstützt, ist ihre Assoziation zur Viruslast. So waren im untersuchten Material bei SNP p.57V>I, die PCV2-Isolate mit der Aminosäure Isoleucin an Position 57 im Kapsidprotein mit einer höheren Virusmenge assoziiert als PCV2-Isolate mit der Aminosäure Valin an selbiger Position. Möglicherweise beeinflusst die in einem immunogenen Bereich (Lekcharoensuk et al. 2004) des Kapsidproteins lokalisierte Sequenzvariation durch eine Konformationsänderung des immunogenen Epitopes die Antigenität der Virusisolate. Denkbar ist, dass PCV2-Isolate mit

einem Isoleucin an Position 57 im Kapsidprotein den Zellen des Wirtsimmunsystems eher verborgen bleiben als Virusisolate mit einem Valin an selbiger Position. So könnten sich die Isoleucin-haltigen PCV2-Isolate dem Wirtsimmunsystem besser entziehen und über eine verlängerte Virusreplikation zu den höheren Virusmengen führen. Diese Annahme wird durch die Ergebnisse von Fenaux et al. (2004b) unterstützt. Fenaux et al. (2004) beschrieben Auswirkungen auf das Replikationsvermögens von PCV2-Isolaten durch eine mögliche Konformationsänderung des Kapsidproteins infolge von Sequenzvariationen. Wobei die Variation (R191S) ebenfalls in einer immunogenen Region (Lekcharoensuk et al. 2004) lokalisiert war.

Bezogen auf SNP p.185L>M waren PCV2-Isolate mit der Aminosäure Methionin an Position 185 mit einer niedrigeren Virusmenge assoziiert als PCV2-Isolate mit der Aminosäure Leucin. Des Weiteren bestand ein signifikanter Zusammenhang zwischen SNP p.185L>M und dem PCV2-Genotyp. Alle PCV2a-Sequenzen besaßen im untersuchten Material an Position 185 die Aminosäure Methionin, während die PCV2b-Sequenzen zu 88,5 % die Aminosäure Leucin und zu 11,5 % die Aminosäure Methionin trugen. Bereits de Boisséson et al. (2004) und Opriessnig (2006) beschrieben die Aminosäuresubstitution von Leucin zu Methionin an Proteinposition 185 als eine hochfrequente Mutation in PCV2a-Isolaten.

Weiterhin bestand ein signifikanter Zusammenhang zum Impfstatus. Im untersuchten Material wurde die Variabilität des Aminosäuremusters in Abhängigkeit vom Impfstatus beobachtet. Während Methionin noch zu 39,4 % in den PCV2-Sequenzen aus ungeimpften Betrieben vertreten war, wiesen nur noch 7,1 % der PCV2-Sequenzen aus geimpften Betrieben ein Methionin an dieser Position auf. Eine PCV2-Impfung scheint Virus-Isolate mit der Aminosäure Methionin an Position 185 des Kapsidproteins besser abzudecken als Virusisolate mit der Aminosäure Leucin an selbiger Position. Da der SNP p.185L>M in einem immunogenen Bereich des ORF2 liegt, ist es denkbar, dass sich die Änderung der Aminosäurefrequenz an Position 185 des Kapsidprotein über eine Konformationsänderung auf die Antigenität der PCV2-Isolate auswirkt. Womöglich werden die PCV2-Isolate mit einem Leucin im Kapsidprotein von den Impfstoff-induzierten, neutralisierenden Antikörpern der aktuellen PCV2a-basierenden Impfstoffe weniger gut gebunden, wodurch sich die Virusisolate dem Wirtsimmunsystem entziehen und über eine verlängerte Virusreplikation zu den höheren Virusmengen sowie zu den PCVD Fällen in geimpften Beständen führen könnten. Die Annahme potenzieller immunmodulatorischer Effekte durch Sequenzvariation innerhalb der immunogenen Epitope des ORF2 im Zusammenhang mit der PCV2-Impfung wird durch die

Ergebnisse von Tribble et al. (2012, 2011) unterstützt. Tribble et al. (2011) verglichen die Antikörpererkennung immunogener Epitope des Kapsidproteins nach PCV2-Impfung, experimenteller Infektion und klinischer Erkrankung. Während PCV2-geimpfte Tiere bevorzugt nahezu gegen das gesamte Kapsidprotein (aa 43-233) gerichtete Antikörper besaßen, wiesen PCVD erkrankte Tiere gegen das Epitop C (aa 167-207), insbesondere gegen das Segment aa 169-180, gerichtete Antikörper auf. Des Weiteren waren die gegen das Epitop C gerichteten Antikörper nicht am Immunschutz beteiligt. Laut Tribble et al. (2011) fungiert das Epitop C möglicherweise als Köder für das Immunsystem, um die Bildung von Antikörper ohne Schutzwirkung zu induzieren. Ähnlich der bereits von HIV und PRRSV bekannten Umleitung der humoralen Immunität (Tribble et al. 2011). In weiterführenden Untersuchungen beschrieb Tribble et al. (2012) die Bildung einer schützende Immunität in Abhängigkeit von der räumlichen Struktur des Kapsidproteins. Wenn es in der quartären Form vorlag, wurde das gesamte Kapsidprotein erkannt, gegen aa 43-233 im Epitop gerichtet Antikörper erzeugt und eine schützende Immunität gebildet. Hingegen entstand keine schützende Immunität, wenn das Kapsidprotein infolge der Virusreplikation in infizierten Zellen in der tertiären oder einer niedrigeren Form vorlag. Daraufhin wurden gegen aa 167-207 im Epitop gerichtete Antikörper ohne Schutzwirkung gebildet (Tribble et al. 2012). Weitere Untersuchungen sind erforderlich, um potentielle Auswirkungen der Substitutionen aus der vorliegenden Arbeit, insbesondere von p.185M>L, auf die räumliche Struktur des Kapsidproteins und das PCV2-Replikationsvermögen zu bestätigen. So könnte in Anlehnung an Tribble et al. (2011, 2012) Studien, mithilfe von Neutralisationstest geklärt werden, ob die identifizierten Substitutionen der vorliegenden Arbeit den vermuteten Immun-Escape gegen PCV2-Impfantikörper veranlassen.

Weitere Aminosäuresubstitutionen wurden innerhalb des Kapsidproteins identifiziert. Jedoch wurden sie jeweils nur anhand von einer oder zwei der 62 PCV2-Sequenzen nachgewiesen. Damit konnten sie keiner vernünftigen statistischen Analyse unterzogen werden. Unter ihnen waren die Aminosäurepositionen 59, 64 und 190 des Kapsidproteins für die Lekcharoensuk et al. (2004) Funktionen in der Epitop Erkennung nachwiesen und Kekarainen et al (2014) eine Variabilität belegte. Weitere Studien mit einer höheren Anzahl an Sequenzen sind erforderlich, um mögliche Auswirkungen dieser Substitutionen im Hinblick auf die Impfung, Viruslast oder Pathogenität detektieren zu können. In der vorliegenden Arbeit zeigten sich die Aminosäurepositionen 86, 131, 133 und 136 zwischen den PCV2a- und PCV2b-Sequenzen variabel und bestätigen die Ergebnisse von Kekarainen et al. (2014). Für diese

Aminosäurepositionen beschreiben Mahe et al. (2000) und Meng (2013) eine Beteiligung an der Epitop-Bildung des PCV2. Saha et al. (2012b) lokalisierte die Aminosäuren 59, 63, 89, 130, 133, 206 und 210 auf der äußere Oberfläche des Kapsidproteins. Liu et al. (2013) unterstrichen die Bedeutung der Aminosäurepositionen 59 und 60. In der vorliegenden Arbeit wiesen die Sequenzen eine Variabilität für die Aminosäurepositionen 59, 63, 89 und 133 auf. Liu et al. (2013), Huang et al. (2011) und Saha et al. (2012a) belegten für die Aminosäuresubstitution an Position 59 eine phänotypische Schalterfunktion. Obwohl in der vorliegenden Studie die Allele der Positionen 59 und 63 getrennt betrachtet wurden, konnten keine signifikanten Assoziationen zur Impfung oder Viruslast dargestellt werden. Liu et al. (2013) wiesen nach, dass die Substitution der Iminosäure Prolin zu Threonin (Hydroxylgruppe) an Position 151 keine Auswirkungen auf die Antikörper bindende Funktion hat. Das gleiche konnte für die Substitutionen an den Positionen 57, 63, 121 und 210 belegt werden. In der vorliegenden Studie waren jedoch zusätzliche Aminosäuren an den Positionen 63 und 121 beteiligt. Es sind weitere Untersuchungen erforderlich, um diesen Aspekt zu klären.

Fazit:

Nach erfolgreicher Einführung einer PCV2-Impfung 2008 sank die PCV2-Viruslast innerhalb der betroffenen Bestände unter die Nachweisgrenze. Seit dem dritten Quartal 2011 ist ein zunehmender Anstieg der Viruslast zu beobachten, trotz weiterhin durchgeführter PCV2-Impfung. Sequenzvergleiche geimpfter und nicht-geimpfter Bestände zum Zeitpunkt der Einführung der Impfung und zu Beginn des Wiederanstiegs der Viruslast ergaben eine signifikante Verdrängung des Genotypen PCV2a zugunsten von PCV2b. Obwohl die Sequenzen eine hohen Variabilität aufwiesen und daher keine spezifische Sequenz mit den Beobachtungen in Verbindung gebracht werden konnte. Ließ sich eine signifikante Assoziation für einige SNPs zu PCV2-Genotyp, Virusmenge und Impfstatus darstellen. Von besonderer Bedeutung war der im ORF2 lokalisierte SNP g.1182G>T, der eine Aminosäuresubstitution innerhalb eines immunogenen Epitopes des Kapsidproteins zur Folge hat. Die Ergebnisse der vorliegenden Dissertation sprechen für einen signifikanten Einfluss der Impfung auf PCV2-Sequenz, PCV2-Genotyp-Verteilung und PCV2-Virusmenge.

6 Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es mittels vergleichender Sequenzanalyse, Mutationen innerhalb der für Antigenität und Virusreplikation zuständigen Gene des PCV2-Genoms mit möglicher Assoziation zwischen PCV2-Genotyp, PCV2-Impfstatus und PCV2-Virusmenge in 62 PCV2-Sequenzen aus geimpften und nicht-geimpften Schweinebeständen aus Deutschland zu untersuchen. Als Ausgangsmaterial dienten PCV2-positive Proben, die im Rahmen des Schweinegesundheitsdienstes der Klinik für Wiederkäuer und Schweine, Professur Schweinekrankheiten, der Justus-Liebig-Universität, im Zeitraum 2008 bis 2012 gesammelt wurden. Anhand der beim Bestandsbesuch erstellten Anamnesebögen wurde eine Vorauswahl der Proben nach Herkunft aus geimpften und nicht-geimpften Beständen vorgenommen. 83,9 % der untersuchten 62 PCV2-Sequenzen entsprachen dem Genotyp PCV2b und 14,5 % dem Genotyp PCV2a. Die PCV2-Variante mPCV2b konnte nur ein einziges Mal unter den 62 Sequenzen nachgewiesen werden. Die von den Genotypen realisierten PCV2-Erregermengen waren mit $10^{3,6}$ für PCV2a und $10^{5,5}$ für PCV2b signifikant ($p=0,011$) verschieden. Einiges spricht dafür, dass die PCV2-Impfung an der Verdrängung des Genotyps 2a durch 2b zumindest beteiligt sein könnte, da in den Proben der geimpften Bestände bis auf eine Ausnahme nur der Genotyp PCV2b vertreten war. Durch vergleichende Sequenzanalysen konnten Mutationen detektiert und Assoziationen zu PCV2-Virusmenge, PCV2-Genotyp und PCV2-Impfstatus hergestellt werden. Von insgesamt 47 SNPs im ORF2 mit Aminosäuresubstitution wiesen der SNP g.1566C>T (c.169G>A; p.57I>V) und der SNP g.1182G>T (c.553C>A; p.185L>M) eine signifikante Assoziation ($p=0,005$) zur PCV2-Virusmenge auf. Beide SNPs sind jeweils in immunogenen Bereichen des Kapsidproteins lokalisiert. Des Weiteren bestand eine signifikante Assoziation zwischen dem Aminosäureaustausch des SNP g.1182G>T und den PCV2-Genotypen ($p < 0,001$) sowie zum Impfstatus der 62 PCV2-Sequenzen ($p = 0,03$).

In der vorliegenden Arbeit konnte anhand der 62 untersuchten PCV2-Sequenzen ein signifikanter Vorteil der PCV2b gegenüber den PCV2a-Sequenzen nachgewiesen werden. Obwohl die Sequenzen eine hohe Variabilität aufwiesen und somit keine spezifische Sequenz mit den Beobachtungen in Verbindung gebracht werden konnte. Ließ sich eine signifikant Korrelation einiger SNPs zu PCV2-Genotyp, PCV2-Impfstatus und PCV2-Virusmenge nachweisen. Von großer Relevanz hierbei war der im ORF2 lokalisierte SNP an Genomposition 1182 (g.1182G>T), welcher eine Aminosäuresubstitution innerhalb eines immunogenen Epitopes des Kapsidproteins veranlasste. Es wurde ein signifikanter Zusammenhang zwischen PCV2-Impfung und PCV2-Sequenz, PCV2-Genotyp und PCV2-Virusmenge aufgezeigt.

7 Summary

The present study investigates hints of adaptation based on the analysis of sequence variation of PCV2 amplicates from vaccinated and non-vaccinated herds. 62 complete PCV2-sequences were obtained from the respective herds. Sequence data were substantiated by the quantification of sample viral loads. Sequences were compared to the PCV2 reference sequences of PCV2a (Acc. no. AF055392) and PCV2b (Acc. no. AF055394). Nine of the 62 PCV2 sequences belonged to genotype 2a (14.5%) and 53 to genotype 2b (83.9%). One of the PCV2b sequences was identified as mPCV2b (mutant PCV2b). Samples of the genotype 2b had significantly higher virus loads per μg DNA than samples representing genotype 2a ($p = 0,011$). With one exception, only genotype 2b was present on vaccinating herds, providing evidence for some association between vaccination and PCV2 genotype. There is some evidence that the PCV2 vaccination on the displacement of the genotype 2a through 2b may be at least involved because, with one exception only the genotype PCV2b was represented in the samples of vaccinated herds.

Sequence analysis revealed correlations and associations of SNPs with PCV2 genotype, vaccination status and virus load. From a total of 47 SNPs in ORF2 leading to an amino acid substitution, the SNPs g.1566C> T (c.169G>A; p.57I>V) and g.1182G> T (c.553C > A, p.185L > M) showed significant associations with PCV2 virus load ($p = 0.005$). Both SNPs are located in the immunogenic regions of the capsid protein. The substitution of Leucine by Methionine at amino acid position 185 (p.185L > M; g.1182G>T) was significantly associated with PCV2 genotypes. All PCV2a sequences had the amino acid Methionine. Simultaneously the SNP at nucleotide position 1182 (g.1182G > T) was significantly associated with the status of vaccination ($p = 0.03$). Our data provide some evidence that PCV2 vaccination may select for PCV2 isolates with the amino acid Leucine at position 185 of the capsid protein.

In conclusion, the comparison of 62 complete PCV2 sequences from vaccinated and non-vaccinated herds identified a significant decrease in PCV2a genotypes in favour of PCV2b. Sequences were highly variable and some SNPs showed a significantly association with genotype (2a vs. 2b), vaccination status and virus load. The most important SNP was located at nucleotide 1182 of PCV2 (g.1182G > T), leading to an amino acid substitution within one of the capsid epitopes. The results provide evidence for a selectional impact of vaccination on PCV2 sequence, PCV2 genotype and PCV2 load.

8 Literaturverzeichnis

- Albina, E.; Truong, C.; Hutet, E.; Blanchard, P.; Cariolet, R.; L'Hospitalier, R. et al. (2001): An Experimental Model for Post-weaning Multisystemic Wasting Syndrome (PMWS) in Growing Piglets. In: *Journal of Comparative Pathology* 125 (4), S. 292–303.
- Allan, G. M.; Ellis, J. A. (2000): Porcine Circoviruses: A Review. In: *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 12 (1), S. 3–14.
- Allan, G. M.; McNeilly, F.; Ellis, J.; Krakowka, S.; Meehan, B.; McNair, I. et al. (2000): Experimental infection of colostrum deprived piglets with porcine circovirus 2 (PCV2) and porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) potentiates PCV2 replication. In: *Arch Virol* 145 (11), S. 2421–2429.
- Allan, G. M.; McNeilly, F.; Kennedy, S.; Daft, B.; Ellis, J. A.; Haines, D. M. et al. (1998): Isolation of Porcine Circovirus-like Viruses from Pigs with a Wasting Disease in the USA and Europe. In: *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 10 (1), S. 3–10.
- Allan, G. M.; McNeilly, F.; McMenamy, M.; McNair, I.; Krakowka, S. G.; Timmusk, S. et al. (2007): Temporal Distribution of Porcine Circovirus 2 Genogroups Recovered from Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome-Affected and -Nonaffected Farms in Ireland and Northern Ireland. In: *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 19 (6), S. 668–673.
- Allan, G. M. et al; Allan, G.M; Kennedy, S.; McNeilly, F.; Foster, J.C; Ellis, J.A et al. (1999): Experimental Reproduction of Severe Wasting Disease by Co-infection of Pigs with Porcine Circovirus and Porcine Parvovirus. In: *Journal of Comparative Pathology* 121 (1), S. 1–11.
- Allan GM, McNeilly F, Cassidy JP, Reilly GA, Adair B. et al (1995): Pathogenesis of porcine circovirus; experimental infections of colostrum deprived piglets and examination of pig foetal material. In: *Veterinary Microbiology* 44, S. 49–64.
- Allemandou, Aude; Grasland, Béatrice; Hernandez-Nignol, Anne-Cécile; Kéranflec'h, André; Cariolet, Roland; Jestin, André (2011): Modification of PCV-2 virulence by substitution of the genogroup motif of the capsid protein. In: *Vet Res* 42 (1), S. 54.
- Andraud, M.; Rose, N.; Grasland, B.; Pierre, J.S; Jestin, A.; Madec, F. (2009): Influence of husbandry and control measures on porcine circovirus type 2 (PCV-2) dynamics within a farrow-to-finish pig farm: A modelling approach. In: *Preventive Veterinary Medicine* 92 (1-2), S. 38–51.
- Baekbo, P.; Kristensen, C. S.; Larsen, L. E. (2012): Porcine Circovirus Diseases: A review of PMWS. In: *Transboundary and Emerging Diseases* 59, S. 60–67.
- Beach, Nathan M.; Meng, Xiang-Jin (2012): Efficacy and future prospects of commercially available and experimental vaccines against porcine circovirus type 2 (PCV2). In: *Virus Research* 164 (1-2), S. 33–42.
- Beach, Nathan M.; Ramamoorthy, Sheela; Opriessnig, Tanja; Wu, Stephen Q.; Meng, Xiang-Jin (2010): Novel chimeric porcine circovirus (PCV) with the capsid gene of the emerging PCV2b subtype cloned in the genomic backbone of the non-pathogenic PCV1 is attenuated in vivo and induces protective and cross-protective immunity against PCV2b and PCV2a subtypes in pigs. In: *Vaccine* 29 (2), S. 221–232.
- Blanchard, P. (2003): An ORF2 protein-based ELISA for porcine circovirus type 2 antibodies in post-weaning multisystemic wasting syndrome. In: *Veterinary Microbiology* 94 (3), S. 183–194.

- Blanchard, P.; Mahé, D.; Cariolet, R.; Keranflec'h, A.; Baudouard, M.A; Cordioli, P. et al. (2003): Protection of swine against post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) by porcine circovirus type 2 (PCV2) proteins. In: *Vaccine* 21 (31), S. 4565–4575.
- Blinkova, O.; Victoria, J.; Li, Y.; Keele, B. F.; Sanz, C.; Ndjango, J.-B N. et al. (2009): Novel circular DNA viruses in stool samples of wild-living chimpanzees. In: *Journal of General Virology* 91 (1), S. 74–86.
- Blunt, R.; McOrist, S.; McKillen, J.; McNair, I.; Jiang, T.; Mellits, K. (2011): House fly vector for porcine circovirus 2b on commercial pig farms. In: *Veterinary Microbiology* 149 (3-4), S. 452–455.
- Bolin, S. R.; Stoffregen, W. C.; Nayar, G. P. S.; Hamel, A. L. (2001): Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome Induced after Experimental Inoculation of Cesarean-Derived, Colostrum-Deprived Piglets with Type 2 Porcine Circovirus. In: *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 13 (3), S. 185–194.
- Brunborg, I. M.; Jonassen, C. M.; Moldal, T.; Bratberg, B.; Lium, B.; Koenen, F.; Schonheit, J. (2007): Association of Myocarditis with High Viral Load of Porcine Circovirus Type 2 in Several Tissues in Cases of Fetal Death and High Mortality in Piglets. A Case Study. In: *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 19 (4), S. 368–375.
- Carman Susy, Beverly McEwen (2006): Porcine circovirus-2 associated disease in swine in Ontario (2004 to 2005). In: *Can Vet J* 47 (8), S. 761–762.
- Carman Susy, Hugh Y. Cai Josepha DeLay Sameh A. Youssef Beverly J. McEwen Carl A. Gagnon; Carman, Susy; Cai, Hugh Y.; DeLay, Josepha; Youssef, Sameh A.; McEwen, Beverly J. et al. (2008): The emergence of a new strain of porcine circovirus-2 in Ontario and Quebec swine and its association with severe porcine circovirus associated disease — 2004–2006. In: *Can J Vet Res* 72 (3), S. 259–268.
- Chae, C. (2005): A review of porcine circovirus 2-associated syndromes and diseases. In: *The Veterinary Journal* 169 (3), S. 326–336.
- Chae, Chanhee (2012): Commercial porcine circovirus type 2 vaccines: Efficacy and clinical application. In: *The Veterinary Journal* 194 (2), S. 151–157.
- Chae, Chanhee (2015): An emerging porcine circovirus type 2b mutant (mPCV2b) originally known as PCV2d. In: *The Veterinary Journal* 203 (1), S. 6–9.
- Chaiyakul, M.; Hsu, K.; Dardari, R.; Marshall, F.; Czub, M. (2010): Cytotoxicity of ORF3-Proteins from a Nonpathogenic and a Pathogenic Porcine Circovirus. In: *Journal of Virology* 84 (21), S. 11440–11447.
- Chang, Hui-Wen; Jeng, Chian-Ren; Liu, Jiuan J.; Lin, Tsang-Long; Chang, Chih-Cheng; Chia, Mi-Yuan et al. (2005): Reduction of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection in swine alveolar macrophages by porcine circovirus 2 (PCV2)-induced interferon-alpha. In: *Veterinary Microbiology* 108 (3-4), S. 167–177.
- Cheung, A. K. (2004): Identification of the essential and non-essential transcription units for protein synthesis, DNA replication and infectious virus production of Porcine circovirus type 1. In: *Arch Virol* 149 (5), S. 975–988.
- Cheung, A. K.; Bolin, S. R. (2002): Kinetics of porcine circovirus type 2 replication. In: *Arch Virol* 147 (1), S. 43–58.

- Cheung, A. K.; Lager, K. M.; Kohutyuk, O. I.; Vincent, A. L.; Henry, S. C.; Baker, R. B. et al. (2007): Detection of two porcine circovirus type 2 genotypic groups in United States swine herds. In: *Arch Virol* 152 (5), S. 1035–1044.
- Cheung, Andrew K. (2003a): Comparative analysis of the transcriptional patterns of pathogenic and nonpathogenic porcine circoviruses. In: *Virology* 310 (1), S. 41–49.
- Cheung, Andrew K. (2003b): The essential and nonessential transcription units for viral protein synthesis and DNA replication of porcine circovirus type 2. In: *Virology* 313 (2), S. 452–459.
- Cheung, Andrew K. (2003c): Transcriptional Analysis of Porcine Circovirus Type 2. In: *Virology* 305 (1), S. 168–180.
- Cheung, Andrew K. (2009): Homologous recombination within the capsid gene of porcine circovirus type 2 subgroup viruses via natural co-infection. In: *Arch Virol* 154 (3), S. 531–534.
- Cheung, Andrew K. (2012): Porcine circovirus: Transcription and DNA replication. In: *Virus Research* 164 (1-2), S. 46–53.
- Cheung, Andrew K.; Greenlee, Justin J. (2011): Identification of an amino acid domain encoded by the capsid gene of porcine circovirus type 2 that modulates intracellular viral protein distribution during replication. In: *Virus Research* 155 (1), S. 358–362.
- Choi, C.; Chae, C. (2001): Colocalization of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus and Porcine Circovirus 2 in Porcine Dermatitis and Nephropathy Syndrome by Double-Labeling Technique. In: *Veterinary Pathology* 38 (4), S. 436–441.
- Correa, A. M. R.; Zlotowski, P.; Barcellos, D. E. S. N. de; da Cruz, C. E. F.; Driemeier, D. (2007): Brain Lesions in Pigs Affected with Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome. In: *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 19 (1), S. 109–112.
- Cortey, M.; Pileri, E.; Sibila, M.; Pujols, J.; Balasch, M.; Plana, J.; Segalés, J. (2011a): Genotypic shift of porcine circovirus type 2 from PCV-2a to PCV-2b in Spain from 1985 to 2008. In: *The Veterinary Journal* 187 (3), S. 363–368.
- Cortey, Martí; Olvera, Alex; Grau-Roma, Llorenç; Segalés, Joaquim (2011b): Further comments on porcine circovirus type 2 (PCV2) genotype definition and nomenclature. In: *Veterinary Microbiology* 149 (3-4), S. 522–523.
- Darwich, L.; Balasch, M.; Plana-Duran, J.; et al. (2003a): Cytokine profiles of peripheral blood mononuclear cells from pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome in response to mitogen, superantigen or recall viral antigens. In: *Journal of General Virology* 84 (12), S. 3453–3457.
- Darwich, L.; Pie, S.; Rovira, A.; et al. (2003b): Cytokine mRNA expression profiles in lymphoid tissues of pigs naturally affected by postweaning multisystemic wasting syndrome. In: *Journal of General Virology* 84 (8), S. 2117–2125.
- Darwich, L.; Segalés, J.; Resendes, A.; Balasch, M.; Plana-Durán, J.; Mateu, E. (2008): Transient correlation between viremia levels and IL-10 expression in pigs subclinically infected with porcine circovirus type 2 (PCV2). In: *Research in Veterinary Science* 84 (2) S. 194-198
- den Dunnen, J.; Antonarakis, S. (2001): Nomenclature for the description of human sequence variations. In: *Hum Genet* 109 (1), S. 121–124.

- Díaz, Ivan; Cortey, Martí; Darwich, Laila; Sibila, Marina; Mateu, Enric; Segalés, Joaquim (2012): Subclinical porcine circovirus type 2 infection does not modulate the immune response to an Aujeszky's disease virus vaccine. In: *The Veterinary Journal* 194 (1), S. 84–88.
- Dorr PM, Baker RB, Almond GW, Wayne SR, Gebreyes WA (2007): Epidemiologic assessment of porcine circovirus type 2 coinfection with other pathogens in swine. In: *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 230, S. 244–250.
- Drolet Richard; Stephane Thibault; Sylvie Allaire; Jill R. Thomson; Stan H. Done (1999): Porcine dermatitis and nephropathy syndrome (PDNS): An overview of the disease. In: *Swine Health and Production* 7 (6), S. 283–285.
- Dulac, G. and Afshar A. (1989): Porcine Circovirus Antigens in PK-15 Cell Line (ATCC CCL-33) and Evidence of Antibodies to Circovirus in Canadian Pigs. In: *Can J Vet Res* 53, S. 431–433.
- Dupont, K.; Nielsen, E.O; Bækbo, P.; Larsen, L.E (2008): Genomic analysis of PCV2-Isolates from Danish archives and a current PMWS case–control study supports a shift in genotypes with time. In: *Veterinary Microbiology* 128 (1-2), S. 56–64.
- Duran CO, Ramos-Vara JA Render JA (1997): Porcine dermatitis and nephropathy syndrome: A new condition to include in the differential diagnosis list for skin discoloration in swine. In: *Swine Health and Production* 5 (6), S. 241–244.
- Edwards, S.; Sands, J. (1994): Evidence of circovirus infection in British pigs. In: *Veterinary Record* 134 (26), S. 680–681.
- Eddicks, M.; Fux, R.; Szikora, F.; Eddicks, L.; Majzoub-Altweck, M.; Hermanns, W.; Sutter, G.; Palzer, A.; Banholzer, E.; Ritzmann, M. (2015): Detection of a new cluster of porcine circovirus type 2b strains in domestic pigs in Germany. In: *Veterinary Microbiology* 176 (3-4), S. 337-343
- Ellis, J. A.; Bratanich, A.; Clark, E. G.; Allan, G.; Meehan, B.; Haines, D. M. et al. (2000): Coinfection by Porcine Circoviruses and Porcine Parvovirus in Pigs with Naturally Acquired Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome. In: *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 12 (1), S. 21–27.
- Ellis J.; Hassard L.; Clark E.; Harding J.; Allan G.; Willson P. (1998): Isolation of circovirus from lesions of pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. In: *Can Vet J* (39), S. 44–51.
- Fachinger, Vicky; Bischoff, Ralf; Jedidia, Samir Ben; Saalmüller, Armin; Elbers, Knut (2008): The effect of vaccination against porcine circovirus type 2 in pigs suffering from porcine respiratory disease complex. In: *Vaccine* 26 (11), S. 1488–1499.
- Fenaux, M.; Opriessnig, T.; Halbur, P. G.; Elvinger, F.; Meng, X. J. (2004a): A Chimeric Porcine Circovirus (PCV) with the Immunogenic Capsid Gene of the Pathogenic PCV Type 2 (PCV2) Cloned into the Genomic Backbone of the Nonpathogenic PCV1 Induces Protective Immunity against PCV2 Infection in Pigs. In: *Journal of Virology* 78 (12), S. 6297–6303.
- Fenaux, M.; Opriessnig, T.; Halbur, P. G.; Meng, X. J. (2003): Immunogenicity and Pathogenicity of Chimeric Infectious DNA Clones of Pathogenic Porcine Circovirus Type 2 (PCV2) and Nonpathogenic PCV1 in Weanling Pigs. In: *Journal of Virology* 77 (20), S. 11232–11243.

- Fenaux, M.; T. Opriessnig; P. G. Halbur; F. Elvinger; X. J. Mengl (2004b): Two Amino Acid Mutations in the Capsid Protein of Type 2 Porcine Circovirus (PCV2) Enhanced PCV2 Replication In Vitro and Attenuated the Virus In Vivo. In: *Journal of Virology* 78 (24), S. 13440–13446.
- Finsterbusch, Tim; Mankertz, Annette (2009): Porcine circoviruses—Small but powerful. In: *Virus Research* 143 (2), S. 177–183.
- Finsterbusch, Tim; Steinfeldt, Tobias; Doberstein, Kai; Rödner, Claudia; Mankertz, Annette (2009): Interaction of the replication proteins and the capsid protein of porcine circovirus type 1 and 2 with host proteins. In: *Virology* 386 (1), S. 122–131.
- Firth, C.; Charleston, M. A.; Duffy, S.; Shapiro, B.; Holmes, E. C. (2009): Insights into the Evolutionary History of an Emerging Livestock Pathogen: Porcine Circovirus 2. In: *Journal of Virology* 83 (24), S. 12813–12821.
- Fort, M.; Sibila, M.; Allepuz, A.; Mateu, E.; Roerink, F.; Segalés, J. (2008): Porcine circovirus type 2 (PCV2) vaccination of conventional pigs prevents viremia against PCV2-Isolates of different genotypes and geographic origins. In: *Vaccine* 26 (8), S. 1063–1071.
- Fort, M.; Sibila, M.; Pérez-Martín, E.; Nofrarías, M.; Mateu, E.; Segalés, J. (2009): One dose of a porcine circovirus 2 (PCV2) sub-unit vaccine administered to 3-week-old conventional piglets elicits cell-mediated immunity and significantly reduces PCV2 viremia in an experimental model. In: *Vaccine* 27 (30), S. 4031–4037.
- Fort, Maria; Sibila, Marina; Nofrarías, Miquel; Pérez-Martín, Eva; Olvera, Alex; Mateu, Enric; Segalés, Joaquim (2010): Porcine circovirus type 2 (PCV2) Cap and Rep-Proteins are involved in the development of cell-mediated immunity upon PCV2 infection. In: *Veterinary Immunology and Immunopathology* 137 (3-4), S. 226–234.
- Fraile, Lorenzo; Grau-Roma, Llorenç; Sarasola, Patxi; Sinovas, Nuria; Nofrarías, Miquel; López-Jimenez, Rosa et al. (2012a): Inactivated PCV2 one shot vaccine applied in 3-week-old piglets: Improvement of production parameters and interaction with maternally derived immunity. In: *Vaccine* 30 (11), S. 1986–1992.
- Fraile, Lorenzo; Sibila, Marina; Nofrarías, Miquel; López-Jimenez, Rosa; Huerta, Eva; Llorens, Anna et al. (2012b): Effect of sow and piglet porcine circovirus type 2 (PCV2) vaccination on piglet mortality, viraemia, antibody titre and production parameters. In: *Veterinary Microbiology* 161 (1-2), S. 229–234.
- Gagnon, Carl A.; Music, Nedzad; Fontaine, Guy; Tremblay, Donald; Harel, Josée (2010): Emergence of a new type of porcine circovirus in swine (PCV): A type 1 and type 2 PCV recombinant. In: *Veterinary Microbiology* 144 (1-2), S. 18–23.
- Gagnon CA.; Tremblay D.; Tijssen P.; Venne MH.; Houde A; Elahi SM. (2007): The emergence of porcine circovirus 2b genotype (PCV-2b) in swine in Canada. In: *Canadian veterinary journal* 48 (8), S. 811–819.
- Gerber, Priscilla F.; Garrocho, Flávia M.; Lana, Ângela M.Q; Lobato, Zélia I.P (2011): Serum antibodies and shedding of infectious porcine circovirus 2 into colostrum and milk of vaccinated and unvaccinated naturally infected sows. In: *The Veterinary Journal* 188 (2), S. 240–242.
- Gerber, Priscilla F.; Johnson, John; Shen, Huigang; Striegel, Dave; Xiao, Chao-Ting; Halbur, Patrick G.; Opriessnig, Tanja (2013): Association of concurrent porcine circovirus (PCV) 2a and 2b infection with PCV associated disease in vaccinated pigs. In: *Research in Veterinary Science* 95 (2), S. 775–781.

- Gibbs, M. J.; Weiller, G. F. (1999): Evidence that a plant virus switched hosts to infect a vertebrate and then recombined with a vertebrate-infecting virus. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96 (14), S. 8022–8027.
- Gillespie, J.; Juhan, N.M; DiCristina, J.; Key, K.F; Ramamoorthy, S.; Meng, X.J (2008): A genetically engineered chimeric vaccine against porcine circovirus type 2 (PCV2) is genetically stable in vitro and in vivo. In: *Vaccine* 26 (33), S. 4231–4236.
- Gilpin, D.F; McCullough, K.; Meehan, B.M; McNeilly, F.; McNair, I.; Stevenson, L.S et al. (2003): In vitro studies on the infection and replication of porcine circovirus type 2 in cells of the porcine immune system. In: *Veterinary Immunology and Immunopathology* 94 (3-4), S. 149–161.
- Grau-Roma, L.; Crisci, E.; Sibila, M.; López-Soria, S.; Nofrarias, M.; Cortey, M. et al. (2008): A proposal on porcine circovirus type 2 (PCV2) genotype definition and their relation with postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) occurrence. In: *Veterinary Microbiology* 128 (1-2), S. 23–35.
- Grierson, S. S.; King, D. P.; Wellenberg, G. J.; Banks, M. (2004): Genome sequence analysis of 10 Dutch porcine circovirus type 2 (PCV-2) isolates from a PMWS case-control study. In: *Research in Veterinary Science* 77 (3), S. 265–268.
- Guo, Long J.; Lu, Yue H.; Wei, Yan W.; Huang, Li P.; Liu, Chang M. (2010): Porcine circovirus type 2 (PCV2): genetic variation and newly emerging genotypes in China. In: *Virology* 419 (1), S. 1–12.
- Guo, Longjun; Fu, Yujie; Wang, Yiping; Lu, Yuehua; Wei, Yanwu; Tang, Qinghai et al. (2012): A Porcine Circovirus Type 2 (PCV2) Mutant with 234 Amino Acids in Capsid Protein Showed More Virulence In Vivo, Compared with Classical PCV2a/b Strain. In: *PLoS ONE* 7 (7), S. e41463.
- Guo, Longjun; Lu, Yuehua; Wei, Yanwu; Huang, Liping; Wu, Hongli; Liu, Changming (2011): Porcine circovirus genotype 2a (PCV2a) and genotype 2b (PCV2b) recombinant mutants showed significantly enhanced viral replication and altered antigenicity in vitro. In: *Virology* 419 (2), S. 57–63.
- Ha, Y.; Ahn, K.K; Kim, B.; Cho, K.-D; Lee, B.H; Oh, Y.-S et al. (2009): Evidence of shedding of porcine circovirus type 2 in milk from experimentally infected sows. In: *Research in Veterinary Science* 86 (1), S. 108–110.
- Ha, Y.; Jung, K.; Chae, C. (2005): Lack of evidence of porcine circovirus type 1 and type 2 infection in piglets with congenital tremors in Korea. In: *Vet. Rec.* 156 (12), S. 383–384.
- Ha, Y.; Shin, J. H.; Chae, C. (2010): Colostral transmission of porcine circovirus 2 (PCV-2): reproduction of post-weaning multisystemic wasting syndrome in pigs fed milk from PCV-2-infected sows with post-natal porcine parvovirus infection or immunostimulation. In: *Journal of General Virology* 91 (6), S. 1601–1608.
- Hamberg, A.; Ringler, S.; Krakowka, S. (2007): A Novel Method for the Detection of Porcine Circovirus Type 2 Replicative Double Stranded Viral DNA and Nonreplicative Single Stranded Viral DNA in Tissue Sections. In: *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 19 (2), S. 135–141.
- Hamel, A. L. Lin L. L. Nayar G. P. (1998): Nucleotide sequence of porcine circovirus associated with postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs. In: *Journal of Virology* 72 (6), S. 5262–5267.

- Harding, J.C.S; Ellis, J.A; McIntosh, K.A; Krakowka, S. (2010): Dual heterologous porcine circovirus genogroup 2a/2b infection induces severe disease in germ-free pigs. In: *Veterinary Microbiology* 145 (3-4), S. 209–219.
- Harding JCS, Clark E. G. (1997): Recognizing and diagnosing postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). In: *Swine Health and Production* 5 (5), S. 201–203.
- Harms, P. A.; Sorden, S. D.; Halbur, P. G.; Bolin, S. R.; Lager, K. M.; Morozov, I.; Paul, P. S. (2001): Experimental Reproduction of Severe Disease in CD/CD Pigs Concurrently Infected with Type 2 Porcine Circovirus and Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus. In: *Veterinary Pathology* 38 (5), S. 528–539.
- Harms, Perry A.; D. MSV.M.; Patrick G. Halbur, D. PhDV.M.; Steven D. Sorden, D. PhD Dipl ACVPV.M. (2002): Three cases of porcine respiratory disease complex associated with porcine circovirus type 2 infection. In: *J Swine Health Prod* 10 (1), S. 27–30.
- He, J.; Cao, J.; Zhou, N.; Jin, Y.; Wu, J.; Zhou, J. (2013): Identification and Functional Analysis of the Novel ORF4 Protein Encoded by Porcine Circovirus Type 2. In: *Journal of Virology* 87 (3), S. 1420–1429.
- Hemann, M.; Beach, N.M; Meng, X.J; Halbur, P.G; Opriessnig, T. (2012): Vaccination with inactivated or live-attenuated chimeric PCV1–2 results in decreased viremia in challenge-exposed pigs and may reduce transmission of PCV2. In: *Veterinary Microbiology* 158 (1-2), S. 180–186.
- Hesse, Richard; Kerrigan, Maureen; Rowland, Raymond R.R (2008): Evidence for recombination between PCV2a and PCV2b in the field. In: *Virus Research* 132 (1-2), S. 201–207.
- Hoogland MJ, Opriessnig T. Halbur PG (2006): Effects of adjuvants on porcine circovirus type 2-associated lesions. In: *J Swine Health Prod* 14 (3), S. 133–139.
- Horlen, Kyle P.; Dritz, Steve S.; Nietfeld, Jerome C.; Henry, Steven C.; Hesse, Richard A.; Oberst, Richard et al. (2008): A field evaluation of mortality rate and growth performance in pigs vaccinated against porcine circovirus type 2. In: *Journal of the American Veterinary Medical Association* 232 (6), S. 906–912.
- Horlen KP, Schneider P. Anderson J. et al (2007): A cluster of farms experiencing severe porcine circovirus associated disease: Clinical features and association with the PCV2b genotype. In: *J. Swine Health Prod* 15 (5), S. 270–278.
- Horner, G. (1991): Pig circovirus antibodies present in New Zealand pigs. In: *Surveillance Vol.18 No.5 1991* 18 (5), S. 23.
- Hua, Tao; Wang, Xianwei; Bai, Juan; Zhang, Lili; Liu, Jie; Jiang, Ping (2013): Attenuation of porcine circovirus type-2b by replacement with the Rep-Gene of porcine circovirus type-1. In: *Virus Research* 173 (2), S. 270–279.
- Huang, Li P.; Lu, Yue H.; Wei, Yan W.; Guo, Long J.; Liu, Chang M. (2011): Identification of one critical amino acid that determines a conformational neutralizing epitope in the capsid protein of porcine circovirus type 2. In: *BMC Microbiol* 11 (1), S. 188.
- Jacobsen, Bjoern; Krueger, Lars; Seeliger, Frank; Bruegmann, Michael; Segalés, Joaquim; Baumgaertner, Wolfgang (2009): Retrospective study on the occurrence of porcine circovirus 2 infection and associated entities in Northern Germany. In: *Veterinary Microbiology* 138 (1-2), S. 27–33.

- Jantafong, Tippawan; Boonsoongnern, Alongkot; Poolperm, Pariwat; Urairong, Kitcha; Lekcharoensuk, Chalermopol; Lekcharoensuk, Porntippa (2011): Genetic characterization of porcine circovirus type 2 in piglets from PMWS-affected and -negative farms in Thailand. In: *Virology* 8 (1), S. 88.
- 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*. In: *Journal of Comparative Pathology* 135 (4), S. 176–182.
- Johnson, Charles S.; Joo, Han S.; Direksin, Kochakorn; Yoon, Kyoung-Jin; Choi, Young K. (2002): Experimental in utero inoculation of late-term swine fetuses with porcine circovirus type 2. In: *J. Vet. Diagn. Invest.* 14 (6), S. 507–512.
- Juhan, N.M; LeRoith, T.; Opriessnig, T.; Meng, X.J (2010): The open reading frame 3 (ORF3) of porcine circovirus type 2 (PCV2) is dispensable for virus infection but evidence of reduced pathogenicity is limited in pigs infected by an ORF3-null PCV2 mutant. In: *Virus Research* 147 (1), S. 60–66.
- Karuppappan, Anbu K.; Jong, Ming Hwa; Lee, Shu-Hwae; Zhu, Yu; Selvaraj, Madhan; Lau, Jennifer et al. (2009): Attenuation of porcine circovirus 2 in SPF piglets by abrogation of ORF3 function. In: *Virology* 383 (2), S. 338–347.
- Karuppappan, Anbu K.; Liu, Sen; Jia, Qiang; Selvaraj, Madhan; Kwang, Jimmy (2010): Porcine circovirus type 2 ORF3-Protein competes with p53 in binding to Pirh2 and mediates the deregulation of p53 homeostasis. In: *Virology* 398 (1), S. 1–11.
- Kawashima, K.; Tsunemitsu, H.; Horino, R.; Katsuda, K.; Onodera, T.; Shoji, T. et al. (2003): Effects of Dexamethasone on the Pathogenesis of Porcine Circovirus Type 2 Infection in Piglets. In: *Journal of Comparative Pathology* 129 (4), S. 294–302.
- Kekarainen, T. (2006): Prevalence of swine Torque teno virus in post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS)-affected and non-PMWS-affected pigs in Spain. In: *Journal of General Virology* 87 (4), S. 833–837.
- Kekarainen, T.; McCullough, K.; Fort, M.; Fossum, C.; Segalés, J.; Allan, G.M (2010): Immune responses and vaccine-induced immunity against Porcine circovirus type 2. In: *Veterinary Immunology and Immunopathology* 136 (3-4), S. 185–193.
- Kekarainen, T., Gonzalez, A., Llorens, A., Segalés, J. (2014): Genetic variability of porcine circovirus 2 in vaccinated and non-vaccinated commercial farms. In: *Journal of General Virology* 95 (Pt8), S. 1734-1742.
- 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. In: *Journal of Comparative Pathology* 122 (1), S. 9–24.
- Kennedy, S.; Segalés, J.; Rovira, A.; Scholes, S.; Domingo, M.; Moffett, D. et al. (2003): Absence of Evidence of Porcine Circovirus Infection in Piglets with Congenital Tremors. In: *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 15 (2), S. 151–156.
- Khaiseb, S.; Sydler, T.; Zimmermann, D.; Pospischil, A.; Sidler, X.; Brugnera, E. (2011): Coreplication of the Major Genotype Group Members of Porcine Circovirus Type 2 as a Prerequisite to Coevolution May Explain the Variable Disease Manifestations. In: *Journal of Virology* 85 (21), S. 11111–11120.
- Kim, D.; Kim, C.H; Han, K.; Seo, H.W; Oh, Y.; Park, C. et al. (2011): Comparative efficacy of commercial *Mycoplasma hyopneumoniae* and porcine circovirus 2 (PCV2) vaccines in

- pigs experimentally infected with *M. hyopneumoniae* and PCV2. In: *Vaccine* 29 (17), S. 3206–3212.
- Kim, Hye Kwon; Luo, Yuzi; Moon, Hyung Joon; Park, Seong Jun; Keum, Hyun Ok; Rho, Semi; Park, Bong Kyun (2009): Phylogenetic and recombination analysis of genomic sequences of PCV2-Isolated in Korea. In: *Virus Genes* 39 (3), S. 352–358.
- Kim, J.; Chung, H.-K; Chae, C. (2003): Association of porcine circovirus 2 with porcine respiratory disease complex. In: *The Veterinary Journal* 166 (3), S. 251–256.
- Kim, J.; Jung, K.; Chae, C. (2004): Prevalence of porcine circovirus type 2 in aborted fetuses and stillborn piglets. In: *Vet. Rec.* 155 (16), S. 489–492.
- Kim, Ha Y. Jung K. Choi C. Chae C. (2004): Enteritis associated with porcine circovirus 2 in pigs. In: *The Canadian Journal of Veterinary Research* (68), S. 218–221.
- Kixmüller, Marion; Ritzmann, Matthias; Eddicks, Matthias; Saalmüller, Armin; Elbers, Knut; Fachinger, Vicky (2008): Reduction of PMWS-associated clinical signs and co-infections by vaccination against PCV2. In: *Vaccine* 26 (27-28), S. 3443–3451.
- Knell, Sebastian; Willems, Hermann; Hertrampf, Barbara; Reiner, Gerald (2005): Comparative genetic characterization of Porcine Circovirus type 2 samples from German wild boar populations. In: *Veterinary Microbiology* 109 (3-4), S. 169–177.
- Krakowka, S.; Ellis, J.; McNeilly, F.; Waldner, C.; Allan, G. (2005): Features of Porcine Circovirus-2 Disease: Correlations between Lesions, Amount and Distribution of Virus, and Clinical Outcome. In: *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 17 (3), S. 213–222.
- Krakowka, S.; Ellis, J. A.; Meehan, B.; Kennedy, S.; McNeilly, F.; Allan, G. (2000): Viral Wasting Syndrome of Swine: Experimental Reproduction of Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome in Gnotobiotic Swine by Coinfection with Porcine Circovirus 2 and Porcine Parvovirus. In: *Veterinary Pathology* 37 (3), S. 254–263.
- 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). In: *Veterinary Pathology* 38 (1) S. 31-42
- Krakowka, Steven; Allan, Gordon; Ellis, John; Hamberg, Alexander; Charreyre, Catherine; Kaufmann, Eva et al. (2012): A nine-base nucleotide sequence in the porcine circovirus type 2 (PCV2) nucleocapsid gene determines viral replication and virulence. In: *Virus Research* 164 (1-2), S. 90–99.
- Krakowka, Steven; Ellis, John A.; McNeilly, Francis; Gilpin, Diedre; Meehan, Brian; McCullough, Ken; Allan, Gordon (2002): Immunologic features of porcine circovirus type 2 infection. In: *Viral Immunology* 15 (4), S. 567–582.
- Krakowka S, Ellis J. McNeilly F. Waldner C. Rings DM Allan G. (2007): Mycoplasma hyopneumoniae bacterins and porcine circovirus type 2 (PCV2) infection: induction of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in the gnotobiotic swine model of PCV2-associated disease. In: *Can Vet J* 48, S. 716–724.
- Kurmman, J.; Sydler, T.; Brugnera, E.; Buergi, E.; Haessig, M.; Suter, M.; Sidler, X. (2011): Vaccination of Dams Increases Antibody Titer and Improves Growth Parameters in Finisher Pigs Subclinically Infected with Porcine Circovirus Type 2. In: *Clinical and Vaccine Immunology* 18 (10), S. 1644–1649.
- Kyriakis, S. C.; Saoulidis, K.; Lekkas, S.; Miliotis, Ch C.; Papoutsis, P. A.; Kennedy, S. (2002): The effects of immuno-modulation on the clinical and pathological expression of

- postweaning multisystemic wasting syndrome. In: *Journal of Comparative Pathology* 126 (1), S. 38-46
- Ladekjaer-Mikkelsen, A. S.; Nielsen, J.; Storgaard, T.; Bøtner, A.; Allan, G.; McNeilly, F. (2001): Transplacental infection with PCV-2 associated with reproductive failure in a gilt. In: *Vet. Rec.* 148 (24), S. 759–760.
- Lager, K. M.; Gauger, P. C.; Vincent, A. L.; Opriessnig, T.; Kehrli, M. E.; Cheung, A. K. (2007): Mortality in pigs given porcine circovirus type 2 subgroup 1 and 2 viruses derived from DNA clones. In: *Veterinary Record* 161 (12), S. 428–429.
- Lainson, F. A.; Aitchison, K. D.; Donachie, W.; Thomson, J. R. (2002): Typing of *Pasteurella multocida* Isolated from Pigs with and without Porcine Dermatitis and Nephropathy Syndrome. In: *J. Clin. Microbiol.* 40 (2), S. 588–593.
- Larochelle, R.; Bielanski, A.; Muller, P.; Müller, P.; Magar, R. (2000): PCR detection and evidence of shedding of porcine circovirus type 2 in boar semen. In: *J. Clin. Microbiol.* 38 (12), S. 4629–4632.
- Larochelle, Renée; Magar, Ronald; D'Allaire, Sylvie (2002): Genetic characterization and phylogenetic analysis of porcine circovirus type 2 (PCV2) strains from cases presenting various clinical conditions. In: *Virus Research* 90 (1-2), S. 101–112.
- Larochelle, Renée; Magar, Ronald; D'Allaire, Sylvie (2003): Comparative serologic and virologic study of commercial swine herds with and without postweaning multisystemic wasting syndrome. In: *Can. J. Vet. Res.* 67 (2), S. 114–120.
- Lefebvre, D.J.; Meerts, P.; Costers, S.; Misinzo, G.; Barbé, F.; van Reeth, K.; Nauwynck, H.J. (2008): Increased porcine circovirus type 2 replication in porcine leukocytes in vitro and in vivo by concanavalin A stimulation. In: *Veterinary Microbiology* 132 (1-2), S. 74–86.
- Lefebvre, David J.; Doorselaere, J.; Delputte, P. L.; Nauwynck, H. J. (2009): Recombination of two porcine circovirus type 2 strains. In: *Arch Virol* 154 (5), S. 875–879.
- Lekcharoensuk, P.; Morozov, I.; Paul, P. S.; Thangthumnyom, N.; Wajjawalku, W.; Meng, X. J. (2004): Epitope Mapping of the Major Capsid Protein of Type 2 Porcine Circovirus (PCV2) by Using Chimeric PCV1 and PCV2. In: *Journal of Virology* 78 (15), S. 8135–8145.
- Li, L.; Kapoor, A.; Slikas, B.; Bamidele, O. S.; Wang, C.; Shaukat, S. et al. (2010a): Multiple Diverse Circoviruses Infect Farm Animals and Are Commonly Found in Human and Chimpanzee Feces. In: *Journal of Virology* 84 (4), S. 1674–1682.
- Li, Wenliang; Wang, Xianwei; Ma, Tao; Feng, Zhixin; Li, Yufeng; Jiang, Ping (2010b): Genetic analysis of porcine circovirus type 2 (PCV2) strains isolated between 2001 and 2009: genotype PCV2b predominate in postweaning multisystemic wasting syndrome occurrences in eastern China. In: *Virus Genes* 40 (2), S. 244–251.
- Lin, Chun-Ming; Jeng, Chian-Ren; Chang, Hui-Wen; Guo, Ing-Cherng; Huang, Yu-Liang; Tsai, Yi-Chieh et al. (2008): Characterization of porcine circovirus type 2 (PCV2) infection in swine lymphocytes using mitogen-stimulated peripheral blood lymphocytes from healthy PCV2-carrier pigs. In: *Veterinary Immunology and Immunopathology* 124 (3-4), S. 355–366.
- Lin, Wei-Li; Chien, Maw-Sheng; Du, Yu-Wen; Wu, Pei-Ching; Huang, Chienjin (2009): The N-terminus of porcine circovirus type 2 replication protein is required for nuclear localization and ori binding activities. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 379 (4), S. 1066–1071.

- Liu, J.; Chen, I.; Du, Q.; Chua, H.; Kwang, J. (2006): The ORF3-Protein of Porcine Circovirus Type 2 Is Involved in Viral Pathogenesis In Vivo. In: *Journal of Virology* 80 (10), S. 5065–5073.
- 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. In: *Journal of Virology* 79 (13), S. 8262–8274.
- Liu, J.; Zhu, Y.; Chen, I.; Lau, J.; He, F.; Lau, A. et al. (2007): The ORF3-Protein of Porcine Circovirus Type 2 Interacts with Porcine Ubiquitin E3 Ligase Pirh2 and Facilitates p53 Expression in Viral Infection. In: *Journal of Virology* 81 (17), S. 9560–9567.
- Liu, Jianbo; Huang, Liping; Wei, Yanwu; Tang, Qinghai; Liu, Dan; Wang, Yiping et al. (2013): Amino acid mutations in the capsid protein produce novel porcine circovirus type 2 neutralizing epitopes. In: *Veterinary Microbiology* 165 (3-4), S. 260–267.
- Liu, Qiang; Tikoo, Suresh K.; Babiuk, Lorne A. (2001): Nuclear Localization of the ORF2 Protein Encoded by Porcine Circovirus Type 2. In: *Virology* 285 (1), S. 91–99.
- López-Soria, Sergio; Nofrarias, Miquel; Calsamiglia, Maria; Espinal, Anna; Valero, Oliver; Ramírez-Mendoza, Humberto et al. (2011): Post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) clinical expression under field conditions is modulated by the pig genetic background. In: *Veterinary Microbiology* 149 (3-4), S. 352–357.
- Lyoo, KwangSoo; Joo, HanSoo; Caldwell, Brian; Kim, HyeunBum; Davies, Peter R.; Torrison, Jerry (2011): Comparative efficacy of three commercial PCV2 vaccines in conventionally reared pigs. In: *The Veterinary Journal* 189 (1), S. 58–62.
- Lv, Q.-Z., Guo, K.-K., Zhang, Y.-M. (2014): Current understanding of genomic DNA of porcine circovirus type 2. In: *Virus Genes* 49 (1), S.1-10.
- Ma, C.-M; Hon, C; Lam, T.-Y; Li, V. Y.-Y; Wong, C. K.-W; Oliveira, T. de; Leung, F. C.-C (2007): Evidence for recombination in natural populations of porcine circovirus type 2 in Hong Kong and mainland China. In: *Journal of General Virology* 88 (6), S. 1733–1737.
- Madec F, Eveno É. Morvan P. Hamon L. Morvan H. Albina E. (1999): La Maladie de l’Amaigrissement du Porcelet (MAP) en France. 1-Aspects descriptifs, impact en élevage. In: *Journées Rech Porcine en France* 31, S. 347–354.
- Madson, D. M.; Opriessnig, T. (2011): Effect of porcine circovirus type 2 (PCV2) infection on reproduction: disease, vertical transmission, diagnostics and vaccination. In: *Anim. Health. Res. Rev.* 12 (01), S. 47–65.
- Madson, D. M.; Patterson, A. R.; Ramamoorthy, S.; Pal, N.; Meng, X. J.; Opriessnig, T. (2009a): Reproductive Failure Experimentally Induced in Sows via Artificial Insemination with Semen Spiked with Porcine Circovirus Type 2. In: *Veterinary Pathology* 46 (4), S. 707–716.
- Madson, D. M.; Ramamoorthy, S.; Kuster, C.; Pal, N.; Meng, X.-J; Halbur, P. G.; Opriessnig, T. (2008): Characterization of Shedding Patterns of Porcine Circovirus Types 2a and 2b in Experimentally Inoculated Mature Boars. In: *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 20 (6), S. 725–734.
- Madson, Darin M.; Ramamoorthy, Sheela; Kuster, Chris; Pal, Narinder; Meng, Xiang-Jin; Halbur, Patrick G.; Opriessnig, Tanja (2009b): Infectivity of porcine circovirus type 2 DNA in semen from experimentally-infected boars. In: *Vet Res* 40 (1), S. 10.

- Mahe; Blanchard P.; Truong C.; Arnauld C.; Le Cann P. (2000): Differential recognition of ORF2 protein from type 1 and type 2 porcine circoviruses and identification of immunorelevant epitopes. In: *J. Gen. Virol.* 81 (7), S. 1815–1824.
- Mankertz, A.; Mueller, B.; Steinfeldt, T.; Schmitt, C.; Finsterbusch, T. (2003): New Reporter Gene-Based Replication Assay Reveals Exchangeability of Replication Factors of Porcine Circovirus Types 1 and 2. In: *Journal of Virology* 77 (18), S. 9885–9893.
- Mankertz, A. Mankertz J. Wolf K. & Buhk H.-J (1998): Identification of a protein essential for replication of porcine circovirus. In: *Journal of General Virology* 79, S. 381–384.
- Mankertz, A. Persson F. Mankertz J. Blaess G. & Buhk H. J. (1997): Mapping and Characterization of the Origin of DNA Replication of Porcine Circovirus. In: *Journal of Virology* 3 (71), S. 2562–2566.
- Mankertz, Annette; Çaliskan, Rifat; Hattermann, Kim; Hillenbrand, Bernd; Kurzendoerfer, Petra; Mueller, Bettina et al. (2004): Molecular biology of Porcine circovirus: analyses of gene expression and viral replication. In: *Veterinary Microbiology* 98 (2), S. 81–88.
- Mankertz, Annette; Hillenbrand, Bernd (2001): Replication of Porcine Circovirus Type 1 Requires Two Proteins Encoded by the Viral Rep-Gene. In: *Virology* 279 (2), S. 429–438.
- Mankertz, Annette Hillenbrand Bernd (2002): Analysis of transcription of Porcine circovirus type 1. In: *Journal of General Virology* 83, S. 2743–2751.
- Mankertz, J.; Buhk, H. J.; Blaess, G.; Mankertz, A. (1998): Transcription analysis of porcine circovirus (PCV). In: *Virus Genes* 16 (3), S. 267–276.
- Martelli, Paolo; Ferrari, Luca; Morganti, Marina; Angelis, Elena de; Bonilauri, Paolo; Guazzetti, Stefano et al. (2011): One dose of a porcine circovirus 2 subunit vaccine induces humoral and cell-mediated immunity and protects against porcine circovirus-associated disease under field conditions. In: *Veterinary Microbiology* 149 (3-4), S. 339–351.
- Mateusen, B.; Maes, D.G.D; van Soom, A.; Lefebvre, D.; Nauwynck, H.J (2007): Effect of a porcine circovirus type 2 infection on embryos during early pregnancy. In: *Theriogenology* 68 (6), S. 896–901.
- Mateusen, B.; Sanchez, R.E; van Soom, A.; Meerts, P.; Maes, D.G.D; Nauwynck, H.J (2004): Susceptibility of pig embryos to porcine circovirus type 2 infection. In: *Theriogenology* 61 (1), S. 91–101
- McIntosh, K. A.; Harding, J. C. S.; Parker, S.; Ellis, J. A.; Appleyard, G. D. (2006): Nested Polymerase Chain Reaction Detection and Duration of Porcine Circovirus Type 2 in Semen with Sperm Morphological Analysis from Naturally Infected Boars. In: *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 18 (4), S. 380–384.
- McKeown, N. E.; Opriessnig, T.; Thomas, P.; Guenette, D. K.; Elvinger, F.; Fenaux, M. et al. (2005): Effects of Porcine Circovirus Type 2 (PCV2) Maternal Antibodies on Experimental Infection of Piglets with PCV2. In: *Clinical and Vaccine Immunology* 12 (11), S. 1347–1351.
- Meehan, B. M.; Creelan, J. L.; McNulty, M. S.; Todd, D. (1997): Sequence of porcine circovirus DNA: Affinities with plant circoviruses. In: *Journal of General Virology* 78 (Pt 1), S. 221–227.
- Meehan, Brian; Francis McNeilly; Daniel Todd; Seamus Kennedy; Victoria A. Jewhurst (1998): Characterization of novel circovirus DNAs associated with wasting syndromes in pigs. In: *J. Gen. Virol.* 79, S. 2171–2179.

- Meng, Xiang-Jin (2013): Porcine Circovirus Type 2 (PCV2): Pathogenesis and Interaction with the Immune System. In: *Annu. Rev. Anim. Biosci.* 1 (1), S. 43–64.
- Mikami, Osamu; Nakajima, Hiroaki; Kawashima, Kenji; Yoshi, Masaaki; Nakajima, Yasuyuki (2005): Nonsuppurative Myocarditis Caused by Porcine Circovirus Type 2 in a Weak-Born Piglet. In: *Journal Of Veterinary Medical Science* 67 (7), S. 735–738.
- Misinzo, G.; Delputte, P. L.; Meerts, P.; Lefebvre, D. J.; Nauwynck, H. J. (2006): Porcine Circovirus 2 Uses Heparan Sulfate and Chondroitin Sulfate B Glycosaminoglycans as Receptors for Its Attachment to Host Cells. In: *Journal of Virology* 80 (7), S. 3487–3494.
- Misinzo, G.; Delputte, P.L; Lefebvre, D.J; Nauwynck, H.J (2009): Porcine circovirus 2 infection of epithelial cells is clathrin-, caveolae- and dynamin-independent, actin and Rho-GTPase-mediated, and enhanced by cholesterol depletion. In: *Virus Research* 139 (1), S. 1–9.
- Misinzo, G. Meerts P. Bublot M. Mast J. Weingartl HM Nauwynck HJ (2005): Binding and entry characteristics of porcine circovirus 2 in cells of the porcine monocytic line 3D4/31. In: *Journal of General Virology* 86 (7), S. 2057–2068.
- Nauwynck, H.J; Sanchez, R.; Meerts, P.; Lefebvre, D.J; Saha, D.; Huang, L.; Misinzo, G. (2012): Cell tropism and entry of porcine circovirus 2. In: *Virus Research* 164 (1-2), S. 43–45.
- Nawagitgul, P.; Morozov, I.; Bolin, S. R.; Harms, P. A.; Sorden, S. D.; Paul, P. S. (2000): Open reading frame 2 of porcine circovirus type 2 encodes a major capsid protein. In: *J. Gen. Virol.* 81 (Pt 9), S. 2281–2287.
- 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. In: *Arch Virol* 143 (9), S. 1723–1744.
- Nunez, A.; McNeilly, F.; Perea, A. (2003): Coinfection by *Cryptosporidium parvum* and porcine circovirus type 2 in weaned pigs. In: *J Vet Med Series B* 50 (5), S. 255–258.
- O'Connor, B.; Gauvreau, H.; West, K.; Bogdan, J.; Ayroud, M.; Clark, E. G. et al. (2001): Multiple porcine circovirus 2-associated abortions and reproductive failure in a multisite swine production unit. In: *Can. Vet. J.* 42 (7), S. 551–553.
- Olvera, A.; Cortey, M.; Segalés, J. (2007): Molecular evolution of porcine circovirus type 2 genomes: Phylogeny and clonality. In: *Virology* 357 (2), S. 175–185.
- Opriessnig, T. (2006): Genetic and experimental comparison of porcine circovirus type 2 (PCV2) isolates from cases with and without PCV2-associated lesions provides evidence for differences in virulence. In: *Journal of General Virology* 87 (10), S. 2923–2932.
- Opriessnig, T.; Fenaux, M.; Thomas, P.; Hoogland, M. J.; Rothschild, M. F.; Meng, X. J.; Halbur, P. G. (2006a): Evidence of Breed-dependent Differences in Susceptibility to Porcine Circovirus Type-2-associated Disease and Lesions. In: *Veterinary Pathology* 43 (3), S. 281–293.
- Opriessnig, T.; Halbur, P. G.; Yu, S.; Thacker, E. L.; Fenaux, M.; Meng, X. J. (2006b): Effects of the timing of the administration of *Mycoplasma hyopneumoniae* bacterin on the development of lesions associated with porcine circovirus type 2. In: *Veterinary Record* 158 (5), S. 149–154.
- Opriessnig, T.; Langohr, I. (2013): Current State of Knowledge on Porcine Circovirus Type 2-Associated Lesions. In: *Veterinary Pathology* 50 (1), S. 23–38.

- Opriessnig, T.; Madson, D.M; Prickett, J.R; Kuhar, D.; Lunney, J.K; Elsener, J.; Halbur, P.G (2008a): Effect of porcine circovirus type 2 (PCV2) vaccination on porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) and PCV2 coinfection. In: *Veterinary Microbiology* 131 (1-2), S. 103–114.
- Opriessnig, T.; Madson, D.M; Roof, M.; Layton, S.M; Ramamoorthy, S.; Meng, X.J; Halbur, P.G (2011a): Experimental Reproduction of Porcine Circovirus Type 2 (PCV2)-Associated Enteritis in Pigs Infected with PCV2 Alone or Concurrently with *Lawsonia intracellularis* or *Salmonella typhimurium*. In: *Journal of Comparative Pathology* 145 (2-3), S. 261–270.
- Opriessnig, T.; Madson, D.M; Schalk, S.; Brockmeier, S.; Shen, H.G; Beach, N.M et al. (2011b): Porcine circovirus type 2 (PCV2) vaccination is effective in reducing disease and PCV2 shedding in semen of boars concurrently infected with PCV2 and *Mycoplasma hyopneumoniae*. In: *Theriogenology* 76 (2), S. 351–360.
- Opriessnig, T.; McKeown, N. E.; Harmon, K. L.; Meng, X. J.; Halbur, P. G. (2006c): Porcine Circovirus Type 2 Infection Decreases the Efficacy of a Modified Live Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Vaccine. In: *Clinical and Vaccine Immunology* 13 (8), S. 923–929.
- 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. In: *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 19 (6), S. 591–615.
- Opriessnig, T.; Patterson, A. R.; Elsener, J.; Meng, X. J.; Halbur, P. G. (2008b): Influence of Maternal Antibodies on Efficacy of Porcine Circovirus Type 2 (PCV2) Vaccination To Protect Pigs from Experimental Infection with PCV2. In: *Clinical and Vaccine Immunology* 15 (3), S. 397–401.
- Opriessnig, T.; Patterson, A. R.; Madson, D. M.; Pal, N.; Rothschild, M.; Kuhar, D. et al. (2009a): Difference in severity of porcine circovirus type two-induced pathological lesions between Landrace and Pietrain pigs. In: *Journal of Animal Science* 87 (5), S. 1582–1590.
- Opriessnig, T.; Patterson, A.R; Madson, D.M; Pal, N.; Halbur, P.G (2009b): Comparison of efficacy of commercial one dose and two dose PCV2 vaccines using a mixed PRRSV–PCV2–SIV clinical infection model 2–3-months post vaccination. In: *Vaccine* 27 (7), S. 1002–1007.
- Opriessnig, T.; Ramamoorthy, S.; Madson, D. M.; Patterson, A. R.; Pal, N.; Carman, S. et al. (2008c): Differences in virulence among porcine circovirus type 2 isolates are unrelated to cluster type 2a or 2b and prior infection provides heterologous protection. In: *Journal of General Virology* 89 (10), S. 2482–2491.
- Opriessnig, T.; Shen, H. G.; Pal, N.; Ramamoorthy, S.; Huang, Y. W.; Lager, K. M. et al. (2011c): A Live-Attenuated Chimeric Porcine Circovirus Type 2 (PCV2) Vaccine Is Transmitted to Contact Pigs but Is Not Upregulated by Concurrent Infection with Porcine Parvovirus (PPV) and Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) and Is Efficacious in a PCV2b-PRRSV-PPV Challenge Model. In: *Clinical and Vaccine Immunology* 18 (8), S. 1261–1268.
- 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. In: *Veterinary Pathology* 41 (6), S. 624–640.

Opriessnig, T.; Xiao, C.-T.; Gerber, P. F.; Halbur, P. G.; Matzinger, S. R.; Meng, X.-J (2014a): Mutant USA strain of porcine circovirus type 2 (mPCV2) exhibits similar virulence to the classical PCV2a and PCV2b strains in caesarean-derived, colostrum-deprived pigs. In: *Journal of General Virology* 95 (Pt_11), S. 2495–2503.

Opriessnig, Tanja; Gerber, Priscilla F.; Xiao, Chao-Ting; Halbur, Patrick G.; Matzinger, Shannon R.; Meng, Xiang-Jin (2014b): Commercial PCV2a-based vaccines are effective in protecting naturally PCV2b-infected finisher pigs against experimental challenge with a 2012 mutant PCV2. In: *Vaccine* 32 (34), S. 4342–4348.

Opriessnig, Tanja; Gerber, Priscilla F.; Xiao, Chao-Ting; Mogler, Mark; Halbur, Patrick G. (2014c): A commercial vaccine based on PCV2a and an experimental vaccine based on a variant mPCV2b are both effective in protecting pigs against challenge with a 2013 U.S. variant mPCV2b strain. In: *Vaccine* 32 (2), S. 230–237.

Opriessnig, Tanja (2014d): Novel PCV2 variants also known as mutant PCV2: Are current vaccines protective? Online verfügbar unter https://www.pig333.com/circovirosis/novel-pcv2-variants-are-current-vaccines-protective_8488/.

Opriessnig, Tanja; Halbur, Patrick G. (2012): Concurrent infections are important for expression of porcine circovirus associated disease. In: *Virus Research* 164 (1-2), S. 20–32.

Opriessnig, Tanja; O'Neill, Kevin; Gerber, Priscilla F.; Castro, Alessandra M.M.G de; Giménez-Lirola, Luis G.; Beach, Nathan M. et al. (2013a): A PCV2 vaccine based on genotype 2b is more effective than a 2a-based vaccine to protect against PCV2b or combined PCV2a/2b viremia in pigs with concurrent PCV2, PRRSV and PPV infection. In: *Vaccine* 31 (3), S. 487–494.

Opriessnig, Tanja; Patterson, Abby R.; Jones, Douglas E.; Juhan, Nicole M.; Meng, Xiang-Jin; Halbur, Patrick G. (2009c): Limited susceptibility of three different mouse (*Mus musculus*) lines to porcine circovirus-2 infection and associated lesions. In: *Can J Vet Res* 73 (2), S. 81–86.

Opriessnig, Tanja; Patterson, Abby R.; Madson, Darin M.; Pal, Narinder; Ramamoorthy, Sheela; Meng, Xiang-Jin; Halbur, Patrick G. (2010): Comparison of the effectiveness of passive (dam) versus active (piglet) immunization against porcine circovirus type 2 (PCV2) and impact of passively derived PCV2 vaccine-induced immunity on vaccination. In: *Veterinary Microbiology* 142 (3-4), S. 177–183.

Opriessnig, Tanja; Patterson, Abby R.; Meng, Xiang-Jin; Halbur, Patrick G. (2009d): Porcine circovirus type 2 in muscle and bone marrow is infectious and transmissible to naïve pigs by oral consumption. In: *Veterinary Microbiology* 133 (1-2), S. 54–64.

Opriessnig, Tanja; Xiao, Chao-Ting; Gerber, Priscilla F.; Halbur, Patrick G. (2013b): Emergence of a novel mutant PCV2b variant associated with clinical PCVAD in two vaccinated pig farms in the U.S. concurrently infected with PPV2. In: *Veterinary Microbiology* 163 (1-2), S. 177–183.

Pallares, F. J.; Halbur, P. G.; Opriessnig, T.; Sorden, S. D.; Villar, D.; Janke, B. H. et al. (2002): Porcine Circovirus Type 2 (PCV-2) Coinfections in US Field Cases of Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome (PMWS). In: *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 14 (6), S. 515–519.

Park, J.-S.; Ha, Y.; Kwon, B.; Cho, K.D.; Lee, B.H.; Chae, C. (2009): Detection of Porcine Circovirus 2 in Mammary and Other Tissues from Experimentally Infected Sows. In: *Journal of Comparative Pathology* 140 (2-3), S. 208–211.

- Patterson, A.R; Madson, D.M; Halbur, P.G; Opriessnig, T. (2011a): Shedding and infection dynamics of porcine circovirus type 2 (PCV2) after natural exposure. In: *Veterinary Microbiology* 149 (1-2), S. 225–229.
- Patterson, A.R; Ramamoorthy, S.; Madson, D.M; Meng, X.J; Halbur, P.G; Opriessnig, T. (2011b): Shedding and infection dynamics of porcine circovirus type 2 (PCV2) after experimental infection. In: *Veterinary Microbiology* 149 (1-2), S. 91–98.
- Pejsak, Zygmunt; Podgórska, Katarzyna; Truszczyński, Marian; Karbowski, Paweł; Stadejek, Tomasz (2010): Efficacy of different protocols of vaccination against porcine circovirus type 2 (PCV2) in a farm affected by postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). In: *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 33 (6), S. e1–e5.
- Pensaert, M. (2004): Viremia and effect of fetal infection with porcine viruses with special reference to porcine circovirus 2 infection. In: *Veterinary Microbiology* 98 (2), S. 175–183.
- Pérez-Martín, Eva; Rovira, Albert; Calsamiglia, Maria; Mankertz, Annette; Rodríguez, Fernando; Segalés, Joaquim (2007): A new method to identify cell types that support porcine circovirus type 2 replication in formalin-fixed, paraffin-embedded swine tissues. In: *Journal of Virological Methods* 146 (1-2), S. 86–95.
- Pogranichniy, R. M.; Yoon, K.-J; Harms, P. A.; Sorden, S. D.; Daniels, M. (2002): Case-Control Study on the Association of Porcine Circovirus Type 2 and Other Swine Viral Pathogens with Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome. In: *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 14 (6), S. 449–456.
- Pogranichniy, Roman M.; Yoon, Kyoung-Jin; Harms, Perry A.; Swenson, Sabrina L.; Zimmermann, Jeffrey J.; Sorden, Steven D. (2000): Characterization of Immune Response of Young Pigs to Porcine Circovirus Type 2 Infection. In: *Viral Immunology* 13 (2), S. 143–153.
- Ramamoorthy, S.; Huang, F.F; Huang, Y.W; Meng, X.J (2009): Interferon-mediated enhancement of in vitro replication of porcine circovirus type 2 is influenced by an interferon-stimulated response element in the PCV2 genome. In: *Virus Research* 145 (2), S. 236–243.
- Ramamoorthy, S.; Opriessnig, T.; Pal, N.; Huang, F.F; Meng, X.J (2011): Effect of an interferon-stimulated response element (ISRE) mutant of porcine circovirus type 2 (PCV2) on PCV2-induced pathological lesions in a porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) co-infection model. In: *Veterinary Microbiology* 147 (1-2), S. 49–58.
- Ramamoorthy Sheela, Xiang-Jin Meng; Ramamoorthy, Sheela; Meng, Xiang-Jin (2009): Porcine circoviruses: a minuscule yet mammoth paradox. In: *Anim. Health. Res. Rev.* 10 (01), S. 1–20.
- Rathkjen, P.H. P. Conradsen E. Nielsen H.-J Riising (2003): Spread Of PMWS Within An Area Of Denmark - An Epidemiological Report From Practice. In: *4th International Symposium on Emerging and Re-emerging Pig Diseases, Rome*, S. 175–176.
- Reiner, Gerald; Bronnert, Bastian; Hohloch, Corinna; Reinacher, Manfred; Willems, Hermann (2011): Distribution of ORF2 and ORF3 genotypes of porcine circovirus type 2 (PCV-2) in wild boars and domestic pigs in Germany. In: *Veterinary Microbiology* 148 (2-4), S. 372–376.
- Reiner, Gerald; Bronnert, Bastian; Hohloch, Corinna; Fresen, Christina; Haack, Ingo; Willems, Hermann; Reinacher, Manfred (2010): Qualitative and quantitative distribution of PCV2 in wild boars and domestic pigs in Germany. In: *Veterinary Microbiology* 145 (1-2), S. 1-8

- Reiner, Gerald; Willems H. (2008): PCV-2 Zusammenhänge zwischen Sequenz, Funktion und Virulenz. In: *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift* 115 115 (12), S. 449–456.
- Rodriguez-Arrioja, G.M. Segalés, J. Calsamiglia M. Resendes A.R (2002): Dynamics of porcine circovirus type 2 infection in a herd of pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. In: *American Journal of Veterinary Research* 63 (3), S. 354–357.
- Rodriguez-Arrioja, G. M.; Segalés, J.; Rosell, C.; Quitana, J.; Ayllon, S.; Camprodon, A.; Domingo, M. (1999): Aujeszky's disease virus infection concurrent with postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs. In: *Veterinary Record* 144 (6), S. 152–153
- Rodriguez-Arrioja, G. M.; Segalés, J.; Rosell, C.; Rovira, A.; Pujols, J.; Plana-Duran, J.; Domingo, M. (2003): Retrospective study on porcine circovirus type 2 infection in pigs from 1985 to 1997 in Spain. In: *J Vet Med Series B* 50 (2), S. 99–101.
- Rodríguez-Cariño, C.; Duffy, C.; Sánchez-Chardi, A.; McNeilly, F.; Allan, G.M; Segalés, J. (2011): Porcine Circovirus Type 2 Morphogenesis in a Clone Derived from the L35 Lymphoblastoid Cell Line. In: *Journal of Comparative Pathology* 144 (2-3), S. 91–102.
- Rodríguez-Cariño, C.; Sánchez-Chardi, A.; Segalés, J. (2010): Subcellular Immunolocalization of Porcine Circovirus Type 2 (PCV2) in Lymph Nodes from Pigs with Post-weaning Multisystemic Wasting Syndrome (PMWS). In: *Journal of Comparative Pathology* 142 (4), S. 291–299.
- Rose, Nicolas; Opriessnig, Tanja; Grasland, Béatrice; Jestin, André (2012): Epidemiology and transmission of porcine circovirus type 2 (PCV2). In: *Virus Research* 164 (1-2), S. 78–89.
- Rosell, C.; Segalés, J.; Domingo, M. (2000): Hepatitis and Staging of Hepatic Damage in Pigs Naturally Infected with Porcine Circovirus Type 2. In: *Veterinary Pathology* 37 (6), S. 687–692.
- Rosell, C. et al; Rosell, C. (1999): Pathological, Immunohistochemical, and In-situ Hybridization Studies of Natural Cases of Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome (PMWS) in Pigs. In: *Journal of Comparative Pathology* 120 (1), S. 59–78.
- Rosell C, Segalés J. Ramos-Vara JA Folch JM Rodríguez-Arrioja GM et al (2000a): Identification of porcine circovirus in tissues of pigs with porcine dermatitis and nephropathy syndrome. In: *Veterinary Record* 146, S. 40–43.
- Rovira, A.; Balasch, M.; Segalés, J.; Garcia, L.; Plana-Duran, J.; Rosell, C. et al. (2002): Experimental Inoculation of Conventional Pigs with Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus and Porcine Circovirus 2. In: *Journal of Virology* 76 (7), S. 3232–3239.
- Saha, D.; Lefebvre, D. J.; Ooms, K.; Huang, L.; Delputte, P. L.; van Doorselaere, J.; Nauwynck, H. J. (2012a): Single amino acid mutations in the capsid switch the neutralization phenotype of porcine circovirus 2. In: *Journal of General Virology* 93 (Pt_7), S. 1548–1555.
- Saha, Dipongkor; Huang, Liping; Bussalleu, Eva; Lefebvre, David J.; Fort, Maria; van Doorselaere, Jan; Nauwynck, Hans J. (2012b): Antigenic subtyping and epitopes' competition analysis of porcine circovirus type 2 using monoclonal antibodies. In: *Veterinary Microbiology* 157 (1-2), S. 13–22.
- Sanches, Edna M. Cavallini; Borba, Mauro R.; Spanemberg, Andréia; Pescador, Caroline; Corbellini, Luís G.; Ravazzolo, A. Pn.A. et al. (2006): Co-Infection of *Pneumocystis carinii* f. sp. suis and Porcine Circovirus-2 (PCV2) in Pig Lungs Obtained from Slaughterhouses in Southern and Midwestern Regions of Brazil. In: *J Eukaryotic Microbiology* 53 (s1), S. S92–S94.

- Sanchez, R. E.; Meerts, P.; Nauwynck, H. J.; Ellis, J. A.; Pensaert, M. B. (2004): Characteristics of Porcine Circovirus-2 Replication in Lymphoid Organs of Pigs Inoculated in Late Gestation or Postnatally and Possible Relation to Clinical and Pathological Outcome of Infection. In: *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 16 (3), S. 175–185.
- Sanchez, Romeo E.; Meerts, Peter; Nauwynck, Hans J.; Pensaert, Maurice B. (2003): Change of porcine circovirus 2 target cells in pigs during development from fetal to early postnatal life. In: *Veterinary Microbiology* 95 (1-2), S. 15–25.
- Sanchez, Romeo E.; Nauwynck, Hans J.; McNeilly, Francis; Allan, Gordon M.; Pensaert, Maurice B. (2001): Porcine circovirus 2 infection in swine foetuses inoculated at different stages of gestation. In: *Veterinary Microbiology* 83 (2), S. 169–176.
- Sauvage, V.; Cheval, J.; Foulongne, V.; Gouilh, M. A.; Pariente, K.; Manuguerra, J. C. et al. (2011): Identification of the First Human Gyrovirus, a Virus Related to Chicken Anemia Virus. In: *Journal of Virology* 85 (15), S. 7948–7950.
- Seeliger, F. A.; Brugmann, M. L.; Kruger, L.; Greiser-Wilke, I.; Verspohl, J.; Segalés, J.; Baumgartner, W. (2007): Porcine Circovirus Type 2-Associated Cerebellar Vasculitis in Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome (PMWS)-Affected Pigs. In: *Veterinary Pathology* 44 (5), S. 621–634.
- Segalés, J.; Calsamiglia, M.; Olvera, A.; Sibila, M.; Badiella, L.; Domingo, M. (2005): Quantification of porcine circovirus type 2 (PCV2) DNA in serum and tonsillar, nasal, tracheo-bronchial, urinary and faecal swabs of pigs with and without postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). In: *Veterinary Microbiology* 111 (3-4), S. 223–229.
- Segalés, J.; Cortey, M. (2010): Changes in age at diagnosis of PMWS in pigs in Spain, 1998 to 2008. In: *Veterinary Record* 167 (24), S. 940–941.
- Segalés, J.; Fernandez-Salguero, J. M.; Fructuoso, G.; Quintana, J.; Rosell, C.; Pozo, J. et al. (2001): Granulomatous Enteritis and Lymphadenitis in Iberian Pigs Naturally Infected with *Lawsonia intracellularis*. In: *Veterinary Pathology* 38 (3), S. 343–346.
- Segalés, J.; Alonso, F.; Rosell, C.; Pastor, J.; Chianini, F.; Campos, E.; López-Fuertes, L.; Quintana, J.; Rodríguez-Arriola, G.; Calsamiglia, M.; Pujols, J.; Domínguez, J.; Domingo, M. (2001a): Changes in peripheral blood leukocyte populations in pigs with natural postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). In: *Veterinary Immunology and Immunopathology* 81 (1-2), S. 37-44
- Segalés, J.; Olvera, A.; Grau-Roma, L.; Charreyre, C.; Nauwynck, H.; Larsen, L. et al. (2008): PCV-2 genotype definition and nomenclature. In: *Veterinary Record* 162 (26), S. 867–868.
- Segalés, J.; Piella, J.; Marco, E.; Mateu-de-Antonio, E. M.; Espuna, E.; Domingo, M. (1998): Porcine dermatitis and nephropathy syndrome in Spain. In: *Veterinary Record* 142 (18), S. 483–486.
- Segalés, J.; Rosell, C.; Domingo, M. (2004): Pathological findings associated with naturally acquired porcine circovirus type 2 associated disease. In: *Veterinary Microbiology* 98 (2), S. 137–149.
- Segales, J. (2004a): Immunosuppression in postweaning multisystemic wasting syndrome affected pigs. In: *Veterinary Microbiology* 98 (2) S. 151-158
- Segalés, J.; Domingo, M. (2002): Postweaning multsystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs. A review. In: *Veterinary Quarterly* 24 (3), S. 109–124.

- Segalés, J.; Pastor, J.; Cuenca, R.; Domingo, M. (2000): Haematological parameters in postweaning multisystemic w syndrome-affeci. In: *Veterinary Record* 146 (23), S. 675–676.
- Segalés, J.; Urniza, A.; Alegre, A.; Bru, T.; Crisci, E.; Nofrías, M. et al. (2009): A genetically engineered chimeric vaccine against porcine circovirus type 2 (PCV2) improves clinical, pathological and virological outcomes in postweaning multisystemic wasting syndrome affected farms. In: *Vaccine* 27 (52), S. 7313–7321.
- Segalés, Joaquim (2012): Porcine circovirus type 2 (PCV2) infections: Clinical signs, pathology and laboratory diagnosis. In: *Virus Research* 164 (1-2), S. 10–19.
- Segalés, Joaquim; Allan, Gordon M.; Domingo, Mariano (2005): Porcine circovirus diseases. In: *Anim. Health. Res. Rev.* 6 (02), S. 119–142.
- Segalés J., M. Sitjar M. Domingo S. Dee M. Del Pozo (1997): First report of post-weaning multisystemic wasting syndrome in pigs in Spain. In: *Veterinary Record* 141 (23), S. 600–601.
- Seo, H. W.; Han, K.; Kim, D.; Oh, Y.; Kang, I.; Park, C. et al. (2011): Effects of an Inactivated Porcine Circovirus Type 2 (PCV2) Vaccine on PCV2 Virus Shedding in Semen from Experimentally Infected Boars. In: *Clinical and Vaccine Immunology* 18 (7), S. 1091–1096.
- Seo, Hwi Won; Han, Kiwon; Oh, Yeonsu; Kang, Ikjae; Park, Changhoon; Chae, Chanhee (2013): Comparison of three commercial one-dose porcine circovirus type 2 (PCV2) vaccines on PCV2 shedding in semen from experimentally infected boars. In: *Veterinary Microbiology* 164 (1-2), S. 145–149.
- Seo, Hwi Won; Park, Changhoon; Kang, Ikjae; Choi, Kyuhyung; Jeong, Jiwoon; Park, Su-Jin; Chae, Chanhee (2014): Genetic and antigenic characterization of a newly emerging porcine circovirus type 2b mutant first isolated in cases of vaccine failure in Korea. In: *Arch Virol* 159 (11), S. 3107–3111.
- Shen, H.G; Beach, N.M; Huang, Y.W; Halbur, P.G; Meng, X.J; Opriessnig, T. (2010): Comparison of commercial and experimental porcine circovirus type 2 (PCV2) vaccines using a triple challenge with PCV2, porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV), and porcine parvovirus (PPV). In: *Vaccine* 28 (37), S. 5960–5966.
- Shen, H.-G; Halbur, P. G.; Opriessnig, T. (2012): Prevalence and phylogenetic analysis of the current porcine circovirus 2 genotypes after implementation of widespread vaccination programmes in the USA. In: *Journal of General Virology* 93 (Pt_6), S. 1345–1355.
- Shibata, I.; Okuda, Y.; Kitajima, K.; Asai, T. (2006): Shedding of Porcine Circovirus into Colostrum of Sows. In: *J Vet Med Series B* 53 (6), S. 278–280.
- Shibata, I.; Okuda, Y.; Yazawa, S. (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. In: *Journal Of Veterinary Medical Science* 65 (3), S. 405–408.
- Sinha, A.; Shen, H. G.; Schalk, S.; Beach, N. M.; Huang, Y. W.; Halbur, P. G. et al. (2010): Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Infection at the Time of Porcine Circovirus Type 2 Vaccination Has No Impact on Vaccine Efficacy. In: *Clinical and Vaccine Immunology* 17 (12), S. 1940–1945.
- Sinha, Avanti; Lin, Kathy; Hemann, Michelle; Shen, Huigang; Beach, Nathan M.; Ledesma, Carmen et al. (2012): ORF1 but not ORF2 dependent differences are important for in vitro replication of PCV2 in porcine alveolar macrophages singularly or coinfecting with PRRSV. In: *Veterinary Microbiology* 158 (1-2), S. 95–103.

- Sorden, S. D. (2000): Update on porcine circovirus and postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). In: *Swine Health and Production* 8 (3), S. 133–136.
- Steinfeldt, T.; Finsterbusch, T.; Mankertz, A. (2007): Functional Analysis of cis- and trans-Acting Replication Factors of Porcine Circovirus Type 1. In: *Journal of Virology* 81 (11), S. 5696–5704.
- Steinfeldt, Tobias; Finsterbusch, Tim; Mankertz, Annette (2001): Rep and Rep' Protein of Porcine circovirus Type 1 Bind to the Origin of Replication in Vitro. In: *Virology* 291 (1), S. 152–160.
- Stevenson, G. W.; Kiupel, M.; Mittal, S. K.; Choi, J.; Latimer, K. S.; Kanitz, C. L. (2001): Tissue Distribution and Genetic Typing of Porcine Circoviruses in Pigs with Naturally Occurring Congenital Tremors. In: *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 13 (1), S. 57–62.
- Thibault, S.; Drolet, R.; Germain, M.-C; D'Allaire, S.; Larochelle, R.; Magar, R. (1998): Cutaneous and Systemic Necrotizing Vasculitis in Swine. In: *Veterinary Pathology* 35 (2), S. 108–116.
- Thomson, J. R.; Henderson, L. E. A.; Meilde, C. S.; MacIntyre, N. (2001): Detection of *Pasteurella multocida* in pigs with porcine dermatitis and nephropathy syndrome. In: *Veterinary Record* 149 (14), S. 412–417.
- Timmusk, S.; Fossum, C.; Berg, M. (2006): Porcine circovirus type 2 replicase binds the capsid protein and an intermediate filament-like protein. In: *Journal of General Virology* 87 (11), S. 3215–3223.
- Timmusk, S.; Merlot, E.; Lovgren, T.; Jarvekulg, L.; Berg, M.; Fossum, C. (2009): Regulator of G protein signalling 16 is a target for a porcine circovirus type 2 protein. In: *Journal of General Virology* 90 (10), S. 2425–2436.
- Timmusk, Sirje; Wallgren, Per; Brunborg, Inger Marit; Wikström, Frida Hasslung; Allan, Gordon; Meehan, Brian et al. (2008): Phylogenetic analysis of porcine circovirus type 2 (PCV2) pre- and post-epizootic postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). In: *Virus Genes* 36 (3), S. 509–520.
- Tischer, I.; Gelderblom, H.; Vettermann, W.; Koch, M. A. (1982): A very small porcine virus with circular single-stranded DNA. In: *Nature* 295 (5844), S. 64–66.
- Tischer, I. Bode L. Peters D. Pociuli S. Germann B. (1995): Distribution of antibodies to porcine circovirus in swine populations of different breeding farms. In: *Arch Virol* 140 (4), S. 737–743.
- Tischer, I. Peters D. Rasch R. Pociuli S. (1987): Replication of porcine circovirus: induction by glucosamine and cell cycle dependence. In: *Arch Virol* 96 (1-2), S. 39–57.
- Tischer, Ilse; Miels, W.; Wolff, D.; Vagt, M.; Griem, W. (1986): Studies on epidemiology and pathogenicity of porcine circovirus. In: *Arch Virol* 91 (3-4), S. 271–276.
- Trible, B. R.; Kerrigan, M.; Crossland, N.; Potter, M.; Faaberg, K.; Hesse, R.; Rowland, R. R. (2011): Antibody Recognition of Porcine Circovirus Type 2 Capsid Protein Epitopes after Vaccination, Infection, and Disease. In: *Clinical and Vaccine Immunology* 18 (5), S. 749–757.
- Trible, B. R.; Suddith, A. W.; Kerrigan, M. A.; Cino-Ozuna, A. G.; Hesse, R. A.; Rowland, R. R. (2012): Recognition of the Different Structural Forms of the Capsid Protein Determines the Outcome following Infection with Porcine Circovirus Type 2. In: *Journal of Virology* 86 (24), S. 13508–13514.

- Trible, Benjamin R.; Rowland, Raymond R.R (2012): Genetic variation of porcine circovirus type 2 (PCV2) and its relevance to vaccination, pathogenesis and diagnosis. In: *Virus Research* 164 (1-2), S. 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. In: *Arch Virol* 146 (6), S. 1197–1211.
- Verreault, Daniel; Létourneau, Valérie; Gendron, Louis; Massé, Daniel; Gagnon, Carl A.; Duchaine, Caroline (2010): Airborne porcine circovirus in Canadian swine confinement buildings. In: *Veterinary Microbiology* 141 (3-4), S. 224–230.
- Vincent, I. E.; Carrasco, C. P.; Herrmann, B.; Meehan, B. M.; Allan, G. M.; Summerfield, A.; McCullough, K. C. (2003): Dendritic Cells Harbor Infectious Porcine Circovirus Type 2 in the Absence of Apparent Cell Modulation or Replication of the Virus. In: *Journal of Virology* 77 (24), S. 13288–13300.
- Wang, Fang; Guo, Xin; Ge, Xinna; Wang, Zhongtian; Chen, Yanhong; Cha, Zhenlin; Yang, Hanchun (2009): Genetic variation analysis of Chinese strains of porcine circovirus type 2. In: *Virus Research* 145 (1), S. 151–156.
- Wei, Chunya; Zhang, Minze; Chen, Ye; Xie, Jiexiong; Huang, Zhen; Zhu, Wanjun et al. (2013): Genetic evolution and phylogenetic analysis of porcine circovirus type 2 infections in southern China from 2011 to 2012. In: *Infection, Genetics and Evolution* 17, S. 87–92.
- Wei, Huiling; Lenz, Stephen D.; van Alstine, William G.; Stevenson, Gregory W.; Langohr, Ingeborg M.; POGRANICHNIY, ROMAN M. (2010): Infection of cesarean-derived colostrum-deprived pigs with porcine circovirus type 2 and Swine influenza virus. In: *Comp. Med.* 60 (1), S. 45–50.
- Wellenberg, G.J; Stockhofe-Zurwieden, N.; Jong, M.F de; Boersma, W.J.A; Elbers, A.R.W (2004): Excessive porcine circovirus type 2 antibody titres may trigger the development of porcine dermatitis and nephropathy syndrome: a case-control study. In: *Veterinary Microbiology* 99 (3-4), S. 203–214.
- West, K. H.; Bystrom, J. M.; Wojnarowicz, C.; Shantz, N.; Jacobson, M.; Allan, G. M. et al. (1999): Myocarditis and Abortion Associated with Intrauterine Infection of Sows with Porcine Circovirus 2. In: *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 11 (6), S. 530–532.
- Wiederkehr, Danja D.; Sydler, Titus; Buergi, Esther; Haessig, Michael; Zimmermann, Dieter; Pospischil, Andreas et al. (2009): A new emerging genotype subgroup within PCV-2b dominates the PMWS epizooty in Switzerland. In: *Veterinary Microbiology* 136 (1-2), S. 27–35.
- Willems, H.; Hofmeister, R.; Reiner, G. (2014): Complete Genome Sequences of Two Porcine Circovirus Type 2 Field Isolates Bearing an Unusual Sequence Duplication in the Rep-Gene. In: *Genome Announcements* 2 (4), S. 00447-14.
- Xiao, C.-T; Halbur, P. G.; Opriessnig, T. (2012): Complete Genome Sequence of a Novel Porcine Circovirus Type 2b Variant Present in Cases of Vaccine Failures in the United States. In: *Journal of Virology* 86 (22), S. 12469.
- 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. In: *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 15 (4), S. 369–373.

Young MG, Cunningham GL Sanford SE (2011): Circovirus vaccination in pigs with subclinical porcine circovirus type 2 infection complicated by ileitis. In: *Journal of Swine Health and Production* 19 (3), S. 175–180.

Yu, S.; Vincent, A.; Opriessnig, T.; Carpenter, S.; Kitikoon, P.; Halbur, P.G; Thacker, E. (2007): Quantification of PCV2 capsid transcript in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) in vitro. In: *Veterinary Microbiology* 123 (1-3), S. 34–42.

9 Anhang

Tabelle 32: Im ORF1 lokalisierte SNPs der 62 PCV2-Sequenzen, mit Positionsangaben im PCV2-Genom und im ORF1, sowie der Auflistung der substituierten Nukleotide. Bei vorhandener Aminosäuresubstitution, Angabe der ausgetauschten Aminosäure mit Position im kodierten Protein. Nomenklatur nach den Dunnen und Antonarakis (2001).

| SNPs im ORF1 (51-995nt) | | |
|--------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| PCV2 Genomposition (nt) | Position im ORF1 (nt) | Protein Position (aa) |
| g.56C>T | c.6C>T | |
| g.59C>T | c.9C>T | |
| g.62G>A | c.12G>A | |
| g.64A>G | c.14A>G | p.5K>R |
| g.73G>A | c.23G>A | p.8K>R |
| g.89C>G | c.39C>G | |
| g.89C>A | c.39C>A | |
| g.89C>T | c.39C>T | |
| g.92T>C | c.42T>C | |
| g.110T>G | c.60T>G | |
| g.110T>A | c.60T>A | |
| g.128A>G | c.78A>G | |
| g.152T>G | c.102T>G | p.34D>E |
| g.161A>C | c.111A>C | |
| g.167A>G | c.117A>G | |
| g.167A>T | c.117A>T | |
| g.197T>C | c.147T>C | |
| g.199A>G | c.149A>G | p.50N>S |
| g.218T>C | c.168T>C | |
| g.224C>T | c.174C>T | |
| g.248G>A | c.198G>A | |
| g.254G>A | c.204G>A | |
| g.257T>A | c.207T>A | |
| g.272G>A | c.222G>A | |
| g.279T>C | c.229T>C | |

| SNPs im ORF1 (51-995nt) | | |
|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| PCV2 Genomposition (nt) | PCV2 Genomposition (nt) | PCV2 Genomposition (nt) |
| g.281G>C | c.231G>C | p.77L>F |
| g.281G>T | c.231G>T | |
| g.296C>T | c.246C>T | |
| g.299C>T | c.249C>T | |
| g.307C>T | c.257C>T | p.86A>V |
| g.308G>T | c.258G>T | |
| g.308G>C | c.258G>C | |
| g.317A>T | c.267A>T | |
| g.317A>C | c.267A>C | |
| g.323G>C | c.273G>C | p.91Q>H |
| g.335A>G | c.285A>G | |
| g.338C>T | c.288C>T | |
| g.341C>T | c.291C>T | |
| g.362G>T | c.312G>T | |
| g.365G>A | c.315G>A | p.105M>I |
| g.365G>T | c.315G>T | |
| g.365G>C | c.315G>C | |
| g.368G>A | c.318G>A | |
| g.385C>G | c.335C>G | p.112S>C |
| g.389G>A | c.339G>A | |
| g.395A>G | c.345A>G | |
| g.405C>T | c.355C>T | |
| g.412C>G | c.362C>G | p.121T>S |
| g.416T>C | c.366T>C | |
| g.425C>T | c.375C>T | |
| g.429T>C | c.379T>C | |
| g.465C>T | c.415C>T | p.139H>Y |
| g.485A>G | c.435A>G | |
| g.503T>C | c.453T>C | |
| g.543T>A | c.493T>A | p.165W>R |
| g.551T>G | c.501T>G | |

| SNPs im ORF1 (51-995nt) | | |
|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| PCV2 Genomposition (nt) | PCV2 Genomposition (nt) | PCV2 Genomposition (nt) |
| g.551T>C | c.501T>C | |
| g.578T>G | c.528T>G | |
| g.587T>C | c.537T>C | |
| g.593C>T | c.543C>T | |
| g.595A>G | c.545A>G | p.182K>R |
| g.617C>G | c.567C>G | p.189D>E |
| g.632C>T | c.582C>T | |
| g.642C>T | c.592C>T | p.198P>S |
| g.650C>T | c.600C>T | |
| g.707C>T | c.657C>T | |
| g.711C>T | c.661C>T | |
| g.713G>T | c.663G>T | |
| g.713G>C | c.663G>C | |
| g.716C>G | c.666C>G | |
| g.716C>T | c.666C>T | |
| g.717T>C | c.667T>C | p.223W>R |
| g.722T>C | c.672T>C | |
| g.728A>G | c.678A>G | |
| g.731G>C | c.681G>C | |
| g.737G>C | c.687G>C | |
| g.746A>G | c.696A>G | |
| g.746A>T | c.696A>T | |
| g.746A>C | c.696A>C | |
| g.752A>T | c.702A>T | |
| g.756A>C | c.706A>C | p.236T>P |
| g.761A>T | c.711A>T | |
| g.796G>A | c.746G>A | p.249R>H |
| g.872T>C | c.822T>C | |
| g.898T>A | c.848T>A | p.283F>Y |
| g.910C>T | c.860C>T | p.287A>V |
| g.920A>G | c.870A>G | |

| SNPs im ORF1 (51-995nt) | | |
|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| PCV2 Genomposition (nt) | PCV2 Genomposition (nt) | PCV2 Genomposition (nt) |
| g.937G>C | c.887G>C | p.296G>A |
| g.941G>A | c.891G>A | |
| g.977A>C | c.927A>C | |
| g.991A>G | c.941A>G | p.314Y>C |

Tabelle 33: Im ORF2 lokalisierte SNPs der 62 PCV2-Sequenzen mit Positionsangaben im PCV2-Genom und im ORF2, sowie der Auflistung der substituierten Nukleotide. Bei vorhandener Aminosäuresubstitution, Angabe der ausgetauschten Aminosäure mit Position im kodierten Protein. Nomenklatur nach den Dunnen und Antonarakis (2001).

| SNPs im ORF2 (1735-1034nt) | | |
|----------------------------|-----------------------|-----------------------|
| PCV2 Genomposition (nt) | Position im ORF2 (nt) | Protein Position (aa) |
| g.1033T>C | c.702A>G | |
| g.1035A>T | c.700T>A | |
| g.1039G>C | c.696C<G | p.232N>K |
| g.1043A>G | c.692T>C | p.231L>F |
| g.1060A>G | c.675T>C | |
| g.1063A>G | c.672T>C | |
| g.1069T>C | c.666A>G | |
| g.1086T>G | c.649A>C | p.217M>L |
| g.1087G>T | c.648C>A | p.216T>A |
| g.1089T>C | c.646A>G | |
| g.1092C>T | c.643G>A | p.215V>I |
| g.1105T>G | c.630A>C | p.210E>D |
| g.1108C>T | c.627G>A | |
| g.1114G>A | c.621C>T | |
| g.1117T>G | c.618A>C | |
| g.1118A>T | c.617T>A | |
| g.1132C<G | c.603G>C | |
| g.1132C>T | c.603G>A | |
| g.1141G>A | c.594C>T | |
| g.1144G>A | c.591C>T | |

| SNPs im ORF2 (1735-1034nt) | | |
|-----------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| PCV2 Genomposition (nt) | Position im ORF2 (nt) | Protein Position (aa) |
| g.1150G>A | c.585C>T | |
| g.1156T>C | c.579A>G | |
| g.1164C>T | c.571G>A | p.191G>R |
| g.1166G>C | c.569C<G | p.190T>A |
| g.1167T>C | c.568A>G | |
| g.1168A>G | c.567T>C | |
| g.1168A>T | c.567T>A | |
| g.1171T>C | c.564A>G | |
| g.1174T>G | c.561A>C | |
| g.1174T>A | c.561A>T | |
| g.1179T>G | c.556A>C | |
| g.1182G>T | c.553C>A | p.185L>M |
| g.1186C<G | c.549G>C | |
| g.1189C>T | c.546G>A | |
| g.1192A>G | c.543T>C | |
| g.1195T>C | c.540A>G | |
| g.1204G>A | c.531C>T | |
| g.1207T>G | c.528A>C | |
| g.1222A>G | c.513T>C | |
| g.1225A>T | c.510T>A | |
| g.1234T>A | c.501A>T | |
| g.1237G>A | c.498C>T | |
| g.1246G>C | c.489C<G | |
| g.1249G>T | c.486C>A | |
| g.1252A>G | c.483T>C | |
| g.1276G>C | c.459C<G | |
| g.1279C>T | c.456G>A | |
| g.1283G>A | c.452C>T | p.151T>I |
| g.1284T>G | c.451A>C | p.151T>P |
| g.1285T>G | c.450A>C | |
| g.1288G>T | c.447C>A | |

| SNPs im ORF2 (1735-1034nt) | | |
|-----------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| PCV2 Genomposition (nt) | Position im ORF2 (nt) | Protein Position (aa) |
| g.1291A>G | c.444T>C | |
| g.1297G>A | c.438C>T | |
| g.1315G>A | c.420C>T | |
| g.1327G>T | c.408C>A | |
| g.1330G>T | c.405C>A | |
| g.1333T>C | c.402A>G | p.134T>P |
| g.1335T>G | c.400A>C | |
| g.1338C>A | c.397G>T | p.133A>S |
| g.1343G>A | c.392C>T | p.131T>I |
| g.1344T>G | c.391A>C | p.131T>P |
| g.1348A>G | c.387T>C | |
| g.1354A>G | c.381T>C | p.127D>A |
| g.1355T>G | c.380A>C | |
| g.1368C>T | c.367G>A | p.123V>I |
| g.1373C<G | c.362G>C | p.121S>T |
| g.1378G>T | c.357C>A | |
| g.1381C>A | c.354G>T | |
| g.1381C>T | c.354G>A | |
| g.1387C>T | c.348G>A | |
| g.1396C>T | c.339G>A | |
| g.1400G>T | c.335C>A | p.112T>N |
| g.1402G>T | c.333C>A | |
| g.1405C>T | c.330G>A | |
| g.1424T>C | c.311A>G | p.104E>G |
| g.1429C>T | c.306G>A | |
| g.1432A>T | c.303T>A | |
| g.1435C>T | c.300G>A | |
| g.1438T>C | c.297A>G | |
| g.1462C<G | c.273G>C | |
| g.1462C>T | c.273G>A | p.91V>I |
| g.1464C>T | c.271G>A | |

| SNPs im ORF2 (1735-1034nt) | | |
|-----------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| PCV2 Genomposition (nt) | Position im ORF2 (nt) | Protein Position (aa) |
| g.1467A>T | c.268T>A | p.90S>T |
| g.1469C>A | c.266G>T | p.89R>L |
| g.1473G>A | c.262C>T | p.88P>S |
| g.1477T>G | c.258A>C | p.86S>T |
| g.1489T>C | c.246A>G | |
| g.1492G>C | c.243C<G | |
| g.1497G>C | c.238C<G | p.80L>V |
| g.1501G>A | c.234C>T | |
| g.1504A>G | c.231T>C | p.77N>D |
| g.1505T>G | c.230A>C | p.77N>T |
| g.1506T>C | c.229A>G | |
| g.1508A>G | c.227T>C | p.76I>T |
| g.1509T>G | c.226A>C | p.76I>L |
| g.1513G>A | c.222C>T | |
| g.1516T>C | c.219A>G | |
| g.1521T>G | c.214A>C | p.72M>L |
| g.1528C>T | c.207G>A | |
| g.1547T>C | c.188A>G | p.63K>R |
| g.1561C>T | c.174G>A | |
| g.1566C>T | c.169G>A | p.57I>V |
| g.1573T>A | c.162A>T | |
| g.1578A>T | c.157T>A | p.53F>I |
| g.1582G>T | c.153C>A | |
| g.1588G>A | c.147C>T | |
| g.1590G>A | c.145C>T | p.49L>F |
| g.1596T>C | c.139A>G | p.47T>A |
| g.1597G>A | c.138C>T | |
| g.1617T>G | c.118A>C | |
| g.1626G>C | c.109C<G | p.37R>G |
| g.1639G>A | c.96C>T | |
| g.1647C<G | c.88G>C | p.30V>L |

| SNPs im ORF2 (1735-1034nt) | | |
|-----------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| PCV2 Genomposition (nt) | Position im ORF2 (nt) | Protein Position (aa) |
| g.1647C>T | c.88G>A | p.30V>I |
| g.1648G>A | c.87C>T | p.29L>F |
| g.1659G>C | c.76C<G | p.26R>G |
| g.1665G>C | c.70C<G | p.24R>G |
| g.1666G>T | c.69C>A | |
| g.1668G>A | c.67C>T | p.23F>L |
| g.1671T>G | c.64A>C | p.22I>L |
| g.1672C>T | c.63G>A | |
| g.1676C<G | c.59G>C | p.20G>A |
| g.1704T>G | c.31A>C | |
| g.1707T>C | c.28A>G | |
| g.1708C<G | c.27G>C | |
| g.1712T>A | c.23A>T | p.8Y>F |
| g.1724G>T | c.11C>A | p.4Q>P |

Tabelle 34: Im ORF3 lokalisierte SNPs der 62 PCV2-Sequenzen mit Positionsangaben im PCV2-Genom und im ORF3, sowie der Auflistung der substituierten Nukleotide. Bei vorhandener Aminosäuresubstitution, Angabe der ausgetauschten Aminosäure mit Position im kodierten Protein. Nomenklatur nach (den Dunnen und Antonarakis 2001).

| SNPs im ORF3 (671-357nt) | | |
|---------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| Genomposition (nt) | Position im ORF3 (nt) | Protein Position (aa) |
| g.362G>T | c.310C>A | p.104Q>K |
| g.365G>A | c.307C>T | p.103H>D |
| g.365G>T | c.307C>A | p.103H>N |
| g.365G>C | c.307C<G | p.103H>Y |
| g.368G>A | c.304C>T | p.102F>L |
| g.385C<G | c.287G>C | p.96R>T |
| g.389G>A | c.283C>T | |
| g.395A>G | c.277T>C | |
| g.405C>T | c.267G>A | |
| g.412C<G | c.260G>C | p.87S>T |

| SNPs im ORF3 (671-357nt) | | |
|--------------------------|-----------------------|-----------------------|
| Genomposition (nt) | Position im ORF3 (nt) | Protein Position (aa) |
| g.416T>C | c.256A>G | p.86S>G |
| g.425C>T | c.247G>A | p.83G>S |
| g.429T>C | c.243A>G | |
| g.465C>T | c.207G>A | |
| g.485A>G | c.187T>C | p.63S>P |
| g.503T>C | c.169A>G | p.57S>G |
| g.543T>A | c.129A>T | |
| g.551T>G | c.121A>C | p.41S>R |
| g.551T>C | c.121A>G | p.41S>G |
| g.578T>G | c.94A>C | |
| g.587T>C | c.85A>G | p.29A>T |
| g.593C>T | c.79G>A | p.27T>A |
| g.595A>G | c.77T>C | p.26F>S |
| g.617C<G | c.55G>C | p.19V>L |
| g.632C>T | c.40G>A | p.14V>I |
| g.642C>T | c.30G>A | |
| g.650C>T | c.22G>A | p.8V>I |

Tabelle 35: Im PCV2-Genom der 62 generierten PCV2-Sequenzen lokalisierte Insertionen

| PCV2 Genomposition (nt) | Anzahl der Sequenzen | PCV2A | PCV2B | PCV2C |
|-------------------------|----------------------|-------|-------|-------|
| g.3_4insC | 4 | 1 | 3 | 0 |
| g.996_997insAG | 4 | 0 | 4 | 0 |
| g.1041_1042insT | 9 | 9 | 0 | 0 |

Tabelle 36: Im PCV2-Genom der 62 generierten PCV2-Sequenzen lokalisierte Deletionen.

| PCV2 Genomposition (nt) | Anzahl der Sequenzen | PCV2A | PCV2B | PCV2C |
|-------------------------|----------------------|-------|-------|-------|
| g.999delT | 2 | 0 | 2 | 0 |
| g.1004delT | 2 | 0 | 2 | 0 |

Tabelle 37: Im PCV2-Genom der 62 generierten PCV2-Sequenzen lokalisierte Insertionen/Deletionen (InDels) mit Positionsangaben im PCV2-Genom und im ORF2. Bei vorhandener Aminosäuresubstitution, Angabe der ausgetauschten Aminosäure mit Position im kodierten Protein. Nomenklatur nach (den Dunnen und Antonarakis 2001).

| PCV2 Genomposition (nt) | Position im ORF2 (nt) | Protein Position (aa) |
|-------------------------|------------------------|-----------------------|
| g.1228_1230delinsCCT | c.507_505delinsGGA | p.169S>R |
| g.1284_1285delinsGG | c.451_450delinsCC | |
| g.1327_1328delinsTT | c.408_407delinsAA | p.136L>Q |
| g.1333_1334delinsAT | c.402_401delinsAT | p.134T>N |
| g.1469_1473delinsATTTT | c.266_262 delins TAAAA | p.89R>I |
| | | p.88P>K |
| g.1479_1480delinsTC | c.256_255delinsAG | |
| g.1488_1489delinsTG | c.247_246delinsAC | p.83G>R |
| g.1497_1498delinsCG | c.238_237delinsGC | |
| g.1531_1533delinsATT | c.204_202delinsTAA | p.68A>N |
| g.1546_1547delinsGC | c.189_188delinsCG | p.63K>S |
| g.1558_1560delinsAGC | c.177_175delinsTCG | p.59R>A |
| g.1559_1560delinsTT | c.176_175delinsAA | p.59R>K |
| g.1698_1699delinsTC | c.37_36delinsAG | p.13H>N |
| g.1707_1708delinsCG | c.28_27delinsGC | p.10R>G |
| g.1735_1736delinsCG | * | |
| g.1755_1756delinsGC | * | |

* intergenische Region

Tabelle 38: Im Rep-Gen (ORF1) identifizierte Sequenzduplikation mit Positionsangaben im PCV2-Genom und im ORF1, sowie der entsprechenden Position im kodierten Protein.

| PCV2 Genomposition (nt) | ORF1 Position (nt) | Protein Position (aa) | Anzahl PCV2- Sequenzen | PCV2 A | PCV2 B |
|---|-----------------------------------|----------------------------------|---------------------------------------|-------------------|-------------------|
| g.800_846dupCAGCAAC ATGCCAGCAAAAAG AATGGAAGAAGCGGA CCCCTCCTCG | 750-791 | 251-256 | 3 | 0 | 3 |
| g.803_880dupCTTCGGC AGCGGCAGCACCTCG GCAGCACCTCAGCAG CAACATGCCAGCAA AAAGAATGGAAGAAG CGGACCCAACA | 753-828 | 252-277 | 1 | 0 | 1 |

Danksagung

Ganz herzlich möchte ich mich bei allen denjenigen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Mein herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dr. habil. Gerald Reiner für die Überlassung des interessanten Themas und die hervorragende Betreuung während dieser Arbeit.

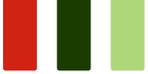
Des Weiteren danke ich dem Laborleiter der Klinik für Schweine, Prof. Dr. Hermann Willems, für seine unermüdliche Hilfe bei alle Fragen und Sorgen rund um den molekularbiologischen Teil, sowie Bettina Hopf und Ute Stoll für die Unterstützung im Labor.

Allen Mitarbeitern des Schweinegesundheitsdienstes der Klinik für Schweine danke ich für die Zusammenarbeit.

Meinen Kolleginnen aus dem Tieraugenzentrum in Pohlheim, danke ich für die Entlastung in der Praxis, die motivierenden Worte und vor allem für das gute Verhältnis und den Zusammenhalt in der Praxis.

Zu guter Letzt danke ich meinem Lebensgefährten für die stetige, liebevolle Unterstützung und seine unerschöpfliche Gelassenheit, sowie meinen Eltern für ihre Fürsorge und ihr Verständnis.

„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.“



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

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

ISBN: 978-3-8359-6429-7



9 783835 1964297