



**REGINE PREIßLER**

Genomweite Assoziationsstudie zur  
Untersuchung der genetischen Variation  
des postpartalen Dysgalaktie-Syndroms bei Sauen

---

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



*edition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

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

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

1. Auflage 2013

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

1<sup>st</sup> Edition 2013

© 2013 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

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

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

Aus dem Klinikum Veterinärmedizin,  
Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie  
der Justus-Liebig-Universität Gießen  
Betreuer: Prof. Dr. Axel Wehrend

**und**

dem Institut für Agrar- und Ernährungswissenschaften  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
Betreuerin: Prof. Dr. Nicole Kemper

**Genomweite Assoziationsstudie zur Untersuchung  
der genetischen Variation des postpartalen  
Dysgalaktie-Syndroms bei Sauen**

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

eingereicht von

**Regine Preißler**

Tierärztin aus Karl-Marx-Stadt, jetzt Chemnitz

Gießen 2013

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

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. Martin Kramer

Gutachter:

Prof. Dr. Axel Wehrend

Prof. Dr. Nicole Kemper

Tag der Disputation: 05.02.2013

Die vorliegende Arbeit wurde im Rahmen der FUGATOplus-Nachwuchsforschergruppe „geMMA - Strukturelle und funktionelle Untersuchung der genetischen Variation des MMA-Syndroms“ (FKZ 0315138) angefertigt und vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) finanziert.

**Teile dieser Arbeit sind in folgenden Publikationen veröffentlicht:**

Internationale begutachtete Zeitschriften

PREIBLER R., TETENS J., REINERS K., LOOFT H., KEMPER N. (2013): **A genome-wide association study to detect genetic variation for postpartum dysgalactia syndrome in five commercial pig breeding lines.** Animal Genetics, submitted.

PREIBLER R., LOOFT H., KEMPER N. (2012): **Postpartales Dysgalaktie-Syndrom bei Sauen: Ein Überblick zur genetischen Prädisposition.** Tierärztliche Umschau 67 (12): 520-527.

PREIBLER R., HINRICHS D., REINERS K., LOOFT H., KEMPER N. (2012): **Estimation of variance components for postpartum dysgalactia syndrome in sows.** Journal of Animal Breeding and Genetics 129: 98-102.

Internationale Kongressbeiträge

PREIBLER R., REINERS K., LOOFT H., TETENS J., GERJETS I., KEMPER N. (2011): **Whole genome association approach to elucidate genetic susceptibility to mastitis in sows.** Mastitis-Symposium 'Physiology and Genomics of Mastitis', 31. Oktober - 2. November 2011, Evangelische Akademie Tutzing, Deutschland.

PREIBLER R., KEMPER N. (2011): **Mastitis in sows - current knowledge and opinions.** 62<sup>nd</sup> Annual Meeting of the European Association for Animal Production (EAAP), 29. August-2. September 2011, Stavanger, Norwegen.

PREIBLER R., GERJETS I., REINERS K., LOOFT H., KEMPER N. (2011): **Prevalence of postpartum dysgalactia syndrome in sows.** XV. International Congress in Animal Hygiene (ISAH), 3.-7. Juli 2011, Wien, Österreich.

PREIBLER R., TETENS J., REINERS K., LOOFT H., KEMPER N. (2011): **Biological pathway analysis for postpartum dysgalactia syndrome in sows via a genome-wide association study.** XV. International Congress in Animal Hygiene (ISAH), 3.-7. Juli 2011, Wien, Österreich.

PREIBLER R., HINRICHS D., REINERS K., LOOFT H., KEMPER N. (2011): **Heritability of the postpartum dysgalactia syndrome in sows.** 3<sup>rd</sup> European Symposium on Porcine Health Management, 26.-28. Mai 2011, Helsinki, Finnland.

PREIBLER R., TETENS J., REINERS K., LOOFT H., KEMPER N. (2011): **Genetic variation of the postpartum dysgalactia syndrome in sows.** 3<sup>rd</sup> European Symposium on Porcine Health Management, 26.-28. Mai 2011, Helsinki, Finnland.

PREIBLER R., TETENS J., REINERS K., KEMPER N. (2010): **Genome-wide association study for susceptibility to Coliform Mastitis in sows.** 32<sup>nd</sup> Conference of the International Society for Animal Genetics (ISAG), 26. - 30. Juli 2010, Edinburgh, United Kingdom.

Nationale Kongressbeiträge

PREIBLER R., GERJETS I., REINERS K., TETENS J., KEMPER N. (2011): **geMMA - Strukturelle und funktionelle Untersuchung der genetischen Variation des MMA-Syndroms.** 3. FUGATO-Statusseminar, 09.- 10. Februar 2011, Kassel.

PREIBLER R., TETENS J., REINERS K., KEMPER N. (2010): **Genomweite Assoziationsstudie zur Untersuchung der genetischen Variation des MMA-Syndroms bei Sauen.** Projektgruppe „Genetisch-Statistische Methoden“ der Deutschen Gesellschaft für Züchtungskunde (DGFZ), 28.- 30. September 2010, Fulda.

PREIBLER R., TETENS J., REINERS K., KEMPER N. (2010): **Genomweite Assoziationsstudie zur Untersuchung der genetischen Variation des MMA-Syndroms bei Sauen.** Deutsche Gesellschaft für Züchtungskunde (DGFZ-/GfT-Gemeinschaftstagung), 15.- 16. September 2010, Kiel.

PREIBLER R., GERJETS I., REINERS K., KEMPER N. (2010): **FUGATO-plus: geMMA - Strukturelle und funktionelle Untersuchung der genetischen Variation des MMA Syndroms.** BMBF-Nachwuchsförderung: Präsentation GO-Bio, BioFuture und weitere Gruppen. 26.- 27. Januar 2010, Berlin-Brandenburgische Akademie der Wissenschaften, Berlin.

## Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....	III
TABELLENVERZEICHNIS .....	V
ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....	VII
<b>1 EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>2 LITERATUR .....</b>	<b>2</b>
<b>2.1 HISTORISCHER HINTERGRUND .....</b>	<b>2</b>
2.1.1 ÜBERBLICK ZUR SCHWEINEZUCHT .....	2
2.1.2 ÜBERBLICK ZUR GENETIK .....	3
2.1.3 HISTORISCHER RÜCKBLICK ZUR BEZEICHNUNG DES POSTPARTALEN DYS GALAKTIE- SYNDROMS .....	6
<b>2.2 DAS POSTPARTALE DYS GALAKTIE-SYNDROM .....</b>	<b>8</b>
2.2.1 KRANKHEITSBILD .....	8
2.2.2 EINFLUSS- UND RISIKOFAKTOREN .....	11
2.2.3 PATHOGENESE UND PATHOMECHANISMEN .....	13
2.2.4 PROPHYLAXE UND THERAPIE .....	15
<b>2.3 GENETIK UND PDS .....</b>	<b>17</b>
2.3.1 DAS SCHWEINEGENOM .....	17
2.3.2 ERBLICHKEIT VON PDS .....	19
2.3.3 GENOMWEITE ASSOZIATIONSSTUDIEN .....	21
2.3.4 KANDIDATENGENE .....	27
<b>3 MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>30</b>
<b>3.1 PROBENMATERIAL .....</b>	<b>30</b>
<b>3.2 BETEILIGTE LABORATORIEN .....</b>	<b>34</b>
<b>3.3 GERÄTE .....</b>	<b>35</b>
<b>3.4 VERBRAUCHSMATERIAL .....</b>	<b>35</b>
<b>3.5 COMPUTERPROGRAMME .....</b>	<b>35</b>
<b>3.6 INTERNETRESSOURCEN .....</b>	<b>36</b>
<b>3.7 METHODEN .....</b>	<b>36</b>
3.7.1 PHÄNOTYPISIERUNG .....	36
3.7.2 HERITABILITÄTSSCHÄTZUNG .....	38
3.7.3 DNA-ISOLIERUNG .....	39
3.7.4 GENOTYPISIERUNG .....	40
3.7.5 QUALITÄTSKONTROLLE .....	41
3.7.6 STATISTISCHE AUSWERTUNG .....	43
3.7.7 KANDIDATENGENSUCHE .....	43

<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>44</b>
<b>4.1</b>	<b>PHÄNOTYPISIERUNG .....</b>	<b>44</b>
4.1.1	AUSWERTUNG DER EINGEGANGENEN PROBEN.....	44
4.1.2	LINIENSPEZIFISCHE AUSWERTUNG DER PARAMETER.....	46
4.1.3	EINFLUSSFAKTOREN GEBURTSEINLEITUNG UND GEBURTSEINGRIFF .....	48
4.1.4	BAKTERIENPROFILE.....	48
<b>4.2</b>	<b>HERITABILITÄT .....</b>	<b>51</b>
<b>4.3</b>	<b>GENOTYPISIERUNG .....</b>	<b>52</b>
4.3.1	GENOTYPISIERUNGSERGEBNISSE .....	52
4.3.2	QUALITÄTSKONTROLLE DER GENOTYPISIERUNGSERGEBNISSE.....	52
<b>4.4</b>	<b>GENOMWEITE ASSOZIATIONSSTUDIE.....</b>	<b>54</b>
4.4.1	LINIENÜBERGREIFENDE GENOMWEITE ASSOZIATIONSSTUDIE .....	54
4.4.2	PATHOGEN-SPEZIFISCHE RESISTENZ.....	64
4.4.3	LINIENSPEZIFISCHE AUSWERTUNG .....	64
4.4.4	LOKALISIERTE REGIONEN IM DETAIL .....	67
<b>4.5</b>	<b>KANDIDATENGENE .....</b>	<b>73</b>
4.5.1	POSITIONELLE KANDIDATENGENE.....	73
4.5.2	FUNKTIONELLE KANDIDATENGENE .....	73
<b>5</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>75</b>
<b>5.1</b>	<b>PHÄNOTYPISIERUNG .....</b>	<b>75</b>
<b>5.2</b>	<b>HERITABILITÄT .....</b>	<b>77</b>
<b>5.3</b>	<b>GENOTYPISIERUNG .....</b>	<b>77</b>
<b>5.4</b>	<b>GENOMWEITE ASSOZIATION .....</b>	<b>78</b>
<b>5.5</b>	<b>KANDIDATENGENE .....</b>	<b>84</b>
<b>5.6</b>	<b>ZÜCHTERISCHE NÜTZUNG .....</b>	<b>87</b>
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>89</b>
<b>7</b>	<b>SUMMARY.....</b>	<b>91</b>
<b>8</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>93</b>
<b>9</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>104</b>
<b>10</b>	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>110</b>
<b>11</b>	<b>ERKLÄRUNG.....</b>	<b>111</b>

## Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
agf	abgesetzte Ferkel
APP	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>
bp	Basenpaare
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
CM	coliforme Mastitis
DNA	Desoxyribonukleinsäure (Deoxyribonucleic acid)
DU	Duroc
EC	<i>Escherichia coli</i>
G	Guanin
GC	genomische Kontrolle
GWA	genomweite Assoziation
h	Stunden
h <sup>2</sup>	Heritabilität
HWE	Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (Hardy-Weinberg-Equilibrium)
ID-call	tierindividuelle Callrate
IE	Internationale Einheit
kg	Kilogramm
KI	Konfidenzintervall
KWo	Kalenderwoche
L	Landrasse
lgf	lebendgeborene Ferkel
LW	Large White
LxLW	Kreuzungssau Landrasse x Large White
LPS	Lipopolysaccharide
MAF	Allelfrequenz des selteneren Allels (Minor Allele Frequency)
Max	Maximum
mg	Milligramm
mgf	mumifiziert geborene Ferkel
μl	Mikroliter
Min	Minimum
ml	Milliliter
MM	gemischte Modelle (mixed model)
MMA	Mastitis-Metritis-Agalaktie
n	Anzahl der Beobachtungen
ng	Nanogramm
OR	Odds Ratio
PCA	Hauptkomponenten-korrigierte Assoziationsanalyse
PCR	Polymerasekettenreaktion

PCV-2	porcines Circovirus Typ 2
PDS	postpartales Dysgalaktie-Syndrom
PIC	Pig Industry Company
p.p.	post partum
PRRS	porcines reproduktives und respiratorisches Syndrom
QQ	Quantil-Quantil
QTL	merkmalspezifische Genorte (Quantitative Trait Locus)
SA	strukturierte Assoziation
sd	Standardabweichung
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SGSC	Schweinegenom-Konsortium (Swine Genome Sequencing Consortium)
SNP	Einzelbasenaustauschpolymorphismus (Single Nucleotide Polymorphism)
SNP-call	SNP-Callrate
spp.	Spezies
SSC	porcines Chromosom (Sus Scrofa Chromosom)
StA	<i>Staphylococcus aureus</i>
STREP	<i>Streptococcus dysgalactiae</i> und <i>Streptococcus agalactiae</i>
T	Thymin
tgf	totgeborene Ferkel
$\sigma_a^2$	additiv genetische Varianz
$\sigma_d^2$	Dominanzvarianz
$\sigma_{ep}^2$	Epistasievarianz
$\sigma_g^2$	genetische Varianz
$\sigma_p^2$	phänotypische Gesamtvarianz
$\sigma_u^2$	Umweltvarianz
$\chi^2$	Chi-Quadrat
$\lambda$	Inflationsfaktor

## Tabellenverzeichnis

- Tabelle 1: Auflistung der häufigsten und bekanntesten Bezeichnungen für das puerperale Krankheitsgeschehen bei der Sau.
- Tabelle 2: Übersicht der Angaben zur Prävalenz bzw. Inzidenz von PDS.
- Tabelle 3: Literaturüberblick zu Heritabilitätsschätzungen für den Merkmalskomplex PDS.
- Tabelle 4: Darstellung der Hypothesen und des Entscheidungsbaums mithilfe der Vierfelder-Tafel.
- Tabelle 5: Auflistung erwähnenswerter potenziell funktioneller Kandidatengene für das Merkmal PDS.
- Tabelle 6: Übersicht der über den Zeitraum von 28 Monaten insgesamt eingegangenen Proben (n=2.012) unter Berücksichtigung der Probenebene sowie der Einzeltierebene.
- Tabelle 7: Übersicht der genotypisierten Sauen (n=597) entsprechend verteilt nach Linie (Landrasse, Large White und entsprechende Kreuzungssauen) und Betrieb (A, B, C, D, E, F) jeweils unter Angabe des Erkrankungsstatus (PDS+/ PDS-).
- Tabelle 8: Vergleichende Übersicht der zugrunde liegenden Qualitätskriterien und die entsprechende Anzahl der Tiere und der autosomalen SNPs.
- Tabelle 9: Übersicht und Einteilung der beprobten Sauen (n=1.680) anhand des Erkrankungsstatus.
- Tabelle 10: Einteilung der mehrfach beprobten Sauen (n=268) nach PDS-Status.
- Tabelle 11: Übersicht des Auftretens von linienspezifischer PDS-Charakteristik im Hinblick auf rektale Körpertemperatur, hochgradige Betroffenheit des Gesäuges (MAM+) und Ferkelauffälligkeiten der Beprobungen (n=2.001), absolute Tierzahlen.
- Tabelle 12: Übersicht der linienspezifischen PDS-Charakteristik in Bezug zu den Parametern lebendgeborene Ferkel und abgesetzte Ferkel (n=2.001).
- Tabelle 13: Übersicht der linienspezifischen PDS-Charakteristik in Bezug zur Anzahl totgeborener und mumifiziert geborener Ferkel (n=2.001).
- Tabelle 14: Auswertung der wichtigen Bakterienspezies *Escherichia coli* (EC), *Staphylococcus aureus* (StA) und der *Streptococci agalactiae* bzw. *dysgalactiae* (STREP) in Kombinationsbetrachtung unter Berücksichtigung des PDS-Status. Es werden jeweils die absoluten Häufigkeiten und in Klammern die Reihenprozentage angegeben.
- Tabelle 15: Einteilung auf Sauenebene je nach Befund der klinischen bzw. der bakteriologischen Untersuchung am Beispiel von *Escherichia coli* (EC). Die Angabe der Sauen erfolgt für alle beprobten Sauen ( $n_{\text{gemma}}=1.680$ ) und für die Auswahl der genotypisierten Sauen ( $n_{\text{geno}}=597$ ).
- Tabelle 16: Linienspezifische Heterozygotie (Mittelwert, Min-Max, Standardabweichung, Varianz, n), verschiedene Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede ( $p<0,001$ ) [Welch Two Sample t-test].
- Tabelle 17: Linienspezifische Unterschiede in Minor Allel/ Major Allel. Die entsprechenden Zahlen stellen die Anzahl der SNPs mit gegensätzlicher Allelausrichtung dar. Mit steigender Anzahl erhöht sich die genetische Distanz zwischen den Populationen.

- Tabelle 18: Vergleichende Übersicht der SNPs mit den signifikantesten Ergebnissen (Angabe des p-Wertes des Chi-Quadrat-Tests) unter Verwendung des jeweiligen Datensatzes (fixalle, fixauto, fixrare und fixstrict). Die Positionsangabe (SSC, bp) erfolgt unter Verwendung des alten Assembly (Sscrofa7).
- Tabelle 19: Übersicht der fixen Effekte und deren Einfluss auf die Teststatistik der logistischen Regression und den Inflationsfaktor  $\lambda$ .
- Tabelle 20: Auswahl der assoziierten SNPs mit genomweiter und moderater Signifikanz unter Angabe der p-Werte der entsprechenden Assoziationstests (chi-Quadrat, Armitage-Trend-test (egscore) mit bzw. ohne Geburtseingriff (gebeing) als Kovariate und unter Korrektur mit 17 Hauptkomponenten). Die Chromosomenlokalisierung ist in Basenpaaren (bp) auf den jeweiligen porcinen Chromosomen (SSC) nach Illumina bei SNP INRA0058958 bzw. nach GROENEN (2012) angegeben.
- Tabelle 21: Übersicht der ausgewählten SNPs und der chromosomalen Lokalisation (Chromosom, genaue Lokalisation in bp) nach Sscrofa7, Sscrofa9, Sscrofa10 und Sscrofa10.2.
- Tabelle 22: Genotypenverteilung in den jeweiligen Linien für den SNP „ASGA0057450“ (n=594, SNP\_call=0.995): Absolute Verteilung der Tiere auf die entsprechenden Genotypen AA, AC bzw. CC. Die Allelfrequenz des selteneren Allels (MAF) und der p-Wert (Fisher-Exakt-Test) sind linienspezifisch angegeben.
- Tabelle 23: Genotypenverteilung in den jeweiligen Linien für den SNP „INRA0058958“ (n=595, SNP\_call=0.997): Absolute Verteilung der Tiere auf die entsprechenden Genotypen AA, AC bzw. CC. Die Allelfrequenz des selteneren Allels (MAF) und der p-Wert sind linienspezifisch angegeben.
- Tabelle 24: Genotypenverteilung in den jeweiligen Linien für den SNP „ALGA0094182“ (n=596, SNP\_call=0.998): Absolute Verteilung der Tiere auf die entsprechenden Genotypen AA, AG bzw. GG. Die Allelfrequenz des selteneren Allels (MAF) und der p-Wert (Fisher-Exakt-Test) sind linienspezifisch angegeben.
- Tabelle 25: Genotypenverteilung in den jeweiligen Linien für den SNP „ALGA0027303“ (n=596, SNP\_call=0.998): Absolute Verteilung der Tiere auf die entsprechenden Genotypen AA, AC bzw. CC. Die Allelfrequenz des Allels A und der p-Wert (Fisher-Exakt-Test) sind linienspezifisch angegeben.
- Tabelle 26: Übersicht der funktionellen Kandidaten zu dem Merkmalskomplex PDS.

## Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: Übersicht über die Entwicklung der zeitlichen Veröffentlichungen und darin publizierter QTL beim Schwein (eigene Darstellung unter Verwendung der Daten von PigQTLdb, Internetlink: <http://www.animalgenome.org/QTLdb/>, Stand: 25.04.2012, (HU et al., 2005)).
- Abbildung 2: Die Anzahl identifizierter und publizierter QTL beim Schwein verteilt auf Merkmalsklassen (Gesundheit, Reproduktion, Exterieur, Produktion, Fleischqualität) (eigene Darstellung unter Verwendung der Daten von PigQTLdb, Internetlink: <http://www.animalgenome.org/QTLdb/>, Stand: 25.04.2012, (HU et al., 2005)).
- Abbildung 3: Systematische Darstellung eines Chromosomenpaars, jeweils mit Allel A bzw. Allel G an einem SNP [A/G], je nach Kombination der Chromosomen bei bestimmten Individuen könnten der Genotyp AA, AG bzw. GG auftreten (eigene modifizierte Darstellung unter Verwendung der Abbildung des Chromosoms von [www.wikipedia.org](http://www.wikipedia.org)).
- Abbildung 4: Darstellung der zwei theoretischen Möglichkeiten für das postpartale Dysgalaktie-Syndrom (PDS): Entweder kann ein SNP genau im Bereich der kausalen Variante liegen (direkte Assoziation) oder die SNPs befinden sich im Kopplungsungleichgewicht zum kausalen Gen (nach ZIEGLER et al. 2010).
- Abbildung 5: Überblick der Methoden für die Korrektur von Stratifikation auf Grund von Populationsunterschieden bzw. Verwandtschaftsverhältnissen in genomweiten Assoziationsstudien (nach AULCHENKO 2010).
- Abbildung 6: Verteilung der SNPs (n=62.163) des Illumina PorcineSNP60 BeadChip entsprechend der Nomenklatur in Bezug auf die Herkunft des SNPs. Die einzelnen Abkürzungen stehen dabei für die verschiedenen Labore bzw. die Herkunftssequenz des SNPs (Quelle: Martien Groenen, Illumina).
- Abbildung 7: Verteilung der SNPs (n=62.163) des Illumina PorcineSNP60 BeadChip auf die Autosomen (1-18) und Gonosomen (X, Y) beim Schwein zur Übersicht der Annotierungen der 62.163 SNPs des Illumina PorcineSNP60 BeadChip. Die von Illumina verwendete Annotierung Sscrofa7 enthielt 13.970 SNPs ohne Chromosomenangabe. Spätere Versionen verbesserten die Annotierung, jedoch traten auch hier fehlende Annotierungen (NA), uneindeutige Annotierungen (Ambiguos) und Annotierungen auf einem einzelnen Contig ohne Chromosomenangabe (UWGS) auf (<http://www.animalgenome.org/repository/pig/>).
- Abbildung 8: Schema der Tierauswahl und der Probennahme des geMMA-Projekts.
- Abbildung 9: Probeneingang im Probennahmezeitraum April 2008 bis Juli 2010.
- Abbildung 10: Liniendiagramm zur Darstellung der absoluten Anzahl der beprobten Sauen (n=1.680) verteilt auf die PDS-Codierung und der davon ausgewählten Sauen für die Genotypisierung (n=597).
- Abbildung 11: Verteilung der rektalen Körpertemperatur in °C in Bezug zur Diagnose PDS (n=1.816).

- Abbildung 12: Posterior-Verteilung der Heritabilität entsprechend der relativen Häufigkeit (in %) der Gibbs-Samples.
- Abbildung 13: Plot der individuellen Callrate (ID-call) auf der x-Achse und der Heterozygotie (y-Achse) aller Proben. Linienspezifische Unterschiede sind durch die Farbcodierung zu erkennen (schwarz-Landrasse, rot-Large White, grün-LxLW, blau-LxL\_Du, türkis-LWxLW\_Du).
- Abbildung 14: Scree-Plot der einzelnen Hauptkomponenten sortiert nach der Höhe des jeweiligen Eigenwertes jeder einzelnen Komponente.
- Abbildung 15: Plot der ersten und zweiten Hauptkomponente: Die einzelnen Kreise repräsentieren jeweils die genotypisierten Sauen, die sich entsprechend der genomischen Verwandtschaftsmatrix clustern. Die Linien sind jeweils farbcodiert angegeben (schwarz-Landrasse, rot-Large White, grün-LxLW, blau-LxL\_Du, türkis-LWxLW\_Du).
- Abbildung 16: Einfluss der Anzahl an Hauptkomponenten auf den Inflationsfaktor  $\lambda$
- Abbildung 17: Darstellung des Quantil-Quantil-Plots der Teststatistik mit (links) und ohne (rechts) Berücksichtigung des Geburtseingriffs als zusätzliche Kovariate neben den verwendeten ersten 17 Hauptkomponenten.
- Abbildung 18: Manhattanplot zur Darstellung der Ergebnisse der genomweiten Assoziationsstudie für das Merkmal PDS. Der p-Wert wird als negativ dekadischer Logarithmus angegeben, die Linie kennzeichnet die Bonferroni-korrigierte Signifikanzgrenze ( $p < 1 \times 10^{-6}$ ).
- Abbildung 19: Manhattanplot zur Darstellung der Ergebnisse der genomweiten Assoziationsstudie für das Merkmal PDS bei Berücksichtigung von 74 Hauptkomponenten. Der p-Wert wird als negativ dekadischer Logarithmus angegeben, die Linie kennzeichnet die Bonferroni-korrigierte Signifikanzgrenze ( $p < 1 \times 10^{-6}$ ).
- Abbildung 20: Manhattanplot zur Darstellung der Ergebnisse der GWA-Analyse innerhalb der einzelnen Reinzuchtsauen der Linie Landrasse und LargeWhite für das Merkmal PDS. Der p-Wert wird als negativ dekadischer Logarithmus angegeben, die Linie kennzeichnet die angenommene Signifikanzgrenze ( $p < 1 \times 10^{-4}$ ).
- Abbildung 21: Manhattanplot zur Darstellung der Ergebnisse der GWA-Analyse innerhalb der einzelnen Kreuzungslinien für das Merkmal PDS. Der p-Wert wird als negativ dekadischer Logarithmus angegeben, die Linie kennzeichnet die angenommene Signifikanzgrenze ( $p < 1 \times 10^{-4}$ ).
- Abbildung 22: Vulkanplot zur Darstellung des p-Wertes als negativ dekadischer Logarithmus und das entsprechende Odds ratio (OR) für die jeweiligen analysierten SNPs. Rot markiert ist der SNP INRA0058958 (OR=0,3, p-Wert= $5,5 \times 10^{-6}$ ).



## 1 Einleitung

Entsprechend der Bundestierärzteordnung ist es ein Ziel der Tiermedizin, „Krankheiten der Tiere zu verhüten, zu lindern und zu heilen [sowie] zur Erhaltung und Entwicklung eines leistungsfähigen Tierbestandes beizutragen“ (Bundes-Tierärzteordnung §1). Krankheiten werden meist anhand der Symptome beim Tier diagnostiziert und entsprechend behandelt. Bei bekannter Ätiologie ist auf lange Sicht auch eine Bekämpfung hinsichtlich der Ursachen möglich. Das genaue Verständnis der Pathomechanismen ist unabdingbar für die Eliminierung einer Erkrankung und zur Optimierung von Behandlungsansätzen. Mitunter gibt es noch etliche Erkrankungen beim Tier, bei denen Ursache und Pathomechanismus nur unzulänglich bekannt sind. Eine dieser Erkrankungen beim Schwein ist das postpartale Dysgalaktie-Syndrom (PDS), auch bekannt als Mastitis-Metritis-Agalaktie (MMA)-Syndrom der Sauen. Gerade im Hinblick auf die übliche Medikamentengabe und den damit einhergehenden Einsatz von Antibiotika zur Behandlung des Syndroms ist eine Aufklärung der genetischen Ursache wünschenswert. Mit diesem Wissen können gegebenenfalls gezielt Sauen gezüchtet werden, die weniger anfällig für diesen Krankheitskomplex sind.

Eine genetische Prädisposition für diese Erkrankung wurde von verschiedenen Autoren diskutiert und es wurden Heritabilitäten um 0,10 für dieses Krankheitsmerkmal geschätzt (BERG et al., 2001; KRIETER&PRESUHN, 2009; LINGAAS&RONNINGEN, 1991). Detaillierte genetische Analysen für dieses Merkmal sind allerdings kaum in der Literatur zu finden. In der vorliegenden Arbeit wurde daher die genetische Variation des MMA-Syndroms mithilfe einer genomweiten Assoziationsstudie untersucht. Ziele dieser Arbeit waren:

- die genaue Phänotypisierung von Sauen post partum mit dem Schwerpunkt Mastitis
- die Heritabilitätsschätzung anhand des verfügbaren Datenmaterials
- die DNA-Isolierung und Genotypisierung ausgewählter Sauen
- die genomweite Assoziationsstudie unter Anwendung verschiedener statistischer Methoden sowie die Identifikation von positionellen Kandidatengenen.

Die vorliegende Arbeit umfasst die – nach Wissen der Autorin – erste ausführliche Untersuchung der genetischen Variation des postpartalen Dysgalaktie-Syndroms.

## 2 Literatur

### 2.1 Historischer Hintergrund

#### 2.1.1 Überblick zur Schweinezucht

Zucht und Züchtung in Form von Domestikation und gezielter Weiterverwendung bestimmter Tiere fand schon in der Antike statt. Dies betrifft auch das Schwein (*Sus scrofa*), welches eines der ältesten Haustiere des Menschen ist (FALKENBERG&HAMMER, 2006a). Verschiedene Domestikationsorte für das Hausschwein sind bekannt (CHEN et al., 2007). Die älteste Datierung von archäozoologischen Funden von Hausschweinskeletten geht zurück auf 7800 v. Chr. und befand sich im Bereich der jetzigen Türkei (FALKENBERG&HAMMER, 2006a). Von einer eigenständigen Domestikation von Schweinen im siebten Jahrhundert v. Chr. in Südostasien und China wird ausgegangen. Weitere lokale Regionen für eine Domestizierung des Schweins und für regionale Hausschweingruppen sind in Europa noch bis ins 20. Jahrhundert n. Chr. anzunehmen (FALKENBERG&HAMMER, 2006a).

Auch wenn die Schweinehaltung während der Zeit des Mittelalters weitverbreitet und auch der ‚Schweinehirt‘ ein angesehener Beruf war (FALKENBERG&HAMMER, 2006b), begann die eigentliche Schweinezucht und die Einführung von bestimmten Rassebezeichnungen erst Anfang des 19. Jahrhunderts (FALKENBERG&HAMMER, 2007). Die Weidehaltung oder die Eichelmast in Wäldern wurde allmählich von der Stallhaltung abgelöst. Im Rahmen der Industrialisierung und Urbanisierung folgte die Intensivierung der Schweinehaltung, um der steigenden Nachfrage der Stadtbevölkerung nach Schweinefleisch nachzukommen.

Bis zum Ende des 19. Jahrhunderts wurden Exterieurmerkmale wie Farbe, Typ, Rahmen oder Beinsetzung für die Tierbeurteilung und die züchterische Bewertung verwendet (FALKENBERG&HAMMER, 2008). Zudem wurden bereits damals der Gesundheitszustand und die Widerstandskraft oder Krankheitsanfälligkeit bei der Auswahl der Zuchttiere berücksichtigt (FALKENBERG&HAMMER, 2008). Der Versuch, „seuchen-immune“ Schweine durch Kreuzung mit verschiedenen Rassen oder Wildschweinpopulationen zu züchten, scheiterte aber meist auf Grund der geringeren Leistung dieser Tiere (FALKENBERG&HAMMER, 2008).

Das Schwein gilt heute mit über 960 Millionen Individuen weltweit als eine der weitverbreitetsten Säugetierarten auf der Erde (CHEN et al., 2007). Unter den mehr als 541

Schweinerassen auf allen Kontinenten (CHEN et al., 2007) zählen Large White, Landrasse und Duroc mit zu den wichtigsten und bekanntesten.

Die Rasse **Large White (LW)** oder auch Edelschwein ist die wohl am häufigsten registrierte Rasse in den Industrienationen. Dies gilt insbesondere dann, wenn berücksichtigt wird, dass die in den USA und Kanada vorkommenden Yorkshire Schweine direkte Nachkommen von Large White sind. Der Ursprung dieser Rasse liegt in Yorkshire County, England. Large White Schweine haben aufrecht stehende Ohren, weiße Haarfarbe, pinke Haut und sind durch ihre Größe gekennzeichnet. Sie sind bekannt für ihre Schinkenqualität und den relativ geringen Fettanteil, und werden weit verbreitet als Kreuzungstier für kommerzielle Linien verwendet. Large White sind robuste Schweine, die auch Klimavariationen oder Variationen anderer Umweltfaktoren gut vertragen. Large White Sauen sind für große Würfe, gute Milchproduktion und gutes mütterliches Verhalten bekannt (BRIGGS, 1983).

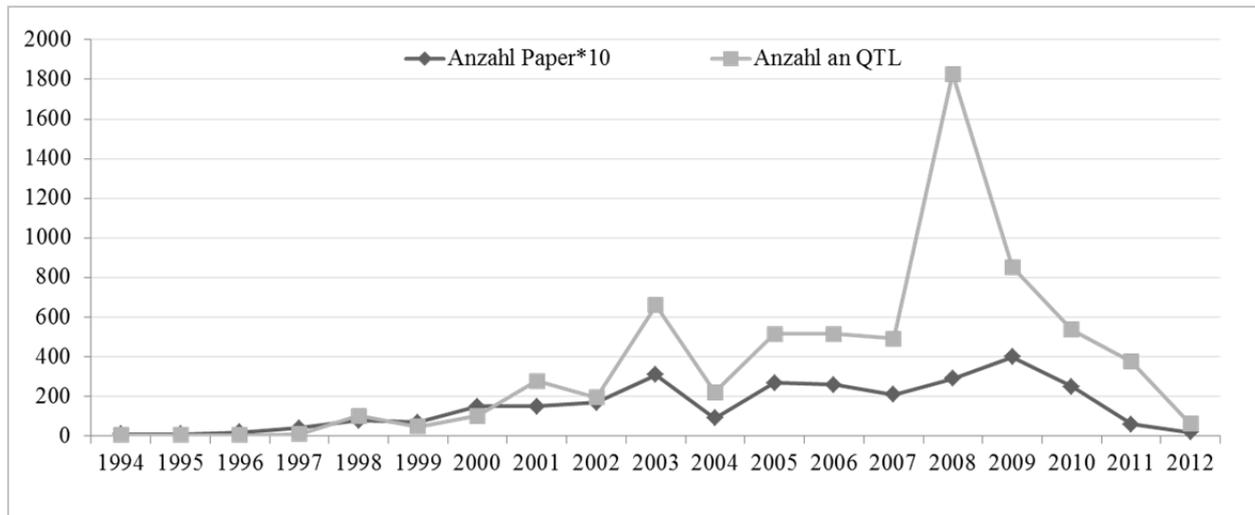
Das als **Landrasse (L)** bezeichnete Schwein kann verschiedene regionale Herkünfte haben, so sind die Ursprünge der Deutschen Landrasse um 1900 in Niedersachsen, Deutschland, zu finden (ADS 2010). Sein charakteristisches Merkmal sind die herunterhängenden Ohren. Zuchtselektion basiert vor allem auf guter Fruchtbarkeit, Milchproduktion und guten Muttereigenschaften (ADS 2010).

Der Ursprung der Rasse **Duroc (Du)** ist vor allem in den östlichen Vereinigten Staaten zu finden. Die rotbraunen Schweine stammten vermutlich von der Guinea Küste Afrikas. Rote Schweine (red hogs) wurden aber auch von Columbus und DeSoto nach Amerika gebracht, sodass deren Ursprung in Spanien und Portugal zu finden ist (BRIGGS, 1983). Durocs haben mitunter viele Farbvariationen von golden über gelb bis zu dunkelrot. Die Rasse Duroc zeichnet sich durch sehr gute Fleischqualität, insbesondere durch höheren intramuskulären Fettgehalt, sowie durch gute Wachstumsraten aus. Aufgrund der dunklen Haut und Haarfarbe wird die Rasse auch für die Outdoorhaltung bevorzugt.

### **2.1.2 Überblick zur Genetik**

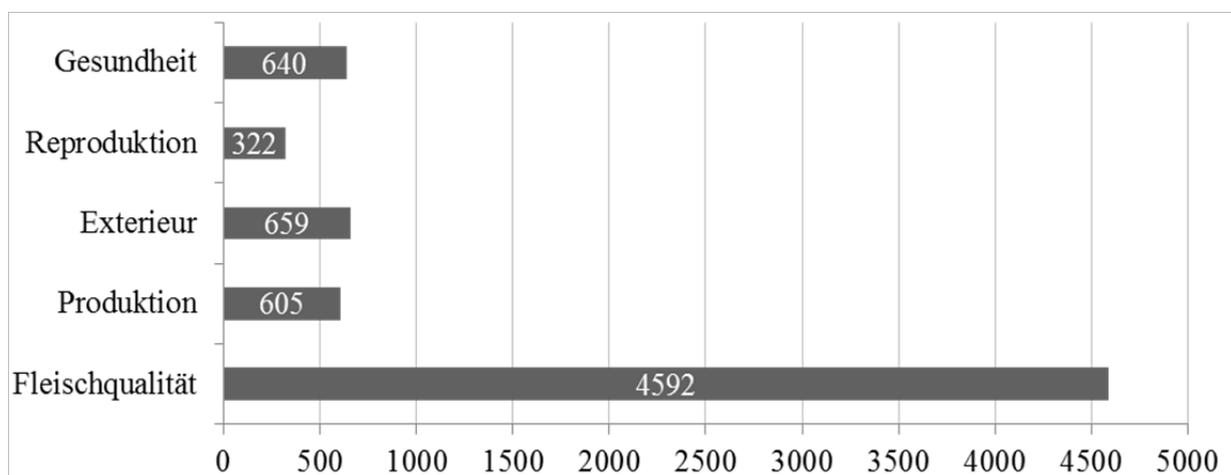
Mit Mendels beschriebenen Gesetzen der Vererbung, die für einfache Erbkrankheiten noch immer gelten, begann die eigentliche Genetik oder Vererbungslehre. Die Bezeichnung ‚Gen‘ wurde dabei um 1900 von Wilhelm Johannsen eingeführt (JOHANNSEN, 1913). Schließlich wurde von Watson und Crick, inspiriert durch das Betrachten des Modells von Rosalind Franklin, die Doppelstrangtheorie der DNA beschrieben (MADDOX, 2002; OLBY, 1994). Das steigende Interesse an Genetik spiegelte sich in der umfangreichen Entwicklung der Genforschung wider. So wurde 1983 von Kary Mullis die Polymerasekettenreaktion (PCR)

etabliert, die bis heute die wichtigste Analysemethode in der Molekulargenetik darstellt (GELDERMANN, 2005). Seit diesem Zeitpunkt folgten in rasanter Entwicklung immer neue Technologien zum Verständnis genetischer Variation und Prädisposition. Mit der Entdeckung der so genannten DNA-Marker wie Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismen, Mikrosatelliten oder Einzel-Nukleotid-Polymorphismen (single nucleotide polymorphisms = SNPs, gesprochen: snips) war die Grundlage für zahlreiche Kandidatengenstudien, Kopplungsstudien und schließlich genomweite Assoziationsstudien geschaffen. Weltweit wurden in Kopplungsstudien unter Nutzung von Mikrosatelliten zahlreiche genomische Lokalisationen mit Einfluss auf wichtige, meist wirtschaftlich relevante, quantitative Merkmale bei landwirtschaftlichen Nutztieren identifiziert (SCHWERIN, 2004). Diese Genorte, die sich zunächst über bis zu 20 cM (ca. 20 Mbp) erstrecken können und erst in einer sogenannten Feinkartierung näher bis auf 10cM eingegrenzt werden, werden als Quantitative Trait Loci (QTL) bezeichnet (SCHWERIN, 2004). Ziel der QTL-Studien innerhalb der Nutztierwissenschaften ist zum einen die züchterische Verbesserung bestimmter Merkmale mittels Marker-gestützter Zuchtwertschätzung, zum anderen die Identifikation von kausalen Varianten (SCHWERIN, 2004). Ein Beispiel für eine Kandidatengen-Lokalisation beim Schwein ist die Identifikation der Mutation im alpha (1,2)-Fucosyltransferase-Gen (FUT-1), welches eng gekoppelt mit dem *Escherichia coli*-F18-Rezeptorlocus (ECF18R) vorliegt und die Resistenz gegen die als Ödemkrankheit bekannte Colienterotoxämie durch *Escherichia coli* F18 beeinflusst (MEIJERINK et al., 1997; MEIJERINK et al., 2000; VÖGELI et al., 1996). Vereinzelt sind genetische Marker für eine Marker-gestützte Selektion in Einsatz gekommen, wie im Rahmen des Programms PICmarq<sup>TM</sup> der Marker DR2 für Krankheitsresistenz gegen Ödemkrankheit bei der PIC Deutschland (PIC Deutschland GmbH, 2004). Innerhalb weniger Jahre wurden zahlreiche QTL für das Schwein publiziert und in einer Datenbank (PIGQTLDB) gelistet (HU et al., 2005). Der rasante Anstieg an identifizierten QTL wird vor allem im Jahr 2008 deutlich, in dem – nach aktuellem Stand der Datenbank – 1.828 QTL publiziert wurden (Abbildung 1).



**Abbildung 1:** Übersicht über die Entwicklung der zeitlichen Veröffentlichungen und darin publizierter QTL beim Schwein (eigene Darstellung unter Verwendung der Daten von PigQTLdb, Internetlink: <http://www.animalgenome.org/QTLdb/>, Stand: 25.04.2012, (Hu et al., 2005)).

Der Schwerpunkt in den QTL-Studien wurde insbesondere auf wirtschaftlich bedeutende Merkmale wie Fleischqualität gelegt (Abbildung 2). Insgesamt 640 QTL wurden im Bereich Gesundheit publiziert, davon 107 QTL zur Krankheitsresistenz (PigQTLdb, Stand: 25.04.2012, (HU et al., 2005)).



**Abbildung 2:** Die Anzahl identifizierter und publizierter QTL beim Schwein verteilt auf Merkmalsklassen (Gesundheit, Reproduktion, Exterieur, Produktion, Fleischqualität) (eigene Darstellung unter Verwendung der Daten von PigQTLdb, Internetlink: <http://www.animalgenome.org/QTLdb/>, Stand: 25.04.2012, (HU et al., 2005)).

### 2.1.3 Historischer Rückblick zur Bezeichnung des postpartalen Dysgalaktie-Syndroms

Seit Mitte des 20. Jahrhunderts – im Zusammenhang mit der Intensivierung der Schweinehaltung – gibt es zahlreiche Veröffentlichungen, die das postpartale Krankheitsbild der Sau, welches sich am Gesäuge und am Uterus manifestiert, unter unterschiedlichen Bezeichnungen zusammenfassen und ihm mögliche Ätiologien zuschreiben. Eine Auswahl der wichtigsten und bekanntesten Bezeichnungen für diesen Krankheitskomplex ist Tabelle 1 zu entnehmen.

**Tabelle 1:** Auflistung der häufigsten und bekanntesten Bezeichnungen für das puerperale Krankheitsgeschehen bei der Sau.

	<b>Bezeichnung</b>	<b>Literaturquelle</b>
<b>Agalaktie der Sau</b>	Agalactia toxaemica	RINGARP, 1960
	Agalactia complex	PENNY, 1970
	Agalactia post partum	HERMANSSON et al., 1978a; HERMANSSON et al., 1978b
<b>komplexes Syndrom mit Begleiterkrankungen wie Metritis, Vaginitis, ggf. Cystitis</b>	Mastitis-Metritis-Agalaktie (MMA)	ELMORE&MARTIN, 1986; GOONERATNE et al., 1982; SMITH, 1965; THARP&AMSTUTZ, 1958
	Swine Urogenital Disease (SUGD)	BILKEI et al., 1994b
<b>puerperale Septikämie</b>	puerperale Septikämie und Toxämie (pST)	BOSTEDT et al., 1998; HEINRITZI&HAGN, 1999
<b>puerperales Fieber</b>	farrowing fever	HALGAARD, 1983
<b>coliforme Mastitis</b>	coliforme Mastitis (CM)	BERTSCHINGER, 1999; GERJETS&KEMPER, 2009; HELMBOLDT et al., 1953; JONES, 1979
<b>Hypo-/Dysgalaktie</b>	Lactation Failure (LF)	ELMORE&MARTIN, 1986; MARTIN&ELMORE, 1981
	Postpartum Dysgalactia syndrome (PDS, PPDS)	KLOPFENSTEIN et al., 2006; PAPADOPOULOS et al., 2010
	periparturient Hypogalactia syndrom (PHS)	SMITH et al., 1992

Die Tendenz zur Verwendung von PDS, in einigen Publikationen auch als PPDS abgekürzt, ist vor allem in englischsprachiger Literatur zu erkennen (KAHN et al., 2008; KLOPFENSTEIN et al., 2006; PAPADOPOULOS et al., 2010). Insbesondere in deutschsprachigen Ländern und hier vor allem in der Praxis wird weiterhin sehr häufig die Bezeichnung MMA verwendet

(HOY, 2003; KEMPER, 2010; LARSEN&THORUP, 2006). In einzelnen wissenschaftlichen Veröffentlichungen wurde das Krankheitsbild auch als puerperale Septikämie und Toxämie bezeichnet (BOSTEDT et al., 1998; HEINRITZI&HAGN, 1999). Diese Bezeichnung hat sich aber, wie die meisten anderen Versuche der Neueinführung präziserer Begriffe, weder in der europäischen noch in der internationalen Literatur durchgesetzt. In Anlehnung an die Beteiligung von coliformen Bakterien und in Analogie zum Rind wurde von einigen Autoren der Begriff der coliformen Mastitis (CM) beim Schwein verwendet (BERTSCHINGER et al., 1990; HELMBOLDT et al., 1953; WEGMANN, 1985). Andere Bezeichnungen entstanden durch unterschiedliche Betonung der Krankheitsausprägung (Agalaktiesyndrom vs. Postpartales Hypogalaktiesyndrom). Umstritten ist, inwieweit diese einzelnen Bezeichnungen wirklich Synonyme für ein Krankheitsbild sind, oder ob es sich dabei auch um verschiedene Pathomechanismen (siehe Kapitel 2.2.3) handelt.

## 2.2 Das postpartale Dysgalaktie-Syndrom

### 2.2.1 Krankheitsbild

Das postpartale Dysgalaktie-Syndrom (PDS) ist eine der wichtigsten peri- und postpartalen Erkrankungen, die sowohl die Sau als auch die neugeborenen Ferkel beeinträchtigt. Es existieren unterschiedliche klinische Ausprägungen und Manifestationen, die auch zu den verschiedenen Krankheitsbezeichnungen führten. In der ‚klassischen‘ Form wurden die Entzündung der Milchleiste (Mastitis), die einhergeht mit einem Versiegen der Milchleistung (Agalaktie), und die Entzündung der Gebärmutter (Metritis) beschrieben (THARP&AMSTUTZ, 1958). Fast gleichzeitig mit der Einführung des Namens wurde auch die nicht zutreffende Beschreibung diskutiert (MARTIN&ELMORE, 1981; SMITH, 1965). So handelt es sich in den seltensten Fällen um ein vollständiges Versiegen (=Agalaktie), sondern meist nur um eine Verminderung des Milchflusses (Hypogalaktie) oder eine gestörte Milchabgabe (Dysgalaktie). Des Weiteren liegt eher eine Endometritis (Entzündung der Gebärmutter Schleimhaut) als eine Metritis (Entzündung der Gebärmutter mit Metrium) vor. Als Leitsymptom wurde vor allem die Mastitis und die gestörte Milchproduktion (=Dysgalaktie) beschrieben (BERTSCHINGER et al., 1990; KLOPFENSTEIN et al., 2006). Das Krankheitsbild geht zudem meistens mit einer Körpertemperaturerhöhung über 39,5°C und einem gestörten Allgemeinbefinden der Sau einher (FRANEK&BILKEI, 2005; FURNISS, 1987; HALGAARD, 1983; KING et al., 1972; RINGARP, 1960). Erkrankte Sauen zeigen Inappetenz, Obstipation oder Koprostase, in Einzelfällen kommt es zu erhöhter Atem- bzw. Herzfrequenz und ZNS-Depressionen (BOSTEDT et al., 1998; HEINRITZI et al., 2006; RINGARP, 1960). Gelegentlich kann pathologischer Vaginalausfluss beobachtet werden, der auf eine puerperale Endometritis hinweist (BOSTEDT et al., 1998; HEINRITZI et al., 2006; RINGARP, 1960). Das Gesäuge kann klinische Veränderungen einer akuten bis subakuten, katarrhalisch-eitrigen bis nekrotisierenden Mastitis mit Rötung, Wärme, Schwellung und Schmerzhaftigkeit zeigen (KLOPFENSTEIN et al., 2006). Die Sauen liegen häufiger in Brust-Bauchlage, um ein Saugen der Ferkel am schmerzhaften Gesäuge zu verhindern (HEINRITZI et al., 2006; HERMANSSON et al., 1978b). Die Ferkel zeigen auf Grund der fehlenden Milchaufnahme deutlich ihren Hunger, indem sie sich unruhig in der Nähe des Muttertieres aufhalten und vergeblich Saugversuche starten. Diese typischen Verhaltensreaktionen dienen aufmerksamen Landwirten neben der Temperaturerhöhung bei der Sau post partum als wichtige Hilfsmittel zur Früherkennung auffälliger Sauen.

Die in der Literatur angegebene Prävalenz für diesen Krankheitskomplex schwankt zwischen 15 bis 20% je nach Merkmalsdefinition (Tabelle 2). In Problembeständen wird die Prävalenz mit bis zu 80 oder gar 100% angegeben (GLOCK, 1983; MARTIN et al., 1974; WALDMANN&WENDT, 2004). Bislang ist nicht bekannt, wie viele Betriebe in Deutschland derzeit von PDS betroffen sind. Mittels einer aktuellen Umfrage (2007) anhand eines Fragebogens an konventionelle Schweine-haltende Betriebe und deren Tierärzte in Belgien gaben 37 von 110 Betrieben (34%) an, eine PDS-Problematik zu haben (PAPADOPOULOS et al., 2010). In diesen betroffenen Betrieben schwankte die von Betriebsleiter oder Tierarzt geschätzte betriebsspezifische Prävalenz zwischen 1 und 15% (PAPADOPOULOS et al., 2010). In einer Befragung von ökologisch wirtschaftenden Betrieben in Deutschland wurde PDS als immer wieder oder als vereinzelt auftretend benannt und 18% der ökologischen Ferkelerzeuger gaben an, homöopathische Mittel als PDS-Prophylaxe zu verwenden (LANDBAU, 2004).

Auch wenn die hochgradig klinischen Fälle durch rechtzeitiges Erkennen und schneller Therapie in heutigen Schweinebetrieben eher selten sind, kommt es gerade durch die geringgradig klinischen oder subklinischen Formen zu Leistungseinbußen und Saugferkelverlusten. Verbunden mit der unzureichenden Versorgung mit Kolostrum, das als Immunglobulin- und Energielieferant für die neugeborenen Ferkel lebensnotwendig ist, kann es vor allem in den ersten Lebenstagen zu Durchfall, Unterernährung, Wachstumsverzögerung und erhöhter Krankheitsanfälligkeit („Kümmern“) der Ferkel kommen. Je nach Schwere können außerdem bei schwächeren Ferkeln Hypoglykämie und der Tod durch Verhungern oder durch Erdrücken die Folge sein (HEINRITZI et al., 2006). Neben diesen genannten unmittelbaren Folgen führen auch Spätfolgen wie Konzeptionsstörungen in den Folgewürfen zu wirtschaftlichen Einbußen (HOY, 2006).

**Tabelle 2:** Übersicht der Angaben zur Prävalenz bzw. Inzidenz von PDS.

Prävalenz	PDS-Charakteristik	Rasse	Betriebsinformationen	Quelle
3,7% in Bezug auf alle Abferkelungen aller Betriebe	Agalactia toxoemica	Schwedische Landrasse	klinische Fälle in 238 von 700 (34%) Betrieben, Schweden	RINGARP, 1960
5,5% (kleine Betriebe) bis 10,3% (große Betriebe) bezogen auf Betriebe			kleine und große Betriebe, Schweden	BÄCKSTRÖM, 1973
6,9% (1,1%–37,2%) in Bezug auf alle Abferkelungen			1 Jahr, 31 Betriebe, 16.405 Geburten, Illinois, USA	BÄCKSTRÖM et al., 1984
13,1% (bezogen auf alle Betriebe) 19,8% (bezogen auf betroffene Betriebe = Innerherdprävalenz)	Umfrage mittels Fragebogen an Betriebsleiter	keine Angabe	50.4% (277 von 550) der Sauenbetriebe mit Agalaktie betroffen, 27.656 Geburten, Missouri, USA	THRELFALL&MARTIN, 1973
16,5 – 18,5% in Bezug auf alle Abferkelungen aller Betriebe	klinische Beurteilung durch Tierärzte	Norwegische Landrasse (NL), Kreuzung NL x Yorkshire	70 Betriebe, Norwegen	LINGAAS&RONNINGEN, 1991
25% in einem Betrieb	Aufzeichnung der Behandlung durch Betriebsleiter	Dänische Landrasse, Yorkshire	1 Betrieb, 12.031 Sauen, Dänemark	BERG et al., 2001
38,4% in einem Betrieb	Aufzeichnung Behandlung ab 39,4°C durch eine Person	Deutsche Landrasse	1 Betrieb, 544 Sauen, Deutschland	KRIETER&PRESUHN, 2009
1-15% in betroffenen Betrieben [geschätzte Angabe]	Umfrage zu PDS mittels Fragebogen (Landwirt mit Tierarzt)	verschiedene	34% (37/110) der Betriebe mit PDS betroffen, Belgien	PAPADOPOULOS et al., 2010

### 2.2.2 Einfluss- und Risikofaktoren

Da es sich um eine komplexe multifaktorielle Erkrankung handelt, wird die Diagnose und klinische Bewertung durch zahlreiche ursächliche oder mit-beeinflussende Faktoren erschwert. Bisher sind bereits zahlreiche solcher Faktoren beschrieben worden, deren Einfluss zum Teil kontrovers diskutiert wird.

Prinzipiell erkranken Sauen jeden Alters, dennoch beobachteten einige Autoren bei Jungsaunen eine erhöhte Anfälligkeit, die u.a. auf den geringeren immunologischen Schutz von Jungsaunen zurückgeführt wird (BOSTEDT et al., 1998; GERJETS et al., 2011a; HOY, 2002; KRIETER&PRESUHN, 2009). Andere Autoren betonten, dass vermehrt Sauen der zweiten und dritten Parität betroffen sind, und diese in stärkerem Maße Mastitis und vor allem Endometritis zeigten (HERMANSSON et al., 1978b; RINGARP, 1960). Die Autoren BAER&BILKEI (2005) beobachteten verstärkt pathologisch veränderte Mammae bei Altsauen. Während PLONAIT&BICKHART (1997) ebenfalls vermehrt PDS bei mehrgebärenden und vor allem übergewichtigen Sauen feststellten, lag nach HEINRITZI&HAGN (1999) kein Einfluss der Wurfzahl auf die Erkrankungshäufigkeit vor. Das Durchschnittsalter der an PDS erkrankten Sauen lag in einer Studie bei drei Jahren (HEINRITZI&HAGN, 1999).

In der Milch von erkrankten Tieren wurden zahlreiche bakterielle Erreger nachgewiesen, denen man eine ursächliche Rolle in der Auslösung einer galaktogen induzierten Mastitis zuspricht (AWAD MASALMEH et al., 1990; BERTSCHINGER et al., 1990; ROSS et al., 1981; ROSS et al., 1975). In der Milch wurden Rein- und Mischkulturen verschiedener Bakterienarten (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, alpha-hämolyisierende *Streptococcus* spp.) isoliert (AWAD MASALMEH et al., 1990; BERTSCHINGER et al., 1990; HIRSCH et al., 2003; RINGARP, 1960; ROSS et al., 1981; ROSS et al., 1975). In Endometriumabstrichen wurden jedoch vor allem Monokulturen von coliformen Keimen festgestellt (BILKEI et al., 1994b; HIRSCH et al., 2003). Als bedeutende Risikofaktoren kommen weiterhin alle Faktoren in Betracht, die zum einen den peripartalen Stress der Sau erhöhen, und zum anderen die Bakterienvermehrung und eine Endotoxämie begünstigen. Ein Rohfasermangel im Futter kann zu einer reduzierten Darmperistaltik und einer verlängerten Darmpassage führen, die wiederum die intensive Vermehrung von Bakterien in Magen-Darm-Inhalt und eine verstärkte Freisetzung von Endotoxinen aus gramnegativen Bakterien fördern (REINER et al., 2009).

In vielen Fällen finden sich beim Postpartalen Dysgalaktie-Syndrom neben den Hauptbefunden Mastitis und Metritis auch weitere klinische Befunde, wie u.a. Cystitis, Vaginitis oder Obstipation (BILKEI et al., 1994a; BILKEI et al., 1994b). Insbesondere die Obstipation führt zur Dysbiose der natürlichen Darmflora. Die übermäßige Bakterienvermehrung kann schließlich zur Translokation der Bakterien bzw. zur Freisetzung von bakteriellem Endotoxin in die Blutbahn führen (REINER et al., 2009).

Einer der wichtigsten Risikofaktoren ist das Geburtsmanagement und der Geburtsverlauf. Eine verlängerte Geburtsdauer von mehr als vier Stunden geht sehr häufig mit einem verzögerten Schluss der Zervix und als weitere Folge des erleichterten Einwanderns von Keimen über die geöffnete Zervix mit einer Endometritis puerperalis einher. Der Zusammenhang zwischen erhöhter Trächtigkeitsdauer (AWAD MASALMEH et al., 1990; RINGARP, 1960) sowie verzögerter Geburtsdauer (BOSTEDT et al., 1998; RINGARP, 1960; SCHULZ et al., 1983) und dem Auftreten von PDS ist mehrfach beschrieben. Zahlreiche Faktoren können sich wiederum negativ auf die Geburtsdauer auswirken. So zeigen Sauen in bewegungsarmen Abferkelständen im Vergleich zu in Gruppenhaltung gehaltenen Sauen vermehrt Geburtsstockungen, und die Geburtsdauer ist erhöht (HOY, 2003). Aber auch die Fütterung mit rohfaserarmer Diät oder eine zu rasche Umstellung des energieärmeren, ballaststoffreichen Futters während der Trächtigkeit auf energiereiches Laktationsfutter führt sowohl zu verlängerten Darmpassagen als auch zu Obstipation und kann die Geburtsdauer erhöhen (WENDT, 2000).

Kontrovers diskutiert wird auch die Frage, inwieweit ein Zusammenhang zwischen Wurfgröße und PDS-Erkrankungshäufigkeit vorliegt. HEINRITZI&HAGN (1999) stellten keinen Einfluss fest, während PLONAIT&BICKHART (1997) in steigender Wurfgröße eine Prädisposition für PDS sahen.

Weitere mögliche Einflussfaktoren wie Mykotoxine sind mitunter nur in einzelnen Studien wissenschaftlich überprüft wurden. So konnte u.a. mit steigendem Ergotoxin-Gehalt um 1,5% im Futter ein Rückgang der Milchproduktion post partum beobachtet werden (KOPINSKI et al., 2007). Als mögliche Ursache wird eine Hemmung der Prolaktinsekretion durch Ergotoxin angenommen (KOPINSKI et al., 2007; MARTINEAU et al., 2012).

### **2.2.3 Pathogenese und Pathomechanismen**

Die genaue Pathogenese von PDS ist auf Grund des komplexen und multifaktoriellen Zusammenhangs zwar vielfältig diskutiert, bislang aber noch nicht vollständig geklärt.

Entsprechend folgender Unterscheidung der Krankheitsbilder (I-IV) werden die möglichen Pathomechanismen erläutert:

#### **I. Komplexes Syndrom mit Begleiterkrankungen wie Metritis bzw. Endometritis, Vaginitis, ggf. Cystitis und Obstipation**

Es kommt zu einer hämatogenen Infektion genitalen oder enteralen Ursprungs, die in der Folge zu einer septikämischen Puerperalerkrankung führt. Als eine Hauptursache werden Endotoxine von gramnegativen Bakterien, insbesondere von *Escherichia coli*, beschrieben (PEJSAK&TARASIUK, 1989; SMITH&WAGNER, 1984, 1985). Die als Lipopolysaccharide (LPS) bezeichneten Zellwandbestandteile der gramnegativen Bakterien führen zu einer Kaskade von Immunreaktionen, die schließlich alle Zeichen der Entzündung verursachen (Fieber, Rötung, Schmerz). Die bakteriellen Endotoxine können entweder aus dem Uterus durch z.B. eine Endometritis puerperalis, oder aus der Milchdrüse oder dem Darm, bedingt durch ein überschießendes Bakterienwachstum als Folge von Obstipation, stammen und eine Endotoxämie verursachen (REINER et al., 2009). Welche von diesen drei möglichen Quellen die Hauptquelle von bakteriellen Endotoxinen ist, ist bisher nicht sicher bekannt. Durch sowohl parenterale als auch intramammäre Applikation von *Escherichia coli*-Endotoxin konnte ein gestörtes Allgemeinbefinden mit Fieber induziert werden (ELMORE et al., 1978).

#### **II. Puerperales Fieber**

Zahlreiche Autoren haben das Auftreten von erhöhten Temperaturen bzw. Fieber nach der Geburt beschrieben, welches mit klinischen Befunden der Dysgalaktie einhergeht (HALGAARD, 1983; RINGARP, 1960). Eine klinische Mastitis mit primären Gesäugeveränderungen ist meistens nicht diagnostizierbar (HALGAARD, 1983). Fraglich ist, ob betroffene Sauen unter subklinischer Mastitis leiden, oder ob tatsächlich keine Entzündung vorliegt. Aufschluss darüber könnten Untersuchungen mit Bestimmung anderer Entzündungsparameter geben. Für die bovine subklinische Mastitis ist die Zellzahl eine der bedeutendsten Kennzahlen: ein Zellgehalt von bis zu 100.000 Zellen/ml wird als physiologisch bezeichnet (WIESNER et al., 2000), bei einem deutlichen Anstieg auf über 100.000 Zellen/ml bis zu 400.000 Zellen/ml ohne weitere Befunde besteht ein Verdacht auf subklinische Mastitis (DVG-LEITLINIEN, 2012). Beim Schwein gilt nach Literaturangaben die Zellzahl als physiologisch erhöht, da auch bei unauffälligen Sauen Werte zwischen 500.000

Zellen/ml und 3 Millionen Zellen/ml gemessen werden (PERSSON et al., 1996; SCHOLLENBERGER et al., 1986; VARADIN&FILIPOVIC, 1975). Die Gründe für die signifikant erhöhte physiologische Zellzahl im Vergleich zu anderen Säugetieren sind nicht bekannt. Möglicherweise liegen subklinische Mastitiden bei Sauen viel häufiger vor, als bisher in Literatur oder Praxis beschrieben, so dass die ‚physiologisch‘ erhöhte Zellzahl auch bei der Sau eine Art reaktiver Entzündungsmechanismus darstellt. Eine genaue Differenzierung der Zellen zwischen epithelialen Zellen oder Entzündungszellen wie neutrophilen Granulozyten und Makrophagen ist wünschenswert. Weitere mögliche Entzündungsparameter wie Akut-Phase-Proteine oder proinflammatorische Zytokine sind ebenfalls mit einem peri- bzw. puerperalen Anstieg bei sonst klinisch unauffälligen Sauen beschrieben, der meist auf den mit der Geburt einhergehenden Stress für den Organismus zurückgeführt wird (DUNKELBERG, 2006; SORRELLS et al., 2007; VERHEYEN et al., 2007).

### **III. Infektiös bedingte Mastitis**

Hierbei kommt es durch eine galaktogene Infektion durch coliforme Bakterien oder auch andere Mastitis-assoziierte Erreger wie *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus agalactiae* oder *Staphylococcus (Staph.) aureus* zu einer Entzündung der Milchdrüse (AWAD MASALMEH et al., 1990; BERTSCHINGER et al., 1990; KEMPER&GERJETS, 2009). Endogene Pyrogene in der Milchdrüse verursachen Fieber, und die Endotoxine unterdrücken die Freisetzung von Prolaktin aus der Hirnanhangsdrüse, vermindern die Schilddrüsenproduktion und erhöhen die Kortisol-Konzentration im Blut (ELMORE et al., 1978; SMITH&WAGNER, 1985). Diese Veränderungen beeinträchtigen wiederum die Kolostrum- bzw. Milchproduktion und Milchsekretion.

### **IV. Nicht-infektiös bedingte Hypo-/Dysgalaktie (primäre hormonelle Störung)**

Die Kolostrum- oder Milchejektion wird durch ein komplexes Hormongleichgewicht gesteuert und aufrechterhalten. Differenziert werden sollte zwischen einer primären und sekundären hormonellen Störung. Die hypophysäre Insuffizienz tritt dabei meist unabhängig von der Körpertemperatur bzw. Fieber auf. Verschiedene Autoren diskutieren eine hormonell bedingte PDS-Prädisposition im Zusammenhang mit einer Uterusatonie (HILDENBRAND, 1984; RINGARP, 1960). Einige Autoren beschreiben einen Zusammenhang mit dem Fette-Sauen-Syndrom (HILDENBRAND, 1984; MARTINEAU et al., 2012). Die Verfettung der Sau kann zur Wehenschwäche führen, die verzögerte und verlängerte Geburten bedingt und damit das PDS-Risiko erhöht. In älteren Literaturquellen werden partielle

Hypophysenvorderlappeninsuffizienz und postpartale Hypophyseninsuffizienz in Erwägung gezogen (HILDENBRAND, 1984).

#### **2.2.4 Prophylaxe und Therapie**

Durch regelmäßige Kontrolle der rektalen Körpertemperatur post partum und des Verhaltens der Sau, sowie einer Kontrolle der Ferkel und des Saugverhaltens, werden frühzeitig erste Anzeichen einer PDS-Problematik erkannt. Da bei den meisten größeren Schweinezucht- und Vermehrungsbetrieben mitunter auch pro- und metaphylaktische Maßnahmen durchgeführt werden, sind die in alter Literatur beschriebenen schwerwiegenden Fälle heute meist selten zu beobachten. So wird in vielen Betrieben bereits bei Anzeichen einer Temperatur ab 39.5°C eine Behandlung eingeleitet.

Für eine Therapie der an PDS erkrankten Sau wird eine kombinierte Gabe von Entzündungshemmern und Antibiotika, und ggf. Oxytocin, angeraten (AURICH, 2002; NIEMANN&SCHMELZ, 2008; STRAW et al., 2000). Die Nicht-steroidalen Antiphlogistika (NSAIDs) haben eine antiphlogistische (entzündungshemmende), analgetische (schmerzlindernde) und antipyretische (fiebersenkende) Wirkung und führen meist sehr schnell zu einem besseren Allgemeinbefinden der Sau (RATHMANN, 2008). Als Antibiotika werden alle mit Breitbandspektrum gegen sowohl gramnegative als auch grampositive Bakterien empfohlen (HEINRITZI&HAGN, 1999; KOBERA, 2000; LOHR et al., 2004; MARKOWSKA-DANIEL&KOLODZIEJCZYK, 2001; SCHÖNING&PLONAIT, 1990; SCUKA et al., 2006; STRAW et al., 2000). Im Hinblick auf sich ausbreitende Antibiotikaresistenzen ist eine gezielte Antibiotikatherapie nach genauer Erreger- und Resistenzbestimmung wünschenswert, aber bislang aus praktischen Gründen oft nicht realisierbar. Oxytocin und Prostaglandine sind als unterstützende Therapie bei verzögerten oder verlängerten Geburten empfohlen, sofern kein Verdacht auf Geburtsprobleme vorliegt, der ein manuelles Eingreifen erforderlich macht (AURICH, 2002). Auch zur Behandlung von puerperalen Endometritiden werden Oxytocin und Prostaglandine angeraten (AURICH, 2002). Zur Anregung der Laktation ist Oxytocin bedingt durch die sehr kurzfristige Wirkung nur in Einzelfällen empfehlenswert (5-10 IE/Sau, 4-5x täglich, 2-3 h Intervall) (AURICH, 2002). Das bis zu 5-6 Stunden länger wirkende Carbetocin (Präparatename: Depotocin) kann als Alternative angewandt werden. Wenn die betroffene Muttersau nicht schnell genug erfolgreich therapiert wird, kann eine Versorgung der Ferkel mit Kolostrum- oder Milchersatz erforderlich sein. Je nach Betriebsgröße ist auch ein Umsetzen der Ferkel angebracht. Eine zeitnahe Diagnose und Therapie verringert das Risiko von Ferkelverlusten, sodass eine betriebliche Kontrolle der rektalen Temperatur post partum

als Frühkriterium empfohlen wird (FURNISS, 1987). Die Vorteile einer schnellen Medikamentengabe nach Früherkennungsmethoden wie Temperaturmessung gehen einher mit dem gestiegenen Risiko für den erhöhten Einsatz von Antibiotika bei falsch-positiven Tieren.

Eine Aufklärung der genetischen Ursache von PDS zur Senkung der Inzidenz ist daher nicht nur aus Gründen der Tiergesundheit und des Tierschutzes wünschenswert, vielmehr kann durch gezielte Zucht und Selektion auch der Medikamenteneinsatz reduziert werden.

## 2.3 Genetik und PDS

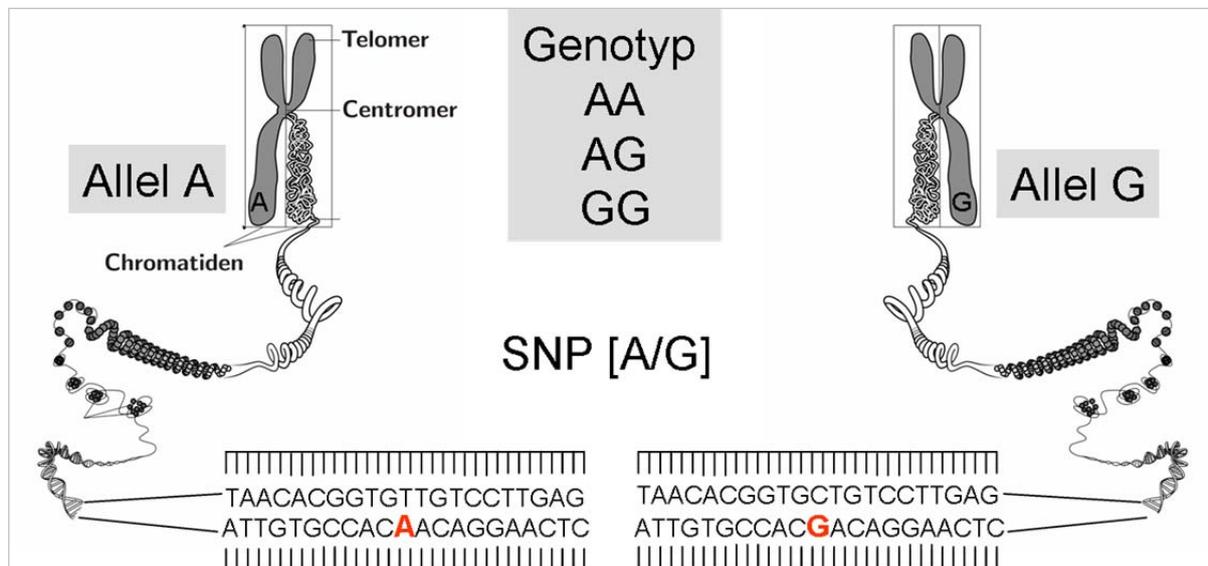
### 2.3.1 Das Schweinegenom

Dieses Unterkapitel bietet einen kurzen, übersichtlichen und anschaulichen Einblick in das genetische Grundlagenwissen, das für das Verständnis der vorliegenden Arbeit unumgänglich ist. Für detaillierte und ausführliche Erläuterungen sei allerdings auf umfangreiche Lehrbücher (FALCONER, 1984; GELDERMANN, 2005) und weitere wissenschaftliche Literaturquellen verwiesen (COOPER&SHENDURE, 2011; MANOLIO, 2010; PEARSON&MANOLIO, 2008).

Das Schweinegenom hat 38 Chromosomen, bestehend aus 18 homologen Autosomenpaaren und einem Gonosomenpaar (X, Y). Der einfach haploide Chromosomensatz beim Schwein besteht aus etwa  $2,7 \times 10^9$  Basenpaaren (bp) DNA und umfasst eine genetische Distanz von etwa 2,3 Morgan (GELDERMANN, 2005).

Zur Untersuchung und Kartierung von Genomen bedient man sich so genannter genetischer Marker. Ein genetischer Marker ist ein Gen oder ein DNA-Abschnitt mit bekannter Lokalisation im Genom, der in seiner Basenabfolge polymorph ist (GELDERMANN, 2005). Innerhalb der Marker oder Loci kann man zwischen Typ I-Loci und Typ II-Loci unterscheiden: Typ I-Loci befinden sich innerhalb funktioneller Gensequenzen, und Typ II-Loci sind in DNA-Regionen lokalisiert, deren primär funktionelle Bedeutung nicht bekannt ist (GELDERMANN, 2005). Beispiele für genetische Marker sind Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismen, Mikrosatelliten und Einzel-Nukleotid-Polymorphismen. Einzel-Nukleotid-Polymorphismen (SNPs) sind Einzelbasenaustausche, die über das gesamte Genom unregelmäßig verteilt sind (etwa alle 200bp ein SNP). Für Hochdurchsatztechnologien und die Chipentwicklung werden SNPs ausgewählt, die nahezu regelmäßig über das Genom verteilt sind (etwa alle 40 kb ein SNP). Dabei werden codierende und nicht codierende SNPs in Abhängigkeit davon unterschieden, ob sich der SNP innerhalb eines Gens oder außerhalb codierender Regionen befindet. Befindet sich der SNP in einer codierenden Region, kann dieser zu einer veränderten Aminosäureabfolge in der Translation führen (nicht-synonym) oder auf Grund der Redundanz des genetischen Codes keine Veränderung bewirken (synonym). Kommt es zu einer veränderten Aminosäureabfolge, kann diese wiederum das Protein entweder nicht beeinträchtigen, oder aber dessen Funktion verändern (missense) oder zu vollständigem Funktionsverlust führen (nonsense).

Ein SNP des kommerziellen Illumina BeadChips (Illumina, [www.illumina.com](http://www.illumina.com)) besteht aus mindestens 121 Basen, wobei die mittlere Base den jeweiligen Polymorphismus darstellt. Theoretisch könnten alle vier Basen (Adenin, Guanin, Cytosin, Thymin) an dieser Position vorkommen, sodass ein SNP vier Allele besitzen würde. Da aber die Wahrscheinlichkeit sehr gering ist, dass gerade an einer Mutationsstelle auch noch eine weitere Mutation stattfindet, sind die meisten SNPs biallelisch. Vereinzelt werden in der Humangenetik triallelische SNPs beschrieben (CHUNG et al., 2010). Bezüglich des Auftretens eines Polymorphismus wird zwischen Transition und Transversion unterschieden. Während es bei der Transition zu einem Austausch innerhalb Purinbasen (Adenin = A, Guanin = G) bzw. Pyrimidinbasen (Cytosin = C, Thymin = T) kommt, wird bei der Transversion eine Pyrimidinbase durch eine Purinbase oder umgekehrt getauscht (Beispiele: A mit C, A mit T, C mit G, C mit T). Obwohl es bei Transversionen dreimal mehr Mutationsmöglichkeiten gibt, sind Transitionen doppelt so häufig wie Transversionen, sodass zwei Drittel aller SNPs meist C/T oder A/G Allele besitzen. Unter Annahme eines biallelischen SNPs [A/G] kann ein Tier jeweils den homozygoten Genotyp AA bzw. GG oder den heterozygoten Genotyp AG besitzen (Abbildung 3).



**Abbildung 3:** Systematische Darstellung eines Chromosomenpaars, jeweils mit Allel A bzw. Allel G an einem SNP [A/G], je nach Kombination der Chromosomen bei bestimmten Individuen könnten der Genotyp AA, AG bzw. GG auftreten (eigene modifizierte Darstellung unter Verwendung der Abbildung des Chromosoms von [www.wikipedia.org](http://www.wikipedia.org)).

### 2.3.2 Erbllichkeit von PDS

Schon 1960 postulierte RINGARP (1960), dass PDS zu einem gewissen Ausmaß eine erbliche Prädisposition aufweist. Zwar wurde bis dato nie die Vererbung untersucht, doch würden bestimmte Beobachtungen hinweisend sein (RINGARP, 1960). Der Autor zitiert mehrere Literaturquellen, die Unterschiede in der Inzidenz und Prävalenz bei verschiedenen Rassen und Zuchtlinien beobachteten und bestätigt dies durch seine eigene Beobachtung, dass in einem Schweinebetrieb mit zwei nichtverwandten Zuchtlinien ein Unterschied in der Inzidenz von PDS festzustellen war (RINGARP, 1960). Dies zeigt, dass trotz gleicher Umweltbedingungen wie Haltung, Fütterung und Hygiene eine genetische Prädisposition vorliegen kann. So wurde eine höhere Krankheitsanfälligkeit für PDS in Sauenfamilien gefunden, die generell eher eine Uterusatonie, Milchfieber und Koprostasis zeigten, und möglicherweise eine konstitutionelle (anlagebedingte) Schwäche hinsichtlich Dysfunktion endokriner Organe aufwiesen (BAUER-WAHLWIES, 1956). In weiteren älteren Literaturquellen wird auf die starke Inzucht und die Zuchtlektion auf Frohwüchsigkeit verwiesen, die zu möglichen endokrinen Störungen führen könne (BAUER-WAHLWIES, 1956; HEIDRICH, 1954; NOBLE, 1972; WILZ, 1956). Andere konnten bei stressempfindlichen Linien eine höhere Krankheitsanfälligkeit erkennen (MARTIN&MCDOWELL, 1975).

Auch HILDENBRAND (1984) fasst unter den nichtinfektiösen Ursachen für PDS die Ansichten zahlreicher Autoren hinsichtlich der Rassendisposition zusammen. Während einige die Erkrankung bei allen Sauenrassen beobachten konnten, verweisen andere auf bestimmte Rassen wie Large White, Large Black, Berkshire, Wessex und Yorkshire (HILDENBRAND, 1984). Im Vergleich zu einheimischen afrikanischen Rassen erkrankten Pietrain, Large White und Landrasse häufiger laut einer Studie in Zaire (VERHULST&MUSERU, 1973). Ein weiterer Hinweis auf die Möglichkeit der Vererbung ist die Beobachtung, dass häufiger Nachkommen von Sauen erkrankten, die selbst schon einmal erkrankt waren (SCHNELL et al., 1977). Ein signifikant höheres Risiko für puerperales Fieber konnte HALGAARD (1983) bei Large White Sauen in seiner Studie mit Rein- und Kreuzungstieren der Rassen Large White, Dänische Landrasse, Hampshire und Duroc feststellen.

Neben der zum Teil auch subjektiv beeinflussbaren deskriptiven Beschreibung der Erbllichkeit oder Rassendisposition existieren auch klar messbare Größen zur Beschreibung der Erbllichkeit. Ein wichtiger genetischer Parameter ist der Erbllichkeitsgrad, die sogenannte Heritabilität ( $h^2$ ). Dieses Maß dient der Quantifizierung der additiv genetischen Varianz ( $\sigma_a^2$ ) an der phänotypischen Gesamtvarianz ( $\sigma_p^2$ ) (FALCONER, 1984). Die  $\sigma_p^2$  setzt sich zusammen

aus der genetischen Varianz ( $\sigma_g^2$ ) und der Umweltvarianz ( $\sigma_u^2$ ). Die  $\sigma_g^2$  beinhaltet sowohl die  $\sigma_a^2$  als auch die nicht-additiv genetischen Varianzen wie die Dominanzvarianz ( $\sigma_d^2$ ) und die Epistasievarianz ( $\sigma_{ep}^2$ ) (FALCONER, 1984).

**Gleichung 1:** Berechnung der Heritabilität ( $h^2$ ).

$$h^2 = \sigma_a^2 / \sigma_p^2 = \sigma_a^2 / (\sigma_g^2 + \sigma_u^2) = \sigma_a^2 / (\sigma_a^2 + \sigma_d^2 + \sigma_{ep}^2 + \sigma_u^2)$$

Das Maß der  $h^2$  ist keine Konstante, sondern ist jeweils merkmals- und populationspezifisch. Sie kann Werte zwischen 0 (keine Erbllichkeit) und 1 (vollständig erblich) annehmen. Je nach Höhe der  $h^2$  unterscheidet man gering erbliche ( $h^2 < 0,25$ ), mittlere erbliche ( $0,25 < h^2 < 0,5$ ) und stark erbliche ( $h^2 > 0,5$ ) Merkmale (MIELENZ&SCHÜLER, 2002).

Die  $h^2$  wurde in verschiedenen Studien für das Merkmal PDS geschätzt (BERG et al., 2001; KRIETER&PRESUHN, 2009; LINGAAS&RONNINGEN, 1991). Da bei diesen Studien der Phänotyp ‚PDS‘ zum Teil unterschiedlich klassifiziert wurde, können die geschätzten  $h^2$  nur bedingt miteinander verglichen werden (Tabelle 3). So wurden in Norwegen unter Berücksichtigung der klinischen Beurteilung durch Tierärzte eine Heritabilität für PDS bis zu 0,2 berechnet, während niedrigere  $h^2$  in Dänemark geschätzt wurden, wenn die durchgeführte Behandlung als Phänotyp verwendet wurde (BERG et al., 2001; LINGAAS&RONNINGEN, 1991). Die aufgezeichnete Behandlung diente auch in einer Studie an Schweinen der Deutschen Landrasse als Hilfsmerkmal, in der eine Heritabilität von 0,13 geschätzt wurde (KRIETER&PRESUHN, 2009).

**Tabelle 3:** Literaturüberblick zu Heritabilitätsschätzungen für den Merkmalskomplex PDS.

	LINGAAS&RONNINGEN, 1991	BERG et al., 2001	KRIETER&PRESUHN, 2009
<b>Heritabilität</b>	<b>0,1 – 0,2</b>	<b>0,02 – 0,06</b>	<b>0,13</b>
Rassen	Norwegische Landrasse (NL), Kreuzung NL x Yorkshire	Dänische Landrasse, Yorkshire	Deutsche Landrasse
Tierzahl	70 Betriebe	12.031 Sauen (14.502 Reinzucht- und Kreuzungswürfe)	544 Sauen (2.597 Reinzuchtwürfe)
Phänotyp-beurteilung ,PDS‘	klinische Beurteilung durch Tierärzte	Aufzeichnung der Behandlung durch Betriebsleiter	Aufzeichnung Behandlung ab 39,4 °C durch eine Person
Prävalenz bezogen auf Gesamtzahl der Tiere	<b>16,5 – 18,5 %</b>	<b>25%</b>	<b>38,4%</b>

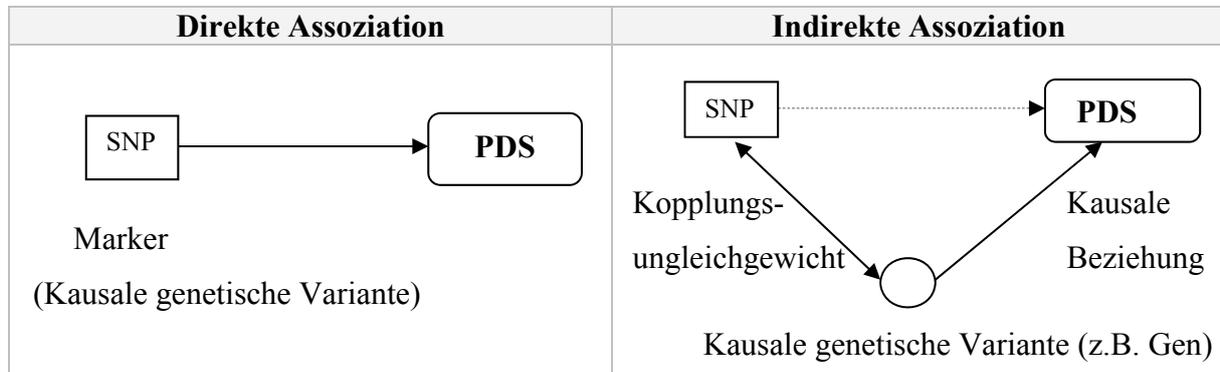
Das Merkmal PDS gehört mit einer  $h^2$  von durchschnittlich 0,10 (0,02-0,20) zu den gering erblichen Merkmalen und ist mit anderen Reproduktionsmerkmalen bei der Sau wie Geburtsdauer (0,10) und Geburtseingriff (0,05) vergleichbar (BERG et al., 2001; CANARIO et al., 2006). Dass eine züchterische Bearbeitung trotz niedriger  $h^2$  möglich und sinnvoll ist, zeigen u.a. Studien zur Mastitis-Anfälligkeit beim Rind von HERINGSTAD et al. (2000; 2003).

### 2.3.3 Genomweite Assoziationsstudien

Eine Assoziationsstudie untersucht als solches, ob zwei Eigenschaften häufiger zusammen auftreten, als zufällig zu erwarten wäre. Genetische Assoziationsstudien haben das Ziel, herauszufinden, ob und welche genetische Varianten (Genotyp) mit einem gewählten Phänotyp häufiger auftreten als zufällig zu erwarten wäre. Eine statistisch signifikante Assoziation sagt dabei aber noch nichts über eine mögliche Kausalität aus. Die Frage nach der Kausalität muss in weiteren funktionellen Untersuchungen geklärt werden.

Genomweite Assoziationsstudien (GWA-Studien) sind mit der Entwicklung von Hochdurchsatztechnologien zur Genotypisierung von genomweit verteilten SNPs realisiert worden (FAN et al., 2003). Sie haben das Ziel, eine genomweite Assoziation eines SNPs zu einem bestimmten Phänotyp zu detektieren (PEARSON&MANOLIO, 2008). Rein theoretisch

sind mit den GWA-Studien sowohl direkte Assoziationen, bei dem sich der SNP im Bereich eines kausalen Gens befindet, als auch und insbesondere indirekte Assoziationen zu finden. Der assoziierte SNP befindet sich dabei im Kopplungsungleichgewicht mit dem eigentlich krankheitsverursachenden Genort, der für die Merkmalsausprägung verantwortlich ist (Abbildung 4).



**Abbildung 4:** Darstellung der zwei theoretischen Möglichkeiten für das postpartale Dysgalaktie-Syndrom (PDS): Entweder kann ein SNP genau im Bereich der kausalen Variante liegen (direkte Assoziation) oder die SNPs befinden sich im Kopplungsungleichgewicht zum kausalen Gen (nach ZIEGLER et al. 2010).

Im Rahmen von GWA-Studien können sowohl mögliche kausale genetische Varianten oder Gene, als auch funktionelle Pathomechanismen und Funktionswege identifiziert werden (HUNTER et al., 2008).

Je nach Merkmalsklasse der Phänotypen wird zwischen quantitativen Merkmalen (z.B. Wachstumsleistung, Milchleistung) und qualitativen Merkmalen unterschieden. Zu letzteren zählen insbesondere die binären Merkmale mit jeweils zwei Ausprägungen wie im Falle dieser Studie die bestimmte Krankheitsausprägung PDS (0=gesund bzw. PDS-negativ, 1=krank bzw. PDS-positiv). Das dafür optimale Design entspricht einer Fall-Kontroll-Studie (Case-Control), bei der möglichst in Bezug zu anderen Faktoren vergleichbare Tiere gewählt werden, die sich jeweils nur in der Krankheitsausprägung unterscheiden.

Verschiedene statistische Methoden und Programme sind verfügbar, um die große Datenmenge auszuwerten und die Interpretation der Ergebnisse zu erleichtern. Der chi-Quadrat-Test ( $\chi^2$ ), der Fisher-Exakt-Test und der Armitage-Trend-Test gehören dabei zu den wichtigsten Hypothesentests. Die Nullhypothese ( $H_0$ ) nimmt an, dass die Allelfrequenzen eines bestimmten SNPs bei gesunden und erkrankten Tieren gleich sind (Tabelle 4). Die Alternativhypothese ( $H_A$ ) stellt im Gegensatz dazu die Behauptung auf, dass es Allelfrequenzunterschiede zwischen gesunden und kranken Tieren gibt (chi<sup>2</sup>-Test, Fisher-

Exakt-Test). Entsprechend der jeweiligen Annahme oder Ablehnung von  $H_0$  bzw.  $H_A$  kommt es entweder zu einer korrekten Entscheidung oder aber zum Auftreten des Fehlers 1. Art oder des Fehlers 2. Art. Dieser Entscheidungsbaum ist mit Beispielen in Bezug auf eine genomweite Assoziation zu einem SNP in Tabelle 4 aufgeführt.

**Tabelle 4:** Darstellung der Hypothesen und des Entscheidungsbaums mithilfe der Vierfelder-Tafel.

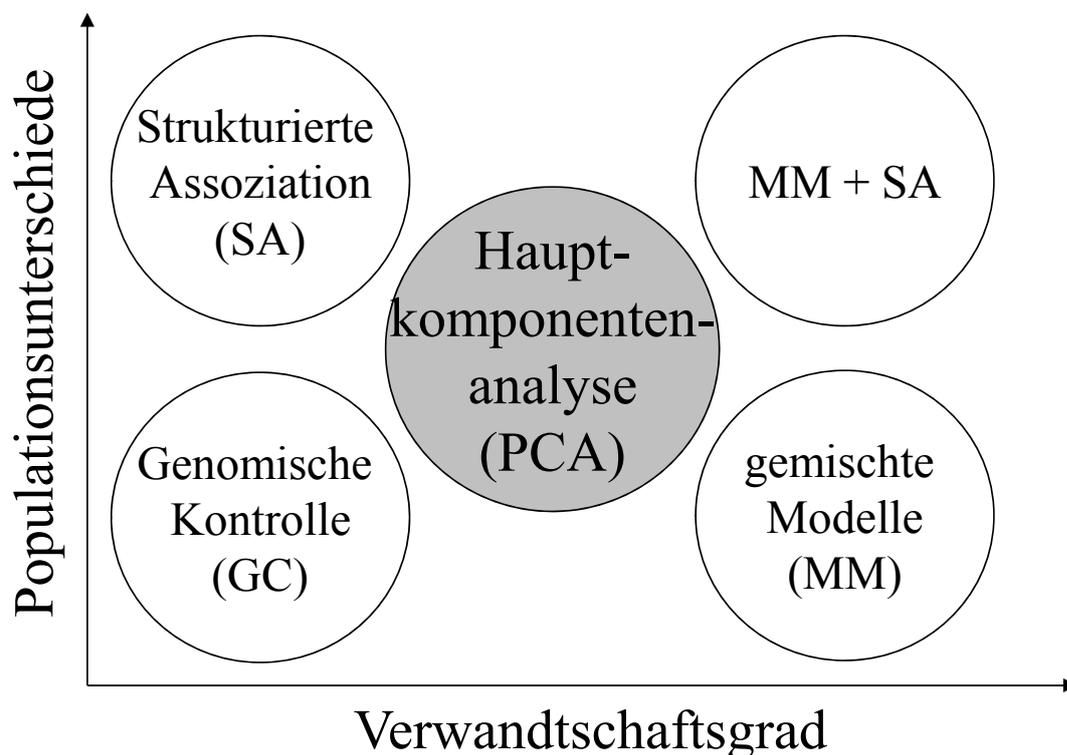
			Annahme $H_0$	Annahme $H_A$
			kein SNP mit Assoziation gefunden	SNP gefunden mit Assoziation
$H_0$ ist korrekt	ist	kein ursächliches Gen vorhanden	korrekte Entscheidung ( $1 - \alpha$ )	Fehler 1. Art = $\alpha$ falsch positive Ergebnisse
$H_A$ ist korrekt	ist	es gibt ein/mehrere mit PDS assoziierte Gene	Fehler 2. Art = $\beta$ falsch-negative Ergebnisse	korrekte Entscheidung = Power ( $1 - \beta$ )

Werden anstelle der Allelfrequenzen die Genotypfrequenzen betrachtet, kann u.a. mittels des Armitage-Trend-Tests auf das Vorliegen eines Trends bzw. einer Tendenz getestet werden. Die entsprechende  $H_0$ , dass die PDS-erkrankten Tiere gleichmäßig auf die Genotypen verteilt sind, würde gegen die  $H_A$ , dass die Genotypenverteilung zwischen kranken und gesunden Tieren einem „Trend“ bzw. einer Tendenz unterliegen, getestet werden.

Nachteil dieser Methoden (chi-Quadrat-Test ( $\chi^2$ ), Fisher-Exakt-Test, Armitage-Trend-Test) ist die zunächst unzureichende Korrektur von Stratifikationseffekten. Als Stratifikation werden systematische Allelfrequenzunterschiede zwischen erkrankten und gesunden Tieren bezeichnet, die auf Grund von Populations- bzw. Linienunterschieden, Familien- oder Verwandtschaftsverhältnissen entstehen (YU et al., 2008). Der Quantil-Quantil (QQ) Plot oder chi<sup>2</sup>-chi<sup>2</sup>-Plot wird verwendet, um das Ausmaß der Verzerrung durch Vergleich der beobachteten Assoziation mit den zu erwarteten Assoziationen bei  $H_0$  einzuschätzen (PEARSON&MANOLIO, 2008). Der Inflationsfaktor  $\lambda$  quantifiziert dabei den Grad der Abweichung, und ein Wert von  $1 \leq \lambda < 1,1$  ist annehmbar.

Stratifikation ist vor allem ein Problem bei populationsbasierten Case-Control-Studien, bei denen nicht von vornherein die Verwandtschaftsverhältnisse bekannt sind (PEARSON&MANOLIO, 2008). In einer familienbasierten Case-Control Studie wird durch die aufeinander abgestimmten Halb- oder Vollgeschwisterpaare diese Verzerrung minimiert (BENYAMIN et al., 2009; VISSCHER et al., 2008). Dennoch kann eine Korrektur hinsichtlich Familien- oder Linien vonnöten sein.

Mittels logistischer Regression kann eine Korrektur mit fixen Effekten wie Linie, Betrieb oder Familien-ID durchgeführt werden und eignet sich für eine grobe Verbesserung der Stratifikation durch Störeffekte. Weitere Korrekturmöglichkeiten sind die Genomische Kontrolle (GC), die strukturierte Assoziation (SA), gemischte Modelle (MM), Kombinationen der beiden letztgenannten, sowie eine Hauptkomponenten-korrigierte Assoziationsanalyse (PCA) (AULCHENKO, 2010). Während GC und insbesondere SA vor allem Populations- bzw. Linienunterschiede berücksichtigt, wird das Verwandtschaftsverhältnis am besten durch MM korrigiert (Abbildung 5).



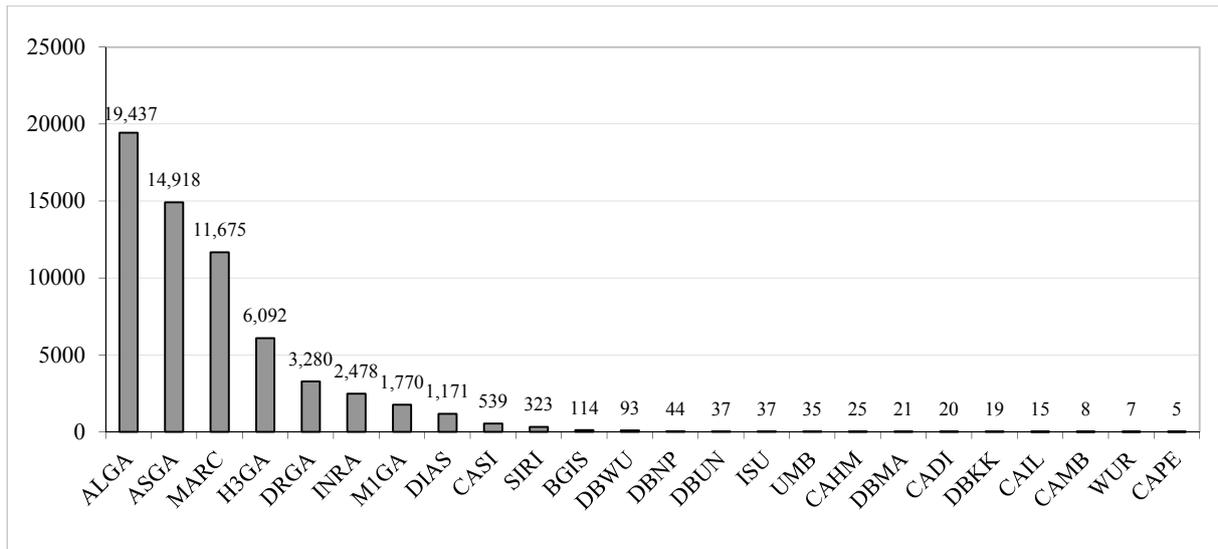
**Abbildung 5:** Überblick der Methoden für die Korrektur von Stratifikation auf Grund von Populationsunterschieden bzw. Verwandtschaftsverhältnissen in genomweiten Assoziationsstudien (nach AULCHENKO 2010).

Die Hauptkomponentenanalyse oder PCA ist besonders für die Korrektur von Daten optimal, bei denen sowohl verschiedene Linien als auch die Familien- bzw. Verwandtschaftsbeziehungen zu berücksichtigen sind. Die genomische oder die pedigreebasierte Verwandtschaftsmatrix wird verwendet, um entsprechende Hauptkomponenten zu definieren, die die Variation der Populations- bzw. Familien- oder Verwandtschaftsstruktur widerspiegeln (PATTERSON et al., 2006; PRICE et al., 2006). Die Anzahl der für die Korrektur zu verwendenden Hauptkomponenten wird durch Bestimmung der Eigenwerte für jede Hauptkomponente und unter Verwendung des Kaiserkriteriums, des Scree-Kriteriums oder des Jolliffee-Kriteriums festgelegt (BACKHAUS et al., 2008).

Im Bereich der Humangenetik sind sehr informative Reviews publiziert (CANTOR et al., 2010; MANOLIO, 2010; MCCARTHY et al., 2008; PEARSON&MANOLIO, 2008). Zahlreiche GWA-Studien und verschiedene assoziierte genetische Varianten wurden zu bestimmten Erkrankungen beim Menschen detektiert und in Form eines Online-Kataloges zusammengestellt ([www.genome.gov/GWASudies](http://www.genome.gov/GWASudies) (HINDORFF et al., 2011; HINDORFF et al., 2009)).

Im Bereich der Tierwissenschaften sind Hochdurchsatz-Genotypisierungs-Chips für Rind (BovineSNP50), Schaf (OvineSNP50), Schwein (PorcineSNP60 BeadChip) und Pferd (EquineSNP50 BeadChip) seit den letzten Jahren verfügbar ([www.illumina.com](http://www.illumina.com)), sodass mittlerweile auch einige GWA-Studien im Bereich der Veterinärmedizin bzw. Tierzucht publiziert worden sind (GODDARD&HAYES, 2009; LYKKJEN et al., 2010; MINOZZI et al., 2010).

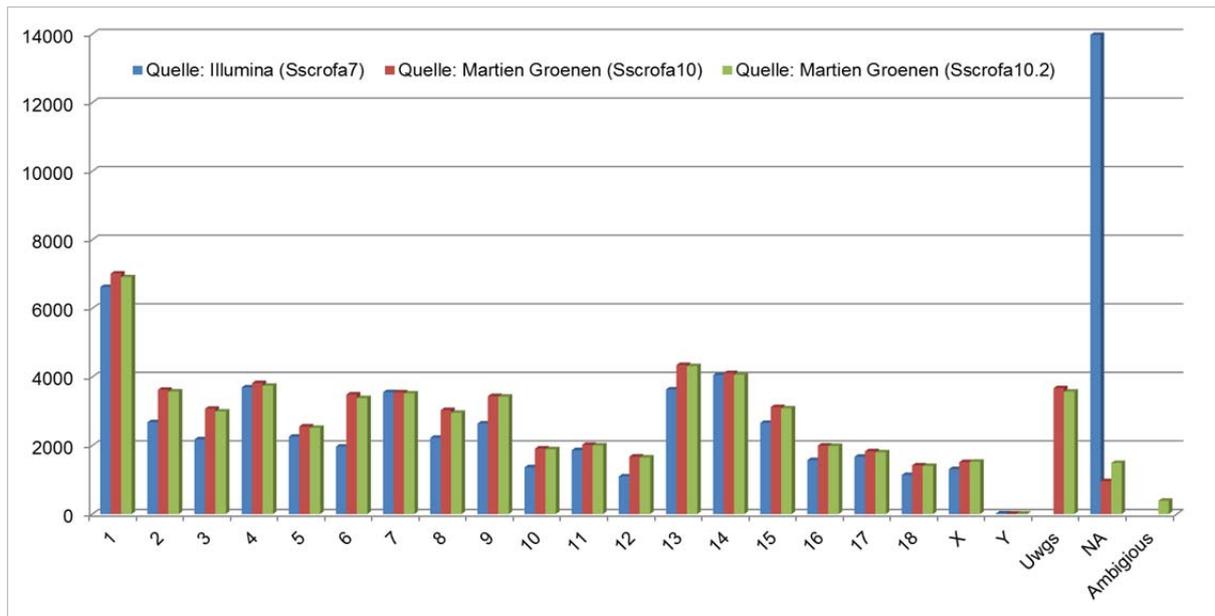
Der Illumina BeadChip „PorcineSNP60“ für die Genotypisierung beim Schwein wurde dabei von einem Konsortium koordiniert (RAMOS et al., 2009). Insgesamt 62.163 SNPs wurden aus verschiedenen Arbeitsgruppen und Laboratorien zusammengestellt (Abbildung 6), um einen vielseitigen und informativen SNP-Chip über alle Schweinechromosomen hinweg zu erhalten.



**Abbildung 6:** Verteilung der SNPs (n=62.163) des Illumina PorcineSNP60 BeadChip entsprechend der Nomenklatur in Bezug auf die Herkunft des SNPs. Die einzelnen Abkürzungen stehen dabei für die verschiedenen Labore bzw. die Herkunftssequenz des SNPs (Quelle: Martien Groenen, Illumina).

Da zum Zeitpunkt der Freigabe des porcinen Chips die Sequenzierung des Schweinegenoms noch nicht abgeschlossen war, existierten 13.970 SNPs auf dem BeadChip, die nach Genombild 7 des Schweinegenoms (=Sscrofa7) nicht annotiert werden konnten.

Die Fertigstellung der Genomsequenzierung des Schweinegenombildes (=Sscrofa10) durch das Konsortium („Swine Genome Sequencing Consortium“ (SGSC)) und die Freigabe durch das „Genome Analysis Centre“ am 20.09.2010 ermöglichte u.a. eine neue Annotierung der SNPs des BeadChips von Illumina. Die Annotierung wurde öffentlich bereitgestellt (<http://www.animalgenome.org/repository/pig/>). Vor allem die bis dato 13.970 nicht-annotierten SNPs konnten teilweise neu-annotiert werden (Abbildung 7). Bislang ist aber weiterhin für 3.671 SNPs die genaue Chromosomenlokalisierung nicht sicher bekannt. Auch die aktuellste Version (=Sscrofa10.2) verbesserte nur in Einzelfällen die Annotierung.



**Abbildung 7:** Verteilung der SNPs (n=62.163) des Illumina PorcineSNP60 BeadChip auf die Autosomen (1-18) und Gonosomen (X, Y) beim Schwein zur Übersicht der Annotierungen der 62.163 SNPs des Illumina PorcineSNP60 BeadChip. Die von Illumina verwendete Annotierung Sscrofa7 enthielt 13.970 SNPs ohne Chromosomenangabe. Spätere Versionen verbesserten die Annotierung, jedoch traten auch hier fehlende Annotierungen (NA), uneindeutige Annotierungen (Ambiguous) und Annotierungen auf einem einzelnen Contig ohne Chromosomenangabe (Uwgs) auf (<http://www.animalgenome.org/repository/pig/>).

Bei 2.069 SNPs kam es durch die neue Genomsequenzierung auch zu unterschiedlichen Chromosomenlokalisationen, d.h. nach Annotierung auf Sscrofa7 (ILLUMINA INC.) würde sich z.B. SNP ASGA0022047 auf SSC4 (108.005.714 bp) befinden, nach neuer Annotierung auf Sscrofa10 ist dieser SNP aber auf SSC3 (120.903.688 bp) lokalisiert. In 1.663 Fällen sind ehemals lokalisierte SNPs, z.B. INRA0058958 (SSC15, 131.684.198 bp) in neuer Annotierung nicht mehr eindeutig im Schweinegenom lokalisierbar.

### 2.3.4 Kandidatengene

Es wird zwischen positionellen und funktionellen Kandidatengenen unterschieden, je nachdem ob entsprechend einer Positionsbestimmung durch Kopplungs- oder Assoziationsanalysen ein Gen in Betracht gezogen wird (positionelles Kandidatengen) oder ob auf Grund funktioneller Beschreibung eine Bedeutung dieses Gens hypothesiert wird (funktionelles Kandidatengen). Potenzielle funktionelle Kandidatengene, die im Zusammenhang mit anderen Merkmalen wie Fruchtbarkeit oder Krankheitsresistenz in früheren Kopplungsstudien bei verschiedenen Tierspezies oder im Rahmen von

Kandidatengenanalysen speziesübergreifend beschrieben wurden, und die ebenso im Zusammenhang mit PDS stehen könnten, sind in Tabelle 5 aufgelistet.

**Tabelle 5:** Auflistung erwähnenswerter potenziell funktioneller Kandidatengene für das Merkmal PDS.

Kandidatengen	Spezies	Funktion	Quelle
Fucosyltransferase	spezifische FUT1	Resistenz gegenüber Schwein Ödemkrankheit	<i>Escherichia coli</i> MEIJERINK et al. (1997)
	F4acR	Schwein	Rezeptor für <i>Escherichia coli</i> F4 PYTHON et al. (2002)
Transmembranes Mucin	MUC13	Schwein	Enterotoxischer <i>Escherichia coli</i> (ETEC) F4ab/ac-Rezeptor ZHANG et al. (2008)
allgemeine Resistenz – Pathomechanismus			
Toll-like-Rezeptor	TLR4	Mensch	Transmembranrezeptor MEDZHITOV et al. (1997)
Gesäuge/Fruchtbarkeit			
Estrogenrezeptor	ESR	Schwein	Einfluss auf Fruchtbarkeit ROTHSCHILD (1996)
Oxytocin	OXT	Schwein	hormonelle Steuerung Geburt und Milchejektion LEE et al. (2001)
Prolaktin	PRL	Schwein	Milchejektion VINCENT et al. (1998), MARTINEAU et al. (2012)
Prolaktinrezeptor	PRLR	Schwein	Wurfgröße OMELKA et al. (2008)
Retinol-binding protein	RBP4	Schwein	Bedeutung für Fruchtbarkeit MESSER et al. (1996)
Sonstiges			
Ryanodinrezeptor 1	RYR1	Schwein	Maligne Hyperthermie FUJI et al. (1991); LEE et al. (2002)
	NRAMP1	Schwein	resistenzsteigernd gegenüber Salmonellen SUN et al. (1998)

Ein wichtiges Beispiel ist das porcine MUC13 Gen, welches mit der Empfänglichkeit für *Escherichia coli* F4ab/ac assoziiert ist (ZHANG et al., 2008). Weitere potentielle Gene sind das FUT1 Gen, und andere im Zusammenhang mit Coli-Durchfall oder Ödemkrankheit identifizierte genetische Varianten. Die Anfälligkeit für die Ödemkrankheit wurde zurückgeführt auf eine Mutation im alpha(1,2)-Fucosyltransferase-Gen (FUT1) (MEIJERINK et al., 1997; MEIJERINK et al., 2000), welches eng gekoppelt mit dem *E. coli*-F18-Rezeptorlocus

(ECF18R) vorliegt. Da ECF18R erst ab dem 20. Lebenstag exprimiert wird, treten keine Erkrankungen bei jüngeren Ferkeln auf.

Ein weiteres funktionelles Kandidatengen ist das Prolaktin- oder das Prolaktinrezeptor-Gen, da Prolaktin selbst eine wichtige Schlüsselrolle in der Initiation und insbesondere in der Aufrechterhaltung der Milchabgabe in der Laktationszeit beim Schwein darstellt (MARTINEAU et al., 2012). Ein Zusammenhang zwischen den verschiedenen Prolaktinrezeptorgenotypen und der Wurfgröße (insgesamt geborene, lebendgeborene und abgesetzte Ferkel) wurde in einer Studie mit sechs slowakischen Betrieben beobachtet (OMELKA et al., 2008).

Inwieweit diese Gene bzw. Genombereiche für die puerperale Erkrankung PDS eine Rolle spielen, soll in dieser Studie mit erörtert werden.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Probenmaterial

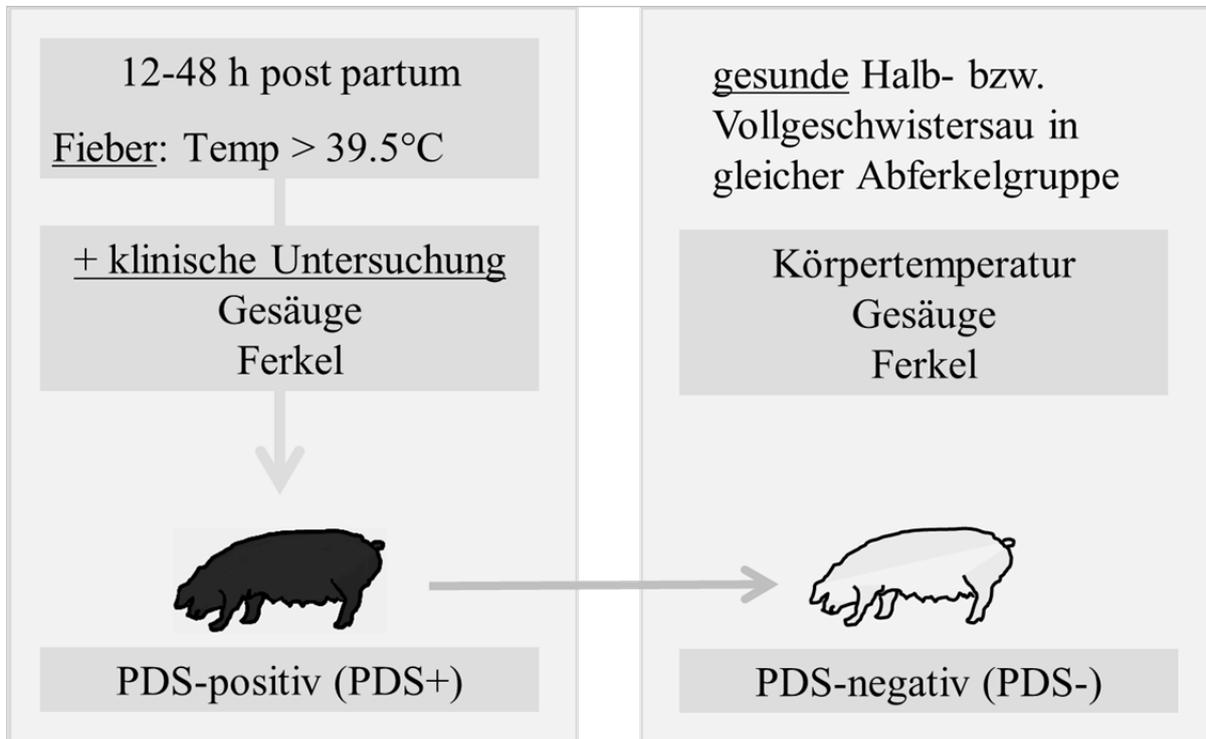
Die Probennahme erfolgte auf sechs Nukleus- bzw. Vermehrungsbetrieben der Pig Industry Company (PIC) Deutschland GmbH im Zeitraum von April 2008 bis Juli 2010. Der Vorteil dieser engen Betriebsauswahl ist in dem weitestgehend einheitlichen Fütterungs- und Haltungsmanagement zu sehen. Für die genetischen Untersuchungen waren zudem Abstammungsdaten der Tiere notwendig, die mithilfe der langjährigen Zuchtdokumentation der PIC gegeben waren. Für die Vergleichbarkeit war auch die einheitliche Verwendung bestimmter PIC-Linien über die Betriebe hinweg von Vorteil. Bedingt durch die Verwendung von Reinzuchtlinien (Landrasse (L), Large White (LW)) in den Nukleusbetrieben (B, D, F) und durch die Verwendung von F1-Kreuzungsauen (LxLW, LxL\_Duroc, LWxLW\_Duroc) in den Vermehrungsbetrieben (A, C, E) war aber eine betriebsspezifische Liniennutzung nicht zu vermeiden.

Hinsichtlich des Gesundheitsstatus waren alle ausgewählten Betriebe negativ getestet auf Salmonellen, *Actinobacillus pleuropneumoniae* (APP), Dysenterie und Rhinitis atrophicans. Insgesamt drei Bestände (A, D, F) waren frei vom Virus des porcinen reproduktiven und respiratorischen Syndroms (PRRS) getestet, in den entsprechend anderen drei Betrieben wurde gegen PRRS geimpft. Des Weiteren erfolgte auf allen Betrieben eine Schutzimpfung gegen Parvovirus und porcines Circovirus (PCV-2).

Die Studie wurde als anzeigepflichtiger Tierversuch beim Niedersächsischen Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit nach Benehmensherstellung mit den Genehmigungsbehörden der Bundesländer Sachsen-Anhalt, Mecklenburg-Vorpommern und Brandenburg zur Kenntnis genommen (Aktenzeichen 33.9-42502-05-09A600).

Bezüglich des Abferkelmanagements existierten über alle Betriebe hinweg ähnliche Produktionsabläufe. Alle Sauen wurden in diesen Betrieben am 110. Trächtigkeitstag in die gereinigten Abferkelbuchten eingestallt. In den meisten Betrieben erfolgte im Einzelfall mittels Prostaglandin-F2alpha-Analoga die Geburtseinleitung bzw. Partussynchronisation ab einer Trächtigkeitsdauer > 114 Tage. Geburtseingriffe erfolgten nur in besonderen Fällen bei Geburtsstockungen oder verzögerten Geburten. Die Notwendigkeit der Geburtseinleitung und der Durchführung eines Geburtseingriffes wurden auf der Sauenkarte dokumentiert.

Die Probennahme erfolgte je nach Abferkelrhythmus der Betriebe wöchentlich (A, F) oder zweiwöchentlich (B, D, E). Die Betriebsleiter oder Betriebstierärzte übernahmen nach eingehender Einweisung die Probennahme bei erkrankten und gesunden Tieren nach einem vorher definierten Probenschema (Abbildung 8).



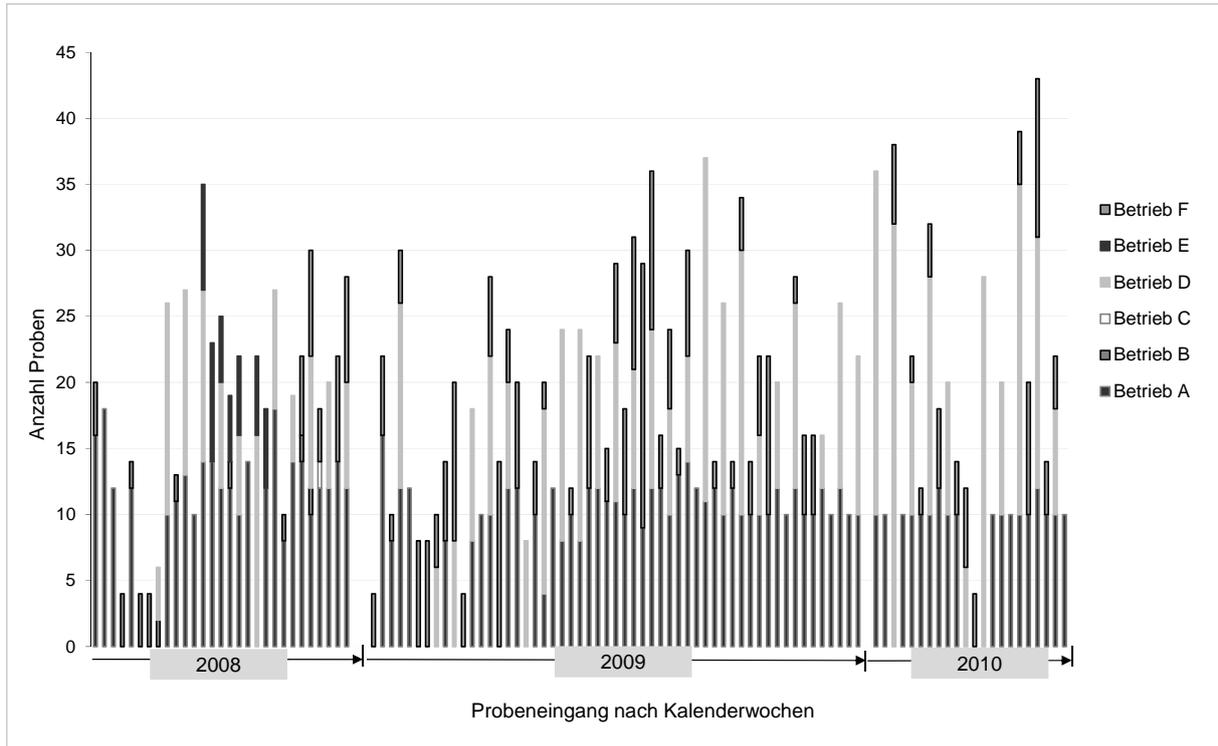
**Abbildung 8:** Schema der Tierauswahl und der Probennahme des geMMA-Projekts.

Die Sauen galten als PDS-positiv, wenn bei ihnen bis 48 h nach der Geburt Temperaturen über 39,5°C und klinische Anzeichen für PDS bzw. krankheitstypische Verhaltensweisen bei den Sauen oder bei den Ferkeln auftraten. In Einzelfällen zeigten Sauen klinische Veränderungen ohne eine rektale Temperaturerhöhung, diese Sauen sind ebenfalls als PDS-positiv beprobt worden. Aus tierschutzrechtlichen, ethischen und betriebspraktischen Gründen erfolgte eine unverzügliche Behandlung der Sauen mit erhöhter Temperatur und reduziertem Allgemeinbefinden nach betriebsspezifischem Vorgehen. Es wurde nicht abgewartet, bis diese Sauen eine ausgeprägte klinische Mastitis entwickelten. Wenn es zu deutlichen Anzeichen einer mittel- bis hochgradigen klinischen Mastitis kam, oder Ferkel deutlich betroffen waren, wurde dies extra notiert (MAM+, FERKEL+). Als Kontrollsauen wurden in der jeweiligen Abferkelwoche klinisch unauffällige Sauen, nach Möglichkeit gesunde Halb- oder Vollgeschwistersauen zu den jeweils PDS-positiv beprobten Sauen, ausgewählt und als PDS-negativ beprobt. Die Körpertemperatur sowie Veränderungen des Gesäuges und/oder der

Ferkel wurden auch bei den Kontrollsaueen erfasst. Zusätzliche Informationen zu den einzelnen Saueen hinsichtlich der Durchführung von Geburtseinleitung und Geburtseingriff, Hinweisen zu Behandlungen oder Auffälligkeiten aber auch die Angabe der lebend geborenen Ferkel (lgF) notierten die Betriebsleiter auf dem Probenbegleitzettel (Anhang 1). Weitere Ferkelkennzahlen wie die Anzahl totgeborener Ferkel (tgF), mumifiziert geborener Ferkel (mgF) und abgesetzter Ferkel (agF) wurden mithilfe der Datenbank der PIC Deutschland GmbH in der Auswertung berücksichtigt.

Es wurden von jeder beprobten Sau jeweils eine Milchprobe zur bakteriologischen Untersuchung (GERJETS, 2011; GERJETS et al., 2010; GERJETS et al., 2011b) und eine Gewebeprobe (Ohrstanze) genommen. Die bakteriologische Untersuchung erfolgte wie von GERJETS (2011) beschrieben. Die bakteriologischen Ergebnisse wurden im Hinblick auf eine mögliche pathogen-spezifische genetische Resistenz analysiert. Hierfür wurden entsprechende Bakterienprofile sowohl auf Proben- als auch auf Saueenebene erstellt. Die Gewebeproben wurden gekühlt bei +4°C zum Institut für Tierzucht und Tierhaltung der Christian-Albrechts-Universität nach Kiel versandt, an dem das Projekt bis zum Wechsel nach Halle im Jahr 2011 durchgeführt wurde. Anschließend wurden die Gewebeproben bei -20°C gelagert. Weitere Daten hinsichtlich Rasse bzw. Linienzugehörigkeit, wurfspezifische und allgemeine Leistungsdaten sowie die Abstammungsdaten der beprobten Tiere wurden von der PIC Deutschland GmbH regelmäßig zur Verfügung gestellt.

Über einen Zeitraum von 28 Monaten (April 2008 bis Juli 2010) sind insgesamt 2.012 Proben eingegangen (Abbildung 9). Aus verschiedenen betriebsinternen Gründen kam es zum Ausscheiden von einzelnen Betrieben aus dem Projekt (B, C). Ein einzelner Betrieb (E) hatte nach Anwendung homöopathischer Prophylaxe nach eigenen Angaben keine Erkrankungsfälle mehr. Die Mehrzahl der Proben stammen daher von Betrieb A (n=1.001), Betrieb D (n=600) und Betrieb F (n=334).



**Abbildung 9:** Probeneingang im Probennahmezeitraum April 2008 bis Juli 2010.

Von den insgesamt 2.012 eingesandten Proben konnten fünf Einsendungen wegen fehlender Informationen nicht ausgewertet werden. Bei weiteren sechs Beprobungen wurden Sauen innerhalb einer Abferkelwoche zunächst als PDS-negativ beprobt und dann einige Stunden später als PDS-positiv erkannt und nochmals beprobt. Die zunächst als ‚PDS-negativ‘ eingesandten Proben wurden in die abschließende Auswertung nicht einbezogen (Tabelle 6). Die restlichen 2.001 Proben setzen sich zusammen aus 1.028 Proben von PDS-positiven Tieren und 973 Proben gesunder Tiere, die entsprechend verteilt von sechs Betrieben stammten.

Bei 233 Proben von PDS-positiven Tieren wurde das Gesäuge als mittel- bis hochgradig betroffen gekennzeichnet. In 50 klinischen Fällen waren auch die Ferkel auffällig. Bei 1.816 Beprobungen ist die rektale Körpertemperatur erfasst.

Zudem wurden von der PIC Sperma von zehn Vaterebern der beprobten Sauen und DNA-Proben von weiteren elf Vaterebern für Abstammungsanalysen bereitgestellt.

**Tabelle 6:** Übersicht der über den Zeitraum von 28 Monaten insgesamt eingegangenen Proben (n=2.012) unter Berücksichtigung der Probenebene sowie der Einzeltierebene.

<b>2.012</b>	<b>Proben insgesamt</b>	
-5	5 Proben ohne Probenbegleitzettel	
-6	6 Fehlbeprobungen oder ohne eindeutige Identifizierung	
<b>2.001</b>	<b>auswertbare Proben</b>	
	1.028 Proben von PDS-positiver Tiere	233 Proben mit mittel- bis hochgradig betroffenem Gesäuge (MAM+)
		50 Proben, bei denen die Ferkel deutlich betroffen waren (FERKEL+)
	973 Proben von PDS-negativen Tieren	
-321	Mehrfachbeprobungen	
		221 Doppelbeprobungen
		41 Dreifachbeprobungen
		6 Vierfachbeprobung
<b>1.680</b>	<b>beprobte Sauen</b>	

### 3.2 Beteiligte Laboratorien

Die praktischen Arbeiten zur DNA-Isolierung und die Kontrolle der DNA-Qualität sowie die Vorbereitung der DNA-Proben für die Genotypisierung fanden im Labor des Instituts für Tierzucht und Tierhaltung in Kiel statt.

Die Genotypisierung der 624 DNA-Proben mit dem PorcineSNP60 BeadChip von Illumina (Illumina Inc., San Diego, CA, USA) wurde von der Arbeitsgruppe bei Herrn Dr. Peter Lichtner am Institut für Humangenetik, Helmholtz Zentrum München in Neuherberg

durchgeführt. Im Rahmen eines Forschungsbesuchs wurde die Prozessierung der Proben begleitet.

### **3.3 Geräte**

Folgende Geräte wurden für die vorliegende Arbeit am Institut für Tierzucht und Tierhaltung verwendet:

- Spectrophotometer Nanodrop ND-1000, peqLab Biotechnologie GmbH
- Robotron TECAN Genesis RSP 150
- PCR-Gerät PTC-200 BIOZYM
- Gelkammer ComPhor Mt Maxi BIOplastics BV
- Electrophoresis PowerSupply EPS200 Pharmacia Biotech
- UV-Gerät von BIO-RAD
- Zentrifugen, Vortexer, Kühlschrank, Tiefkühlschrank, Hybridofen, Wärme-Alublock
- Brutschrank (36-38°C) Function line, Heraeus Instruments
- Etikettendrucker BRADY BP-1344
- Personal Computer (PC) Dell, Intel® Core™2 Duo CPU, 4GB (RAM)

### **3.4 Verbrauchsmaterial**

Die Verbrauchsmaterialien sind im Anhang 2 aufgelistet.

### **3.5 Computerprogramme**

Für die Datenaufbereitung und die statistische Auswertung wurden folgende Programme verwendet:

- Microsoft Excel (MS Office Paket)
- SAS 9.2 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)
- GenomeStudio Version 2010.3 (Illumina Inc., San Diego, CA, USA)
- Tinn-R ([www.sciviews.org/Tinn-R/](http://www.sciviews.org/Tinn-R/))
- R ([www.r-project.org](http://www.r-project.org))
- GenABEL (AULCHENKO et al., 2007)
- Plink (PURCELL et al., 2007)
- Haploview (BARRETT et al., 2005)

### 3.6 Internetressourcen

Folgende Internetressourcen kamen im Rahmen der Dissertation zur Anwendung:

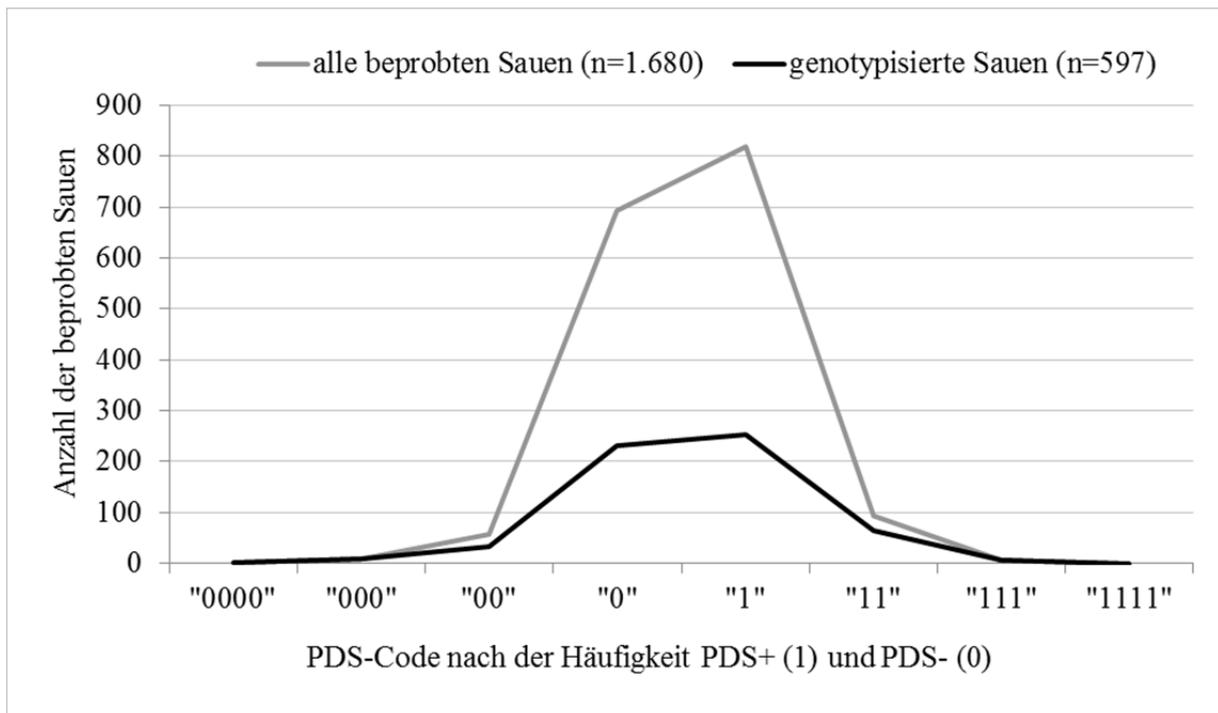
<a href="ftp://ftp.ncbi.nih.gov/blast/documents/">ftp://ftp.ncbi.nih.gov/blast/documents/</a>	FTP-Server zum herunterladen BLAST
<a href="http://www.animalgenome.org/repository/pig/">www.animalgenome.org/repository/pig/</a>	Bereitstellung der SNP-Annotierung des PorcinenSNP60 BeadChip von Martien Groenen auf Sscrofa10.2
<a href="http://www.ensembl.org">www.ensembl.org</a>	Abfrage des Schweinegenoms, Suche nach funktionellen und positionellen Kandidatengen
<a href="http://www.genome.gov/GWAStudies">www.genome.gov/GWAStudies</a>	offizielle Seite mit Übersicht der beim Menschen veröffentlichten genomweiten Assoziationsstudien (Katalogsuche) (HINDORFF et al., 2011)
<a href="http://www.animalgenome.org/cgi-bin/gbrowse/ssc/">www.animalgenome.org/cgi-bin/gbrowse/ssc/</a>	Chromosomenlokalisierung beim Schwein mit annotierten Genen, QTLs, SNPs (Gbrowse)
<a href="http://www.animalgenome.org/cgi-bin/QTLdb/SS/index">www.animalgenome.org/cgi-bin/QTLdb/SS/index</a>	QTL-Datenbank für das Schwein (PigQTL-database) (HU et al., 2010; HU et al., 2005)
<a href="http://www.kegg.com">www.kegg.com</a>	molekulare Pathomechanismen, Signalwege und physiologische Netzwerke
<a href="http://www.isiknowledge.com">www.isiknowledge.com</a>	Literatursuche
<a href="http://www.google.com">www.google.com</a> / <a href="http://www.wikipedia.org">www.wikipedia.org</a> / <a href="http://www.genome.gov/Glossary">www.genome.gov/Glossary</a> / <a href="http://www.ansi.okstate.edu/breeds/swine/">http://www.ansi.okstate.edu/breeds/swine/</a>	allgemeine Glossar-Suchseiten

### 3.7 Methoden

#### 3.7.1 Phänotypisierung

Sauen wurden als phänotypisch PDS-positiv (PDS+) bezeichnet, wenn sie mindestens einmal entsprechend der klinischen Gesichtspunkte Fieber, Gesäugeentzündung oder Dysgalaktie-Anzeichen bei den Ferkeln als betroffen beprobt wurden. Als negative Kontrollsaue (PDS-) wurden Saue derselben Abferkelgruppen ausgewählt, die im Rahmen der Untersuchung auf

den Betrieben innerhalb des Probenzeitraums von zwei Jahren keine klinischen Zeichen für PDS gezeigt haben. Durch die fortlaufende Probennahme über zwei Jahre kam es zum Auftreten von Doppel- und Mehrfachbeprobungen. Es konnte also vorkommen, dass eine als PDS-negativ beprobte Sau später in einer folgenden Abferkelung selbst als PDS-positiv beprobt wurde. Diese Sau ging als PDS-positives Tier in die Auswertung ein. Entsprechend des klinischen Befundes (1=PDS+, 0=PDS-) und der entsprechenden Anzahl an Beprobungen wurde der Phänotyp codiert: Eine dreimal als PDS-positiv beprobte Sau („111“) hat im Vergleich zu einer einmalig als PDS-positiv beprobten Sau eine höhere Aussagekraft. Daher erfolgte die Auswahl der Sauen für die Genotypisierung nicht nur nach der Analyse der Abstammung, sondern vor allem nach der Beurteilung der Phänotypen (Abbildung 10). Eine Auswahl der Sauen zur Genotypisierung fand statt, da aus Kostengründen nur eine begrenzte Zahl an Tieren mittels PorcineSNP60 BeadChip genotypisiert werden konnte. Die weiteren beprobten Tiere sollten erst nach der genomweiten Studie im Rahmen von Wiederholungs- und Bestätigungsstudien genotypisiert werden. Um trotz beschränkter Tierzahl möglichst aussagekräftige Ergebnisse zu erzielen, wurde das Hauptaugenmerk bei der Auswahl vor allem auf die Phänotypisierung gelegt. Hierbei wurden die Sauen mit uneindeutigem Phänotyp bevorzugt wie z.B. mehrfach beprobte Sauen, sowie Sauen mit deutlicher Klinik hinsichtlich Temperaturangabe und Gesäugeentzündung. Die Abstammungsdaten wurden hinzugezogen, um entsprechend gesunde Halbgeschwistersauen zu den phänotypisch erkrankten Sauen zahlenmäßig bestmöglich übereinstimmend auszuwählen.



**Abbildung 10:** Liniendiagramm zur Darstellung der absoluten Anzahl der beprobten Sauen (n=1.680) verteilt auf die PDS-Codierung und der davon ausgewählten Sauen für die Genotypisierung (n=597).

Die Auswertung der Phänotypen und die Zusammenstellung der Doppelbeprobungen erfolgten mit SAS (SAS 9.2, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) unter Verwendung der Prozeduren FREQ, LOGISTIC, MEANS, CORR und GLIMMIX.

### 3.7.2 Heritabilitätsschätzung

Die Varianzkomponentenschätzung wurde mithilfe eines Schwellenwertmodells berechnet (Gleichung 2).

**Gleichung 2:** Schwellenwertmodell zur Schätzung der Varianzkomponenten für PDS.

$$\lambda_{ijkl} = \text{Linie}_i + \text{Saison}_j + \text{Wurf}_k + \text{Sau}_l + e_{ijkl}$$

mit  $\lambda_{ijkl}$  ... Schwellenwert der Anfälligkeit für PDS (betroffen = 1, gesund = 0)

Linie<sub>i</sub> ... fixer Effekt der Linie (i = 1, ..., 6)

Saison<sub>j</sub> ... fixer Effekt der Saison (j = 1, ..., 4)

Wurf<sub>k</sub> ... zufälliger Effekt der Wurfnummer (k = 1, ..., 11)

Sau<sub>l</sub> ... tierindividueller Effekt der Sau (l = 1, ..., 1.680)

$e_{ijkl}$  ... Resteffekt

Mit dem FORTRAN Programm LMMG\_TH, der Schwellenwertversion von LMMG (REINSCH, 1996) wurde die posterior-Verteilung der tierindividuellen Varianz und der permanenten Umweltvarianz unter Anwendung eines Gibbs sampling Algorithmus geschätzt

(REINSCH, 1996). Der Gibbs Sampler lief in fünf Millionen wiederholten Runden. Die erste eine Million Wiederholungen wurde verworfen. Die letzten 100.000 Iterationen wurden für die Varianzkomponentenschätzung verwendet. Datenkontrolle und statistische Auswertung der Varianzkomponenten und der Heritabilität erfolgte unter Nutzung der Statistiksoftware SAS (SAS 9.2, Institute Inc., Cary, NC, USA).

### 3.7.3 DNA-Isolierung

Bis zu Beginn der DNA-Isolierung wurden alle entnommenen Ohrstanzen tiefgefroren. Mit der DNA-Extraktion aus Ohrstanzgewebe wurde im Februar 2009 begonnen. Die DNA-Isolierung erfolgte mittels eines Ethanol-Extraktionsverfahrens aus Blut, Gewebe und Sperma (MILLER et al., 1988).

Hierzu wurde zunächst das Ohrstanzgewebe (5-25 mg) mit 5µl Proteinase K, 20µl Natrium-Sodiumdodecylsulfat (SDS) und 300µl Kalium-Puffer bei 56°C im Hybridofen für 2 h verdaut. Nach dem Abkühlen wurden die Proben mit 200µl Ammoniumacetat versetzt und auf Eis gestellt. Die Ausfällung erfolgte mit 500µl Isopropanol und 300µl Ethanol. Die gefällte DNA wurde in TRIS-EDTA-Puffer gelöst. Die entsprechende DNA-Konzentration wurde mittels Nanodrop (ND-1000) gemessen und anschließend für die Aufbewahrung tiefgefroren. Aus den zur Verfügung gestellten zehn Eberspermaproben wurde ebenfalls DNA isoliert. Von weiteren elf Ebern wurde die DNA von der PIC zugeschickt.

Alle für die Genotypisierung vorgesehenen DNA-Proben wurden verdünnt auf 70 ng/µl auf eine 96-Well-Platte pipettiert. Die Qualität der DNA wurde mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) und Gelbild der genomischen DNA überprüft (Anhang 3). Für die PCR wurden zwei am Labor etablierte schweinespezifischen Primerpaare (IGF2-Ex7 und KVL5231) ausgewählt und zusammen mit 3µl DNA und Wasser, Puffer, Magnesiumchlorid und Nukleotiden sowie Taq-Polymerase im Gesamtvolumen von 10 µl angesetzt und mittels Auftragen auf ein 2%iges Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Für die Qualitätskontrolle der genomischen DNA wurden jeweils 10µl DNA auf ein 0,8%iges Agarose-Gel aufgetragen und elektrophoretisch getrennt. Optimalerweise sollte bei der genomischen DNA vor allem hochmolekulare DNA vorhanden sein, die sich als deutliche Bande bei größer als 5.000bp im UV-Licht erkennen lässt. Schlechte DNA-Qualität zeigte sich anhand von Schmierbanden von 4.000 bis zu 100 bp. Solche Proben wurden in Einzelfällen (wie z.B. die zur Verfügung gestellten DNA-Proben von der PIC) trotzdem genotypisiert, zeigten dann aber mitunter niedrigere Callrates.

### 3.7.4 Genotypisierung

Die Genotypisierung erfolgte unter Verwendung des PorcineSNP60 BeadChip von Illumina (ILLUMINA INC., 2010). Mit einem Chip sind jeweils 12 DNA-Proben zu genotypisieren. Entsprechend der Angabe von Illumina wird mit diesem Chip eine repräsentative Auswahl von insgesamt 62.163 SNP auf allen 18 Autosomen und den Chromosomen X, Y genotypisiert (ILLUMINA INC., 2010).

Es wurden 624 DNA-Proben (597 Sauen, 20 Eber, 7 Standards) genotypisiert. Die auf jeder prozessierten Platte für 96 Proben aufgetragenen Standardproben (7 Standarddeber-Proben, 2 Standardsauen-Proben) dienen der Qualitätssicherung und -kontrolle. Die Genotypen der Standardtiere wurden auf 100% Übereinstimmung („Reproducibility“) und auf Abweichungen hinsichtlich erfolgreich genotypisierter Marker überprüft. Zum Zwecke von Abstammungskontrollen und zusätzlichen Kopplungsanalysen erfolgte die Genotypisierung von 20 Vaterebern.

Insgesamt sind 322 PDS+ und 275 PDS- Sauen aus 76 väterlichen Halbgeschwisterfamilien genotypisiert worden. Die Verteilung entsprechend der PIC-Linien und Betriebe ist in Tabelle 7 ersichtlich.

Die Auswertung der Genotypen erfolgte mittels der Software GenomeStudio der Firma Illumina (Version 2010.3, Illumina Inc., San Diego, CA, USA).

**Tabelle 7:** Übersicht der genotypisierten Sauen (n=597) entsprechend verteilt nach Linie (Landrasse, Large White und entsprechende Kreuzungssauen) und Betrieb (A, B, C, D, E, F) jeweils unter Angabe des Erkrankungsstatus (PDS+/ PDS-).

Linie	Betrieb						Insgesamt
	A	B	C	D	E	F	
Landrasse (L)	0/0	0/0	0/0	18/14	3/2	1/0	22/16
Large White (LW)	9/4	0/0	0/1	12/6	12/11	0/0	33/22
L x LW	36/36	5/5	0/0	3/2	0/0	2/2	46/45
L x L_Duroc	0/0	0/0	0/0	39/37	0/0	30/35	69/72
LW x LW_Duroc	147/114	0/0	0/0	3/5	0/0	0/0	150/119
sonstige	0/0	0/0	0/0	1/0	0/0	1/1	2/1
<b>Insgesamt</b>	192/154	5/5	0/1	76/64	15/13	34/38	<b>322/275</b>

### 3.7.5 Qualitätskontrolle

Zu den wichtigsten Qualitätskriterien der Genotypisierung gehört die tierindividuelle Callrate (ID-call) und die Callrate des SNP (SNP-call). Die ID-call gibt an, wie viele der jeweiligen SNP-Beads (Kügelchen) des Chips bei einer DNA-Probe gelesen werden konnten. Sie sollte im Optimalfall über 98% liegen. Eine zu niedrige ID-call ist meist bedingt durch ungenügende DNA-Qualität oder durch Prozessionsfehler bei der Genotypisierung. Mit sinkender ID-call erhöht sich die Risiko-Wahrscheinlichkeit für fehlerhafte Genotypisierungen von SNPs. Die SNP-call ist ein Maß für die erfolgreiche Typisierung eines SNPs bei allen genotypisierten Proben. Weitere Qualitätskriterien sind die Allelfrequenz des selteneren Allels (MAF) und ob sich der entsprechende SNP im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (HWE) befindet.

Folgende Qualitätskriterien wurden ausgewählt und mit dem kompletten Datensatz (fixalle) verglichen:

- (1) **fixauto**: eine ID-call von mindestens 95%, eine SNP-call von mindestens 90%, eine MAF von mindestens 5% und ein p-Wert von mindestens  $10^{-9}$  für die Erfüllung des HWE wurden verwendet. Insgesamt 585 Sauen, jeweils 314 PDS+ und 271 PDS-, und 49.740 SNPs erfüllten diese Kriterien und wurden für die weitere statistische Auswertung verwendet.
- (2) **fixrare**: alle Kriterien von (1), aber mit einer Allelfrequenz des selteneren Allels von mindestens 1%. Die ausgewählten Tiere entsprechen der Version (1), die Anzahl der SNPs erhöht sich auf 52.553 (Tabelle 8). Mittels dieser Kriterien sollten insbesondere seltenere genetische Varianten einbezogen werden.
- (3) **fixstrict**: während im Vergleich zu (2) die MAF von mindestens 1% beibehalten wurde, wurden alle anderen Kriterien stringenter. Eine ID-call von mindestens 99%, eine SNP-call von mindestens 99%, und ein p-Wert von mindestens 0.01 für die Erfüllung des HWE, sollten eine möglichst gute Absicherung bieten gegen mögliche Genotypisierungsfehler, die die statistische Auswertung beeinflussen könnten. Summa summarum erfüllten 583 Sauen, jeweils 313 MMA-positive und 270 MMA-negative, und 40.277 SNPs diese sehr stringenten Kriterien.

**Tabelle 8:** Vergleichende Übersicht der zugrunde liegenden Qualitätskriterien und die entsprechende Anzahl der Tiere und der autosomalen SNPs.

	<b>fixauto</b>	<b>fixrare</b>	<b>fixstrict</b>
<b>SNP-call</b>	0,9	0,9	0,99
<b>ID-call</b>	0,95	0,95	0,99
<b>MAF</b>	0,05	0,01	0,01
<b>HWE (p-Wert)</b>	$1 \times 10^{-9}$	$1 \times 10^{-9}$	0,01
<b>Marker</b>	<b>49.740</b>	<b>52.553</b>	<b>40.277</b>
<b>Sauen (PDS+/PDS-)</b>	<b>585 (314/271)</b>	<b>585 (314/271)</b>	<b>583 (313/270)</b>
<b>mittlere</b>			
<b>Heterozygotie (sd)</b>	0,391 (0,028)	0,374 (0,027)	0,363 (0,022)

Die Heterozygotie wurde ebenso wie die allgemeinen Allelfrequenzen linienspezifisch und im Gesamten ausgewertet.

### 3.7.6 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung unter Zuhilfenahme der oben genannten Computerprogramme beinhaltete neben deskriptiver Statistik unter anderem den  $\chi^2$ -Test ( $\chi^2$ ), den Fisher-Exact-Test und den Cochran-Mantel-Haenszel-Test. Vergleichend wurde mittels logistischer Regression der Einfluss des Genotyps auf das Merkmal PDS bestimmt. Eine Korrektur ist mit fixen Effekten wie Linie, Betrieb oder Familien-ID möglich. Der Einfluss dieser Effekte auf das Ergebnis und auf den Inflationsfaktor wurde überprüft und gegeneinander abgewogen.

Der Armitage-Trend-Test unter Nutzung der Korrektur mittels Hauptkomponenten wurde als Methode der Wahl für diese Arbeit verwendet. Die Hauptkomponentenanalyse basierte auf der genomischen Verwandtschaftsmatrix, um entsprechend die Populations- und Verwandtschaftsstruktur der genotypisierten Sauen zu korrigieren. Die Hauptkomponentenanalyse ist für die Korrektur der in dieser Arbeit vorliegenden Daten optimal, um sowohl die verschiedenen Linien als auch die Familienbeziehungen einzubeziehen. Mittels Kaiserkriterium wurde die Anzahl der zu verwendenden Hauptkomponenten bestimmt. Es wurden die 17 ersten Hauptkomponenten als zusätzliche Kovariable in der Auswertung berücksichtigt. Die Hinzunahme der Geburtshilfe (ja/nein) als fixer Effekt wurde vergleichend beurteilt.

Um dem multiplen Testen gerecht zu werden, wurde das allgemeine Signifikanzniveau von 0.05 unter Anwendung der Bonferroni-Korrektur adjustiert.

### 3.7.7 Kandidatengensuche

Die Kandidatengensuche basierte auf den Angaben zur Lokalisation bzw. Annotierung der SNPs auf dem Schweinegenom. Hierbei wurde sowohl die Illumina-Version auf Grundlage der Genomversion 7 des Schweinegenoms (Sscrofa7) als auch die von MARTIEN GROENEN öffentlich zugängliche Annotierung nach dem aktuellen Genombild (Sscrofa10 und Sscrofa10.2) verwendet (GROENEN 2012).

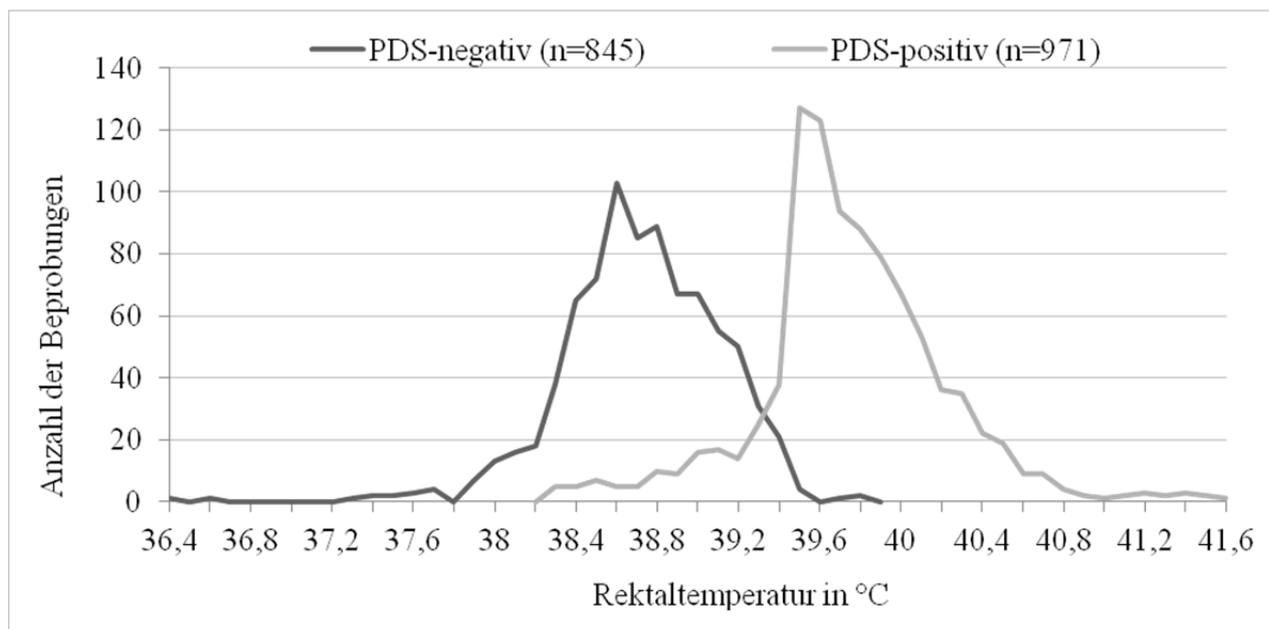
Eine weitere Möglichkeit ist das Verwenden der SNP-Sequenzinformation für ein eigenständiges Mappen (z.B. BLAST – Basic Local Alignment Search Tool) gegen vorhandene Genomsequenzen (*Sus scrofa* version 9 oder 10). Dies wurde im Besonderen bei den nicht oder unsicher annotierten SNPs durchgeführt. Die SNP-Sequenzen wurden auch auf anderen Genomen wie Mensch, Rind oder anderen Spezies per BLAST gesucht, um homologe Bereiche oder Gene zu identifizieren.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Phänotypisierung

#### 4.1.1 Auswertung der eingegangenen Proben

Über einen Zeitraum von 28 Monaten sind 2.012 Proben eingegangen, von denen 2.001 – jeweils 1.028 Proben von PDS-positiven Tieren und 973 Proben von PDS-negativen Tieren – für die Auswertung genutzt wurden. Bei 1.816 Beprobungen wurde eine genaue Angabe der rektalen Körpertemperatur erfasst. Im Mittel lag die Temperatur bei PDS-positiven Tieren (n=971) bei 39,8°C mit einer Standardabweichung von 0,5 (Min-Max: 38,3-41,6°C). Die Rektaltemperaturen bei PDS-negativ beprobten Sauen reichten von 36,4°C bis 39,8°C und zeigten im Mittelwert eine Temperatur von 38,7°C (sd=0,4).



**Abbildung 11:** Verteilung der rektalen Körpertemperatur in °C in Bezug zur Diagnose PDS (n=1.816).

Während 15 Sauen eine rektale Körpertemperatur über 39,5°C hatten, aber keine klinischen Anzeichen für PDS zeigten, gab es im Gegenzug 289 PDS-positive Sauen, welche zwar keine deutliche Temperaturerhöhung ( $T < 39,5^\circ\text{C}$ : n=157,  $T = 39,5^\circ\text{C}$ : n=132), dafür aber eindeutige klinische Veränderungen insbesondere des Gesäuges zeigten (Abbildung 11).

Hinsichtlich des Wurfes zeigten primipare PDS-negative Sauen durchschnittlich eine rektale Körpertemperatur von 38,9°C (n=108, sd=0,4) und unterschieden sich signifikant (t-test,  $p < 0,01$ ) von pluriparen Sauen mit im Mittel 38,7°C (n=737, sd=0,4). Bei PDS-positiven

Tieren war der Unterschied zwischen Jungsau (39,8°C, n=177) und Altsau (39,7°C, n=794) nicht signifikant.

Die insgesamt 1.028 Proben von PDS-positiven Tieren und 973 Proben von PDS-negativen Tieren wurden für die genetische Analyse auf individueller Sauenebene betrachtet und entsprechen insgesamt 1.680 -teils wiederholt- beprobten Sauen. Diese 1.680 beprobten Sauen können entsprechend der Beprobungshäufigkeit und des entsprechenden PDS-Status in 13 Gruppen eingeteilt werden (Tabelle 9).

**Tabelle 9:** Übersicht und Einteilung der beprobten Sauen (n=1.680) anhand des Erkrankungsstatus.

	Codierung_1 („Code“)													
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
PDS-Status	0000	000.	00.	0.	0001	001.	01.	1.	0011.	011.	11.	0111	111.	1111
Anzahl (n)	2	9	56	693	-	18	82	719	2	9	83	2	5	-
	0 (PDS-negativ)				1x PDS-positiv				2x PDS-positiv			3x PDS-positiv		
Summe	760				819				94			7		

Über den Zeitraum der Probennahme von über zwei Jahren wurden insgesamt 268 Sauen mehrfach beprobt. So sind 222 Sauen doppelt, 41 Sauen dreimal und 6 Sauen viermal beprobt worden. Die mehrfach beprobten Sauen (n=268) lassen sich zunächst in drei Gruppen einteilen (Tabelle 10):

- (A) Sauen, die im Beprobungszeitraum post partum klinisch unauffällig waren (n=67)
- (B) Sauen, die einmal als PDS+ erkannt wurden (n=100)
- (C) Sauen, die wiederholt als PDS+ erkannt wurden (n=101).

Insgesamt stehen 760 PDS-negative Sauen und 920 PDS-positive Sauen für die weitere genetische Analyse zur Verfügung.

**Tabelle 10:** Einteilung der mehrfach beprobten Sauen (n=268) nach PDS-Status.

Gruppe	PDS-Status		Aussagekraft	Anzahl
<b>A</b>	0-0	nie PDS	gesunde, unauffällige Sau	++ <b>67</b>
<b>B</b>	0-1	1x PDS+	PDS+ Sau	+ <b>100</b>
<b>C</b>	1-1	≥ 2x PDS+	PDS++ Sau	++++ <b>101</b>

#### 4.1.2 Linienspezifische Auswertung der Parameter

Folgende Merkmale bzw. Parameter wurden linienspezifisch ausgewertet, um eventuelle linienspezifische Merkmalscharakteristika für die weitere Auswertung zu finden: die rektale Körpertemperatur, der Anteil der mittel- bis hochgradig betroffenen Gesäuge (MAM+), die Ferkelkennzahlen lebendgeborene Ferkel (lgF), totgeborene Ferkel (tgF), mumifiziert geborene Ferkel (mgF) und abgesetzte Ferkel (agF).

Deutlich wird, dass die als PDS+ beprobten Reinzuchtsauen der Landrasse im Vergleich zu Sauen der Linie Large White tendenziell höhere mittlere Temperaturen zeigten (Tabelle 11). Die mittlere Körpertemperatur bei gesunden Sauen der Landrasse war im Durchschnitt mit 38,8 °C tendenziell niedriger als beim Edelschwein mit 38,9°C.

**Tabelle 11:** Übersicht des Auftretens von linienspezifischer PDS-Charakteristik im Hinblick auf rektale Körpertemperatur, hochgradige Betroffenheit des Gesäuges (MAM+) und Ferkelauffälligkeiten der Beprobungen (n=2.001), absolute Tierzahlen.

Linie	PDS+/ PDS-	MAM+ (% Anteil an PDS+)	Ferkel +	rektale Körpertemperatur in °C	
				Angabe des Mittelwerts (n; Standardabweichung; Min-Max) PDS+	PDS-
L	106/67	20 (18,9%)	11	39,83 (106; 0,30; 39,5-40,7)	38,78 (60; 0,40; 37,9-39,5)
LW	116/85	26 (22,4%)	5	39,80 (111; 0,54; 38,5-41,4)	38,87 (78; 0,33; 38,3-39,7)
L x LW	107/97	40 (37,4%)	8	39,61 (84; 0,52; 38,3-41,1)	38,66 (64; 0,35; 37,5-39,3)
L x L_Du	260/287	34 (13,1%)	13	39,86 (259; 0,35; 38,8-41,3)	38,71 (264; 0,46; 36,4-39,5)
LW x LW_Du	381/404	105 (27,6%)	9	39,66 (354; 0,53; 38,3-41,6)	38,72 (348; 0,30; 37,7-39,8)
Sonstige	58/33	8 (13,8%)	4	39,80 (57; 0,34; 39,2-41,2)	38,78 (31; 0,65; 36,6-39,4)
Insgesamt	1028/973	233 (22,7%)	50	39,75 (971; 0,47; 38,3-41,6)	38,73 (845; 0,39; 36,4-39,8)

Es fanden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen PDS-positiven und PDS-negativen Beprobungen in der Anzahl lebendgeborener Ferkel (Tabelle 11). Tendenziell zeigte sich allerdings, dass PDS-positive Sauen der Landrasse im Mittelwert ca. 0.5 mehr lebendgeborene Ferkel aufwiesen. Sauen mit PDS im Puerperalstadium wiesen tendenziell weniger abgesetzte Ferkel auf (Tabelle 12). Dieser Unterschied war vor allem bei der Kreuzung LxLW und LWxLW\_Du auffällig.

**Tabelle 12:** Übersicht der linienspezifischen PDS-Charakteristik in Bezug zu den Parametern lebendgeborene Ferkel und abgesetzte Ferkel (n=2.001).

Linie	PDS+/ PDS-	lebend geborene Ferkel (lgF) Mittelwert (Standardabweichung; Min-Max)		abgesetzte Ferkel (agF) Mittelwert (Standardabweichung; Min- Max)	
		PDS+	PDS-	PDS+	PDS-
L	106/67	12,6 (3,1; 4-21)	12,1 (3,5; 4-19)	10,3 (3,2; 0-20)	10,4 (2,4; 0-21)
LW	116/85	12,2 (3,1; 3-21)	12,4 (3,3; 5-21)	10,4 (2,1; 0-14)	10,5 (2,6; 0-17)
L x LW	107/97	12,1 (3,3; 3-19)	12,1 (3,1; 4-19)	9,9 (1,3; 6-13)	10,4 (1,2; 6-13)
L x L_Du	260/287	12,0 (3,0; 1-19)	11,8 (3,0; 2-19)	10,2 (2,2; 0-17)	10,3 (2,2; 0-18)
LW x LW_Du	381/404	12,1 (3,2; 1-20)	12,1 (2,8; 2-19)	10,5 (1,8; 0-18)	10,9 (1,2; 4-20)
Sonstige	58/33	12,1 (3,4; 4-18)	12,4 (3,3; 6-19)	11,4 (1,7; 6-15)	11,4 (1,3; 9-13)
Insgesamt	1.028/973	12,2 (3,1; 1-21)	12,0 (3,0; 2-21)	10,4 (2,1; 0-20)	10,6 (1,8; 0-21)

Im Hinblick auf die Anzahl totgeborener Ferkel (tgF) wurden signifikant mehr totgeborene Ferkel bei PDS-auffälligen Sauen festgestellt (Tabelle 13).

**Tabelle 13:** Übersicht der linienspezifischen PDS-Charakteristik in Bezug zur Anzahl totgeborener und mumifiziert geborener Ferkel (n=2.001).

Linie	PDS+ / PDS-	totgeborene Ferkel Mittelwert (Standardabweichung; Min- Max)		mumifiziert geborene Ferkel Mittelwert (Standardabweichung; Min- Max)	
		PDS+	PDS-	PDS+	PDS-
L	106/67	1,3 (1,6; 0-7)	0,8 (1,2; 0-5)	0,03 (0,2; 0-1)	0
LW	116/85	0,9 (1,2; 0-6)	0,7 (1,0; 0-4)	0,09 (0,4; 0-3)	0,05 (0,2; 0-1)
L x LW	107/97	1,6 (2,0; 0-12)	1,2 (1,3; 0-5)	0,30 (0,6; 0-3)	0,30 (0,6; 0-2)
L x L_Du	260/287	1,1 (1,7; 0-13)	1,0 (1,4; 0-8)	0,17 (0,5; 0-3)	0,12 (0,4; 0-2)
LW x LW_Du	381/404	1,4 (2,0; 0-21)	1,1 (1,4; 0-7)	0,28 (0,6; 0-4)	0,20 (0,5; 0-3)
Sonstige	58/33	0,9 (1,5; 0-9)	0,4 (0,7; 0-3)	0,10 (0,4; 0-2)	0,03 (0,2; 0-1)
Insgesamt	1.028/973	1,3 (1,8; 0-21)	1,0 (1,3; 0-8)	0,19 (0,5; 0-4)	0,15 (0,5; 0-3)

### 4.1.3 Einflussfaktoren Geburtseinleitung und Geburtseingriff

Zwischen Geburtseingriff und dem Auftreten einer postpartalen Dysgalaktie bestand ein signifikanter Zusammenhang ( $p < 0,0001$ ). Sauen, bei denen ein Geburtseingriff vonnöten war, hatten ein nahezu zweifach erhöhtes Risiko an PDS zu erkranken (OR=1,76 (95% KI 1,42-2,19),  $p < 0,0001$ ).

Geburtseinleitung und PDS-Auftreten standen nicht direkt miteinander im Zusammenhang ( $p = 0,9086$ ), nur ein indirekter Zusammenhang über das Merkmal Geburtseingriff war gegeben. Sauen, bei denen die Geburt eingeleitet wurde, hatten ein zweifach höheres Risiko, dass bei ihnen auch ein Geburtseingriff stattfand (OR=2,04 (95% KI 1,63-2,55),  $p < 0,0001$ ). Während 84,7% der Sauen, die keine Geburtseinleitung benötigten, auch keine Geburtshilfe brauchten, wurden bei jeweils 26,9% der Sauen, deren Geburt eingeleitet wurde, geburtshilfliche Maßnahmen ergriffen ( $p < 0,0001$ ).

### 4.1.4 Bakterienprofile

Die insgesamt mehr als 7.045 isolierten Bakterien aus den Milchproben ( $n = 1998$ ) gehören zu über 30 wichtigen Bakterienspezies (KEMPER et al., 2012). Von diesen wurden im Rahmen der genetischen Untersuchung zur pathogen-spezifischen Resistenz vor allem der Schwerpunkt auf bislang beschriebene gesäuge-pathogene Spezies wie *Escherichia coli* (EC), sowie auf die insbesondere als euterpathogen bekannten Spezies wie *Staphylococcus aureus* (StA) und *Streptococcus dysgalactia* und *agalactia* (STREP) gelegt. In nur 0,5% der Proben wurden die genannten Pathogene in Kombination gefunden. Mit 57,1% trat am häufigsten der Befund mit *Escherichia coli* auf (Tabelle 14). Unter Berücksichtigung der gesamten Gruppe der coliformen Erreger mit u.a. *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Citrobacter* spp. und *Enterobacter* spp. (COLIFORM) zusammen mit EC, veränderten sich die entsprechenden Werte auf Grund der relativ niedrigen Prävalenz dieser Spezies nur geringfügig (Anhang 4). Deutlich wird in dieser Kombinationsbetrachtung, dass zwar die Kombinationen in signifikant verschiedenen Häufigkeiten auftraten, jedoch aber die Unterschiede zwischen PDS-positiv oder PDS-negativ beprobten Tieren nicht signifikant verschieden sind.

**Tabelle 14:** Auswertung der wichtigen Bakterienspezies *Escherichia coli* (EC), *Staphylococcus aureus* (StA) und der *Streptococci agalactiae* bzw. *dysgalactiae* (STREP) in Kombinationsbetrachtung unter Berücksichtigung des PDS-Status. Es werden jeweils die absoluten Häufigkeiten und in Klammern die Reihenprozente angegeben.

	PDS+	PDS-	
kein EC, StA oder STREP	236 (23,0%)	173 (17,8%)	409 (20,5%)
EC+StA+STREP	6 (0,6%)	4 (0,4%)	10 (0,5%)
nur STREP	34 (3,3%)	24 (2,5%)	58 (2,9%)
STREP + StA	7 (0,7%)	2 (0,2%)	9 (0,4%)
nur StA	27 (2,6%)	15 (1,5%)	42 (2,1%)
StA + EC	19 (1,9%)	14 (1,5%)	33 (1,6%)
nur EC	571 (55,6%)	569 (58,5%)	1.140 (57,1%)
STREP + EC	126 (12,3%)	171 (17,6%)	297 (14,9%)
gesamt	1.026 (100,0%)	972 (100,0%)	1.998 (100%)

Für die genetische Untersuchung war sowohl eine Auswertung auf Sauenebene als auch eine Einteilung in verschiedene phänotypische Klassifizierungen notwendig. Hierbei wurden die Sauen jeweils in die möglichen vier Kategorien unterschieden: Sauen mit klinischem PDS-Befund und entsprechendem positiven bakteriologischen Befund (PDS+/Bak+), Sauen mit klinischem PDS-Befund aber mit – für den jeweiligen Erreger – negativem bakteriologischen Befund (PDS+/Bak-) sowie jeweils aus klinischer Sicht PDS-negative Sauen mit (PDS-/Bak+) bzw. ohne positivem bakteriologischen Befund (PDS-/Bak-). Mehrfach beprobte Sauen wurden entsprechend ihres positiven PDS-Befundes und des positiven bakteriologischen Befundes eingeteilt. Zum Beispiel würde eine Sau, die zweimal als PDS+ beprobt wurde, einmal mit EC-positivem Befund und einmal ohne EC-positivem Befund, als PDS+/EC+ – Sau in die Auswertung einfließen. Die eingeteilte Klassifizierung ist am Beispiel von EC in der Tabelle 15 ersichtlich.

**Tabelle 15:** Einteilung auf Sauenebene je nach Befund der klinischen bzw. der bakteriologischen Untersuchung am Beispiel von *Escherichia coli* (EC). Die Angabe der Sauen erfolgt für alle beprobten Sauen ( $n_{\text{gemma}}=1.680$ ) und für die Auswahl der genotypisierten Sauen ( $n_{\text{geno}}=597$ ).

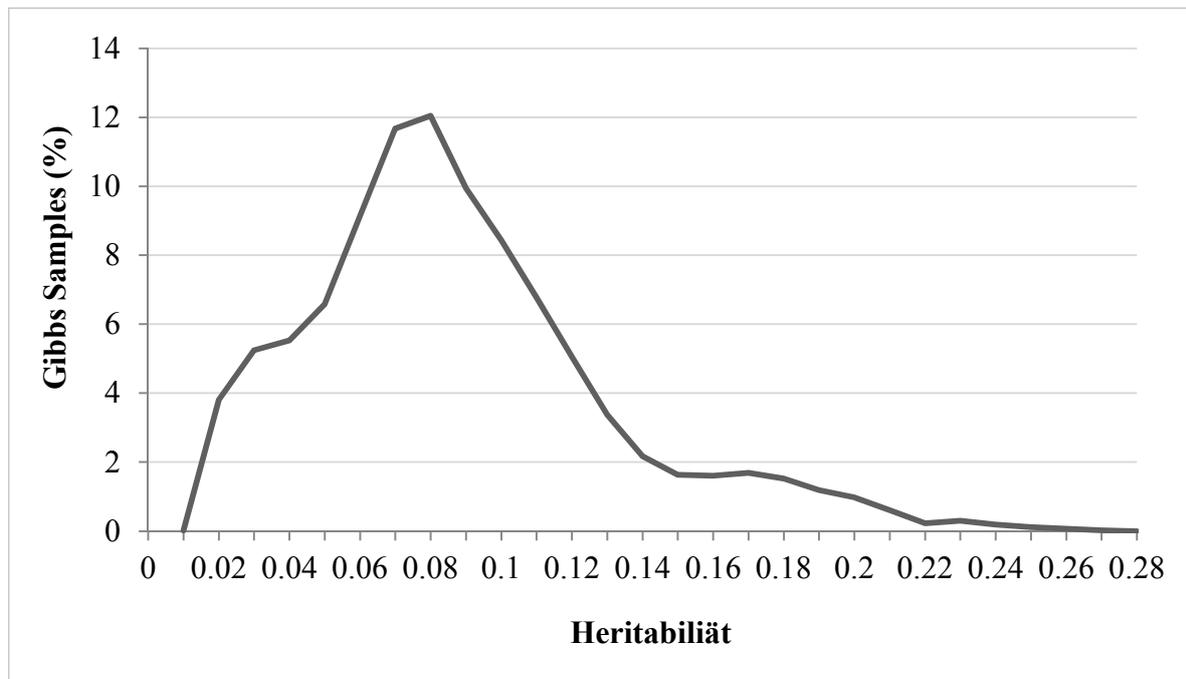
	Klinik	bakteriologischer Befund	$n_{\text{gemma}}$	$n_{\text{geno}}$
PDS-negative Sau ohne EC	-	-	153	48
PDS-negative Sau mit EC	-	+	607	227
PDS-positive Sau ohne EC	+	-	212	67
PDS-positive Sau mit EC	+	+	708	255
Insgesamt			1.680	597

Zusätzlich wurde auf Probenebene die jeweilig gemessene Rektaltemperatur bei PDS+/EC+ im Vergleich zu PDS+/EC- getestet. Dabei zeigten als PDS-positiv beprobte Sauen mit EC-positiven Befund keine signifikant verschiedene Körpertemperatur zu PDS+/EC+ -beprobten Tieren.

Andere Bakterienspezies wie *Enterococcus* spp. oder *Aerococcus viridans*, aber auch weitere Spezies der Familie *Staphylococcaceae* oder *Streptococcaceae* wurden auf Grund der niedrigen Prävalenzen und der geringen zu erwartenden Power nicht für die pathogen-spezifische Auswertung verwendet.

## 4.2 Heritabilität

Es wurde eine additiv genetische Varianz von 0,10 geschätzt. Die entsprechende Heritabilität für das Merkmal PDS betrug 0,09 mit einer Standardabweichung von 0,03 (Abbildung 12).



**Abbildung 12:** Posterior-Verteilung der Heritabilität entsprechend der relativen Häufigkeit (in %) der Gibbs-Samples.

## 4.3 Genotypisierung

### 4.3.1 Genotypisierungsergebnisse

Die Auswertung der Standardproben ergab eine durchschnittlich 99,0%ige Übereinstimmung. Anhand des Vergleichs der Übereinstimmungen und der Unterschiede der Standardtiere (Eber bzw. Sauen) wurde aber auch ersichtlich, dass bis zu einem gewissen Prozentsatz Fehler in der Genotypisierung zu erwarten sind. So konnten einzelne SNPs mitunter nicht bei allen Standardtieren bestimmt werden.

Für einzelne SNPs wie DRGA0002444, ALGA0070158, ASGA0000928 und H3GA0051802 wurden unterschiedliche Genotypen von einem Tier erzielt. Anhand der Call-plots wird ersichtlich, dass es sich hierbei um nicht gut-„gecallte“ (=bestimmbare) SNPs handelt (Anhang 5). Unter Anwendung von Qualitätskriterien wie z.B. einer Callrate von 95% für die SNPs werden diese für die statistische Auswertung ausgeschlossen. Zum Vergleich werden im Anhang 6 die Signalintensitätsplots einer Auswahl an SNPs mit Callrates entsprechend der Qualitätskriterien dargestellt.

### 4.3.2 Qualitätskontrolle der Genotypisierungsergebnisse

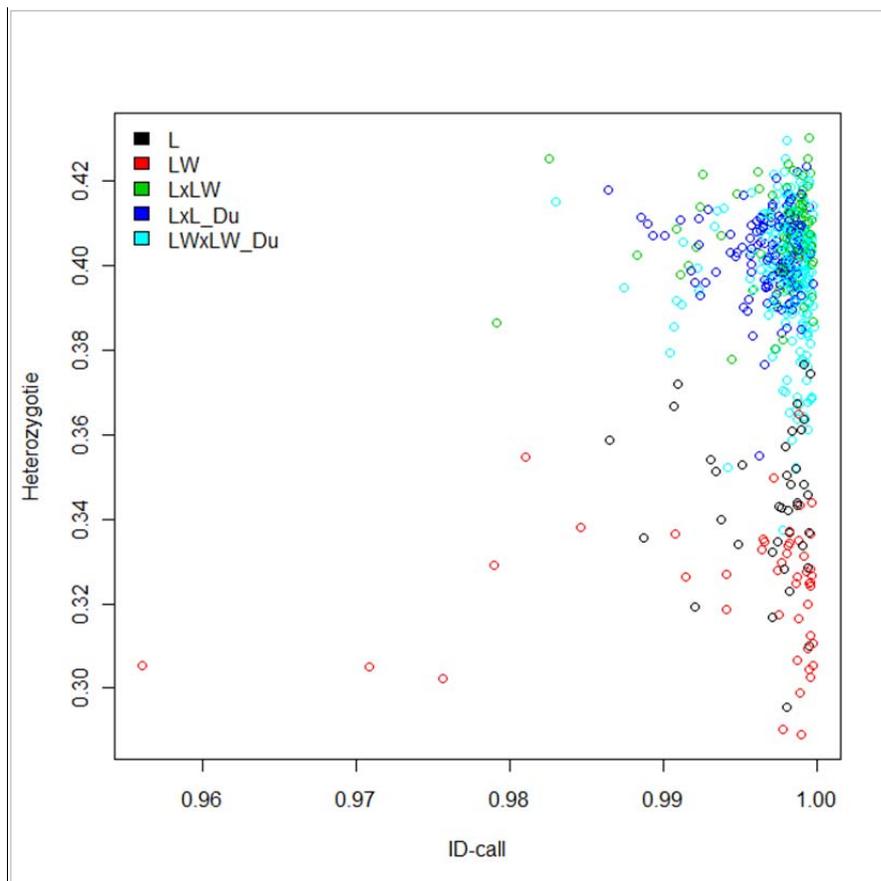
Insgesamt 34,4% (21.384) aller SNPs wurden zu 100% bei allen Tieren genotypisiert. Bei 3,6% (2.268) der SNPs wurden bei keinem Tier Genotypen ermittelt. Die tierindividuellen Callrates (ID-call) lagen bei den 624 DNA-Proben zwischen 0,779 und 0,999 (Mittelwert=0,991, Median=0,994, sd=0,021). Bezogen auf die SNP-call lag die mittlere Callrate bei 0,954 (sd=0,191).

Der Homozygotiegrad bzw. die Heterozygotie unterschied sich zwischen den einzelnen PIC-Linien. So wurden signifikante Unterschiede bei der Heterozygotie zwischen den reinrassigen (L, LW) und den Kreuzungssauen festgestellt (Tabelle 16).

**Tabelle 16:** Linienspezifische Heterozygotie (Mittelwert, Min-Max, Standardabweichung, Varianz, n), verschiedene Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede ( $p < 0,001$ ) [Welch t-test].

Heterozygotie	Mittelwert	Min-Max	Standardabweichung	Varianz	n
Landrasse (L)	0,344 <sup>a</sup>	0,295-0,376	0,018	0,0003	38
Large White (LW)	0,325 <sup>b</sup>	0,288-0,402	0,019	0,0004	49
L x LW	0,407 <sup>c</sup>	0,378-0,430	0,010	0,0001	91
L x L_Duroc	0,403 <sup>cd</sup>	0,355-0,424	0,009	$9 \times 10^{-5}$	140
LW x LW_Duroc	0,399 <sup>d</sup>	0,338-0,429	0,014	0,0002	268
Sonstige	0,405 <sup>cd</sup>	0,397-0,411	0,007	$5 \times 10^{-5}$	3
Gesamt (mit Ebern)	0,390	0,288-0,430	0,029	0,001	607

Anhand des grafischen Plots des Heterozygotiegrades und der individuellen Callrate können gegebenenfalls Abweichungen und Verunreinigungen erkannt werden (Abbildung 13).



**Abbildung 13:** Plot der individuellen Callrate (ID-call) auf der x-Achse und der Heterozygotie (y-Achse) aller Proben. Linienspezifische Unterschiede sind durch die Farbcodierung zu erkennen (schwarz-Landrasse, rot-Large White, grün-LxLW, blau-LxL\_Du, türkis-LWxLW\_Du).

Linienspezifische Unterschiede sind auch in der Allelfrequenz zu finden: Bei nur 27.328 SNPs ist das seltenere Allel in allen fünf Linien übereinstimmend. Bei vielen SNPs existieren dagegen unterschiedliche seltenere Allele, so ist z.B. SNP1 (A/G) mit Allel A bei Rasse1 das seltenere Allel, während bei Rasse2 das Allel G das seltenere ist. Die Unterschiede in Minor Allel/ Major Allel sind für jede einzelne Linie in der folgenden Tabelle 17 ersichtlich.

**Tabelle 17:** Linienspezifische Unterschiede in Minor Allel/ Major Allel. Die entsprechenden Zahlen stellen die Anzahl der SNPs mit gegensätzlicher Allelausrichtung dar. Mit steigender Anzahl erhöht sich die genetische Distanz zwischen den Populationen.

	<b>L</b>	<b>LW</b>	<b>LxLW</b>	<b>LxL_Du</b>	<b>LWxLW_Du</b>
<b>L</b>	--	<b>21.342</b>	12.999	13.324	18.748
<b>LW</b>		--	11.566	18.874	10.959
<b>LxLW</b>			--	11.353	<b>8.577</b>
<b>LxL_Du</b>				--	12.574
<b>LWxLW_Du</b>					--

In den linienspezifischen Unterschieden zwischen Minor/Major Allel spiegelt sich ebenso der Verwandtschaftsgrad wider. Während zwischen L und LW die größte Differenz besteht (21.342), ist zwischen der Kreuzung LxLW und LWxLW\_Du die geringste Differenz zu finden (8.577).

## 4.4 Genomweite Assoziationsstudie

### 4.4.1 Linienübergreifende genomweite Assoziationsstudie

#### 4.4.1.1 Vergleich der Qualitätskriterien

Die Anwendung von Qualitätskriterien ermöglicht durch die gezielte Berücksichtigung von qualitativ selektierten SNPs und Proben zur weiteren statistischen Auswertung eine Reduktion der falsch-positiven Ergebnisse. Die Gefahr von falsch-negativen Ergebnissen kann dazu im Verhältnis ansteigen. Mittels dieses Vergleichs wird aber deutlich, dass nur vereinzelte SNPs unter den signifikanten Ergebnissen vorliegen, die entsprechende Qualitätskriterien nicht erfüllen (ASGA0041945, ALGA0015469). Insgesamt 15 von 20 (75%) erfüllen sogar die sehr stringenten Kriterien von fixstrict (Tabelle 18).

**Tabelle 18:** Vergleichende Übersicht der SNPs mit den signifikantesten Ergebnissen (Angabe des p-Wertes des Chi-Quadrat-Tests) unter Verwendung des jeweiligen Datensatzes (fixalle, fixauto, fixrare und fixstrict). Die Positionsangabe (SSC, bp) erfolgt unter Verwendung des alten Assembly (Sscrofa7).

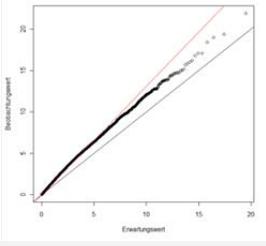
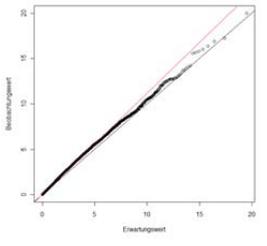
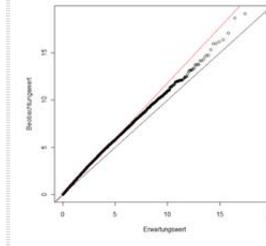
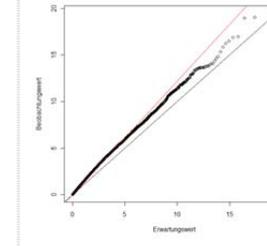
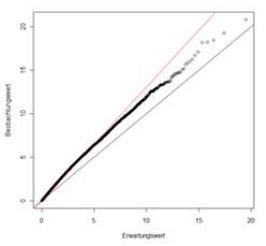
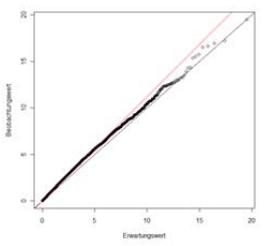
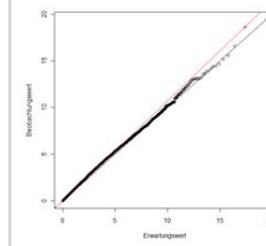
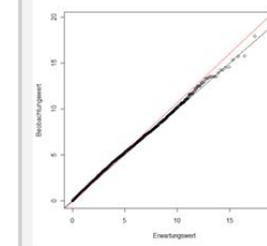
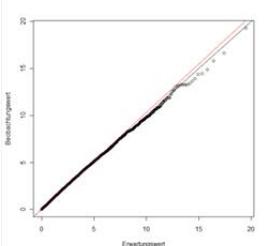
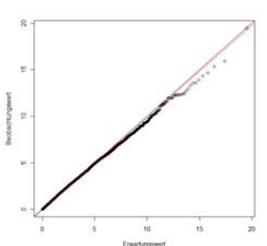
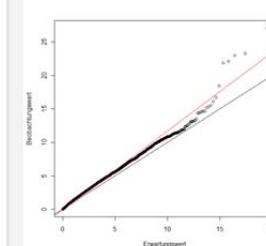
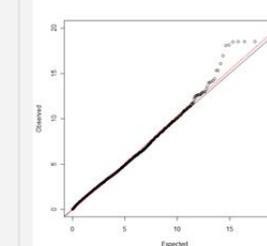
Name des SNPs	SSC	Position in bp	Angabe des p-Wertes			
			fixalle	fixauto	fixrare	fixstrict
INRA0058958	(15)	(59401864)	1,38E-06	1,72E-06	1,72E-06	1,69E-06
CASI0009856	1	275694098	4,59E-06	6,86E-06	6,86E-06	--
ALGA0069809	13	44275725	9,34E-06	1,26E-05	1,26E-05	1,58E-05
ASGA0057450	13	48771191	1,09E-05	1,41E-05	1,41E-05	1,37E-05
MARC0064126	13	45091378	1,54E-05	2,89E-05	2,89E-05	3,65E-05
ALGA0094182	17	33423003	9,39E-05	2,93E-05	2,93E-05	2,79E-05
ASGA0041945	9	21175824	2,63E-05	--	--	--
ALGA0105374	8	39786973	2,77E-05	4,39E-05	4,39E-05	4,29E-05
ALGA0015457	2	123164729	5,10E-05	4,63E-05	4,63E-05	--
ALGA0025824	4	75272674	5,94E-05	3,00E-05	3,00E-05	3,03E-05
ALGA0015469	2	123185443	6,14E-05	--	--	--
DRGA0002473	1	275720770	6,40E-05	7,55E-05	7,55E-05	0,00011913
ALGA0121156	13	85950918	6,67E-05	5,65E-05	5,65E-05	5,54E-05
H3GA0007487	2	122474326	8,80E-05	2,46E-05	2,46E-05	--
ASGA0042057	9	24153991	9,39E-05	0,00016264	0,00016264	0,0001182
ALGA0015393	2	121918697	9,68E-05	4,93E-05	4,93E-05	--
ALGA0105013	1	275978672	0,00010458	0,00015502	0,00015502	0,00024033
ALGA0069815	13	44261413	0,00012225	0,0001578	0,0001578	0,00019777
MARC0036679	2	122138830	0,00012529	4,51E-05	4,51E-05	--
ALGA0008212	1	236285366	0,00012751	0,00023984	0,00023984	0,00023258
MARC0018567	15	100523327	0,00015799	9,41E-05	9,41E-05	9,13E-05
ASGA0098646	9	20278988	0,00019682	5,60E-05	5,60E-05	5,08E-05

Für die weitere Analyse wurden die Qualitätskriterien und der entsprechende Datensatz von ‚fixauto‘ verwendet.

#### 4.4.1.2 Vergleich der fixen Effekte in der logistischen Regression

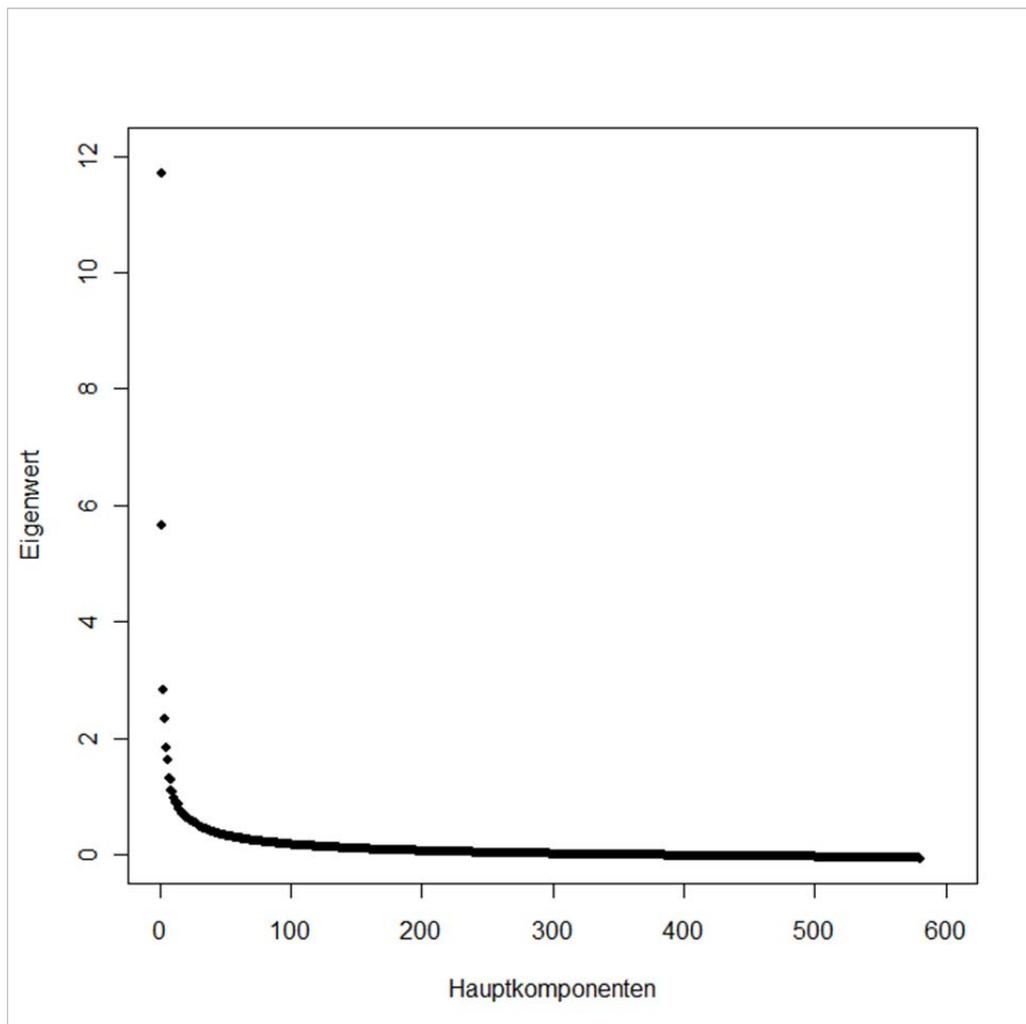
Die Auswahl der fixen Effekte hat einen bedeutenden Einfluss auf den Inflationsfaktor  $\lambda$  und damit auch auf die Ergebnisse der genomweiten Assoziation. Ohne Korrektur lag der Inflationsfaktor bei 1,313 und wies damit auf systematische Allelfrequenzunterschiede aufgrund von anderen Faktoren hin. Mögliche Faktoren sind Linien- und/oder Familienunterschiede, aber ebenso können weitere Effekte wie Betriebs- oder Wurfeffekt für eine Stratifikationskorrektur einbezogen werden (Tabelle 19). Unter Berücksichtigung des Rasseeffektes ( $i=1, \dots, 6$ ) wird der Inflationsfaktor auf 1,117 reduziert, bei Verwendung der einzelnen Familien ( $i=1, \dots, 76$ ) als Effekt minimiert sich der Inflationsfaktor auf 1,031.

**Tabelle 19:** Übersicht der fixen Effekte und deren Einfluss auf die Teststatistik der logistischen Regression und den Inflationsfaktor  $\lambda$ .

<b>nur PDS</b>	<b>Linien</b>	<b>Betrieb</b>	<b>Geburtseingriff</b>
$\lambda=1,313$	$\lambda=1,117$	$\lambda=1,180$	$\lambda=1,220$
			
<b>Wurf</b>	<b>Linien + Betrieb</b>	<b>Linien + Betrieb + Geburtseingriff</b>	<b>Linien + Geburtseingriff</b>
$\lambda=1,306$	$\lambda=1,121$	$\lambda=1,071$	$\lambda=1,068$
			
<b>Familie</b>	<b>Familie + Geburtseingriff</b>	<b>Temperatur</b>	<b>Temperatur + Familie</b>
$\lambda=1,031$	$\lambda=0,988$	$\lambda=1,172$	$\lambda=1,023$
			

#### 4.4.1.3 Hauptkomponentenanalyse

Die Hauptkomponentenanalyse wurde auf Basis der genomischen Verwandtschaftsmatrix der nach Qualitätskontrolle zur Verfügung stehenden 585 genotypisierten Sauen durchgeführt. Für die einzelnen Hauptkomponenten kann der entsprechende Eigenwert angegeben werden. Die Hauptkomponenten werden nach Höhe dieses Wertes sortiert im entsprechenden Scree-Plot abgebildet (Abbildung 14).

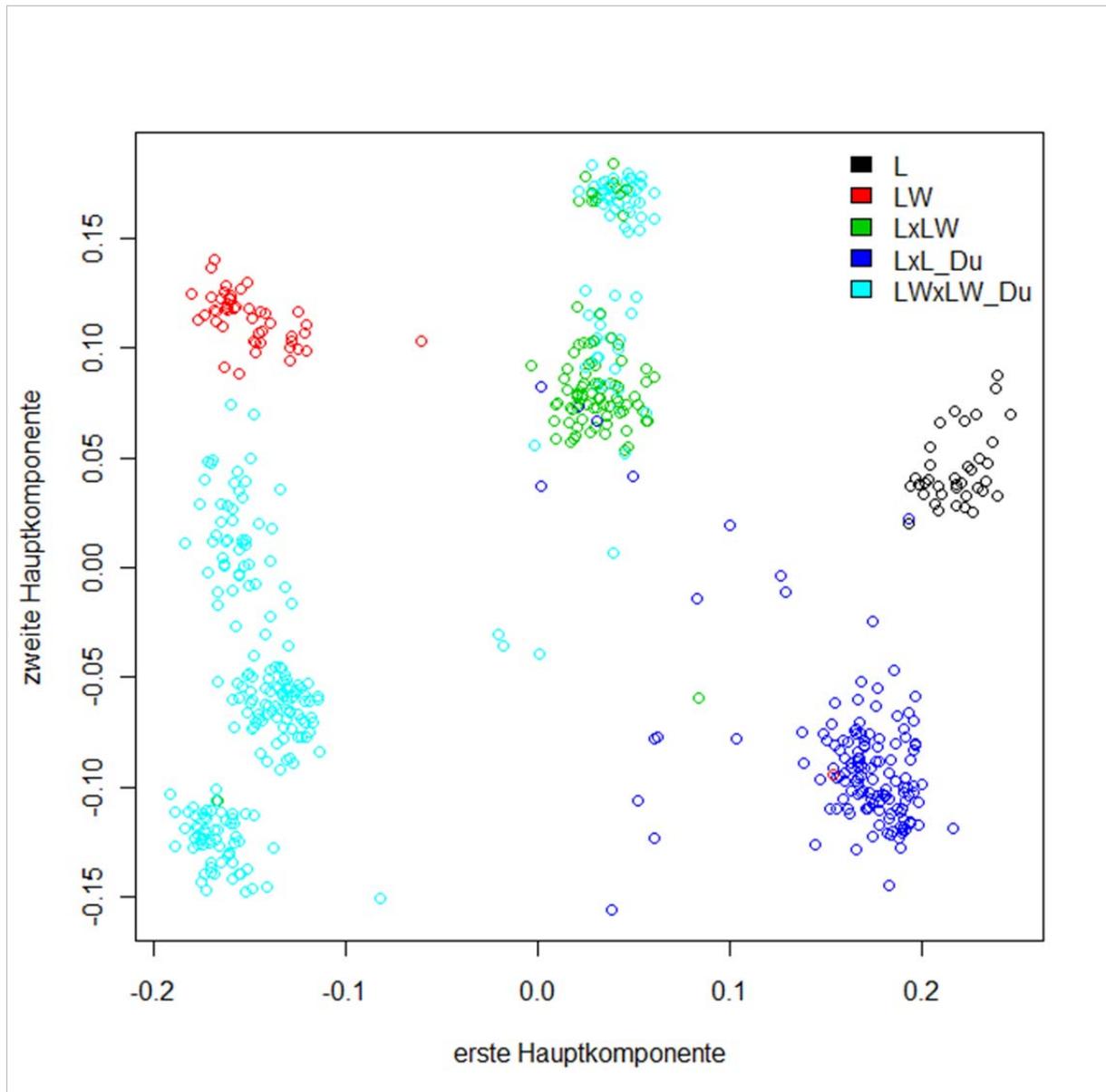


**Abbildung 14:** Scree-Plot der einzelnen Hauptkomponenten sortiert nach der Höhe des jeweiligen Eigenwertes jeder einzelnen Komponente.

Deutlich wird, dass die ersten beiden Hauptkomponenten jeweils mit den Eigenwerten von 11,7 und 5,7 eine große Rolle spielen und jeweils 15,7% bzw. 7,6% der gesamten Varianz erklären.

Im entsprechenden Plot dieser beiden ersten Hauptkomponenten gegeneinander lässt sich eine deutliche Clusterbildung der Sauen erkennen (Abbildung 15). Die entsprechenden Cluster gehen dabei auf die jeweilige Linienzugehörigkeit zurück und können farbcodiert wie in der

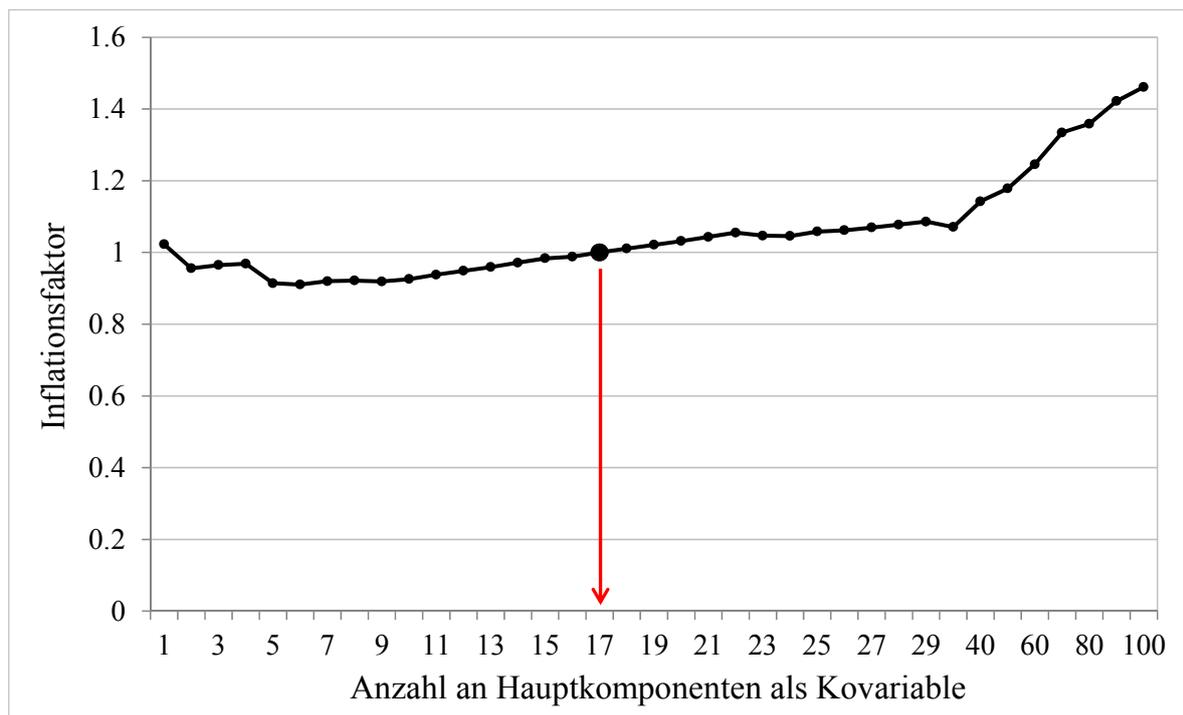
entsprechenden Abbildung dargestellt werden. Während die erste Hauptkomponente vor allem die genomische Distanz zwischen den Hauptlinien Landrasse (L) und Large White (LW) widerspiegelt, stellt die zweite Hauptkomponente die Distanz zwischen den Reinzuchtlinien und den Kreuzungslinien insbesondere mit Duroc-Anteil dar.



**Abbildung 15:** Plot der ersten und zweiten Hauptkomponente: Die einzelnen Kreise repräsentieren jeweils die genotypisierten Sauen, die sich entsprechend der genomischen Verwandtschaftsmatrix clustern. Die Linien sind jeweils farbcodiert angegeben (schwarz-Landrasse, rot-Large White, grün-LxLW, blau-LxL\_Du, türkis-LWxLW\_Du).

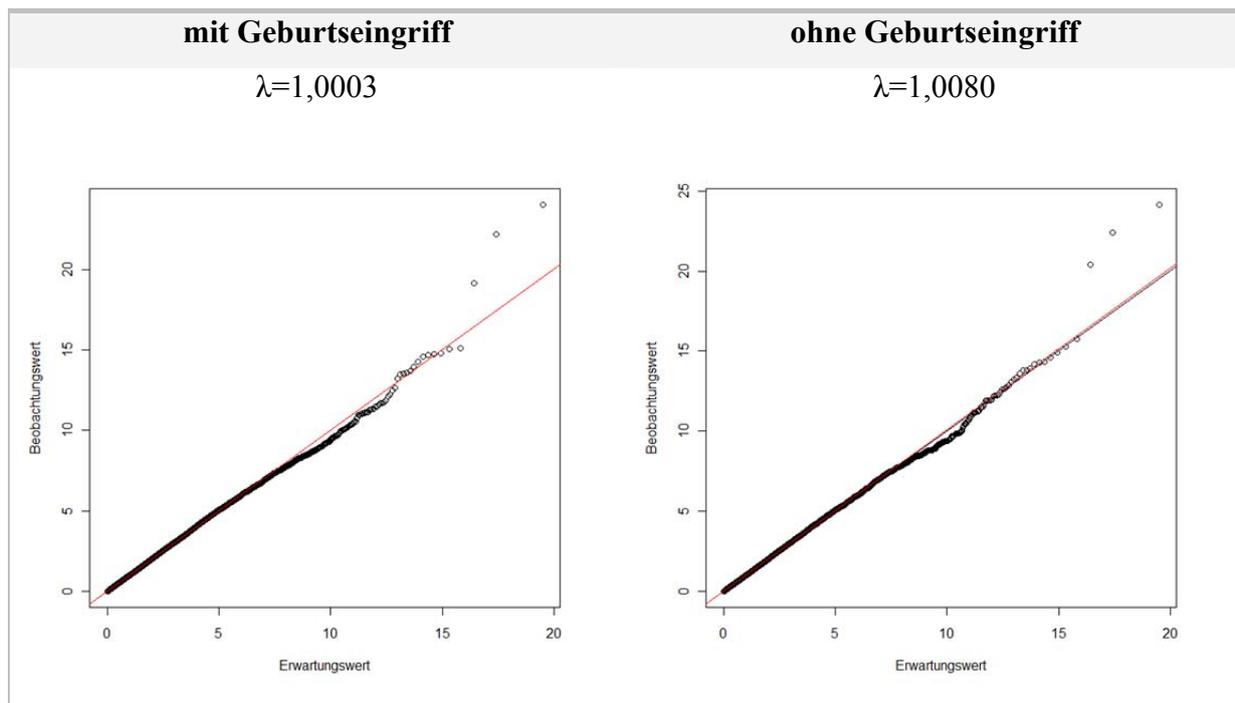
#### 4.4.1.4 Einfluss der Anzahl an Hauptkomponenten

Die Anzahl der Hauptkomponenten, die für die Korrektur verwendet werden, beeinflusst vergleichbar mit den fixen Effekten die Teststatistik (Abbildung 16). Um korrekte Ergebnisse zu erzielen, ist daher eine genaue Begründung für die gewählte Anzahl unabdingbar. Als Auswahlkriterium wurde das Kaiserkriterium angewandt, sodass die ersten 17 Hauptkomponenten ausgewählt werden. Anhand Abbildung 16 wird deutlich, dass unter Verwendung dieser 17 Hauptkomponenten der Inflationsfaktor am ehesten 1,0 erreicht.



**Abbildung 16:** Einfluss der Anzahl an Hauptkomponenten auf den Inflationsfaktor  $\lambda$ .

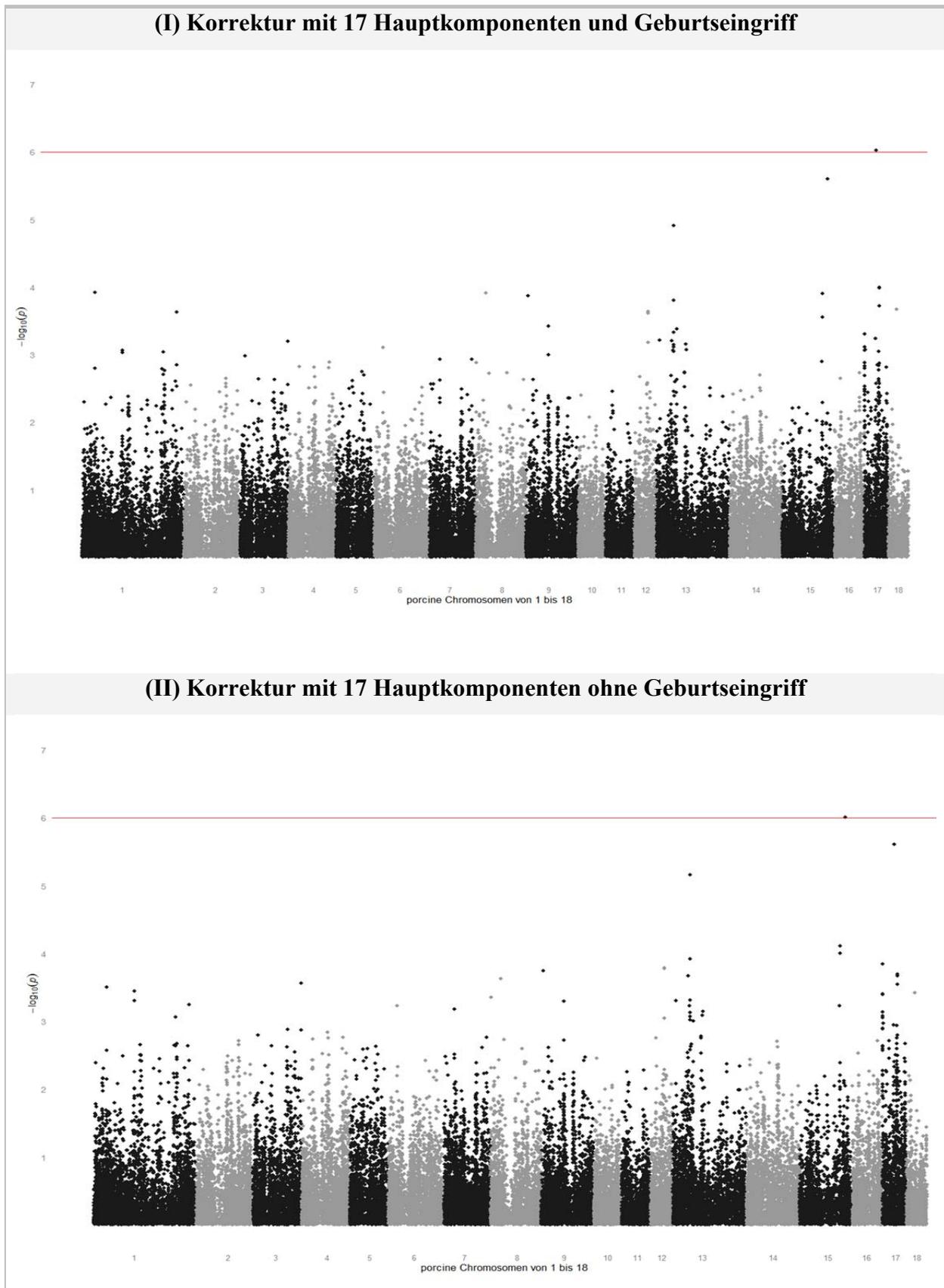
Wird der Geburtseingriff als zusätzliche Kovariate zu den 17 Hauptkomponenten zur Korrektur des Phänotyps PDS verwendet, beträgt  $\lambda=1,0003$ . Ohne Berücksichtigung des Geburtseingriffs ist  $\lambda$  minimal erhöht auf 1,0080. Die  $\chi^2$ - $\chi^2$ -Plots sind in Abbildung 17 vergleichend dargestellt.



**Abbildung 17:** Darstellung des  $\chi^2$  -  $\chi^2$ -Plots der Teststatistik mit (linke Abbildung) und ohne (rechte Abbildung) Berücksichtigung des Geburtseingriffs als zusätzliche Kovariate neben den verwendeten ersten 17 Hauptkomponenten.

#### 4.4.1.5 Ergebnisse der genomweiten Assoziationsstudie

Die Ergebnisse der genomweiten Assoziation für alle Rassen unter Nutzung der 17 Hauptkomponenten und der Korrektur mit oder ohne Geburtseingriff sind für das Merkmal PDS als Manhattanplot in Abbildung 18 dargestellt.



**Abbildung 18:** Manhattanplot zur Darstellung der Ergebnisse der genomweiten Assoziationsstudie für das Merkmal PDS. Der p-Wert wird als negativ dekadischer

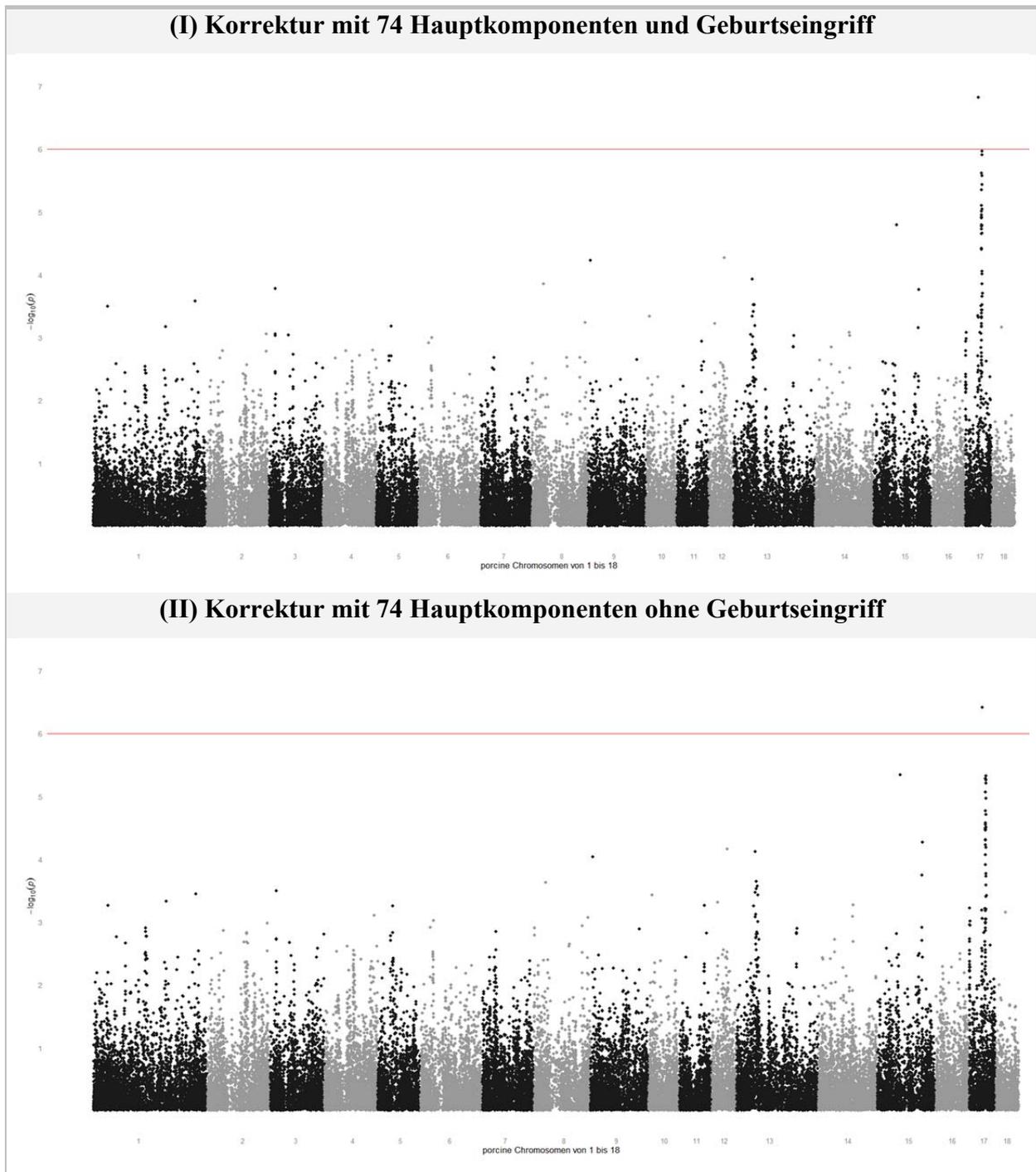
Logarithmus angegeben, die Linie kennzeichnet die Bonferroni-korrigierte Signifikanzgrenze ( $p < 1 \times 10^{-6}$ ).

Unter Anwendung der sehr strikten Bonferroni-Korrektur wird bei (I) (Abbildung 18) nur ein einzelner genomweit signifikanter SNP ALGA0094182 auf Chromosom (SSC) 17 lokalisiert, und bei (II) wird der einzelne SNP INRA0058958 auf SSC15 genomweit signifikant. Dieser SNP ist aber nicht mit Sicherheit annotiert und wird bis jetzt nur unter Vorbehalt auf SSC15 lokalisiert. Eine mit PDS moderat signifikant assoziierte chromosomale Region wird auf SSC13 offensichtlich. Weitere einzeln assoziierte SNPs sind auf SSC1, SSC4, SSC9, SSC12 erkennbar. Es wird deutlich, dass ALGA0094182, INRA0058958 und ASGA0057450 über alle Methoden hinweg zu den signifikantesten Assoziationen zählen (Tabelle 20).

**Tabelle 20:** Auswahl der assoziierten SNPs mit genomweiter und moderater Signifikanz unter Angabe der p-Werte der entsprechenden Assoziationstests (chi-Quadrat, Armitage-Trend-test (egscore) mit bzw. ohne Geburtseingriff (gebeing) als Kovariate und unter Korrektur mit 17 Hauptkomponenten). Die Chromosomenlokalisierung ist in Basenpaaren (bp) auf den jeweiligen porcinen Chromosomen (SSC) nach Illumina bei SNP INRA0058958 bzw. nach GROENEN (2012) angegeben.

SNP	SSC	bp	p-Wert chi- Quadrat	p-Wert egscore (gebeing + 17 Hauptkomponenten)	p-Wert egscore (17 Hauptkomponenten)
<b>INRA0058958</b>	(15)	(131'684'198)	$1,72 \times 10^{-5}$	$2,51 \times 10^{-6}$	<b><math>9,78 \times 10^{-7}</math></b>
<b>ASGA0057450</b>	13	48'771'191	$1,41 \times 10^{-5}$	$1,23 \times 10^{-5}$	<b><math>6,89 \times 10^{-6}</math></b>
<b>ALGA0094182</b>	17	33'423'003	$2,93 \times 10^{-5}$	<b><math>9,48 \times 10^{-7}</math></b>	$2,45 \times 10^{-6}$
ASGA0070346	15	117'040'683	$3,81 \times 10^{-4}$	$2,77 \times 10^{-4}$	$7,66 \times 10^{-5}$
ALGA0069927	13	48'797'943	0,01996	$1,57 \times 10^{-4}$	$1,19 \times 10^{-4}$
ALGA0025824	4	75'272'674	$3,00 \times 10^{-5}$	0,0021	0,0017

Werden vergleichsweise die 74 Hauptkomponenten zur Korrektur genutzt, kommt es zur deutlichen Assoziation auf dem porcinen Chromosom 17 mit wiederum ALGA0094182 als dem signifikantesten SNP (Abbildung 19). Schwach signifikant zeigten sich in diesem Fall die Region auf SSC13 und SSC15.



**Abbildung 19:** Manhattanplot zur Darstellung der Ergebnisse der genomweiten Assoziationsstudie für das Merkmal PDS bei Berücksichtigung von 74 Hauptkomponenten. Der p-Wert wird als negativ dekadischer Logarithmus angegeben, die Linie kennzeichnet die Bonferroni-korrigierte Signifikanzgrenze ( $p < 1 \times 10^{-6}$ ).

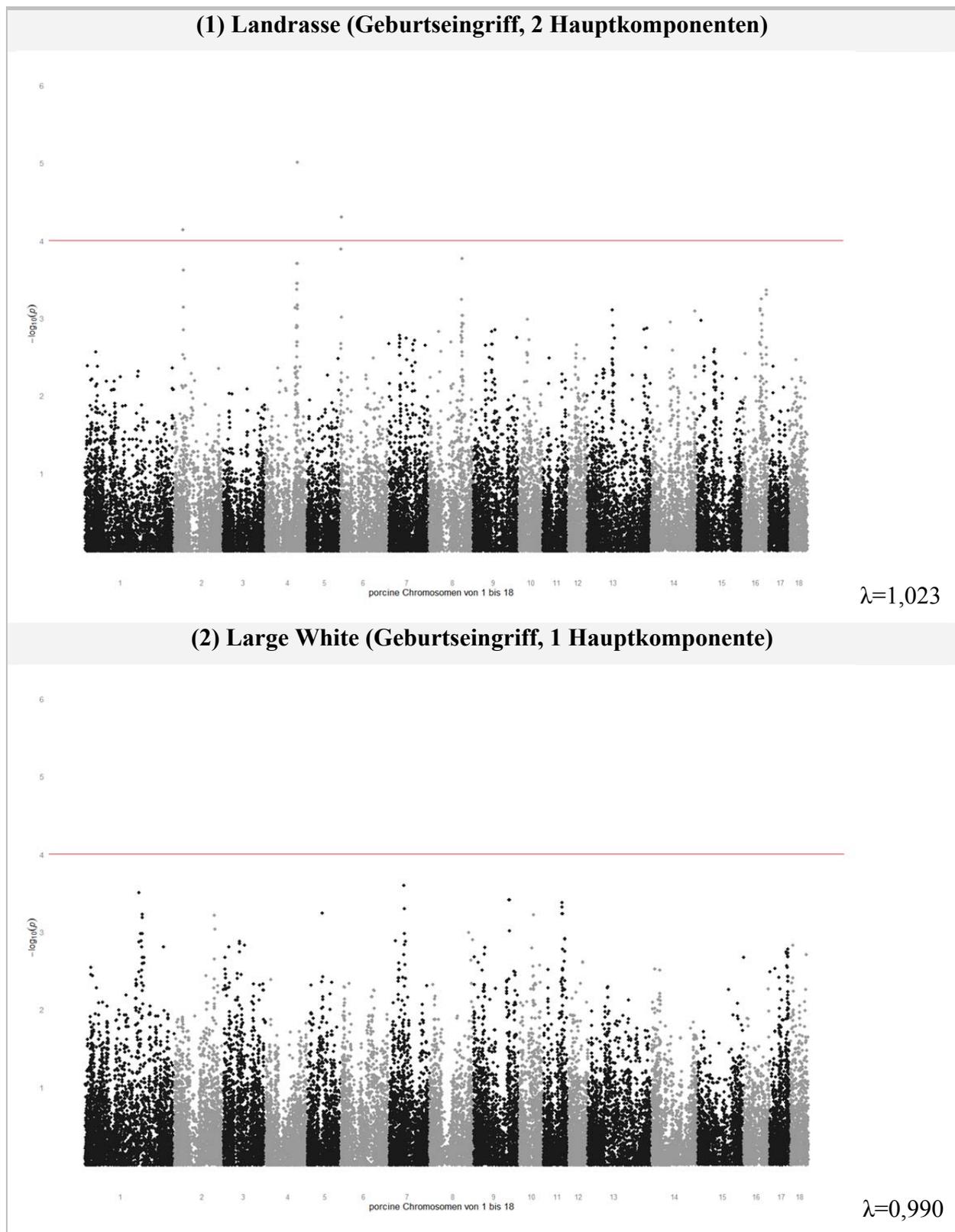
#### **4.4.2 Pathogen-spezifische Resistenz**

Hinsichtlich der Auswertung zur pathogen-spezifischen Resistenz wurden keine neuen signifikanten Assoziationen gefunden. Lediglich die gefundenen Assoziationen auf SSC13, SSC15 und SSC17 wurden bestätigt.

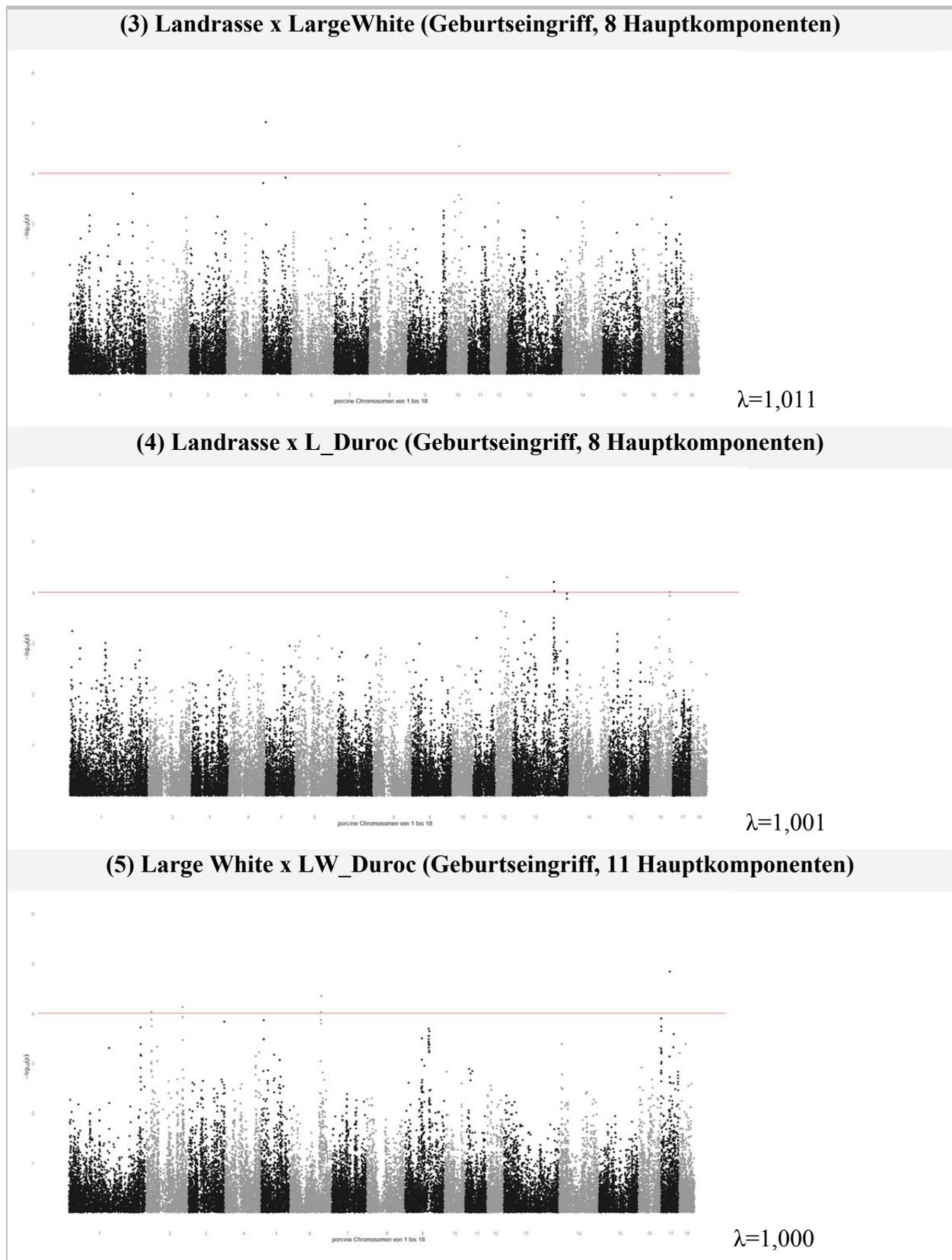
#### **4.4.3 Linienspezifische Auswertung**

Es wurden signifikante Allelfrequenzunterschiede zwischen den Linien festgestellt. Es ist denkbar, dass es nur in einer bestimmten Linie zur Assoziation mit dem Merkmal PDS kommt, die nicht über alle Linien hinweg detektiert werden kann. Daher wurden auch genomweite Assoziationsstudien innerhalb einer Linie durchgeführt. Unter Annahme einer Bonferroni-korrigierten Signifikanzgrenze wurden aber genomweit keine signifikanten Assoziationen detektiert. Nur unter Annahme einer moderaten Signifikanzgrenze von  $p < 0,0001$  wurden bei den Reinzuchtsauen der Landrasse signifikant assoziierte chromosomale Bereiche auf SSC2, SSC4 und SSC6 deutlich (Abbildung 20).

Innerhalb der Kreuzungssauen wurden bei der Kreuzung L\_LW moderat signifikant assoziierte Bereiche auf SSC5 und SSC10, bei der Kreuzung L\_Du moderat signifikante Bereiche auf SSC12, SSC13 und SSC16, und bei der Kreuzung LW\_Du auf SSC2, SSC6 und SSC17 gefunden (Abbildung 21).



**Abbildung 20:** Manhattanplot zur Darstellung der Ergebnisse der GWA-Analyse innerhalb der einzelnen Reinzuchtsauen der Linie Landrasse und LargeWhite für das Merkmal PDS. Der p-Wert wird als negativ dekadischer Logarithmus angegeben, die Linie kennzeichnet die angenommene Signifikanzgrenze ( $p < 1 \times 10^{-4}$ ).



**Abbildung 21:** Manhattanplot zur Darstellung der Ergebnisse der GWA-Analyse innerhalb der einzelnen Kreuzungslinien für das Merkmal PDS. Der p-Wert wird als negativ dekadischer Logarithmus angegeben, die Linie kennzeichnet die angenommene Signifikanzgrenze ( $p < 1 \times 10^{-4}$ ).

#### 4.4.4 Lokalisierte Regionen im Detail

Die folgenden genomischen Regionen sind für eine weitere bioinformatische und funktionelle Auswertung ausgewählt worden (Tabelle 21).

**Tabelle 21:** Übersicht der ausgewählten SNPs und der chromosomalen Lokalisation (Chromosom, genaue Lokalisation in bp) nach Sscrofa7, Sscrofa9, Sscrofa10 und Sscrofa10.2.

SNP	Illumina- Position Chromosom e build 7 = Scrofa7	Sscrofa9 ( <a href="http://www.ensembl.org">www.ensembl.org</a> ) ENSEMBL release 59, November 2010 * <sup>1</sup>	Sscrofa10 neu ( <a href="http://www.animalgenome.org">www.animalgenome.org</a> ) * <sup>2</sup>	Sscrofa10.2 ( <a href="http://www.ensembl.org">www.ensembl.org</a> ) ENSEMBL release 67, Mai 2012
ASGA0057450	SSC13 30,973,030	SSC13 38,585,736 38,585,856	SSC13 to 48,771,131 to 48,771,251	SSC13 50,206,691
INRA0058958	SSC15 131,684,198	--	--	--
ALGA0094182	SSC17 26,439,736	SSC17 30,112,511 30,112,631	SSC17 to 33,422,943 33,423,063	SSC17 to 32,884,855

\*<sup>1</sup> Die DNA-Sequenz stammt von der Assembly, welche vom Wellcome Trust Sanger Institut als Sscrofa5 im Januar 2008 veröffentlicht wurde ([http://www.sanger.ac.uk/Projects/S\\_scrofa](http://www.sanger.ac.uk/Projects/S_scrofa)).

\*<sup>2</sup> Datenbank: Sscrofa10\_all.fa; veröffentlicht am 24. September 2010; **BLASTN 2.2.23**

Während sich bei den SNPs ASGA0057450 und ALGA0094182 lediglich die genaue Positionsangabe in Basenpaaren (bp) ändert, kann der SNP INRA0058958 nach den neuesten Sequenzierungsergebnissen des Genoms keiner sicheren Position zugeordnet werden. Lediglich die Lokalisierung auf einem nicht annotierbaren DNA-Stück mit der Bezeichnung Scaffold JH118531.1: 6,457-115,137 ist bekannt ([www.ensembl.org](http://www.ensembl.org), ENSEMBL release 67, Mai 2012, Zugriff am 21.05.2012).

#### 4.4.4.1 Chromosom 13 (SSC13)

Auf SSC13 wurde über alle Rassen hinweg ein moderat genomweit signifikanter chromosomaler Bereich um ASGA0057450 (rs81445278, dbSNP136) lokalisiert. Die Allelfrequenz des selteneren Allels A ist nahezu über alle Linien hinweg vergleichbar, jeweils mit der höchsten Allelfrequenz von 0,39 bei der Landrasse. Tendenziell zeigten über alle Rassen hinweg Sauen mit dem häufigeren Allel C in der homozygoten Form eine Anfälligkeit für PDS. Linienspezifisch betrachtet, ist dieser Zusammenhang aber nur innerhalb der Kreuzungslinien L x L\_Duroc bzw. LW x LW\_Duroc signifikant (Tabelle 22).

**Tabelle 22:** Genotypenverteilung in den jeweiligen Rassen für den SNP „ASGA0057450“ (n=594, SNP\_call=0.995): Absolute Verteilung der Tiere auf die entsprechenden Genotypen AA, AC bzw. CC. Die Allelfrequenz des selteneren Allels (MAF) und der p-Wert (Fisher-Exakt-Test) sind linienspezifisch angegeben.

ASGA0057450 (SSC13)	MAF		AA	AC	CC	p-Wert (Fisher-Exakt- Test)
Landrasse	0,3947	PDS+	3	8	11	0,1567
		PDS-	3	10	3	
Large White	0,283	PDS+	1	15	15	0,2767
		PDS-	3	7	12	
L x LW	0,2802	PDS+	1	17	28	0,06863
		PDS-	4	24	17	
L x L_Du	0,2	PDS+	0	18	50	0,005566
		PDS-	2	34	36	
LW x LW_Du	0,2007	PDS+	3	42	105	0,01552
		PDS-	11	38	70	
Sonstige	-	PDS+	0	1	1	1
		PDS-	0	1	0	
insgesamt (n=594)		PDS+	8	101	210	4,59 x 10 <sup>-5</sup>
		PDS-	23	114	138	

Der SNP ASGA0057450 ist dabei im Intronbereich innerhalb des Gens PRICKLE2 (ENSSSCG00000011495) gelegen. In diesem Chromosomenbereich sind des Weiteren

diverse reproduktionsspezifische QTLs beschrieben, u.a. sowohl ein QTL für nicht funktionsfähige Zitzen („Nonfunctional nipples QTL 7479“) als auch QTLs für die Anzahl der Gelbkörper bzw. das Eintrittsalter in die Pubertät (BIDANEL et al., 2008; JONAS et al., 2008).

#### 4.4.4.2 Chromosom 15 (SSC15)

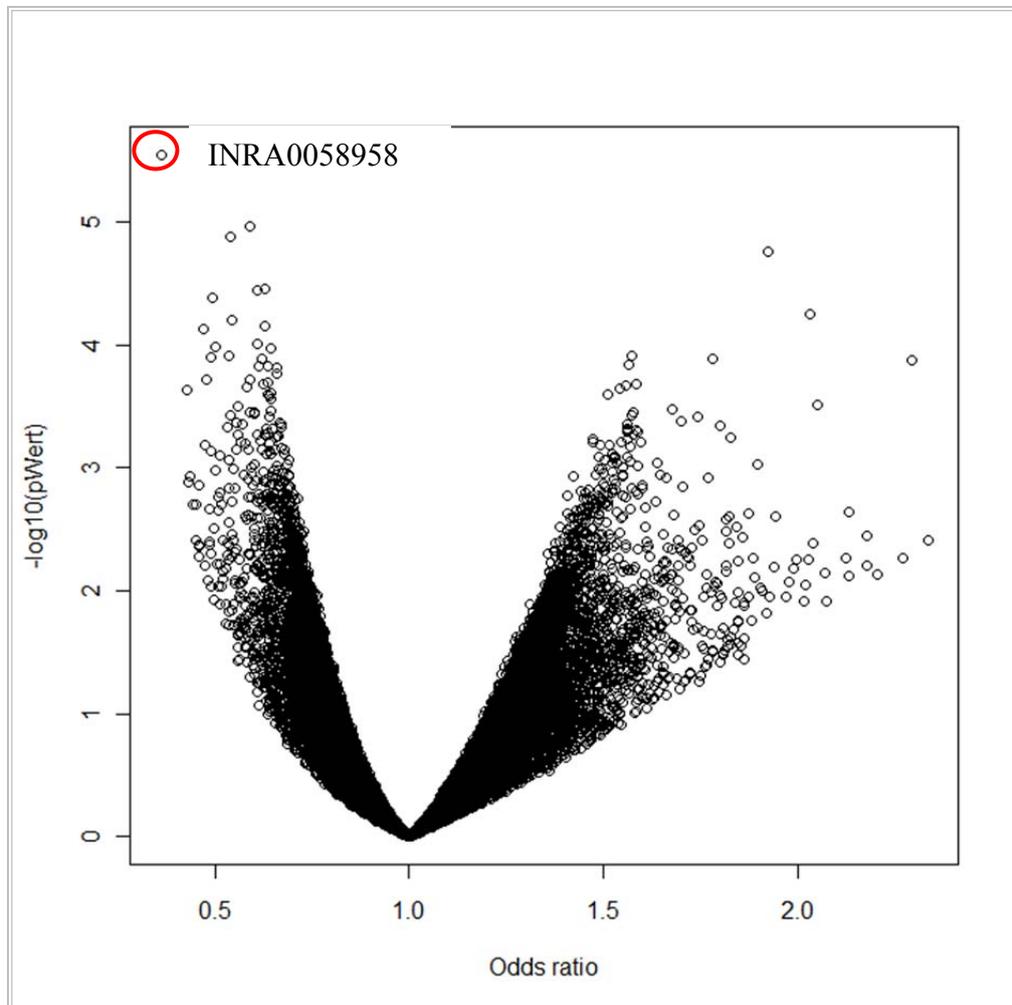
Der SNP INRA0058958 ist über alle Rassen hinweg mit dem Merkmal PDS assoziiert, deutlich signifikant vor allem innerhalb der Kreuzungslinien LxLW und LxL\_DU (Tabelle 23).

**Tabelle 23:** Genotypenverteilung in den jeweiligen Rassen für den SNP „INRA0058958“ (n=595, SNP\_call=0.997): Absolute Verteilung der Tiere auf die entsprechenden Genotypen AA, AC bzw. CC. Die Allelfrequenz des selteneren Allels (MAF) und der p-Wert sind rassespezifisch angegeben.

INRA0058958	MAF		AA	AC	CC	p-Wert (Fisher- Exakt-Test)
Landrasse	0,1184	PDS+	0	4	18	0,4497
		PDS-	0	5	11	
Large White	0,0278	PDS+	0	1	32	0,553
		PDS-	0	2	19	
L x LW	0,1044	PDS+	0	3	43	0,005043
		PDS-	2	12	31	
L x L_Du	0,1929	PDS+	1	16	51	0,02575
		PDS-	3	30	39	
LW x LW_Du	0,0242	PDS+	0	4	146	0,08546
		PDS-	0	9	110	
Sonstige	-	PDS+	0	1	1	1
		PDS-	0	1	0	
insgesamt (n=595)		PDS+	1	29	291	5,546 x 10 <sup>-6</sup>
		PDS-	5	59	210	

Die besondere Bedeutung dieses SNPs ist nicht nur bedingt durch den signifikanten p-Wert: Auch auf Grund des Chancenverhältnisses (OR) von 0,3 hat dieser SNP und die entsprechende Genomregion einen bedeutenden Einfluss auf PDS. So erhöht sich das Risiko

an PDS zu erkranken um das Dreifache, wenn Sauen Träger des Allels A sind. In der grafischen Darstellung der jeweiligen ORs und der dazugehörigen p-Werte von den analysierten SNPs (Vulkanplot) ist erkennbar, dass INRA0058958 den sowohl kleinsten p-Wert als auch das kleinste Odds Ratio besitzt (Abbildung 22).



**Abbildung 22:** Vulkanplot zur Darstellung des p-Wertes als negativ dekadischer Logarithmus und das entsprechende Odds ratio (OR) für die jeweiligen analysierten SNPs. Rot markiert ist der SNP INRA0058958 (OR=0,3, p-Wert= $5,5 \times 10^{-6}$ ).

Nach dem Chromosomenbild 7 (Sscrofa7) ist dieser SNP auf SSC15 lokalisiert. Unter Annahme der ungefähren Position nach Chromosomenbild Sscrofa7 befindet sich dieser SNP u.a. in einer QTL-Region für die Höhe der Körpertemperatur beim Schwein (REINER et al., 2007). Weitere QTLs in dieser Region sind sowohl ein QTL für nicht funktionsfähige Zitzen („Nonfunctional nipples QTL 7468“) (JONAS et al., 2008), QTLs für die Anzahl der Gelbkörper (RATHJE et al., 1997; ROHRER et al., 1999; WILKIE et al., 1999) als auch ein QTL für die Trächtigkeitsdauer (WILKIE et al., 1999). Nach den neuen Ergebnissen des Chromosomenbilds 10 (Sscrofa10.2) ist dieser allerdings nicht sicher annotierbar, d.h. die

genaue Lokalisation im Schweinegenom muss durch weitere Sequenzier- und Nachfolgearbeiten kontrolliert werden. Die Lokalisation auf dem nicht annotierbaren DNA-Stück (=Contig) wird als Scaffold JH118531.1:6,457-112,137 angegeben (www.ensembl.org). Anhand der Sequenzabgleiche mit anderen Spezies ist aber eine Identifikation des Gens Neuropilin-2 (NRP2, ENSSSCG00000026383) möglich.

#### 4.4.4.3 Chromosom 17 (SSC17)

Genomweit signifikante SNPs wurden auf SSC17 identifiziert, mit ALGA0094182 als chromosomweit signifikanteste assoziierte Variante (Tabelle 24).

**Tabelle 24:** Genotypenverteilung in den jeweiligen Rassen für den SNP „ALGA0094182“ (n=596, SNP\_call=0.998): Absolute Verteilung der Tiere auf die entsprechenden Genotypen AA, AG bzw. GG. Die Allelfrequenz des selteneren Allels (MAF) und der p-Wert (Fisher-Exakt-Test) sind linienspezifisch angegeben.

ALGA0094182 (SSC17)	MAF		AA	AG	GG	p-Wert (Fisher- Exakt-Test)
Landrasse	0,2632	PDS+	1	7	14	0,4901
		PDS-	3	5	8	
Large White	0,1818	PDS+	1	8	24	0,1438
		PDS-	0	10	12	
L x LW	0,4066	PDS+	6	20	20	0,2953
		PDS-	11	20	14	
L x L_Du	0,3607	PDS+	7	31	30	0,5383
		PDS-	12	32	28	
LW x LW_Du	0,4591	PDS+	15	89	46	$7,811 \times 10^{-5}$
		PDS-	37	54	28	
Sonstige	-	PDS+	0	1	1	1
		PDS-	0	0	1	
insgesamt (n=596)		PDS+	30	156	135	$2,331 \times 10^{-5}$
		PDS-	63	121	91	

Die benachbarten SNPs (ALGA0094184, INRA0053407) zeigen moderat signifikante Assoziationen. Der SNP ALGA0094182 liegt dabei nicht innerhalb eines Gens (intergenic). Im Bereich von 10 Mbp um ALGA0094182 sind bislang nicht näher beschriebene proteincodierende Gene bekannt. In der benachbarten Region von 30 Mbp bis 35 Mbp sind aber verschiedene bekannte Gene u.a. OXT gelegen. Im direkten Bereich von ALGA0094182 sind des Weiteren ein QTL für die Haptoglobin-Konzentration (WIMMERS et al., 2009), ein QTL für die Anzahl der Zitzen (GUO et al., 2008) und ein QTL für das Level von Interferon  $\gamma$  (UDDIN et al., 2010) annotiert. Auch QTLs für die Hämoglobin-Konzentration (CHO et al., 2011) oder die durchschnittliche Rückenspeckdicke (TRIBOUT et al., 2008) sind unter anderem in dem Bereich um ALGA0094182 kartiert.

#### **4.4.4.5 Weitere Chromosomenregionen**

Moderat signifikant mit PDS assoziiert sind unter anderem auch SNPs auf SSC1, SSC4, SSC9, SSC12 und SSC18.

Eine Besonderheit sind die rassespezifisch mehr oder weniger signifikant mit PDS assoziierten SNPs. Im Vergleich zu den vorher aufgeführten signifikanten SNPs auf SSC13, 15 und 17 ist zum Beispiel der SNP ALGA0027303 nur innerhalb der Landrasse signifikant mit PDS assoziiert (Tabelle 25). Über alle Rassen hinweg getestet, ist dieser SNP nicht signifikant. Dies liegt u.a. auch an der signifikant unterschiedlichen Allelfrequenz zwischen den einzelnen Rassen. Während bei der Landrasse Adenin (A) das seltenere Allel mit einer Allelfrequenz von 0,2237 ist, ist im Gegensatz dazu das Allel Cytosin (C) das seltenere Allel bei Sauen der Linie Large White und dessen Kreuzungstieren (LxLW und LWxLW\_Du).

**Tabelle 25:** Genotypenverteilung in den jeweiligen Rassen für den SNP „ALGA0027303“ (n=596, SNP\_call = 0.998): Absolute Verteilung der Tiere auf die entsprechenden Genotypen AA, AC bzw. CC. Die Allelfrequenz des Allels A und der p-Wert (Fisher-Exakt-Test) sind linienspezifisch angegeben.

ALGA0027303 (SSC4)	MAF		AA	AC	CC	p (Fisher- Exakt-Test)
Landrasse	0,2237	PDS+	0	3	19	5,106 x 10 <sup>-5</sup>
		PDS-	1	12	3	
Large White	0,9455	PDS+	28	4	1	0,1969
		PDS-	22	0	0	
L x LW	0,5440	PDS+	7	38	1	0,525
		PDS-	3	41	1	
L x L_Du	0,4179	PDS+	8	44	16	0,4049
		PDS-	9	39	24	
LW x LW_Du	0,7714	PDS+	93	56	1	0,01895
		PDS-	55	63	1	
Sonstige	-	PDS+	0	1	1	1
		PDS-	0	0	1	
insgesamt (n=596)		PDS+	136	146	39	0,0258
		PDS-	90	155	30	

## 4.5 Kandidatengene

### 4.5.1 Positionelle Kandidatengene

Auf SSC17 ist bislang in dem direkten Bereich des signifikanten SNPs kein Gen beim Schwein bekannt. Gene in der Nähe dieses SNPs sind u.a. verschiedene nicht näher beschriebene proteincodierende Gene (novel protein coding). Entsprechend der gefundenen moderaten Assoziation auf SSC13 um den SNP ASGA0057450 wurde PRICKLE2 als positionelles Kandidatengene detektiert. Der signifikante SNP INRA0058958 (SSC15 bzw. Scaffold JH118531.1) liegt positionell innerhalb eines Introns im Neuropilin-2-Gen (NRP2).

### 4.5.2 Funktionelle Kandidatengene

Funktionelle Kandidatengene und deren bis dato bekannte genomische Lokalisation wurden mit den Ergebnissen der GWA-Studie abgeglichen (Tabelle 26).

**Tabelle 26:** Übersicht der funktionellen Kandidaten zu dem Merkmalskomplex PDS.

Kandidatengen		SSC	Map-Position	signifikante SNPs
spezifische Resistenz gegenüber <i>Escherichia coli</i>				
Fucosyltransferase	FUT1 (ENSSSCG00000003141)	<b>6</b>	37,631,354- 37,632,621	--
Transmembranes Mucin	MUC13 (ENSSSCG00000011862)	<b>13</b>	101,834,422- 101,856,869	<b>ASGA0057450</b>
allgemeine Resistenz – Pathomechanismus				
Toll-like-Rezeptor 4	TLR4 (ENSSSCG00000005503)	<b>1</b>	271,621,935- 271,631,702	--
Gesäuge/Fruchtbarkeit				
Oxytocin	OXT (ENSSSCG00000007164)	<b>17</b>	34,178,421- 34,179,296	<b>ALGA0094182</b>
Gonadotropin-Releasing Hormon 2	GNRH2 (ENSSSCG00000007159)	<b>17</b>	34,047,064- 34,206,128	<b>ALGA0094182</b>
Prolaktin	PRL (ENSSSCG00000001082)	<b>7</b>	18,161,987- 18,174,367	--
Prolaktinrezeptor	PRLR (ENSSSCG00000016830)	<b>16</b>	18,175,457- 18,194,122	--
Retinol-binding protein 4	RBP4 (ENSSSCG00000010479)	<b>14</b>	110,302,357- 110,309,289	--
Sonstiges				
Ryanodinrezeptor 1	RYR1 (ENSSSCG00000002964)	<b>6</b>	32,706,687- 32,735,141	--
solute carrier family 11	NRAMP1 (ENSSSCG00000016190) synonyme: SLC11A1	<b>15</b>	113,574,179- 113,574,788	(INRA0058958)

Eine positionelle Nähe zu den einzelnen signifikanten SNPs wurde unter anderem für die Gene MUC13, OXT und GNRH2 gefunden. Eine funktionelle Bedeutung kann nicht ausgeschlossen werden, ist jedoch eher unwahrscheinlich, da die entsprechenden SNPs um den jeweiligen signifikanten SNP nur schwach korrelierten und nur schwache bis gar keine Signifikanz im Zusammenhang mit PDS zeigten.

## 5 Diskussion

### 5.1 Phänotypisierung

Das Ziel dieser Arbeit war die Aufklärung der genetischen Variation des postpartalen Dysgalaktie-Syndroms bei Sauen mittels einer genomweiten Assoziationsstudie. Hierfür wurden zunächst über zwei Jahre phänotypisch relevante Daten zu PDS-erkrankten und gesunden Sauen auf vergleichbaren Betrieben der PIC Deutschland GmbH erhoben. Die genaue und möglichst eindeutige Phänotypisierung ist unabdingbar für eine biologisch sinnvolle statistische Auswertung der genomweiten DNA-Variationen. Unpräzise Phänotypisierung und fragliche Kontrollgruppen erschweren es, wahr-positiv assoziierte Varianten zu entdecken. Dank der Doppel- bzw. Mehrfachbeprobungen wurde der Phänotyp der jeweiligen Sau präzisiert und die Abhängigkeit und der Einfluss von Umweltfaktoren minimiert. Verschiedene klinische Symptome und Ausprägungen werden aber bei Mehrfachbeprobungen über mehrere Würfe beschrieben (RINGARP, 1960; SCHNELL et al., 1977). Daher muss kritisch angemerkt werden, dass eine Sau, die ein- oder mehrmals nach der Geburt keine auffälligen Symptome für PDS gezeigt hat, nicht unbedingt einer genetisch PDS-resistenten Sau entspricht, da andere Einflüsse wie sehr gute Hygienemaßnahmen und optimale Geburtsbedingungen dem Entstehen des multifaktoriellen Krankheitsbildes PDS entgegenwirken können.

Differentialdiagnostisch sollten auch andere Ursachen für eine Hypogalaktie und der damit verbundenen Mangelernährung der Saugferkel ausgeschlossen werden. Dazu gehören Gesäuge- und Zitzenanomalitäten sowie Zitzenverletzungen aus vorherigen Würfen, Hypokalzämien oder auch Vergiftungen durch Mykotoxine, die die Prolaktinausschüttung senken (KLOPFENSTEIN et al., 2006; MARTINEAU et al., 2012). Postpartales Fieber sollte ebenfalls zur physiologischen peripartalen Hyperthermie bei Sauen soweit wie möglich abgegrenzt werden (KLOPFENSTEIN et al., 2006). In der klinischen Untersuchung im Rahmen der betrieblichen Kontrolle von den Betriebstierärzten bzw. Betriebsleitern wurden daher neben der Temperatur vor allem das Gesäuge und das Allgemeinbefinden sowie Verhalten der Sau bzw. der Ferkel beurteilt. Dadurch sollte eine Abgrenzung zur peripartalen Hyperthermie und anderen differentialdiagnostisch bedeutsamen Erkrankungen ermöglicht werden. Da es sich aber trotzdem um eine subjektive Beurteilung der Klinik durch einzelne Personen handelt, kann nicht mit an Sicherheit grenzender Wahrscheinlichkeit davon ausgegangen

werden, dass jede als PDS-positiv beprobte Sau tatsächlich PDS aufwies. Desgleichen ist anzunehmen, dass einzelne Sauen mit eher subklinischem Krankheitsverlauf möglicherweise nicht detektiert wurden. Die Bedeutung der subklinischen Mastitis ist bislang bei der Sau nur ansatzweise untersucht worden. So zeigten sich auch in normal laktierenden, klinisch unauffälligen Sauen deutliche pathologische Hinweise auf das Vorliegen einer Mastitis (NACHREINER&GINTHER, 1971; NACHREINER et al., 1971). Auch die physiologisch höhere Zellzahl beim Schwein kann als reaktiver Mechanismus in der porcinen Milchdrüse gewertet werden. In einer experimentellen Untersuchung nach Inokulation mit *Escherichia coli* in das Gesäuge bei zwölf Schweinen zeigten sich deutliche individuelle Unterschiede in der klinischen Ausprägung trotz gleicher Infektionsdosis (ÖSTERLUNDH et al., 2002; ZHU et al., 2007a). Während acht Sauen keine klinischen Veränderungen aufwiesen, äußerten sich bei den anderen vier Sauen in unterschiedlicher Ausprägung die entsprechenden Symptome (ÖSTERLUNDH et al., 2002). Die tierindividuelle Empfänglichkeit für experimentell induzierte puerperale Mastitis durch intramammäre Inokulation von *Escherichia coli* bzw. *Klebsiella pneumoniae* wurde auch in Studien aus der Schweiz beobachtet (LOEPFE, 1993; MOSSI, 1995). Die klinische Diagnose ist daher insbesondere bei milden Symptomen (u.a. leichte Körpertemperaturerhöhung) schwierig (BERTSCHINGER, 1984). Weitere zusätzliche Parameter wie beispielsweise Akut-Phase-Proteine weisen eine sehr große tierindividuell bedingte Streuung auf und können geburtsbedingt erhöht sein (DUNKELBERG, 2006; MIRKO&BILKEI, 2004; VAN GELDER&BILKEI, 2005; ZHU et al., 2004). Als optimale Entzündungsmarker werden Interleukin-1 $\beta$  und Tumornekrosefaktor-alpha empfohlen (ZHU et al., 2007b).

Die statistische Auswertung der phänotypischen Daten ergab einen signifikanten Zusammenhang zwischen dem Auftreten von PDS und der Durchführung eines Geburtseingriffes. Dieser Zusammenhang wurde auch von mehreren Autoren beobachtet und verschieden diskutiert (BERG et al., 2001; BOSTEDT et al., 1998; ELZE, 1985; SCHULZ et al., 1983). Bislang ist nicht bekannt, ob PDS als Folge des Geburtseingriffes und etwaiger puerperaler Endometritis zu werten ist, oder ob schlechthin notwendige Geburtshilfe und Geburtsverzögerungen zusätzliche Krankheitsmerkmale für PDS-anfällige Sauen darstellen.

## 5.2 Heritabilität

Die mittels eines Schwellenwertmodells geschätzte Heritabilität von 9% zeigt, dass diese Erkrankung gering erblich bedingt und eine züchterische Bearbeitung möglich ist. Dieser Wert weist aber auch darauf hin, dass trotz aller genetischer Prädisposition oder Resistenz die Umwelt mit verschiedenen auslösenden, verstärkenden oder hemmenden Faktoren von großer Bedeutung ist. Durch eine kombinierte Bearbeitung unter Berücksichtigung der Genetik sowie der Haltungs-, Fütterungs- und Hygienebedingungen in Schweinehaltungen kann PDS bekämpft werden. Im Hinblick auf die genetische Prädisposition ist im weiteren Blickwinkel nicht nur das Krankheitsbild PDS zu betrachten, sondern auch damit vergesellschaftete Merkmale, die als bedeutende Einfluss- und/oder Risikofaktoren bekannt sind. Dazu gehören die verlängerte Trächtigkeitsdauer, die verzögerte und in die Länge gezogene Geburtsdauer und der damit im Zusammenhang stehende Geburtseingriff. Es kann hypothetisiert werden, dass gerade Sauen mit genetischer Prädisposition für PDS für diese anderen Risikofaktoren ebenfalls genetisch veranlagt sind.

## 5.3 Genotypisierung

Genotypisierungsfehler wurden mittels Qualitätskontrolle und Abstammungskontrollen nachgeprüft. Es konnten verlässliche Ergebnisse erzielt werden. Unter Anwendung ausgewählter Qualitätskriterien wurden mit 49.740 SNPs mehr als 80% der SNPs für die statistische Auswertung eingeschlossen.

Die Genotypisierung unter Nutzung des porcinen SNP60 BeadChips von Illumina bietet eine gute Möglichkeit für die genomweite Charakterisierung von Schweinen. Einschränkend sind die ca. 6% der bislang noch nicht sicher annotierten SNPs zu erwähnen, die eine weitere Analyse hinsichtlich Kandidatengen und biologischer Auswertung erschweren. Im Vergleich zu anderen BeadChips der Tierarten wie dem Rind, Pferd oder Schaf wurde der PorcineSNP60 BeadChip schon lange vor der Fertigstellung der Genomsequenzierung des Schweines veröffentlicht und dem Markt zugänglich gemacht. Daher sind vergleichsweise wenig referenzierte SNPs wie zum Beispiel aus der SNP-Datenbank dbSNP verwendet worden. Dieser Umstand kann dazu führen, dass mitunter gefundene Assoziationen zu einzelnen SNPs nur bedingt aussagefähig sind, da die genomische Annotation dieses SNPs nicht sicher bekannt ist. Inwieweit in Zukunft diesen SNPs eine genaue Position zugeordnet werden kann, ist von weiteren Sequenzierungs- und Typisierungsarbeiten abhängig.

## 5.4 Genomweite Assoziation

Genomweite Assoziationsstudien sind seit der Möglichkeit der Hochdurchsatz-Genotypisierung ein neues Forschungsfeld in der Human- und in der Tiermedizin. Diese Studien bieten neue Möglichkeiten, genetische Variationen eines Phänotyps aufzudecken und diese nicht nur in der Zucht zu nutzen, sondern auch für die Erweiterung der Kenntnisse hinsichtlich möglicher Pathomechanismen und der Pathophysiologie bestimmter Krankheiten anzuwenden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mithilfe einer GWA-Studie die genetische Variation des postpartalen Dysgalaktie-Syndroms bei Sauen untersucht. Mindestens drei mit PDS assoziierte Genomregionen auf SSC13, SSC15 und SSC17 wurden identifiziert, die vielversprechend und in weiteren Nachfolge- und Bestätigungsstudien zu kontrollieren sind. Die moderat bis tendenziell signifikant assoziierten Bereiche auf SSC1, SSC4, SSC9, SSC12 und SSC18 sind in nachfolgenden Studien zu überprüfen.

Die Assoziationen auf SSC13 (ASGA0057450), SSC15 (INRA0058958) und SSC17 (ALGA0094182) wurden über alle Linien hinweg gefunden. In den assoziierten Genombereichen um ASGA0057450, INRA0058958 und ALGA0094182 sind neben den entsprechenden Kandidatengenen wie PRICKLE2 (SSC13) und NRP2 (Scaffold JH118531.1) auch zahlreiche QTL beschrieben. Hinweisend sind vor allem die reproduktionsspezifischen QTL für die Anzahl der Gelbkörper (RATHJE et al., 1997; ROHRER et al., 1999; WILKIE et al., 1999) und das Eintrittsalter in die Pubertät (BIDANEL et al., 2008). Die gefundene Assoziation zu einem QTL für die Trächtigkeitsdauer (WILKIE et al., 1999) unterstreicht die beschriebene Auswirkung einer verlängerten Trächtigkeitsdauer auf das erhöhte Risiko, danach an PDS zu erkranken (AWAD MASALMEH et al., 1990; RINGARP, 1960). Weitere QTL in Bezug zum Gesäuge wie der QTL für die Anzahl der Zitzen (GUO et al., 2008) oder der QTL für die Anzahl nicht funktionsfähiger Zitzen (JONAS et al., 2008) betonen die Bedeutung der Gesäugeanatomie und -funktionalität für das Auftreten von Dysgalaktie. Die Assoziation zu Mediatoren innerhalb der Entzündungskaskade wie dem QTL für Haptoglobin-Konzentration (WIMMERS et al., 2009) oder dem QTL für das Level von Interferon  $\gamma$  (UDDIN et al., 2010) bestärken den Entzündungscharakter von PDS. Allerdings wurde ein Anstieg der Konzentration von dem Akut-Phase-Protein Haptoglobin sowohl von DUNKELBERG (2006) als auch von ZHU et al. (2004) generell bei der Sau post partum nur als unspezifisch beobachtet.

Ein weiterer Locus in der assoziierten Region auf SSC15 ist ein QTL für die Höhe der Körpertemperatur beim Schwein (REINER et al., 2007). Die erhöhte Rektaltemperatur ist bislang immer noch aus praktischen Gründen ein wesentliches Kriterium, um nach der Abferkelung die an PDS erkrankten Sauen frühzeitig zu detektieren. In der vorliegenden Studie wurde als diagnostische Temperaturgrenze 39,5°C gewählt. Eine tendenziell erhöhte Körpertemperatur post partum ist allerdings insbesondere bei Jungsauen beschrieben (KLOPFENSTEIN et al., 2006). In der vorliegenden Arbeit wurden ebenfalls signifikante Unterschiede in der rektalen Körpertemperatur zwischen gesunden Jung- und Altsauen (alle Sauen ab dem 2. Wurf) festgestellt. Es kann daher vermutet werden, dass Jungsauen bei ihrem ersten Wurf während der Geburt erhöhtem Stress ausgesetzt sind und dadurch tendenziell die Körpertemperatur in Form einer leichten Hyperthermie ansteigt. Dies scheint aber dennoch von einer klinischen Fiebersymptomatik abgrenzbar zu sein. So waren die Temperaturen im Mittel signifikant verschieden zwischen erkrankten und gesunden Sauen. Bei den an PDS erkrankten Sauen war kein signifikanter Unterschied in der Höhe der Rektaltemperatur zwischen Jung- und Altsau feststellbar. Insofern ist die Höhe der Rektaltemperatur im puerperalen Zeitraum ein gutes Maß für die erste Diagnostik von PDS. Bedeutender scheint, dass insbesondere aber in Einzelfällen auch Tiere ohne erhöhte Körpertemperatur Anzeichen für eine klinische Mastitis zeigen können. So hatten im Rahmen dieser Studie 289 PDS-auffällige Sauen keine Temperaturerhöhung über 39,5°C. Dies deckt sich mit der Erhebung von RINGARP (1960), bei der insgesamt 11,9% der Sauen mit Agalaktie eine Körpertemperatur unter 39,3°C aufwiesen. Jedoch wurde u.a. von ROSS et al. (1983) gezeigt, dass die klinischen Zeichen und damit auch die Höhe der Rektaltemperatur nicht unbedingt mit der pathologisch-anatomischen Schädigung zum Beispiel einer Mastitis korreliert.

Unter Berücksichtigung der Befunde der bakteriologischen Untersuchung der Milchproben wurden keine signifikanten Genombereiche lokalisiert. Ob dies ein Hinweis auf die auch von anderen Autoren beschriebene untergeordnete Bedeutung der Bakterien in der Milch in der Pathogenese von PDS ist, kann nur spekuliert werden. Fakt ist, dass in den Ergebnissen der bakteriologischen Untersuchung der Milchproben keine signifikanten Unterschiede im Bakterienspektrum zwischen kranken oder gesunden Sauen zu erkennen war (GERJETS, 2011). Dies kann verschiedene Ursachen haben und würde sich dementsprechend in deren Konsequenz auf die Ergebnisinterpretation der genetischen Untersuchung auswirken. Zum einen könnte es sich bei den Bakterienprofilen um Kontaminationen der Milchproben handeln. Dies würde zeigen, dass die Sauen bakteriologisch betrachtet jeweils den gleichen Umweltbedingungen ausgesetzt waren. Um eine Kontamination auszuschließen, wäre ein

Indikatorkeim optimal, der eine zweifelsfreie Einteilung in kontaminierte und nicht-kontaminierte Proben zuließe. Unter der Annahme, dass es sich um weitestgehend kontaminationsfreie Milchproben handelt, könnten die bakteriologischen Ergebnisse darauf hinweisen, dass gesunde Sauen die gleichen Bakterien in der Milch enthalten, diese aber auf Grund besserer Abwehr- oder Resistenzmechanismen keine Entzündung der Milchdrüse hervorrufen. Die Wahrscheinlichkeit, eine genetische Variation zu finden, die mit der komplexen und multifaktoriellen Erkrankung im statistischen und kausalen Zusammenhang steht, wäre in diesem Fall realistisch und machbar. Die ähnlichen bakteriologischen Profile in der Milch könnten aber auch ein Hinweis sein, dass die als ‚gesunde‘ bzw. PDS-negativ beprobte Sau subklinisch an Mastitis erkrankt ist. Würde letzteres stimmen, ist es sehr schwer möglich, eine genetische Variation zu entdecken, da es sich eigentlich um erkrankte Sauen handelt. Lediglich der Score, wie oft und intensiv eine Sau an PDS erkrankt, kann dann für eine genomweite Analyse verwendet werden. Dies hätte zur Konsequenz, dass eine genauere klinische Untersuchung unter Zuhilfenahme weiterer Parameter wie quantitative Keimbestimmung und Messung von Entzündungsparametern notwendig wäre, um eine Diagnose bzw. eine genaue Phänotypisierung für genetische Untersuchungen zu ermöglichen. Bei der GWA-Analyse innerhalb der einzelnen Rassen wurden bislang keine genomweit signifikant mit PDS assoziierten Regionen lokalisiert. Lediglich innerhalb der Landrasse wurde eine moderat signifikante Region auf SSC4 um den SNP ALGA0027303 identifiziert. Für eine abschließende Bewertung der rassespezifischen GWA-Analyse sind die Tierzahlen innerhalb der einzelnen Rassen, und damit die eigentliche Power der Analyse, allerdings noch nicht ausreichend. Die Auswertung für die einzelnen Rassen sollte daher im Rahmen der folgenden Untersuchungen und Wiederholungsstudien noch weiter im Detail durchgeführt werden.

Die erstrangige Information der signifikanten SNPs ist die genomische Lokalisation auf dem Schweinegenom. Von 48.193 der 62.163 SNPs (77,5%) ist von Illumina die genaue Annotierung auf Sscrofa7 angegeben, d.h. das Chromosom und die Kartierungsinformation (Map-Position) in bp liegen vor. Nach der Annotierung von Martien Groenen (2012) auf Sscrofa10 sind 57.532 von 62.163 SNPs (92,6%) mit der Angabe einer genauen Map-Position verfügbar. Anhand des Beispiels von SNP ALGA0094182 zeigt sich, dass sich die Map-Position auf SSC17 von 26.439.736 Mbp (Sscrofa7) über 30.112.511- 30.112.631 Mbp (Sscrofa9) bis schließlich 33.423.003 Mbp (Sscrofa10) bzw. 32.884.855 Mbp (Sscrofa10.2) ändert. Eine endgültige Kartierung ist daher wünschenswert, um auch mit Sicherheit entsprechende Kandidatengene bzw. QTLs zu identifizieren.

Die genaue Phänotypisierung ist schließlich der wichtigste Diskussionspunkt, der falsch-negative als auch falsch-positive Ergebnisse bedingen kann. Daher wurden nach bestem Wissen möglichst nur aussagekräftige und verlässlich phänotypisierte Sauen für die Genotypisierung ausgewählt. Doch trotz genauer Phänotypisierung wird das Auffinden von kausalen genetischen Variationen durch weitere folgende Phänomene erschwert:

<b>Phänotypische (Pleiotropie):</b>	<b>Heterogenität</b>	Ein und dieselbe Mutation oder eine Zustandsform eines Gens oder Locus verursacht verschiedene Symptome oder beeinflusst biologisch unterschiedliche Merkmale.
<b>Genetische Heterogenität:</b>		Verschiedene Allele eines Genortes (Locus) oder verschiedene Zustandsformen eines Gens verursachen eine Erkrankung.
<b>Penetranz:</b>		Die Wahrscheinlichkeit oder das Risiko zu erkranken wird nur unter Bedingung eines bestimmten Faktors eintreten. Beispiele dafür sind die altersabhängige oder geschlechtsabhängige Penetranz.
<b>Unterschiedliche Expressivität:</b>		Während Penetranz die Wahrscheinlichkeit ausdrückt, dass die Krankheit ausbricht, beschreibt die variable Expressivität die verschiedenen möglichen Grade des Krankheitsausbruches von milden zu schweren Symptomen.
<b>Phänokopien:</b>		Tiere sind betroffen oder zeigen Klinik der Erkrankung ohne Träger des krankheitsverursachenden Gens oder Genotyps zu sein.

Prinzipiell gibt es eine Vielzahl an möglichen statistischen Tests, um eine Assoziation zwischen einem Genotyp und einem Phänotyp wie z.B. PDS festzustellen. Dabei ist zu beachten, dass die Wahl des Tests und die Wahl der verwendeten Kovariaten in Form von fixen Effekten oder als Kovariablen einen bedeutenden Einfluss auf das Ergebnis und vor allem auf das Signifikanzniveau haben kann. Im Rahmen dieser Arbeit wurden vergleichsweise die verschiedenen Methoden aufgezeigt. Für zukünftige genomweite Assoziationsstudien und für die Bewertung dieser Studien ist die sorgfältige Betrachtung der

Tests und deren Teststatistik in Verbindung mit dem jeweiligen Ergebnis zu beachten. Mitunter sind noch weitere statistische Methoden wie z.B. gemischte Modelle auf Grundlage der genomischen oder der Pedigree-basierten Verwandtschaftsmatrix verfügbar. Für familienbasierte Fall-Kontroll-Assoziationsstudien sind aber statistische Tests wie der Armitage-Trend-Test in Verbindung mit einer Hauptkomponentenanalyse bei bekannten Familien- bzw. Verwandtschaftsverhältnissen empfehlenswert.

Die Hauptkomponentenanalyse wurde in dieser Studie auf Basis der genomischen Verwandtschaftsmatrix angewandt, um zum einen die genetische Ähnlichkeit der genotypisierten Tiere abzubilden und zu überprüfen. Zum anderen wurden die daraus ermittelten Hauptkomponenten für eine Korrektur der Verwandtschaft verwendet. Etwaige Linien- und Familienunterschiede werden damit genauer berücksichtigt, als das mit der Verwendung der Pedigree- oder Vorab-Rasse-Information als Kovariable möglich ist.

Der außerordentlich strikte Studienaufbau einer genetischen Fall-Kontrollstudie auf Basis von Halbgeschwisterfamilien vermindert das Risiko von falschen Assoziationen. Dennoch sind falsch-negative und falsch-positive Ergebnisse zu beachten. Der Gefahr der falsch-positiven Ergebnisse wurde weitestgehend mittels der Korrektur der Populationsstratifikation bedacht, aber auch durch die Verwendung der Bonferroni-Korrektur zur Berücksichtigung des multiplen Testens. Auch das Studiendesign einer familienbasierten und bezogen auf Umweltfaktoren vergleichbaren Fall-Kontroll-Studie verringert die Wahrscheinlichkeit des Auftretens von falsch-positiven Ergebnissen. Nachteil ist, dass damit auch zu einem gewissen Grad die eigentliche Power der Studie vermindert wurde (siehe Tabelle 4). Um dennoch das Auftreten falsch-negativer Ergebnisse weitestgehend einzugrenzen, wurden verschiedene Qualitätskriterien und statistische Methoden verwendet und miteinander verglichen. Hinter den bei einzelnen Tests nur moderat signifikanten assoziierten SNPs auf SSC1, SSC4, SSC9, SSC12 oder SSC18 können sowohl wichtige kausal im Zusammenhang stehende Bereiche, aber auch rein zufallsbedingte Verteilungen stehen. Bedingt durch das familienbasierte Studiendesign und die begrenzte Tierzahl ist aber anzunehmen, dass falsch-negative Ergebnisse möglich sind, d.h. es wurden zu gewisser Wahrscheinlichkeit nicht alle im Hinblick auf PDS relevanten SNPs als signifikant detektiert.

Eine Unterscheidung, ob eine Erkrankung oder die Prädisposition zu einer Erkrankung monogen, oligogen oder sogar polygen vererbt wird, ist nicht ohne weiteres realisierbar. Dennoch sind die Ergebnisse dieser Studie ein Beweis, dass mit an Sicherheit grenzender Wahrscheinlichkeit kein einzelnes Gen existiert, welches das Auftreten von PDS verhindert oder initiiert. Mithilfe der genomweiten Assoziationsstudie ließen sich keine eindeutigen

hochsignifikant assoziierten SNPs detektieren, wie es bei monogen verursachten Erkrankungen der Fall sein würde. Das als PDS oder als PDS-Syndrom bekannte multifaktorielle postpartale Krankheitsbild mit Mastitis, Dysgalaktie, Fieber und/oder Endometritis wird auf Grund des bislang nicht vollkommen gesicherten Pathomechanismus noch immer als „Syndrom“ bezeichnet („Mastitis-Metritis-Agalaktie-Syndrom“, „Postpartales Dysgalaktie-Syndrom“). Es ist anzunehmen, dass komplexe Krankheitsbilder wie PDS generell nicht monogen verursachte Erkrankungen sind. Da es sich bei PDS daher eher um eine oligo- oder polygene Erkrankung handelt, sind die Interaktionen zwischen den einzelnen Genombereichen bzw. Genen von besonderem Interesse (CHEN et al., 2008; WANG et al., 2010). Daher sind auch das Zusammenspiel oder die Wechselwirkungen zwischen den assoziierten Varianten oder Genen von großem Interesse. Unter Annahme eines additiven Modells ist der Gesamteffekt die Summe aus allen Einzeleffekten der Loci. Bei einem multiplikativen Modell ist jeweils der krankheitsauslösende Genotyp an allen entsprechenden Genorten notwendig für die Merkmalsausprägung. In dieser Studie wurden insbesondere ein moderat signifikanter und zwei signifikant mit PDS assoziierte Genombereiche gefunden, die die Empfänglichkeit für PDS erhöhen bzw. erniedrigen. Die in dieser ersten GWA-Studie veröffentlichten Resultate können daher die Grundlage für weiterführende Untersuchungen bilden.

## 5.5 Kandidatengene

Die Suche nach positionellen Kandidatengenem gestaltete sich auf Grund der verschiedenen Annotierungen der SNPs und der erst Ende 2010 vom Konsortium (SGSC) fertiggestellten und vorläufig veröffentlichten Genomsequenzierung schwierig. Dennoch konnten vielversprechende Kandidatengene in den assoziierten Bereichen gefunden werden.

Entsprechend der drei genomweit signifikanten Chromosomenregionen wurden die Kandidatengene PRICKLE2 und NRP2 als positionelle Kandidatengene für PDS festgestellt. Das Kandidatengen PRICKLE2 (ENSSSCG00000011495) gehört zu den Prickle-Genen, die erstmals bei der Obstfliege *Drosophila melanogaster* beschrieben wurden (GUBB&GARCIABELLIDO, 1982). Die Bedeutung dieser Prickle-Gene wurde zunächst vor allem für die Ausrichtung bzw. Polarität der Flügel bei der Fliege gesehen (GUBB&GARCIABELLIDO, 1982). Die später erkannte biologische Bedeutung von PRICKLE2 ist unter anderem in der planaren Zellpolarität (LAWRENCE et al., 2007), als Mediator im WNT-Signaltransduktionsweg (KATOH&KATOH, 2007) als auch in Bezug zu neuronalem Wachstum zu finden (OKUDA et al., 2007). So konnte die Expression von PRICKLE1 und PRICKLE2 in postmitotischen Neuronen bei Mäusen nachgewiesen werden und PRICKLE2 scheint dabei eine besondere Rolle in der Förderung des Wachstums der Neuriten zu besitzen (OKUDA et al., 2007). Das Gen PRICKLE2 wird in zahlreichen Organen und Geweben exprimiert. Es wurde u.a. auch innerhalb des weiblichen Reproduktionstraktes eine Expression in den Ovarien, im Eileiter und im Uterus ermittelt ([http://www.nextprot.org/db/entry/NX\\_Q7Z3G6/expression#a-ts-line-438](http://www.nextprot.org/db/entry/NX_Q7Z3G6/expression#a-ts-line-438), Zugriff am 11.06.2012). Ein Zusammenhang mit PDS, Laktationsleistung oder Fruchtbarkeit ist bislang nicht beschrieben.

Das Kandidatengen NRP2 gehört zu den Neuropilin-Genen, deren Expression vor allem im zentralen Nervensystem beschrieben ist (CARIBONI et al., 2007; HE&TESSIERLAVIGNE, 1997). Neuere Untersuchungen zeigen aber auch Expressionen in anderen Geweben wie u.a. in Endothel-, Epithel- und Tumorzellen (BAGNARD et al., 1998; NASARRE et al., 2009). Die Neuropiline sind in den Axonen von Nervenzellen zu finden und liefern dort Signale für deren Wegfindung (=‘axon guidance‘) und Wachstumsrichtung (CHEN et al., 1997; HE&TESSIERLAVIGNE, 1997; NEUFELD et al., 2002a). In Endothelzellen wirken Neuropiline als Rezeptorkomplexe mit dem Rezeptor des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors (VEGF = vascular endothelial growth factor) und unterstützen dadurch die proangiogene Wirkung von VEGF (NEUFELD et al., 2002a; NEUFELD et al., 2002b). Ein Zusammenhang von

NRP2 mit Unfruchtbarkeit und gestörter Reproduktion wurde aktuell von CARIBONI et al. (2011) postuliert. In dieser in-vitro- und in-vivo-Studie am Mausmodell kam es durch einen Mangel von NRP2 zur gestörten Einwanderung der Gonadotropin-Releasing-Hormon-produzierenden Zellen (CARIBONI et al., 2011; CARIBONI et al., 2007). Die in der Humanmedizin als Kallmann-Syndrom bezeichnete Form des hypogonadotropen Hypogonadismus führt unter anderem zu einem Wegfall bzw. zu einer Verzögerung des Pubertätseintritts beim Menschen (CARIBONI et al., 2011). Inwieweit NRP2 auch eine funktionelle Rolle in der neuronalen Steuerung der Fruchtbarkeit und insbesondere der Geburt bzw. der Laktation bei der Sau spielt, kann aber schlussendlich nur im Rahmen von funktionellen Untersuchungen geklärt werden.

Weitere der ausgewählten funktionellen Kandidatengenene ergaben keine genomweit signifikanten Assoziationen mit dem Merkmal PDS. Das alpha(1,2)-Fucosyltransferase-Gen (FUT1) auf SSC6 oder das Prolaktin- bzw. Prolaktinrezeptor-Gen auf SSC16 scheinen nach den Ergebnissen dieser Studie nicht im Zusammenhang mit PDS zu stehen. Allerdings wurden sowohl in der Nähe zu dem Gen MUC13 (SSC13) als auch zu dem Gen NRAMP1 (SSC15, nach Annotierung Sscrofa7) oder OXT (SSC17) signifikant assoziierte SNPs detektiert. Zwar stehen die benachbarten SNPs nur im vergleichsweise schwachen Kopplungsungleichgewicht und ein Zusammenhang erscheint daher eher unwahrscheinlich, jedoch kann bedingt durch die geringe SNP-Dichte ein Zusammenhang auch nicht völlig ausgeschlossen werden.

Insbesondere die Assoziation zum Gen OXT (SSC17) scheint vor dem Hintergrund interessant, dass Oxytocin eine wichtige Funktion im Ablauf der Geburt und in der Milchejektion spielt. Oxytocin ist ein Nonapeptid, welches in neurosekretorischen Neuronen, dem Nucleus paraventricularis und Nucleus supraopticus des vorderen Hypothalamus gebildet wird (WIESNER UND RIBBECK, 2000). An Neurophysin I gebunden gelangt dieses Hormon auf axonalem Weg zur Neurohypophyse und wird dort zwischengespeichert. Die Sekretion von Oxytocin erfolgt periodisch und eine Inaktivierung durch Aminopeptidasen und Oxidoreduktasen geschieht in den verschiedensten Organen (WIESNER UND RIBBECK, 2000). Die Hauptfunktionen von Oxytocin sind im Rahmen der Geburt und Milchabgabe zu finden. In der Humanmedizin wird diesem Hormon auch eine wichtige Rolle in sozialen Interaktionen zwischen Geschlechtspartnern und der emotionalen Bindung und Verhalten zwischen Mutter und Kind zugeschrieben (ODENT, 1999). Diese psychologische Wirkung ist bislang bei Sauen und Ferkeln noch nicht untersucht worden. Allerdings ist gerade bei Sauen bekannt, dass diese über einen bislang nicht im Detail bekannten Mechanismus die

Milchejektion bewusst steuern können. Durch mechanische Reizung des weiblichen Genitaltraktes in der Austreibungsphase der Geburt wird Oxytocin freigesetzt und unterstützt die durch Estrogen-gesteuerte spontane Kontraktilität des Myometriums (WIESNER UND RIBBECK, 2000). Die Oxytocin-Freisetzung wird auch durch taktile Reizung von sensiblen Nervenendigungen in der Zitzen spitze stimuliert und ermöglicht durch die Kontraktion der Myoepithelzellen die Milchejektion (WIESNER UND RIBBECK, 2000). Inwieweit die gefundenen Kandidatengene PRICKLE2 und NRP2 in Bezug zu ihrer neuronalen Funktion ebenfalls in Verbindung zu Oxytocin und dessen Funktionsweise bzw. Regelkreis stehen, kann abschließend aber nur in funktionellen Studien beantwortet werden.

Die Frage nach der Ursache für den Zusammenhang zwischen Geburtseingriff und PDS konnte über die genomweite Assoziationsstudie nicht gelöst werden. Zwar scheint insbesondere ohne Berücksichtigung des Geburtseingriffes der SNP INRA00958 signifikanter, jedoch ist dieser Unterschied so gering, dass konkrete Schlussfolgerungen schwer möglich sind. Bisher ist also nicht bekannt, ob PDS als eine Folge von Geburtseingriff zu werten ist, oder ob die notwendige Geburtshilfe und Geburtsverzögerung ein zusätzliches Krankheitsmerkmal für PDS-anfällige Sauen darstellt.

Die Auswertung der GWA-Ergebnisse hinsichtlich möglicher Pathomechanismen bzw. biologischer Netzwerke (CHEN et al., 2008; VISWANATHAN et al., 2008; WANG et al., 2010) ergibt den Schwerpunkt auf neuro-endokrinologische Signalwege im Zusammenhang mit entzündlichen (Haptoglobin, erhöhte Körpertemperatur) und funktionell-anatomischen Merkmalen (Anzahl funktionsfähige Zitzen usw.). Insbesondere die Identifikation von zwei positionellen Kandidatengenen, die sich beide im Bereich der neuronalen Wirkung einordnen lassen, ist hindeutend auf die individuelle Disposition und Empfänglichkeit für PDS in Abhängigkeit von anderen mitbeeinflussenden Risikofaktoren. Hierbei ist der Zusammenhang zwischen dem Immunsystem und dem zentralen Nervensystem als den zwei wichtigsten anpassungsfähigen Systemen des Körpers hervorzuheben, auf verschiedene Einflüsse bzw. Risikofaktoren zu reagieren. Dabei stehen beide Systeme über die verschiedenen Hormonkreisläufe und Entzündungskaskaden in direktem und indirektem Zusammenhang (BORGHETTI et al., 2009). Die gefundenen Assoziationen zu den Kandidatengenen und den verschiedenen QTLs bestätigen diese Verbindung der beiden Systeme auch im Hinblick auf die komplexe puerperale Erkrankung PDS bei Sauen. Die genetische Empfänglichkeit beschreibt daher nicht unbedingt die Ursache, sondern vielmehr die Fähigkeit des Individuums auf bestimmte Noxen wie z.B. Endotoxine oder vermehrten Stress adäquat zu reagieren. Die Ergebnisse dieser Studie bestätigen damit quasi den multifaktoriellen

Charakter des PDS-Syndroms hinsichtlich Ätiologie und Einflussfaktoren. Daher ist zu betonen, dass trotz der Möglichkeit der genetischen Verbesserung im Hinblick auf verminderte Krankheitsanfälligkeit oder Krankheitsresistenz, weiterhin das Hauptaugenmerk auf die Optimierung der Tierumwelt durch bestmögliche Haltung, Fütterung, Hygiene und Betriebsmanagement zu richten ist. Denn nur die Kombination der Berücksichtigung der Genetik und der Umweltfaktoren wird schlussendlich bei einem so komplexen Krankheitsbild wie PDS zum Erfolg führen.

### **5.6 Züchterische Nutzung**

Auf lange Sicht gesehen, sind prophylaktische Maßnahmen (z.B. durch Homöopathika, Diät) und konventionelle Therapie von PDS keine Lösung des Problems und können aufgrund der uneindeutigen Phänotypen zu einem Verbreiten der genetisch empfänglichen Tiere in den Schweinezuchtbeständen führen. Eine züchterische Bearbeitung ist daher wünschenswert und auch praktisch realisierbar. So kann zwar theoretisch allein durch klassische Zucht wie eine strikte Selektion von Sauen ohne Mastitis ein Zuchterfolg erreicht werden, doch ist im Hinblick auf PDS zu bedenken, dass sich die Krankheitsmerkmale auch erst mit der zweiten oder dritten Parität oder nur unter schlechten Umweltbedingungen zeigen. Erschwerend kommt hinzu, dass aus betriebspraktischen Gründen nahezu alle Sauen mit den ersten Anzeichen von Fieber antibiotisch behandelt werden und die klassischen PDS- oder MMA-Fälle in praxi nur noch vereinzelt zu beobachten sind. Dadurch kommt es zur Weiterverwendung von eigentlich PDS-anfälligen Sauen. Aus dem Blickwinkel des Tierschutzes, Umweltschutzes und Verbraucherschutzes ist es aber wünschenswert, die Antibiotikaanwendungen weitgehend zu reduzieren, um Resistenzentwicklungen gegen Antibiotika nicht zu fördern. Dies könnte bestenfalls erreicht werden, wenn nur noch mit PDS-negativen Tieren weitergezüchtet würde. Unter Nutzung neuer Möglichkeiten wie markergestützter Selektion (HAYES&GODDARD, 2003; PIYASATIAN et al., 2009; SCHWERIN, 2004) oder genomischer Selektion (MEUWISSEN et al., 2001) ist auch die Zucht auf solche komplexen Merkmale wie PDS-Resistenz in Verbindung mit anderen Leistungsdaten realisierbar. Die damit schon seit Jahrhunderten erwünschte gleichzeitige Zucht auf sowohl Krankheitsresistenz als auch auf gute Leistungseigenschaften ist damit wieder in den aktuellen Blickpunkt geraten. Während die genomische Selektion im Rahmen der genomischen Zuchtwertschätzung beim Rind schon fortgeschritten und weitverbreitet ist (HAYES et al., 2009), ist diese aber beim Schwein noch in den Anfängen (LOOFT, 2010). Ob

ein züchterischer Erfolg bei Betrachtung der in dieser Studie detektierten SNPs im Sinne einer markergestützten Selektion zu erwarten ist, lässt sich schwer abschätzen. Gewiss ist aber, dass sowohl auf genetischer als auch auf phänotypischer Ebene eine ganzheitliche Betrachtung verschiedenster Merkmale (Leistungsmerkmale, Gesundheitsmerkmale, Reproduktionsleistung) unabdingbar ist für eine langfristig leistungsgerechte Selektion. Sowohl einzelne Gene und Chromosomenbereiche als auch die einzelnen phänotypischen Eigenschaften eines Tieres stellen zusammen eine Art funktionelles Netzwerk dar, dessen einzelne Komponenten sich gegenseitig beeinflussen und in Zusammenhang stehen. Die isolierte Betrachtung und Züchtung auf einzelne Merkmale oder SNPs wird daher nur kurzfristig erfolgreich sein.

Die Ergebnisse der genomweiten Assoziationsstudie sind grundlegend für weitere Folgearbeiten wie zum Beispiel genetische Bestätigungs- und Wiederholungsstudien sowie weiteren funktionellen Studien zum PDS-Syndrom wie u.a. Expressionsanalysen.

So könnten weitere Tiere aus der Gruppe der beprobten Sauen mittels des PorcineSNP60 BeadChip genotypisiert werden, um durch eine größere Tierzahl die entsprechende Power zu erhöhen bzw. die Fehlerrate hinsichtlich falsch-positiver als auch falsch-negativer Ergebnisse zu verringern. Hierbei liegt das Ziel darin, sowohl die gefundenen Assoziationen auf SSC13, SSC15 und SSC17 zu überprüfen, als auch die nur schwach moderat signifikanten Assoziationen ( $p > 0.0001$ ) auf den anderen Chromosomen zu bedenken. Gegebenenfalls ist eine Revision der bis jetzt gefundenen Assoziationen notwendig. Nach einer erfolgten Wiederholungsstudie sollten die gefundenen Assoziationen auch in weiteren Populationen, d.h. in anderen Betrieben, mit anderen Rassen usw., überprüft werden (=Bestätigungsstudie). Hierzu wäre es denkbar, bereits vorliegendes Tiermaterial von schon durchgeführten Untersuchungen hinsichtlich PDS von anderen Instituten oder Schweinezuchtunternehmen zu nutzen, um einen Zeitverzug hinsichtlich aufwendiger Phänotypensammlung zu verhindern.

## 6 Zusammenfassung

Das Postpartale Dysgalaktie Syndrom (PDS) ist eine wichtige Erkrankung der Sau nach der Geburt. Diese Erkrankung ist unter verschiedenen Bezeichnungen weltweit bekannt, wovon der Begriff des Mastitis-Metritis-Agalaktie-Syndroms vor allem in den europäischen Ländern noch immer verbreitet ist. Da sowohl die Gesundheit und das Wohlbefinden der Sau als auch der Ferkel betroffen sind, führt diese Erkrankung zu großen wirtschaftlichen Verlusten. Eine genetische Prädisposition wurde diskutiert, aber nie im Detail untersucht. In dieser Untersuchung wurden insgesamt 1.680 Sauen beprobt und deren 2.001 Würfe post partum klinisch untersucht. Alle Beprobungen fanden von April 2008 bis Juli 2010 in sechs Betrieben der PIC Deutschland GmbH statt. Die Untersuchung erfolgte 12 bis 48 h post partum und Sauen wurden als PDS-positiv definiert, wenn diese eine Rektaltemperatur größer  $39.5^{\circ}\text{C}$  zeigten und/oder klinische Anzeichen einer Mastitis wie Rötung, Schwellung oder Verhärtungen des Gesäuges und/oder Veränderungen im Ferkelverhalten zu beobachten waren. Als Kontrollsauen wurden in der jeweiligen Abferkelwoche klinisch unauffällige Sauen, nach Möglichkeit gesunde Halb- oder Vollgeschwistersauen zu den jeweils PDS-positiv beprobten Sauen, ausgewählt und nach einer klinischen Untersuchung als PDS-negativ beprobt. Als besondere mögliche Einflussfaktoren wurden die Durchführung einer Geburtseinleitung bzw. eines Geburtseingriffes notiert. Zusätzliche Reproduktions- und Leistungsdaten wurden dokumentiert sowie die Abstammungsinformationen zu den einzelnen Sauen in Form eines Vier-Generationen-Pedigrees zur Verfügung gestellt.

Die Varianzkomponenten- und Heritabilitätsschätzung erfolgte mithilfe eines Schwellenwertmodells unter Berücksichtigung des permanenten Umwelteffektes der Wurfnummer und der Effekte Linie und Saison. Die geschätzte Heritabilität von 0,09 bei einer Standardabweichung von 0,03 zeigt die Möglichkeit einer züchterischen Bearbeitung.

Für die genomweite Assoziationsstudie wurde ein familienbasiertes Fall-Kontroll-Design gewählt, bei dem möglichst zu den erkrankten Tieren gesunde Halb- oder Vollgeschwistersauen gesucht wurden. Insgesamt 322 PDS-positive Sauen und deren 275 gesunde Halb- oder Vollgeschwister wurden vom Gesamtdatensatz ausgewählt und unter Nutzung des PorcineSNP60 BeadChips von Illumina an 62.163 genomweit verteilten Einzelbasenaustauschpolymorphismen (SNPs) genotypisiert. Die Auswertung beinhaltete eine Hauptkomponentenanalyse auf Basis der genomischen Verwandtschaftsmatrix um sowohl Rassen- als auch Familienunterschiede in der Auswertung zu berücksichtigen. Die statistische

Analyse erfolgte hauptsächlich mittels der Programmiersprache R unter Verwendung des R-Paketes GenABEL.

Es wurde eine genomweit signifikante Assoziation auf dem porcinen Chromosom (SSC) 17 gefunden. Ein weiterer genomweit signifikant assoziierter SNP wurde unter Verwendung der Annotierungsangabe von Illumina nach Genombild Sscrofa7 auf SSC15 identifiziert. Die genaue Lokalisation ist durch die neueren Genomsequenzierungsarbeiten nicht sicher bekannt, kann aber auf dem chromosomalen Stück Scaffold JH118531.1 innerhalb des Neuropilin-2-Gens (NRP2) lokalisiert werden. Ein moderat signifikant mit PDS assoziierter Bereich auf SSC13 ist vielversprechend für weitere Untersuchungen und das Kandidatengen PRICKLE2 konnte direkt im Bereich des assoziierten SNPs identifiziert werden. In den gefundenen Genombereichen sind sowohl reproduktionsspezifische Genorte (QTL) als auch QTL der Gesäugeanatomie und -funktionalität, QTL für die Körpertemperatur sowie QTL für Entzündungsparameter wie Haptoglobin beschrieben.

Innerhalb der linienspezifischen Auswertung wurden bislang keine genomweit signifikanten Ergebnisse identifiziert. Eine weitere detaillierte Untersuchung mit einer größeren Stichprobe pro Linie ist diesbezüglich notwendig.

Die Ergebnisse der Heritabilitätsschätzung und der genomweiten Assoziationsstudie bestätigen die in der Literatur beschriebene individuelle genetische Disposition, an PDS zu erkranken. Trotz der eher geringen Erblichkeit von 0,09 wurden drei Genombereiche lokalisiert, in denen sowohl direkt die Kandidatengene PRICKLE2 und NRP2 als auch mehrere reproduktionsspezifische QTL beschrieben sind.

Die Ergebnisse dieser Arbeit bilden die Grundlage für weitere Untersuchungen. So sind sowohl Bestätigungsstudien mit weiteren Sauen als auch Studien mit unabhängigem Tiermaterial denkbar.

## 7 Summary

The Postpartum Dysgalactia Syndrome in sows is an important disease after parturition. Several other terms for this complex disease are widely spread with mastitis-metritis-agalactiae-syndrome as the most common in European countries. Regarding sows' and piglets' health and welfare this disease has a relevant economic impact. A possible genetic background of this disease has been discussed, but has never been investigated in detail. In this study, 1,680 sampled sows and 2,001 clinically recorded litters were used for analyses.

Sampling took place in six farms affiliated with PIC Germany GmbH from April 2008 to July 2010. The clinical investigation took place between 12 to 48 h postpartum and sows were defined as affected when they showed rectal temperatures above 39.5°C and/or clinical signs of mastitis such as reddening, swelling or hardening and/or changes in piglets' behavior. Healthy half- or fullsib sows from the same farrowing group were selected and sampled as control sows after clinical investigation. The necessity for partus induction and to apply birth assistance was recorded. Additionally, fertility and performance parameters as well as lineage information in the form of the four-generation-pedigree were provided.

Variance components and heritability were estimated with a single trait repeatability model. Estimated heritability averaged 0.09 with a standard deviation of 0.03 and emphasizes the importance of optimizing hygiene and management conditions as well as considering the genetic predisposition for susceptibility to PDS.

The genome-wide association study was designed as a family-based case-control-study with matched sampling of PDS-affected sows and healthy half- or fullsib control sows. In total, 322 affected and their 275 unaffected healthy control sows were selected for genotyping on 62,163 Single Nucleotide Polymorphism (SNP) using the Illumina Porcine SNP60 BeadChip. Statistical analysis included principal components analysis using the genomic kinship to correct for genetic differences between pig breeding lines or families in an adjusted score test. Statistics were done in use of the package GenABEL within the R statistical environment.

A genome-wide significantly associated SNP was identified on porcine chromosome (SSC) 17. Further significant result with genome-wide significance was detected on an unplaced scaffold with an older annotation on SSC15 within the neuropilin-2-gene (NRP2). Another promising associated genomic region was detected on SSC13 and the gene PRICKLE2 is located within the most associated SNP. Several quantitative trait loci (QTL) were described in these genomic regions including QTL for reproduction as well as mammary gland

condition as for example teat number and non-functional nipples QTL, as well as QTL for body temperature, gestation length and haptoglobin.

Within the line-specific analysis no genome-wide significant variants were detected. However, further studies with a higher sample size per line might confirm moderate variants.

In summary, the results of the estimation of variance components and the genome-wide association study approve the existence of individual genetic predisposition for PDS as already mentioned in literature. Even this syndrome is only a low heritable trait with a heritability of 0.09, three promising genome regions on SSC13, SSC15 and SSC17 were identified to be associated with PDS. Several topic-related QTLs and the genes PRICKLE2 (SSC13) and NRP2 (SSC15) were located in these regions.

The results of this study encourage further investigations as for example confirmation as well as replication studies in different sow populations.

## 8 Literaturverzeichnis

- ADS 2010. Die Arbeitsgemeinschaft Deutscher Schweineerzeuger (ADS), Bonn.
- AULCHENKO, Y.S. 2010. ABEL tutorial.
- AULCHENKO, Y.S., RIPKE, S., ISAACS, A., VAN DUIJN, C.M., 2007. GenABEL: An R library for genome-wide association analysis. *Bioinformatics* 23, 1294-1296.
- AURICH, J.E. 2002. Endokrinpharmakologie, In: Frey, H.H., Löscher, W. (Eds.) *Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin*. Enke Verlag, Stuttgart, 280-317.
- AWAD MASALMEH, M., BAUMGARTNER, W., PASSERNIG, A., SILBER, R., HINTERDORFER, F., 1990. Bacteriological studies of the mastitis-metritis-agalactia syndrome in austrian pig farms. *Tierärztliche Umschau* 45, 526-535.
- BACKHAUS, K., ERICHSON, B., PLINKE, W., WEIBER, R., 2008. *Multivariate Analysemethoden - Eine anwendungsorientierte Einführung*, Vol 12. Auflage. Springer Verlag, 12. Auflage, Berlin Heidelberg.
- BÄCKSTRÖM, L., 1973. Environment and animal health in piglet production. A field study of incidences and correlations. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 1-240.
- BÄCKSTRÖM, L., MORKOC, A.C., CONNOR, J., LARSON, R., PRICE, W., 1984. Clinical study of mastitis-metritis-agalactia in sows in Illinois. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 185, 70-73.
- BAER, C., BILKEI, G., 2005. Ultrasonographic and gross pathological findings in the mammary glands of weaned sows having suffered recidiving mastitis metritisagalactia. *Reproduction in Domestic Animals* 40, 544-547.
- BAGNARD, D., LOHRUM, M., UZEIL, D., PUSCHEL, A.W., BOLZ, J., 1998. Semaphorins act as attractive and repulsive guidance signals during the development of cortical projections. *Development* 125, 5043-5053.
- BARRETT, J.C., FRY, B., MALLER, J., DALY, M.J., 2005. Haploview: Analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics* 21, 263-265.
- BAUER-WAHLWIES, H., 1956. Die Wehenschwäche der Mutterschweine infolge Mangelfütterung wie Konstitutionsschwäche, und ihre Beziehungen zu Totgeburten und Aufzuchtverlusten der Ferkel. *Züchtungskunde*, 189-203.
- BENYAMIN, B., VISSCHER, P.M., MCRAE, A.F., 2009. Family-based genome-wide association studies. *Pharmacogenomics* 10, 181-190.
- BERG, P., ANDERSEN, S., HENRYON, M., NIELSEN, J. 2001. Genetic variation for birth assistance and MMA in sows and diarrhoea in their litters. In: 52<sup>nd</sup> Annual Meeting of the European Association for Animal Production, Budapest.
- BERTSCHINGER, H.U., 1984. Neue Aspekte der Pathogenese der puerperalen Mastitis. *Tierärztliche Umschau* 39, 458-461.
- BERTSCHINGER, H.U. 1999. *Escherichia coli* infections, In: Straw, B.E., D'Allaire, S., Mengeling, W.L., Taylor, D.J. (Eds.) *Diseases of Swine*, 8. Auflage. Iowa State University Press, Ames, 431-468.
- BERTSCHINGER, H.U., BURGI, E., ENG, V., WEGMANN, P., 1990. Reduction of the incidence of puerperal mastitis in the sow by protection of the mammary gland against fecal contamination. *Schweizer Archiv für Tierheilkunde* 132, 557-566.
- BIDANEL, J.P., ROSENDO, A., IANNUCELLI, N., RIQUET, J., GILBERT, H., CARITEZ, J.C., BILLON, Y., AMIGUES, Y., PRUNIER, A., MILAN, D., 2008. Detection of quantitative trait loci for teat number and female reproductive traits in Meishan X Large White F2 pigs. *Animal* 2, 813-820.

- BILKEI, G., BOLCSKEI, A., CLAVADETSCHER, E., GOOS, T., HOFMANN, C., BILKEI, H., SZENCI, O., 1994a. The periparturient disease complex of the sow. 1. Evaluation of the course of the bacteriuria of urine samples of old sows during the periparturient period. *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift* 107, 327-330.
- BILKEI, G., BÖLCSKEI, A., GOOS, T., HOFMANN, C., SZENCI, O., 1994b. Die Beteiligung von *E. coli* an puerperalen Urogenitaltraktinfektionen bei Altsauen. *Tierärztliche Umschau* 49, 471-476.
- BORGHETTI, P., SALERI, R., MOCCHEGIANI, E., CORRADI, A., MARTELLI, P., 2009. Infection, immunity and the neuroendocrine response. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 130, 141-162.
- BOSTEDT, H., MAIER, G., HERFEN, K., HOSPES, R., 1998. Clinical examinations on gilts with puerperal septicaemia and toxæmia. *Tierärztliche Praxis Ausgabe Grosstiere Nutztiere* 26, 332-338.
- BRIGGS, H.M. 1983. *International Pig Breed Encyclopedia*.
- CANARIO, L., ROY, N., GRUAND, J., BIDANEL, J.P., 2006. Genetic variation of farrowing kinetics traits and their relationships with litter size and perinatal mortality in French Large White sows. *Journal of Animal Science* 84, 1053-1058.
- CANTOR, R.M., LANGE, K., SINSHEIMER, J.S., 2010. Prioritizing GWAS results: A review of statistical methods and recommendations for their application. *American Journal of Human Genetics* 86, 6-22.
- CARIBONI, A., DAVIDSON, K., RAKIC, S., MAGGI, R., PARNAVELAS, J.G., RUHRBERG, C., 2011. Defective gonadotropin-releasing hormone neuron migration in mice lacking SEMA3A signalling through NRP1 and NRP2: Implications for the aetiology of hypogonadotropic hypogonadism. *Human Molecular Genetics* 20, 336-344.
- CARIBONI, A., HICKOK, J., RAKIC, S., ANDREWS, W., MAGGI, R., TISCHKAU, S., PARNAVELAS, J.G., 2007. Neuropilins and their ligands are important in the migration of gonadotropin-releasing hormone neurons. *Journal of Neuroscience* 27, 2387-2395.
- CHEN, H., CHEDOTAL, A., HE, Z.G., GOODMAN, C.S., TESSIERLAVIGNE, M., 1997. Neuropilin-2, a novel member of the neuropilin family, is a high affinity receptor for the semaphorins Sema E and Sema IV but not Sema III. *Neuron* 19, 547-559.
- CHEN, K.F., BAXTER, T., MUIR, W.M., GROENEN, M.A., SCHOOK, L.B., 2007. Genetic resources, genome mapping and evolutionary genomics of the pig (*Sus scrofa*). *International Journal of Biological Sciences* 3, 153-165.
- CHEN, Y.Q., ZHU, J., LUM, P.Y., YANG, X., PINTO, S., MACNEIL, D.J., ZHANG, C.S., LAMB, J., EDWARDS, S., SIEBERTS, S.K., *et al.*, 2008. Variations in DNA elucidate molecular networks that cause disease. *Nature* 452, 429-435.
- CHO, I.C., PARK, H.B., YOO, C.K., LEE, G.J., LIM, H.T., LEE, J.B., JUNG, E.J., KO, M.S., LEE, J.H., JEON, J.T., 2011. QTL analysis of white blood cell, platelet and red blood cell-related traits in an F-2 intercross between Landrace and Korean native pigs. *Animal Genetics* 42, 621-626.
- CHUNG, C.C., MAGALHAES, W.C.S., GONZALEZ-BOSQUET, J., CHANOCK, S.J., 2010. Genome-wide association studies in cancer-current and future directions. *Carcinogenesis* 31, 111-120.
- COOPER, G.M., SHENDURE, J., 2011. Needles in stacks of needles: finding disease-causal variants in a wealth of genomic data. *Nature Reviews Genetics* 12, 628-640.
- DUNKELBERG, S., 2006. Haptoglobin in Milch und Blut von Sauen und ihren Ferkeln - Zusammenhänge mit weiteren immunologischen Parametern und der Entwicklung der Ferkel. Dissertation Justus-Liebig-Universität Gießen und Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, Gießen und Bonn.

- DVG-LEITLINIEN, 2012. Leitlinien - Bekämpfung der Mastitis des Rindes als Bestandsproblem, 5. Auflage. Gießen.
- ELMORE, R.G., MARTIN, C.E. 1986. Mammary Glands. In: Diseases of Swine, 6. Auflage.
- ELMORE, R.G., MARTIN, C.E., BERG, J.N., 1978. Absorption of *Escherichia coli* endotoxin from the mammary glands and uteri of early postpartum sows and gilts. Theriogenology 10, 439-446.
- ELZE, K., 1985. Correlations between Perinatal Piglet Loss and Farrowing as Well as Puerperium of Swine. Monatshefte für Veterinärmedizin 40, 811-814.
- FALCONER, D.S., 1984. Einführung in die Quantitative Genetik. Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart.
- FALKENBERG, H., HAMMER, H., 2006a. Zur Geschichte und Kultur der Schweinezucht und -haltung 1. Mitteilung: Zur Domestikation und Verbreitung der Hausschweine in der Welt. Züchtungskunde 78, 55-68.
- FALKENBERG, H., HAMMER, H., 2006b. Zur Geschichte und Kultur der Schweinezucht und Haltung 2. Mitteilung: Schweinezucht und -haltung in Europa im Mittelalter. Züchtungskunde 78, 291-308.
- FALKENBERG, H., HAMMER, H., 2007. Zur Geschichte und Kultur der Schweinezucht und -haltung. 3. Mitteilung: Schweinezucht und -haltung in Deutschland von 1650 bis 1900. Züchtungskunde 79, 92-110.
- FALKENBERG, H., HAMMER, H., 2008. Zur Geschichte und Kultur der Schweinezüchtung und -haltung 4. Mitteilung: Schweinezucht und -produktion in Europa zwischen 1900 und 1945. Züchtungskunde 80, 315-333.
- FAN, J.B., OLIPHANT, A., SHEN, R., KERMANI, B.G., GARCIA, F., GUNDERSON, K.L., HANSEN, M., STEEMERS, F., BUTLER, S.L., DELOUKAS, P., *et al.*, 2003. Highly parallel SNP genotyping. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology 68, 69-78.
- FRANEK, S.P., BILKEI, G., 2005. Correlations of prepartum body temperature and postpartum fever of sows with vulvovaginal discharge: a case report. Acta Veterinaria Brno 74, 395-399.
- FURNISS, S.J., 1987. Measurement of rectal temperature to predict mastitis, metritis and agalactia (MMA) in sows after farrowing. Preventive Veterinary Medicine 5, 133-139.
- GELDERMANN, H. 2005. Tier-Biotechnologie. Ulmer Eugen Verlag, Stuttgart.
- GERJETS, I., 2011. Coliform mastitis in sows: Analysis of potential influencing factors and bacterial pathogens with special emphasis on *Escherichia coli*. Dissertation Christian-Albrechts-Universität Kiel, Kiel.
- GERJETS, I., KEMPER, N., 2009. Coliform mastitis in sows: A review. Journal of Swine Health and Production 17, 97-105.
- GERJETS, I., REINERS, K., KEMPER, N. 2010. Bacteriological analysis from milk of sows affected and non-affected by PDS (Postpartum Dysgalactia Syndrome) with special emphasis on *Escherichia coli*. Proceedings of the 21<sup>st</sup> IPVS Kongress, 18.-21. Juni 2010, Vancouver, Kanada.
- GERJETS, I., TRAULSEN, I., REINERS, K., KEMPER, N., 2011a. Assessing individual sow risk factors for coliform mastitis: A case-control study. Preventive Veterinary Medicine 100, 248-251.
- GERJETS, I., TRAULSEN, I., REINERS, K., KEMPER, N., 2011b. Comparison of virulence gene profiles of *Escherichia coli* isolates from sows with coliform mastitis and healthy sows. Veterinary Microbiology 152, 361-367.
- GLOCK, H., 1983. On the treatment of the mastitis-agalactia-complex (MMA) of the pig and of related fertility disorders. Praktische Tierarzt 64, 511-516.
- GODDARD, M.E., HAYES, B.J., 2009. Mapping genes for complex traits in domestic animals and their use in breeding programmes. Nature Reviews Genetics 10, 381-391.

- GOONERATNE, A.D., HARTMANN, P.E., NOTTAGE, H.M., 1982. The Initiation of Lactation in Sows and the Mastitis-Metritis-Agalactia Syndrome. *Animal Reproduction Science* 5, 135-140.
- GUBB, D., GARCIABELLIDO, A., 1982. A Genetic-Analysis of the Determination of Cuticular Polarity during Development in *Drosophila-Melanogaster*. *Journal of Embryology and Experimental Morphology* 68, 37-57.
- GROENEN, M., 2012. SNP\_pos\_build10.zip, <http://www.animalgenome.org/repository/pig/>.
- GUO, Y.M., LEE, G.J., ARCHIBALD, A.L., HALEY, C.S., 2008. Quantitative trait loci for production traits in pigs: a combined analysis of two Meishan x Large White populations. *Animal Genetics* 39, 486-495.
- HALGAARD, C., 1983. Epidemiologic factors in puerperal diseases of sow. *Nordisk Veterinaer Medicin* 35, 161-174.
- HAYES, B., GODDARD, M.E., 2003. Evaluation of marker assisted selection in pig enterprises. *Livestock Production Science* 81, 197-211.
- HAYES, B.J., BOWMAN, P.J., CHAMBERLAIN, A.J., GODDARD, M.E., 2009. Invited review: Genomic selection in dairy cattle: Progress and challenges. *Journal of Dairy Science* 92, 433-443.
- HE, Z.G., TESSIERLAVIGNE, M., 1997. Neuropilin is a receptor for the axonal chemorepellent Semaphorin III. *Cell* 90, 739-751.
- HEIDRICH, H.J., 1954. Zur Therapie der symptomlosen puerperalen Agalaktie und Hypogalaktie. *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift*, 215-217.
- HEINRITZI, GINDELE, REINER, SCHNURRBUSCH, 2006. *Schweinekrankheiten*. Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart.
- HEINRITZI, K., HAGN, J., 1999. Untersuchungen zur Wirksamkeit und Verträglichkeit des neu entwickelten Cephalosporins Cefquinom bei an pueperaler Septikämie und Toxämie erkrankten Sauen. *Tierärztliche Praxis* 27, 114-121.
- HELMBOLDT, C.F., HALE, H.H., WINN, J.D., 1953. Coliform mastitis in swine. A case report. *Vet. Med.* 48.
- HERINGSTAD, B., KLEMETSDAL, G., RUANE, J., 2000. Selection for mastitis resistance in dairy cattle: a review with focus on the situation in the Nordic countries. *Livestock Production Science* 64, 95-106.
- HERINGSTAD, B., KLEMETSDAL, G., STEINE, T., 2003. Selection responses for clinical mastitis and protein yield in two norwegian dairy cattle selection experiments. *Journal of Dairy Science* 86, 2990-2999.
- HERMANSSON, I., EINARSSON, S., EKMAN, L., LARSSON, K., 1978a. Agalactia post partum in sow - Hematological and blood chemical study in affected and healthy sows. *Nordisk Veterinaer Medicin* 30, 474-481.
- HERMANSSON, I., LARSSON, K., BACKSTROM, L., EINARSSON, S., 1978b. Agalactia post partum in sow - Clinical study. *Nordisk Veterinaer Medicin* 30, 465-473.
- HILDENBRAND, F., 1984. Der MMA-Komplex in der Literatur von 1950 bis 1983 - Versuch einer Synopse. Dissertation Tierärztliche Hochschule Hannover, Hannover.
- HINDORFF, L.A., JUNKINS, H.A., HALL, P.N., MEHTA, J.P., MANOLIO, T.A. 2011. A Catalog of Published Genome-Wide Association Studies. Available at: [www.genome.gov/gwastudies](http://www.genome.gov/gwastudies).
- HINDORFF, L.A., SETHUPATHY, P., JUNKINS, H.A., RAMOS, E.M., MEHTA, J.P., COLLINS, F.S., MANOLIO, T.A., 2009. Potential etiologic and functional implications of genome-wide association loci for human diseases and traits. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 9362-9367.

- HIRSCH, A.C., PHILIPP, H., KLEEMANN, R., 2003. Investigation on the efficacy of meloxicam in sows with mastitis-metritis-agalactia syndrome. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 26, 355-360.
- HOY, S., 2002. Untersuchungen zum Einfluss verschiedener Haltungsfaktoren auf die Häufigkeit von Puerperalerkrankungen bei Sauen. *Praktischer Tierarzt* 83, 990-996.
- HOY, S., 2003. Auch die Haltung beeinflusst das MMA-Geschehen. *Nutztierpraxis aktuell* 7.
- HOY, S., 2006. The impact of puerperal diseases in sows on their fertility and health up to next farrowing. *Animal Science* 82, 701-704.
- HU, Z.-L., PARK, C.A., FRITZ, E.R., REECY, J.M. 2010. QTLdb: A comprehensive database tool building bridges between genotypes and phenotypes. *Proceedings of the 9<sup>th</sup> World Congress on Genetics Applied to Livestock Production*, Leipzig, Germany.
- HU, Z.L., DRACHEVA, S., JANG, W.H., MAGLOTT, D., BASTIAANSEN, J., ROTHSCILD, M.F., REECY, J.M., 2005. A QTL resource and comparison tool for pigs: PigQTLDB. *Mammalian Genome* 16, 792-800.
- HUNTER, D.J., ALTSHULER, D., RADER, D.J., 2008. From Darwin's finches to canaries in the coal mine - Mining the genome for new biology. *New England Journal of Medicine* 358, 2760-2763.
- ILLUMINA INC. 2010. PorcineSNP60 genotyping BeadChip. In Data Sheet: DNA Analysis. Illumina Inc., San Diego, USA.
- JOHANNSEN, W.L., 1913. *Elemente der exakten Erblichkeitslehre mit Grundzügen der biologischen Variationsstatistik*.
- JONAS, E., SCHREINEMACHERS, H.J., KLEINWACHTER, T., UN, C., OLTMANN, I., TETZLAFF, S., JENNEN, D., TESFAYE, D., PONSUKSILI, S., MURANI, E., *et al.*, 2008. QTL for the heritable inverted teat defect in pigs. *Mammalian Genome* 19, 127-138.
- JONES, J.E.T., 1979. Acute coliform mastitis in the sow. *Annales De Medecine Veterinaire* 19, 97-101.
- KAHN, C.M., ALLEN, D.G., ANDERSON, D.P., RADOSTITS, O.M. 2008. Postpartum dysgalactia syndrome and mastitis in sows: Introduction. In: Kahn, C.M. (Ed.) *The Merck Veterinary Manual*. Merck & Co., Inc., Whitehouse Station, NJ, USA.
- KATOH, M., KATOH, M., 2007. Comparative integromics on non-canonical WNT or planar cell polarity signaling molecules: Transcriptional mechanism of PTK7 in colorectal cancer and that of SEMA6A in undifferentiated ES cells. *International Journal of Molecular Medicine* 20, 405-409.
- KEMPER, N. 2010. MMA - gesunde Ferkel nur mit gesunden Sauen. In *TIERGESUNDHEIT* aktuell 03/2010.
- KEMPER, N., BARDEHLE, D., LEHMANN, J., GERJETS, I., LOOFT, H., PREIBLER, R., 2012. The role of bacterial pathogens in coliform mastitis in sows. *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift*, accepted.
- KEMPER, N., GERJETS, I., 2009. Bacteria in milk from anterior and posterior mammary glands in sows affected and unaffected by postpartum dysgalactia syndrome (PPDS). *Acta Veterinaria Scandinavica* 51:26.
- KING, G.J., WILLOUGH, R.A., HACKER, R.R., 1972. Fluctuations in rectal temperature of swine at parturition. *Canadian Veterinary Journal* 13, 72-74.
- KLOPFENSTEIN, C., FARMER, C., MARTINEAU, G.P. 2006. Diseases of the mammary glands and lactation problems, In: Straw, B.E., Zimmermann, J.J., Taylor, D.J. (Eds.) *Diseases of swine*, 9. Auflage. Iowa State University Press, 833-860.
- KOBERA, R., 2000. Vergleichende Prüfung der klinischen Wirksamkeit von Cefquinom und Enrofloxacin bei der Behandlung des Mastitis-Metritis-Agalaktie-Komplexes der Sau. *Dissertation Universität Leipzig*, Leipzig.

- KOPINSKI, J.S., BLANEY, B.J., DOWNING, J.A., MCVEIGH, J.F., MURRAY, S.A., 2007. Feeding sorghum ergot (*Claviceps africana*) to sows before farrowing inhibits milk production. *Australian Veterinary Journal* 85, 169-176.
- KRIETER, J., PRESUHN, U., 2009. Genetic variation for MMA treatment. *Züchtungskunde* 81, 149-154.
- LANDBAU, B.Ö. 2004. Ökologische Schweineproduktion: Struktur, Entwicklung, Probleme, politischer Handlungsbedarf -Schlussbericht-, BLE, Bonn.
- LARSEN, I., THORUP, F., 2006. The diagnosis of MMA. Proceedings of the 19<sup>th</sup> IPVS Kongress, Kopenhagen, Denmark.
- LAWRENCE, P.A., STRUHL, G., CASAL, J., 2007. Planar cell polarity: one or two pathways? *Nature Reviews Genetics* 8, 555-563.
- LEE, J.H., ZHANG, W., MORAN, C., 2001. Comparative porcine gene mapping relative to human chromosomes 9, 10, 20 and 22. *Animal Genetics* 32, 313-315.
- LINGAAS, F., RONNINGEN, K., 1991. Epidemiological and genetical studies in Norwegian pig herds. V. Estimates of heritability and phenotypic correlations of the most common diseases in Norwegian pigs. *Acta Veterinaria Scandinavica* 32, 115-122.
- LOEPFE, P.J., 1993. Experimentelle Mastitis bei der Sau. Korrelation der pathologisch-anatomischen und histologischen Befunde mit den klinischen Befunden 4-30 Tage nach der Ansteckung mit *E.coli* und *Klebsiella pneumoniae*. Dissertation Universität Zürich, Zürich.
- LOHR, B., BRUNNER, B., HELLMANN, K., 2004. Survey of the use of Cobactan (R) 2.5% in veterinary practice: Pigs. *Tierärztliche Umschau* 59, 356-358.
- LOOFT, H. 2010. Genomische Selektion - von der Utopie zur Realität. In: PIC Zeit (PIC Deutschland GmbH).
- LYKKJEN, S., DOLVIK, N.I., MCCUE, M.E., RENDAHL, A.K., MICKELSON, J.R., ROED, K.H., 2010. Genome-wide association analysis of osteochondrosis of the tibiotarsal joint in Norwegian Standardbred trotters. *Animal Genetics* 41, 111-120.
- MADDOX, B., 2002. Rosalind Franklin. Die Entdeckung der DNA oder der Kampf einer Frau um wissenschaftliche Anerkennung. Campus, Frankfurt am Main.
- MANOLIO, T.A., 2010. Genomewide Association Studies and Assessment of the Risk of Disease. *New England Journal of Medicine* 363, 166-176.
- MARKOWSKA-DANIEL, I., KOLODZIEJCZYK, P., 2001. The usefulness of Amoksiklav susp. in the control of mastitis-metritis-agalactia syndrome in sows. *Slovenian Veterinary Research* 38, 333-342.
- MARTIN, C.E., ELMORE, R.G. 1981. Lactation failure, In: Leman, A.D., Glock, H. (Eds.) *Diseases of swine*, 5. Auflage. Iowa State University Press.
- MARTIN, C.E., MCDOWELL, W.S. 1975. Lactation Failure (MMA), In: Dunne, H.W., Leman, A.D. (Eds.) *Diseases of Swine*. The Iowa State University Press, Ames, 953-960.
- MARTIN, C.E., WAGNER, W.C., ELMORE, R.G., ROSS, R.F., 1974. *Pork industry handbook*. Coop. extension service, Purdue University, West Lafayette.
- MARTINEAU, G.-P., FARMER, C., PELTONIEMI, O. 2012. Mammary System, In: Zimmermann, J., Karriker, L., Ramirez, A., Schwartz, K., Stevens, G. (Eds.) *Diseases of Swine*, 10. Auflage. Iowa State University Press, 270-293.
- MCCARTHY, M.I., ABECASIS, G.R., CARDON, L.R., GOLDSTEIN, D.B., LITTLE, J., IOANNIDIS, J.P.A., HIRSCHHORN, J.N., 2008. Genome-wide association studies for complex traits: consensus, uncertainty and challenges. *Nature Reviews Genetics* 9, 356-369.
- MEDZHITOV, R., PRESTONHURLBURT, P., JANEWAY, C.A., 1997. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388, 394-397.
- MEIJERINK, E., FRIES, R., VÖGELI, P., MASABANDA, J., WIGGER, G., STRICKER, C., NEUENSCHWANDER, S., BERTSCHINGER, H.U., STRANZINGER, G., 1997. Two

- alpha(1,2) fucosyltransferase genes on porcine Chromosome 6q11 are closely linked to the blood group inhibitor (S) and Escherichia coli F18 receptor (ECF18R) loci. *Mammalian Genome* 8, 736-741.
- MEIJERINK, E., NEUENSCHWANDER, S., FRIES, R., DINTER, A., BERTSCHINGER, H.U., STRANZINGER, G., VÖGELI, P., 2000. A DNA polymorphism influencing alpha(1,2)fucosyltransferase activity of the pig FUT1 enzyme determines susceptibility of small intestinal epithelium to Escherichia coli F18 adhesion. *Immunogenetics* 52, 129-136.
- MESSER, L.A., WANG, L., YELICH, J., POMP, D., GEISERT, R.D., ROTHSCHILD, M.F., 1996. Linkage mapping of the retinol-binding protein 4 (RBP4) gene to porcine chromosome 14. *Mammalian Genome* 7, 396-396.
- MEUWISSEN, T.H.E., HAYES, B.J., GODDARD, M.E., 2001. Prediction of total genetic value using genome-wide dense marker maps. *Genetics* 157, 1819-1829.
- MIELENZ, N., SCHÜLER, L. 2002. Einführung in die quantitative Genetik. Heft 4, Lehrmaterialien zur Nutztiergenetik, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- MILLER, S.A., DYKES, D.D., POLESKY, H.F., 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research* 16, 1215-1215.
- MINOZZI, G., BUGGIOTTI, L., STELLA, A., STROZZI, F., LUINI, M., WILLIAMS, J.L., 2010. Genetic Loci Involved in Antibody Response to Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis in Cattle. *Plos One* 5, e11117.
- MIRKO, C.P., BILKEI, G., 2004. Acute phase proteins, serum cortisol and preweaning litter performance in sows suffering from periparturient disease. *Acta Veterinaria* 54, 153-161.
- MOSSI, R., 1995. Experimentelle Kolimastitis bei der Sau. Korrelation der pathologisch-anatomischen und histologischen mit den klinischen Befunden 6-72 Stunden nach der Inokulation. Dissertation Universität Zürich, Zürich.
- NACHREINER, R.F., GINTHER, O.J., 1971. Changes which precede postpartum swine agalactia. *Journal of Animal Science* 33, 1161.
- NACHREINER, R.F., GINTHER, O.J., RIBELIN, W.E., CARLSON, I.H., 1971. Pathologic and endocrinologic changes associated with porcine agalactia. *American Journal of Veterinary Research* 32, 1065.
- NASARRE, C., KONCINA, E., LABOURDETTE, G., CREMEL, G., ROUSSEL, G., AUNIS, D., BAGNARD, D., 2009. Neuropilin-2 acts as a modulator of Sema3A-dependent glioma cell migration. *Cell Adhesion & Migration* 3, 383-389.
- NEUFELD, G., COHEN, T., SHRAGA, N., LANGE, T., KESSLER, O., HERZOG, Y., 2002a. The neuropilins: Multifunctional semaphorin and VEGF receptors that modulate axon guidance and angiogenesis. *Trends in Cardiovascular Medicine* 12, 13-19.
- NEUFELD, G., KESSLER, O., HERZOG, Y., 2002b. The interaction of neuropilin-1 and neuropilin-2 with tyrosine-kinase receptors for VEGF. *Neuropilin: From Nervous System to Vascular and Tumor Biology* 515, 81-90.
- NIEMANN, O., SCHMELZ, F., 2008. Ferkel profitieren: Kombination von Antibiotikum und NSAID bei der MMA Behandlung sorgt für schnelle Genesung der Muttersau. *Der Praktische Tierarzt* 9, Sonderdruck, 772.
- NOBLE, W.A., 1972. When her milk fails. *Pig farming*, 62.
- ODENT, M., 1999. The scientification of love. Free Associations Books Ltd.
- OKUDA, H., MIYATA, S., MORI, Y., TOHYAMA, M., 2007. Mouse Prickle1 and Prickle2 are expressed in postmitotic neurons and promote neurite outgrowth. *Febs Letters* 581, 4754-4760.
- OLBY, R., 1994. The path to the double helix. The discovery of DNA. Dover.

- OMELKA, R., MARTINIÁKOVÁ, M., PESKOVICOVÁ, D., BAUEROVÁ, M., 2008. Associations between Alu I polymorphism in the prolactin receptor gene and reproductive traits of Slovak Large White, White Meaty and Landrace pigs. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 21, 484-488.
- ÖSTERLUNDH, I., HULTEN, F., JOHANNISSON, A., MAGNUSSON, U., 2002. Sows intramammarily inoculated with *Escherichia coli* at parturition: I. Functional capacity of granulocytes in sows affected or non-affected by clinical mastitis. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 90, 35-44.
- PAPADOPOULOS, G.A., VANDERHAEGHE, C., JANSSENS, G.P.J., DEWULF, J., MAES, D.G.D., 2010. Risk factors associated with postpartum dysgalactia syndrome in sows. *Veterinary Journal* 184, 167-171.
- PATTERSON, N., PRICE, A.L., REICH, D., 2006. Population structure and eigenanalysis. *Plos Genetics* 2, 2074-2093.
- PEARSON, T.A., MANOLIO, T.A., 2008. How to interpret a genome-wide association study. *Jama-Journal of the American Medical Association* 299, 1335-1344.
- PEJSÁK, Z., TARASIUK, K., 1989. The occurrence of endotoxin in sows with coliform mastitis. *Theriogenology* 32, 335-341.
- PENNY, R.H.C., 1970. Agalactia complex in sow - a review. *Australian Veterinary Journal* 46, 153-159.
- PERSSON, A., PEDERSEN MORNER, A., KUHL, W., 1996. A long-term study on the health status and performance of sows on different feed allowances during late pregnancy. II. The total cell content and its percentage of polymorphonuclear leucocytes in pathogen-free colostrum and milk collected from clinically healthy sows. *Acta Veterinaria Scandinavica* 37, 279-291.
- PIC Deutschland GMBH, 2004. Neue Technologien - Heute wissen was morgen gefragt ist. Internetlink: [www.picdeutschland.de/services/files/ratgeber/neue\\_technologien.pdf](http://www.picdeutschland.de/services/files/ratgeber/neue_technologien.pdf).
- PIGQTLDB. <http://www.animalgenome.org/cgi-bin/QTLdb/SS/summary>.
- PIYASATIAN, N., FERNANDO, R.L., DEKKERS, J.C.M., 2009. Models for marker-assisted genetic evaluation with multiple QTL in a crossbred population. *Livestock Science* 125, 141-148.
- PLONAIT, H., BICKHART, K. 1997. Geburt, Puerperium und perinatale Verluste, In: Plonait, H., Bickhart, K. (Eds.) *Lehrbuch der Schweinekrankheiten*. Parey, Berlin/Hamburg, 472-512.
- PRICE, A.L., PATTERSON, N.J., PLENGE, R.M., WEINBLATT, M.E., SHADICK, N.A., REICH, D., 2006. Principal components analysis corrects for stratification in genome-wide association studies. *Nature Genetics* 38, 904-909.
- PURCELL, S., NEALE, B., TODD-BROWN, K., THOMAS, L., FERREIRA, M.A.R., BENDER, D., MALLER, J., SKLAR, P., DE BAKKER, P.I.W., DALY, M.J., SHAM, P.C., 2007. PLINK: A tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *American Journal of Human Genetics* 81, 559-575.
- PYTHON, P., JORG, H., NEUENSCHWANDER, S., HAGGER, C., STRICKER, C., BURGI, E., BERTSCHINGER, H.U., STRANZINGER, G., VOGELI, P., 2002. Fine-mapping of the intestinal receptor locus for enterotoxigenic *Escherichia coli* F4ac on porcine chromosome 13. *Animal Genetics* 33, 441-447.
- RAMOS, A.M., CROOIJMANS, R., AFFARA, N.A., AMARAL, A.J., ARCHIBALD, A.L., BEEVER, J.E., BENDIXEN, C., CHURCHER, C., CLARK, R., DEHAIS, P., *et al.*, 2009. Design of a high density SNP genotyping assay in the pig using SNPs identified and characterized by next generation sequencing technology. *Plos One* 4, e6524.
- RATHJE, T.A., ROHRER, G.A., JOHNSON, R.K., 1997. Evidence for quantitative trait loci affecting ovulation rate in pigs. *Journal of Animal Science* 75, 1486-1494.

- RATHMANN, H., 2008. MMA-Komplex: Durch schnelle Injektion Ferkelverluste vermeiden. Landpost 32, 10-11.
- REINER, G., HERTRAMPF, B., RICHARD, H.R., 2009. Dysgalactia in the sow post partum - a review with special emphasis on pathogenesis. Tierärztliche Praxis Ausgabe Grosstiere Nutztiere 37, 305-318.
- REINER, G., KLIEMT, D., WILLEMS, H., BERGE, T., FISCHER, R., KOHLER, F., HEPP, S., HERTRAMPF, B., DAUGSCHIES, A., GELDERMANN, H., *et al.*, 2007. Mapping of quantitative trait loci affecting resistance/susceptibility to *Sarcocystis miescheriana* in swine. Genomics 89, 638-646.
- REINSCH, N., 1996. Two Fortran programs for the Gibbs Sampler in univariate linear mixed models. Archives of Animal Breeding 39, 203-209.
- RINGARP, N., 1960. Clinical and experimental Investigations into a postparturient syndrome with agalactia in sows. Dissertation Royal Veterinary College, Uppsala.
- ROHRER, G.A., FORD, J.J., WISE, T.H., VALLET, J.L., CHRISTENSON, R.K., 1999. Identification of quantitative trait loci affecting female reproductive traits in a multigeneration Meishan-White composite swine population. Journal of Animal Science 77, 1385-1391.
- ROSS, R.F., HARMON, R.L., ZIMMERMANN, B.J., YOUNG, T.F., 1983. Susceptibility of sows to experimentally induced *Escherichia coli* mastitis. American Journal of Veterinary Research 44, 949-954.
- ROSS, R.F., ORNING, A.P., WOODS, R.D., ZIMMERMANN, B.J., COX, D.F., HARRIS, D.L., 1981. Bacteriologic study of sow agalactia. American Journal of Veterinary Research 42, 949-955.
- ROSS, R.F., ZIMMERMAN, B.J., WAGNER, W.C., COX, D.F., 1975. A field study of coliform mastitis in sows. Journal of the American Veterinary Medical Association 167, 231-235.
- ROTHSCHILD, M.F., 1996. Genetics and reproduction in the pig. Animal Reproduction Science 42, 143-151.
- SCHNELL, M., TEUSCHER, R., BITZ, V., 1977. Untersuchungen über die Häufigkeit und Verlauf von Puerperalstörungen bei Sauen eines Schweineaufzuchtkombinates. Monatshefte für Veterinärmedizin, 937-940.
- SCHOLLENBERGER, A., DEGORSKI, A., FRYMUS, T., SCHOLLENBERGER, A., 1986. Cells of sow mammary secretions. 1. Morphology and differential counts during lactation. Journal of Veterinary Medicine Series A (Zentralblatt für Veterinärmedizin Reihe A) 33, 31-38.
- SCHÖNING, G., PLONAIT, H., 1990. Methaphylaxis and therapy of the MMA-syndrome of sows with Baytril. Deutsche Tierärztliche Wochenschrift 97, 5-10.
- SCHULZ, J., ELZE, K., GOTTSCHALK, F., DEMMRICH, K., STENGL, S., BERGER, K., DRESCHEL, B., 1983. Relationships between parturition and puerperal diseases of swine. Monatshefte für Veterinärmedizin 38, 661-664.
- SCHWERIN, M., 2004. Stand und Perspektiven der molekularen Genomanalyse in der Tierzucht und -haltung. Züchtungskunde 76, 403-411.
- SCUKA, L., STUKELJ, M., VALENCAK, Z., 2006. Therapeutic effects of enrofloxacin in mastitis-metritis-agalactia: a review. Acta Veterinaria Brno 75, 5151-5522.
- SMITH, B.B., MARTINEAU, G., BISAILLON, A., 1992. Mammary glands and lactation problems. In: Leman et al. (Eds). Diseases of Swine, 7. Auflage. Iowa university press: 40-61.
- SMITH, B.B., WAGNER, W.C., 1984. Suppression of prolactin in pigs by *Escherichia coli* endotoxin. Science 224, 605-607.

- SMITH, B.B., WAGNER, W.C., 1985. Effect of *Escherichia coli* endotoxin and thyrotropin-releasing hormone on prolactin in lactating sows. *American Journal of Veterinary Research* 46, 175-180.
- SMITH, H.C., 1965. Mastitis, metritis and diarrhea in swine. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 147, 626-631.
- SORRELLS, A.D., EICHER, S.D., HARRIS, M.J., PAJOR, E.A., RICHERT, B.T., 2007. Periparturient cortisol, acute phase cytokine, and acute phase protein profiles of gilts housed in groups or stalls during gestation. *J Anim Sci* 85, 1750-1757.
- STRAW, B.E., BUSH, E.J., DEWEY, C.E., 2000. Types and doses of injectable medications given to periparturient sows. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 216, 510-515.
- SUN, H.S., WANG, L., ROTHSCHILD, M.F., TUGGLE, C.K., 1998. Mapping of the natural resistance-associated macrophage protein 1 (NRAMP1) gene to pig chromosome 15. *Animal Genetics* 29, 138-140.
- THARP, V.L., AMSTUTZ, H.E. 1958. Mastitis, metritis and agalactia, In: Dunne, H.W. (Ed.) *Diseases of swine*, 1. Auflage. Iowa state college press.
- THRELFALL, W.R., MARTIN, C.E., 1973. Swine agalactia in Missouri. *Veterinary Medicine & Small Animal Clinician* 68, 423-426.
- TRIBOUT, T., IANNUCELLI, N., DRUET, T., GILBERT, H., RIQUET, J., GUEBLEZ, R., MERCAT, M.J., BIDANEL, J.P., MILAN, D., LE ROY, P., 2008. Detection of quantitative trait loci for reproduction and production traits in Large White and French Landrace pig populations. *Genetics Selection Evolution* 40, 61-78.
- UDDIN, M.J., GROSSE-BRINKHAUS, C., CINAR, M.U., JONAS, E., TESFAYE, D., THOLEN, E., JUENGST, H., LOOFT, C., PONSUKSILI, S., WIMMERS, K., *et al.*, 2010. Mapping of quantitative trait loci for mycoplasma and tetanus antibodies and interferon-gamma in a porcine F-2 Duroc x Pietrain resource population. *Mammalian Genome* 21, 409-418.
- VAN GELDER, K.N., BILKEI, G., 2005. The course of acute-phase proteins and serum cortisol in mastitis metritis agalactia (MMA) of the sow and sow performance. *Tijdschrift voor Diergeneeskunde* 130, 38-41.
- VARADIN, M., FILIPOVIC, M., 1975. Klinisches Bild der Milchdrüse bei Sauen und einige Besonderheiten ihres Sekretes. *Zuchthygiene*, 109-118.
- VERHEYEN, A.J., MAES, D.G., MATEUSEN, B., DEPREZ, P., JANSSENS, G.P., DE LANGE, L., COUNOTTE, G., 2007. Serum biochemical reference values for gestating and lactating sows. *Veterinary Journal* 174, 92-98.
- VERHULST, A., MUSERU, B., 1973. La mammite postpuerperale de la Truie. *Revue de l'universite nationale de Zaire* 27, 127-141, zitiert von Hildenbrand (1984).
- VINCENT, A., WANG, L., TUGGLE, C.K., ROTHSCHILD, M.F., 1998. Linkage and physical mapping of prolactin to porcine chromosome 7. *Animal Genetics* 29, 27-29.
- VISSCHER, P.M., ANDREW, T., NYHOLT, D.R., 2008. Genome-wide association studies of quantitative traits with related individuals: little (power) lost but much to be gained. *European Journal of Human Genetics* 16, 387-390.
- VISWANATHAN, G.A., SETO, J., PATIL, S., NUDELMAN, G., SEALFON, S.C., 2008. Getting started in biological pathway construction and analysis. *Plos Computational Biology* 4, e16.
- VÖGELI, P., BERTSCHINGER, H.U., STAMM, M., STRICKER, C., HAGGER, C., FRIES, R., RAPACZ, J., STRANZINGER, G., 1996. Genes specifying receptors for F18 fimbriated *Escherichia coli*, causing oedema disease and postweaning diarrhoea in pigs, map to chromosome 6. *Animal Genetics* 27, 321-328.
- WALDMANN, K.-H., WENDT, M., 2004. *Lehrbuch der Schweinekrankheiten*, 4. Auflage. Parey Verlag, Stuttgart.

- WANG, K., LI, M.Y., HAKONARSON, H., 2010. Analysing biological pathways in genome-wide association studies. *Nature Reviews Genetics* 11, 843-854.
- WEGMANN, P., 1985. Zur Pathogenese der Colimastitis beim Mutterschwein. Dissertation Universität Zürich, Zürich.
- WENDT, M., 2000. So optimieren Sie das Geburtsmanagement. *top agrar* 1, 6-8.
- WIESNER, E., RIBBECK, R., AL., E. 2000. *Lexikon der Veterinärmedizin*. Enke Verlag, Stuttgart.
- WILKIE, P.J., PASZEK, A.A., BEATTIE, C.W., ALEXANDER, L.J., WHEELER, M.B., SCHOOK, L.B., 1999. A genomic scan of porcine reproductive traits reveals possible quantitative trait loci (QTLs) for number of corpora lutea. *Mammalian Genome* 10, 573-578.
- WILZ, P., 1956. New information about agalactia in nursing sows. *Praktische Tierarzt*, 8-9.
- WIMMERS, K., MURANI, E., SCHELLANDER, K., PONSUKSILI, S., 2009. QTL for traits related to humoral immune response estimated from data of a porcine F2 resource population. *International Journal of Immunogenetics* 36, 141-151.
- YU, K., WANG, Z.M., LI, Q.Z., WACHOLDER, S., HUNTER, D.J., HOOVER, R.N., CHANOCK, S., THOMAS, G., 2008. Population substructure and control selection in genome-wide association studies. *Plos One* 3, e2551.
- ZHANG, B., REN, J., YAN, X., HUANG, X., JI, H., PENG, Q., ZHANG, Z., HUANG, L., 2008. Investigation of the porcine MUC13 gene: isolation, expression, polymorphisms and strong association with susceptibility to enterotoxigenic *Escherichia coli* F4ab/ac. *Animal Genetics* 39, 258-266.
- ZHU, Y.H., BERG, M., FOSSUM, C., MAGNUSSON, U., 2007a. Proinflammatory cytokine mRNA expression in mammary tissue of sows following intramammary inoculation with *Escherichia coli*. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 116, 98-103.
- ZHU, Y.H., FOSSUM, C., BERG, M., MAGNUSSON, U., 2007b. Morphometric analysis of proinflammatory cytokines in mammary glands of sows suggests an association between clinical mastitis and local production of IL-1beta, IL-6 and TNF-alpha. *Veterinary Research* 38, 871-882.
- ZHU, Y.H., OSTERLUNDH, I., HULTEN, F., MAGNUSSON, U., 2004. Tumor necrosis factor-alpha, interleukin-6, serum amyloid A, haptoglobin, and cortisol concentrations in sows following intramammary inoculation of *Escherichia coli*. *American Journal of Veterinary Research* 65, 1434-1439.



**Anhang 2:** Auflistung der Verbrauchsmaterialien

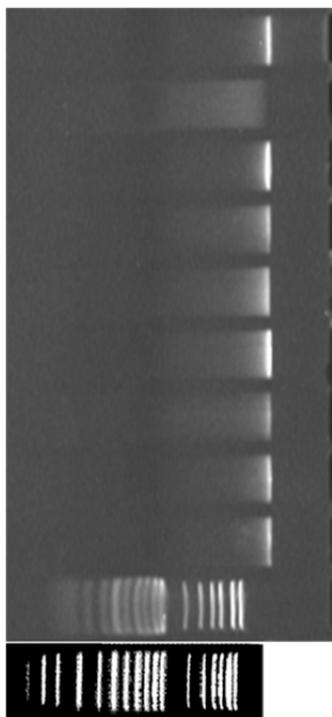
Verbrauchsmaterialien (Plastik, Einweg)	
Eppendorf-Gefäße	(u.a. SARSTEDT®)
Pipettenspitzen (10µl, 20µl, 100µl, 200µl, 1000µl)	(u.a. SARSTEDT®)
Deckelketten	(u.a. SARSTEDT®)
Combitips	(EPPENDORF®)
96-Well Multiply-PCR- Platte	(SARSTEDT®)
Falcontubes (15ml, 50ml)	(u.a. ROTH®)
Skalpellklingen	(Schreiber GmbH)
Präzisionswischtücher	(KIMTECH Science®)
Verbrauchsmaterialien (Chemikalien)	
Proteinase-K-Lösung	(Qiagen®)
10%-Natrium-dodecyl-sulfat (SDS)-Lösung	(Biomol®)
Ethylendiamin-tetraacetat (EDTA)	(ROTH®)
TRIS-Puffer	(ROTH®)
Kaliumchlorid (KCl)	(ROTH®)
Ammoniumacetatlösung	(ROTH®)
Methanol, Ethanol, Isopropanol	(ROTH®)
Agarose	(Biozym®)
Ethidiumbromid	(ROTH®)

**Anhang 3:** Darstellung der qualitativen Kontrolle der DNA-Proben in Form der Gelbilder der genomischen DNA bzw. der PCR-Produkte am Beispiel der DNA-Proben geMMA\_135 bis geMMA\_142.

**Gelbild genomische DNA**

0,8%iges Gel,  
50min 4 V/cm

Proben in TE gelöst



*Marker 100-5000 ext*

Probe

Standard DNA 70 ng

geMMA\_135

geMMA\_136

geMMA\_137

geMMA\_138

geMMA\_139

geMMA\_140

geMMA\_141

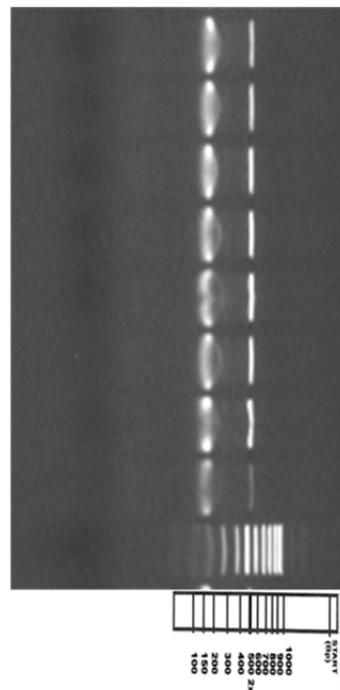
geMMA\_142

Marker

**Gelbild PCR**

KVL5231 (192-196bp)  
IGF2-Ex7 (531bp)

2%iges Gel,  
40min 4 V/cm  
Proben in TE gelöst

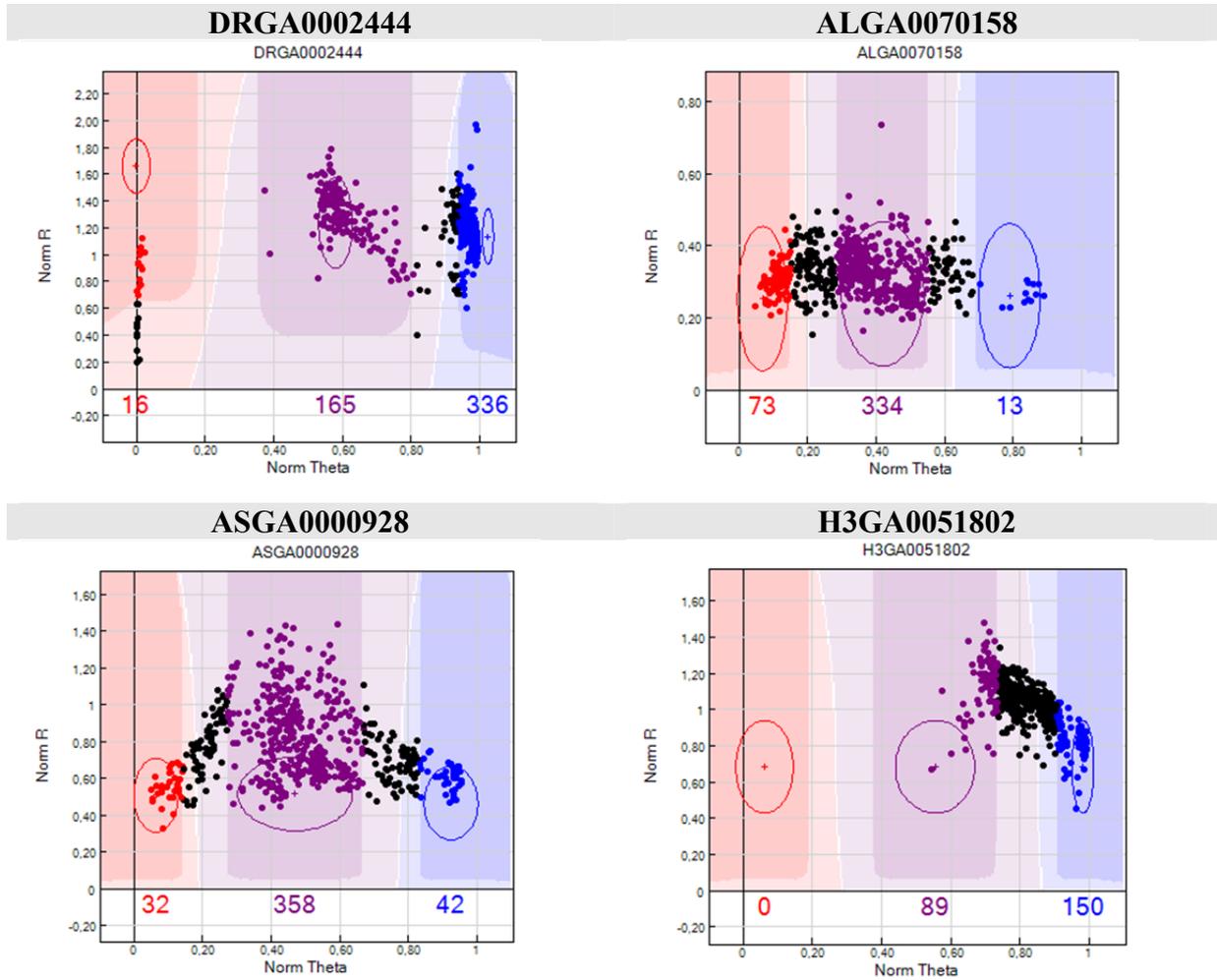


*Marker 100-1000 Äqui*

**Anhang 4:** Auswertung der wichtigen Bakteriengruppe der coliformen Bakterien (COLIFORM), und der Bakterienspezies *Staphylococcus aureus* (StA) und der *Streptococci agalactiae* bzw. *dysgalactiae* (STREP) in Kombinationsbetrachtung unter Berücksichtigung des PDS-Status. Es werden jeweils die absoluten Häufigkeiten und in Klammern die Reihenprozente angegeben.

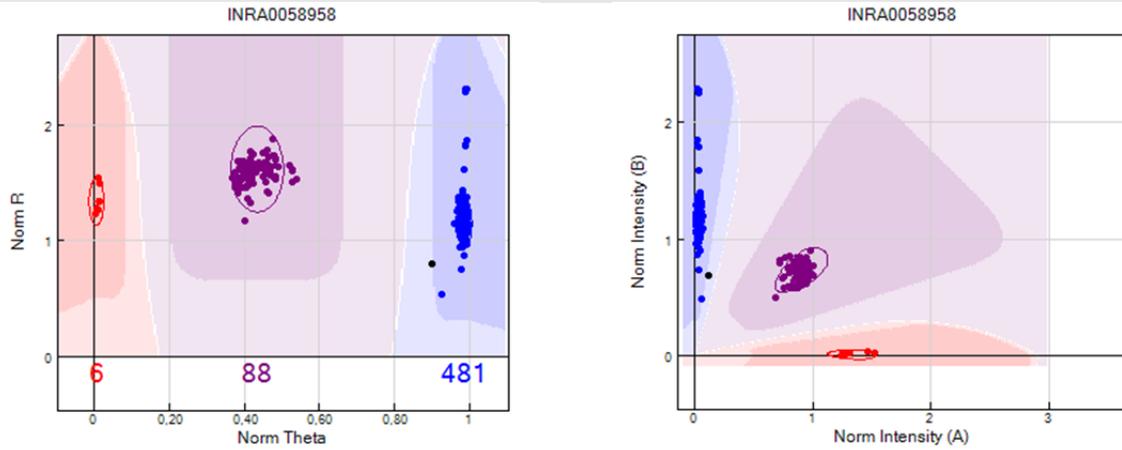
	PDS+	PDS-	
kein COLIFORM, StA oder STREP	208 (20,3%)	162 (16,7%)	370 (18,5%)
EC+StA+STREP	6 (0,6%)	5 (0,5%)	11 (0,5%)
nur STREP	29 (2,8%)	17 (1,8%)	46 (2,3%)
STREP + StA	7 (0,7%)	1 (0,1%)	8 (0,4%)
nur StA	26 (2,5%)	15 (1,5%)	41 (2,1%)
StA + COLIFORM	20 (1,9%)	14 (1,4%)	34 (1,7%)
nur COLIFORM	599 (58,4%)	580 (59,7%)	1.179 (59,0%)
STREP + COLIFORM	131 (12,8%)	178 (18,3%)	309 (15,5%)
gesamt	1.026 (100,0%)	972 (100,0%)	1.998 (100%)

**Anhang 5:** Darstellung der Signalintensitätsplots der Ergebnisse der Genotypisierung für vier SNPs: DRGA0002444, ALGA0070158, ASGA0000928, H3GA0051802.

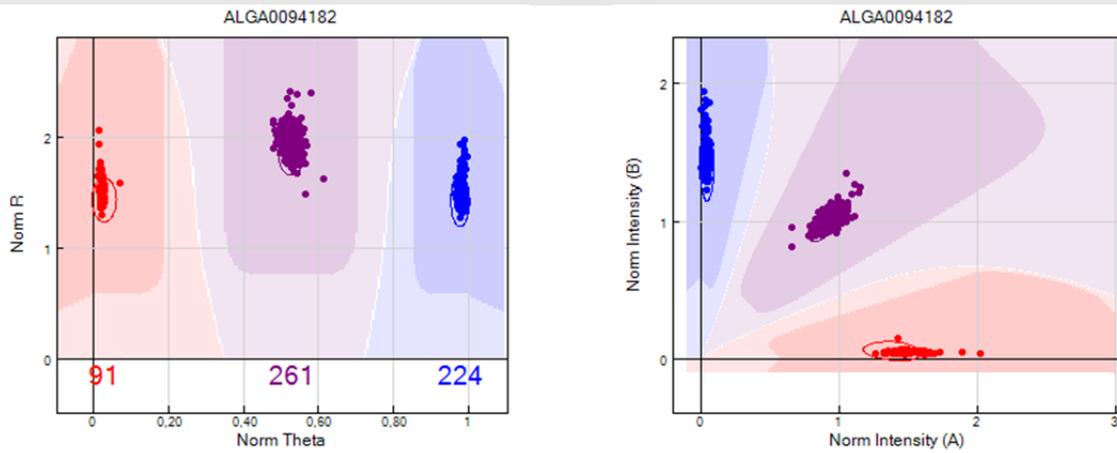


**Anhang 6:** Norm-Plots der Signalintensitäten ausgewählter SNPs (INRA0058958, ALGA0094182, ASGA0057450) zur Darstellung der Ergebnisse der Genotypisierung.

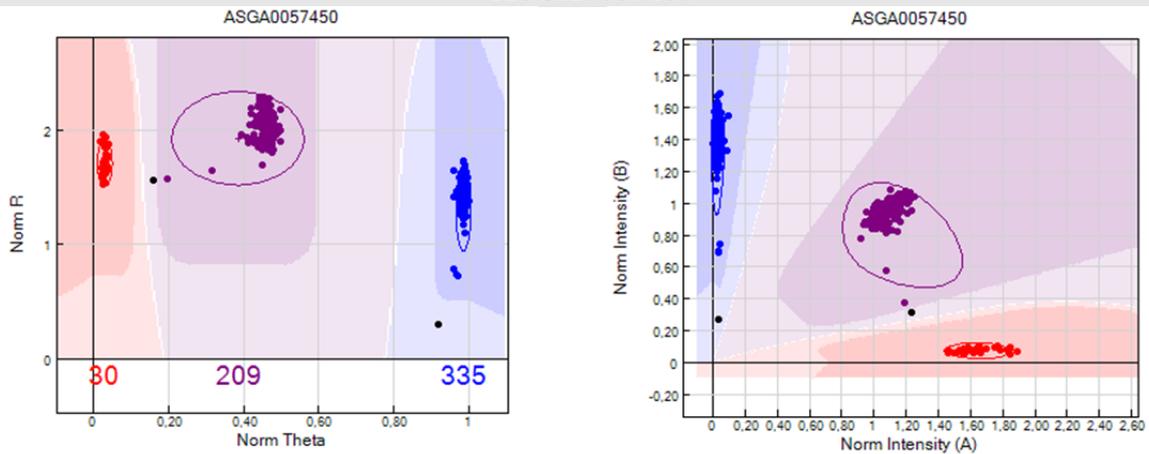
**INRA0058958**



**ALGA0094182**



**ASGA0057450**



## 10 Danksagung

Frau Prof. Dr. Nicole Kemper danke ich auf das herzlichste für ihre sehr gute Betreuung, ihre Unterstützung meines Wissenserwerbes und der vielen Möglichkeiten zur Wahrnehmung von Fortbildungen und zur Teilnahme an nationalen und internationalen Tagungen.

Herrn Prof. Dr. Wehrend danke ich für die fachliche externe Betreuung am Fachbereich Veterinärmedizin in Gießen.

Dank gilt den vielen Mitarbeitern am Institut für Tierzucht und Tierhaltung der Christian-Albrechts-Universität Kiel. Vor allem die Laborgruppe um Herrn Dr. Jens Tetens mit Gabi, Julia und Anne sei erwähnt, ohne die die vorliegende Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Dr. Dirk Hinrichs danke ich für seine Hilfe bei der Schätzung der Heritabilität und die Einführung in die FORTRAN-Programme. Prof. Dr. Thaller danke ich für sein interessantes Modul und Extrakurs zu Genomanalysen in der Tierzucht, die mich auch dank ihm und Nina mit TinnR und der Programmiersprache R bekannt machten. Auch der Laborgruppe der zweiten Etage mit Evelyn und Jens, und meiner Bürokollegin Steffi möchte ich für die schöne Zeit und die immer helfenden Hände danken.

Dank gilt aber auch all den Mitarbeitern der Professur Tierhygiene der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg. Hier sei allen voran Danilo, Jörg und Josefine für ihr geduldiges Korrekturlesen und die immer offenen Ohren gedankt.

Abschließend danke ich ganz besonders herzlichst all meinen Lieben, insbesondere meinen Eltern und meinem Ehemann, für die ständige Unterstützung meiner Träume und Ziele.

Lieben Dank an Euch alle!

## **11 Erklärung**

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.

Regine Preißler



*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: 978-3-8359-5997-2



9 17 8 3 8 3 5 19 5 9 9 7 2