

Bastian Balthasar Marcel Bronnert

**Molekulargenetische Studie zur
Verbreitung und Interaktion von
PCV-2 bei Haus- und Wildschweinen**

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

Bibliografische Informationen der Deutschen Bibliothek

Die Deutsche Bibliothek verzeichnet diese Publikation in der
Deutschen Nationalbibliografie;
Detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

1. Auflage 2014

© 2014 by Verlag: **Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft Service GmbH**,
Gießen
Printed in Germany

ISBN 978-3-86345-214-8

Verlag: DVG Service GmbH
Friedrichstraße 17
35392 Gießen
0641/24466
info@dvf.de
www.dvf.de

Aus der Klinik für Wiederkäuer und Schweine

Professur für Schweinekrankheiten
der Justus-Liebig-Universität Gießen

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

Molekulargenetische Studie zur Verbreitung und Interaktion von
PCV-2 bei Haus- und Wildschweinen

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines

Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von

Bastian Balthasar Marcel Bronnert

Tierarzt aus Kirchen

Gießen, 2014

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

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

Gutachter:

Prof. Dr. Dr. habil. G. Reiner
Prof. Dr. H.-J. Thiel

Tag der Disputation:

09.04.2014

Meiner Freundin

Teile der Dissertation wurden veröffentlicht:

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

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

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis.....	VI
Abkürzungsverzeichnis	VII
1 Einleitung	1
2 Literaturübersicht	3
2.1 Historie	3
2.2 Taxonomie, Morphologie und Eigenschaften	4
2.3 Genetische Charakterisierung porciner Circoviren.....	5
2.3.1 Definition bekannter PCV-2 Typen und Subtypen	9
2.4 Epidemiologie.....	10
2.4.1 Impfung zur Vorbeugung einer PCV-2-Infektion.....	12
2.5 PCV-2 beim Wildschwein	14
2.6 Pathogenese	16
2.7 PCV-2-assoziierte Krankheitsbilder	19
2.7.1 Postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS).....	19
2.7.2 Porcines Dermatitis und Nephropathie Syndrom - PDNS	23
2.7.3 Poliferativ Nekrotisierende Pneumonie – PNP	26
2.7.4 PCV-2-assoziierte Reproduktionsstörungen.....	26
2.7.5 PCV-2-induzierter Kongenitaler Tremor.....	27
2.7.6 PCV-2-assoziierte zerebelläre Enzephalopathie der Absetzferkel	28
2.8 Nachweisverfahren	29
2.8.1 Virusanzüchtung	29
2.8.2 Elektronenmikroskopie.....	30
2.8.3 Antikörpernachweis.....	30
2.8.4 Antigennachweis	31
3 Eigene Untersuchungen.....	34
3.1 Material.....	34
3.1.1 Probenmaterial	34
3.1.2 Verbrauchsmaterialien	37
3.1.3 Geräte.....	37

3.1.4	Reaktionskits	38
3.1.5	Chemikalien	38
3.1.6	Computerprogramme	39
3.2	Methoden	39
3.2.1	Probenentnahme	39
3.2.2	Zahnlaltersschätzung	40
3.5.1	Verifikation der PCR-Produkte	46
3.6	Pyrosequenzierung	47
3.6.1	Durchführung der Pyrosequenzierung	49
3.7	Genotypisierung von PCV-2	51
3.7.1	Analyse der aus der Datenbank extrahierten PCV-2-Sequenzen	51
3.8	Verteilung der PCV-2 Belastung und dem Vorkommen von PCVD	53
3.8.1	Immunhistologie (Dissertation Frau Dr. Corinna Hohloch)	53
3.8.2	Klassifizierung von PCVD	54
3.9	Statistische Analyse	54
4	Ergebnisse	55
4.1	Alter und Gewicht der Tiere	55
4.2	Vorversuche	56
4.2.1	Validierung der qPCR	56
4.2.2	Vorversuche zur Pyrosequenzierung	58
4.3	PCV-2-Prävalenz	59
4.3.1	PCV-2-Prävalenzen bei Wild- und Hausschweinen ermittelt mit der nested PCR	59
4.3.2	PCV-2-Prävalenzen bei Wild- und Hausschweinen ermittelt mit der quantitativen PCR	61
4.3.3	Vergleich der PCV-2-Viruslast bei Wild- und Hausschweinen	65
4.4	PCV-2-Belastung der einzelnen Organe bei Haus- und Wildschweinen	66
4.5	ORF2	67
4.6	ORF3	69
4.7	ORF2-/ORF3-Genotypkombinationen bei Wild- und Hausschweinen	71
4.8	Vergleich der gefundenen Genotypen mit Ergebnissen aus der GenBank®	75
4.9	Ergebnisse der Dissertation Hohloch	77
5	Diskussion	79
5.1	PCV-2 bei Wild- und Hausschweinen	80

5.2	Prävalenz von PCVD	81
5.3	Genotypen.....	83
5.3.1	Zusammenhang von ORF2 und ORF3	83
5.3.2	Genotypen bei Wild- und Hausschweinen	84
5.3.3	Veränderungen von PCV-2 bei Wild- und Hausschwein.....	86
6	Zusammenfassung	87
6.1	Zusammenfassung	87
6.2	Summary	89
7	Literaturverzeichnis	91
8	Anhang.....	116
8.1	Ansätze für Lösungen.....	116
8.2	Primer	117
8.2.1	Primer für Pyrosequenzierung	117
8.2.2	Primer für nPCR und qPCR.....	118
9	Danksagung.....	119
10	Erklärung	120

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung des <i>stem-loop</i> bei PCV-1 (Access.-No.: AY184287) und PCV-2 (Accesss.-No.: AY094619) (Cheung, 2004b)	7
Abbildung 2: Schema des ringförmigen PCV-2-Genoms mit den Leserahmen ORF1 bis ORF6 (Knell, 2005)	8
Abbildung 3: PCV-Stammbaum (schematische Darstellung)	10
Abbildung 4: Der Stamm-baum zeigt die genetische Distanz der in der Studie von Takahagi et al. (2009) untersuchten PCV-2-Stämme. Dabei entspricht PCV2a-2 dem Cluster -2A der Olvera-Klassifikation.....	14
Abbildung 5: Verteilung der Reviere in Deutschland, in denen die Tiere beprobt wurden (weiße Kreise: Wildschweinerkunft, graue Vierecke: Hausschweinerkunft)	35
Abbildung 6: Funktionsprinzip der Realtime-PCR.....	45
Abbildung 7: Funktionsprinzip der Pyrosequenzierung	48
Abbildung 8: Vorbereitende Arbeitsschritte für die Pyrosequenzierung.....	49
Abbildung 9: Position der ORF2-Pyrosequenzierungs-Reaktion und mögliche Variablen in der untersuchten Sequenz (X=variable Position)	52
Abbildung 10: Position der ORF3-Pyrosequenzierungs-Reaktion und mögliche Variablen in der untersuchten Sequenz (X=variable Position)	52
Abbildung 11: PCV-2-Standardgerade einer qPCR (Slope: Steigung, Intercept: Achsenabschnitt, R ² : Bestimmtheitsmaß)	57
Abbildung 12: Amplifikationskurven zu der Standardgeraden aus Abb. 8 (Delta Rn: relative Fluoreszenzwerte, Cycle Number: Anzahl der PCR-Zyklen).....	58
Abbildung 13: Pyrogramm.....	59
Abbildung 14: Grafische Darstellung der prozentualen Verteilung der mittels nested PCR positiv getesteten Wildschweinproben in den einzelnen Bundesländern und für Deutschland.....	60
Abbildung 15: Boxplots der logarithmierten PCV-2- Gehalte bei verschiedenen Geweben vom Wildschwein	63
Abbildung 16: Boxplots der logarithmierten PCV-2- Gehalte in verschiedenen Geweben beim Hausschwein	64
Abbildung 17: Nichtparametrische Darstellung der log ₁₀ PCV-2-Gehalte (Durchschnitt der Gewebe) nach Bundesländern, differenziert zwischen Haus (HS)- und Wildschwein (WS). Unterschiede im PCV-2-Gehalt zwischen Haus- und Wildschwein sind mit Ausnahme der Länder 10 und 11 statistisch signifikant mit P = 0,006 (Land 6), P = 0,002 (Land 12) und P<0,0001 (alle übrigen Länder).....	66
Abbildung 18: PCV-2 DNA-Titer bei Haus- und Wildschweinen nach Geweben und Anteil der Tiere	67
Abbildung 19: Verteilung der ORF3-Genotypen innerhalb Deutschlands, nach Wild- (WS) und Hausschweinen (HS) getrennt.	70

Abbildung 20: Geographische Verteilung der ORF2-/ORF3-Genotypkombinationen bei Wild- und Hausschweinen in Deutschland. Weiße Kreise: Nummer des Jagdgrundes; graue Kreise: Nummer der Herkunftsregion der Hausschweine; weiße und graue Kästen: Kombination von ORF2- (links) und ORF3-Genotyp (rechts) für jeweils Wild- (weißer Kasten) und Hausschwein (grauer Kasten).....	74
Abbildung 21: Darstellung der Herkunftsregionen der Wild- und Hausschweine (die Zahlen in den Kreisen geben die Virusbelastung in log PCV-2 DNA-Äquivalente pro µg DNA an)	78

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Taxonomie der Familie Circoviridae (Mc Nulty et al., 2000).....	5
Tabelle 2: <i>Open reading frames</i> (ORF) bei PCV-2	9
Tabelle 3: Durch PMWS hervorgerufene pathologische Veränderungen in verschiedenen Organen (Segales et al., 2004).....	21
Tabelle 4: Histologische Befunde von 396 Schweinen mit PMWS (Segales et al., 2004)	22
Tabelle 5: Anzahl der pro Bundesland beprobten Wild- und Hausschweine	36
Tabelle 6: Organverteilung der Proben	36
Tabelle 7: Zahnaltersschätzung beim Wildschwein nach Stubbe, 2004	41
Tabelle 8: Zahnaltersschätzung beim Hausschwein nach Dyce et al., 1991	42
Tabelle 9: Primer für die konventionelle (nPCR) und quantitative PCR (qPCR)	46
Tabelle 10: Primer für die Pyrosequenzierung.....	51
Tabelle 11: Alter und Gewicht der Wildschweine nach Bundesländern.....	55
Tabelle 12: Alter und Gewicht der Hausschweine nach Bundesländern	56
Tabelle 13: Anteile (%) mit nested PCR getesteter PCV-2-positiver Wildschweine in Deutschland, sowie in den einzelnen Bundesländern	60
Tabelle 14: PCV-2-Gehalte je µg DNA (Werte logarithmiert), gemittelt über alle Gewebe (Tonsille, Lunge, Milz, Lnn mediastinales) bei Wildschweinen in Deutschland und in den einzelnen Bundesländern.....	61
Tabelle 15: PCV-2-Gehalte je µg DNA (Werte logarithmiert), gemittelt über alle Gewebe (Tonsille, Lunge, Milz, Lnn mediastinales) bei Hausschweinen in Deutschland und in den einzelnen Bundesländern.....	62
Tabelle 16: Numerische Werte für Boxplot (Abb.16)	64
Tabelle 17: Numerische Werte für Boxplot (Abb.17)	65
Tabelle 18: Verteilung der von PCV-2 abgeleiteten ORF2-Genotypen auf die Bundesländer, getrennt nach Haus- und Wildschwein	68
Tabelle 19: Gesamtvariabilität von PCV-2 Genotypen zwischen Wild- und Hausschwein (in %).....	68
Tabelle 20: ORF3-Genotypen und die von ihnen kodierte Aminosäure	69
Tabelle 21: Verteilung der ORF3-Genotypen innerhalb Deutschlands und der einzelnen Bundesländer nach Wild- und Hausschweinen.....	71
Tabelle 22: PCV-2 ORF2- und ORF3-Genotypkombinationen bei Haus- und Wildschweinen (Angaben in %)	73
Tabelle 23: Vergleich der Genbankdaten mit Sequenzen aus der Pyrosequenzierung	76

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenosin
AASV	<i>american association of swine veterinarians</i>
BB	Brandenburg
BE	Berlin
Bp	Basenpaare
BY	Bayern
BW	Baden-Württemberg
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
ca.	circa
cm	Zentimeter
CPE	Cytopathischer Effekt
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
G	Guanin
g	mittlere Erdbeschleunigung
HE	Hessen
HS	Hausschwein
IFA	<i>immunofluorescence assay</i>
IFT	Immunfluoreszenz Test
Ig	Immunglobuline
IPMA	Immunoperoxidase Monolayer Assay
ICH	Immunhistochemie
ISH	<i>in situ</i> -Hybridisierung
KSP	klassische Schweinepest
kg	Kilogramm
Lnn.	Lymphknoten
LOD	limit of detection (Nachweisgrenze)
LOQ	limit of quantitation (Bestimmungsgrenze)
MAK	monoklonaler Antikörper
M	Molar
mM	millimolar

mg	Milligramm
mgr.	mittelgradig
min	Minute
n	Probenumfang
neg	negativ
ng	Nanogramm
NI	Niedersachsen
nm	Nanometer
n.s.	nicht signifikant
n.u.	nicht untersucht
MV	Mecklenburg-Vorpommern
NW	Nordrhein-Westfalen
ORF	<i>open reading frame</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PCV-1	Porcines Circovirus Typ 1
PCV-2	Porcines Circovirus Typ 2
PCVD	<i>porcine Circovirus diseases</i>
PCVAD	<i>porcine circovirus associated diseases</i>
PDNS	<i>porcine dermatitis and nephropathy syndrome</i>
pi	<i>post infectionem</i>
PK 15	„porcine kidney“, Schweinenierenzelllinie
PMWS	<i>postweaning multisystemic wasting syndrome</i>
PNP	Proliferative Nekrotisierende Pneumonie
pos	positiv
PPV	porcines Parvovirus
PRRSV	Porcines reproduktives und respiratorisches Syndrom Virus
qPCR	quantitative PCR, hier auch als Realtime PCR bezeichnet
RFLP	<i>restriction fragment length polymorphism</i>
RP	Rheinland-Pfalz
sec	Sekunde
SH	Schleswig-Holstein
SL	Saarland
SN	Sachsen
ST	Sachsen-Anhalt

T	Thymin
TH	Thüringen
u.a.	unter anderem
V	Volt
WS	Wildschwein
ZNS	Zentrales Nervensystem
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
μM	mikromolar

1 Einleitung

Das Porcine Circovirus vom Typ 2 (PCV-2) verursacht weltweit große wirtschaftliche Verluste in der Schweineproduktion (Armstrong und Bishop, 2004).

PCV-2 gilt als essentieller Erreger einer Reihe von Schweinekrankheiten, die heute allgemein unter dem Begriff PCVD (Allan et al., 2002; Segales et al., 2005a) bzw. PCVAD (AASV, 2007), zusammengefasst werden.

Hierzu gehören insbesondere das Post-Weaning Multisystemic Wasting Syndrome (PMWS) (Harding, 1996), das Porcine Dermatitis und Nephropathie Syndrome (PDNS) (Seagales et al., 1998), sowie respiratorische Probleme (Pesch et al., 2000) und Reproduktionsstörungen (Pensaert et al., 2001).

In Deutschland wurde PCV-2 erstmals im Jahre 1998 nachgewiesen (Hinrichs et al., 1999). Allerdings zeigen retrospektive Untersuchungen mittels Immunfluoreszenz-Antikörpernachweis, dass PCV-2 bereits im Jahr 1962 bei deutschen Schweinen vorlag (Krüger, 2005). In weiteren retrospektiven, serologischen Studien wurden PCV-2-spezifische Antikörper in Proben aus dem Jahr 1969 nachgewiesen (Rodriguez-Arrijo et al., 2003; Sanches et al., 2001; Laborque et al., 2000). Aus diesen frühen Zeiträumen der PCV-2-Geschichte liegen jedoch kaum Untersuchungen zu Prävalenzen vor.

Aktuelle Studien gehen bei Untersuchungen von Hausschweinen mittels PCR von Prävalenzen zwischen 60 und 95,7 % aus (Schmoll, 2008; Vorbucher, 2000).

Bei Wildschweinen wurden Antikörper gegen PCV-2 bereits in mehreren Ländern per Serologie (Belgien: Sanchez et al., 2001a; Spanien: Vicente et al., 2004; Ruiz-Fons et al., 2006; Tschechien: Sedlak et al., 2008) nachgewiesen. Außerdem fanden Studien zur Prävalenz mit Hilfe des direkten Antigennachweises und über den Nachweis von viraler DNA statt (Spanien: Vicente et al., 2004; Deutschland: Knell et al., 2005b; Ungarn: Csagola et al., 2006). Die Seroprävalenzen lagen bei den Untersuchungen zwischen 20 und 40 %. Dies spricht für eine weite Verbreitung von PCV-2 innerhalb der Wildschweinpopulation (Ruiz-Fons et al., 2008). Obwohl eine relativ hohe Seroprävalenz bei den Wildschweinen vorherrscht, sind PMWS-Fälle bei Wildschweinen

selten und beziehen sich meist nur auf einzelne Tiere oder kleine Gruppen (Nordamerika: Ellis et al., 2003; Deutschland: Schulze et al., 2003; Spanien: Vicente et al., 2004; Kroatien: Lipej et al., 2008; Griechenland: Sofia et al., 2008; Italien: Petrini et al., 2009).

Serologische Untersuchungen oder der Nachweis von PCV-2-DNA mittels konventioneller PCR lassen sich aufgrund der hohen Inzidenz von subklinischen Infektionen bei Hausschweinen kaum für die Diagnostik von PCVD heranziehen (LaRochelle et al., 2003). Antikörper werden erst ein bis zwei Wochen nach Erregerkontakt ausgebildet und bleiben noch monatelang nach Abklingen der Krankheit nachweisbar. Die konventionelle PCR weist schon früh im Infektionsgeschehen positive Tiere nach; allerdings korreliert der Nachweis nicht mit dem Auftreten klinischer Krankheitssymptome, weil schon geringe Mengen an Virus DNA zum Nachweis ausreichen (weniger als 10 Virusgenome pro Ansatz). In mehreren Studien wurden allerdings Assoziationen zwischen PCVD und Erregermenge nachgewiesen (Brunborg et al., 2004; Oliveira et al., 2004; Segales et al., 2005b). Daher kommt dem quantitativen Erregernachweis von PCV-2 eine ungleich höhere diagnostische Aussagekraft hinsichtlich PCVD zu.

Bei Wildschweinen liegen bislang nur wenige Daten bezüglich des PCVD-Status und der PCV-2-Belastung vor. Auch bleibt bislang verborgen, ob Wildschweine als Reservoir für PCV-2 angesehen werden müssen, oder ob in irgendeiner Weise eine Übertragung zwischen Haus- und Wildschwein möglich und von Bedeutung ist. Daher ist es Ziel dieser Arbeit, die PCV-2-Belastung bei Wildschweinen aus deutschen Revieren zu untersuchen, den PCVD-Status zu bestimmen und auf der Basis von Sequenzanalysen eine Aussage über den Austausch von PCV2 zwischen Haus- und Wildschwein vorzunehmen.

2 Literaturübersicht

2.1 Historie

Mittlerweile zählt das porcine Circovirus 2 zu den wichtigsten wirtschaftlichen Faktoren in der Schweineproduktion. Weltweit entstehen große Verluste durch Erkrankungen, die mit PCV-2 assoziiert sind (Armstrong und Bishop, 2004).

Tischer et al. entdeckten bereits im Jahre 1974 in einer permanenten porcinen Nierenzelllinie (PK-15) eine apathogene Kontaminante und beschrieben sie als *picornalike particles*.

In den folgenden Jahren untersuchten Tischer et al. das neu entdeckte Virus und fanden ein ringförmiges, einzelsträngiges Genom und bezeichneten es daher als porcines Circovirus (Tischer et al., 1982). Bei serologischen Studien in den 80er Jahren im Norden und Osten Deutschlands, fand sich in der Schweinepopulation eine hohe Seroprävalenz für das damals entdeckte Circovirus (Tischer et al., 1986).

Aufgrund dieser Ergebnisse und fehlender Hinweise auf eine Bedeutung im Krankheitsgeschehen bei serologisch positiven Tieren, kamen Tischer et al. (1986) zum Schluss, dass es sich um ein apathogenes Virus handeln müsse (Tischer et al., 1986).

Wenige Jahre später (1991) wurde bei einer Sauherde in Saskatchewan, Kanada, erstmals das Krankheitsbild des PMWS beschrieben (Harding 1996, Clark 1996). Die Krankheit betraf vor allem Läufer und Aufzuchtsschweine. Bei diesen Tieren wurde klinisch Kümern, Blässe sowie vereinzelt Ikterus beobachtet. Bei der pathologischen Untersuchung wurden bei allen Tieren gleichartige Läsionen in den lymphatischen Organen gefunden – es handelt sich dabei vor allem um eine Lymphozyten-depletion. Erst 1997 gelang es Clark, bei den erkrankten Tieren das porcine Circovirus nachzuweisen. Beim Vergleich der Nukleotidsequenzen des apathogenen porcinen Circovirus mit dem aus den erkrankten Schweinen isolierten porcinen Circovirus fielen große Unterschiede auf. Die PCV-2-Nukleotidsequenzen aus PMWS erkrankten Tieren wiesen untereinander eine Homologie von 96 % auf, im Vergleich

zu den Sequenzen aus der PK-15-Zelllinie betrug die Homologie 80 % (Hamel et al., 1998; Meehan et al. 1998; Morozov, 1998).

1998 gelang es Hinrichs et al. erstmals in Deutschland PCV-2 mittels PCR nachzuweisen (Hinrichs et al., 1999). Dies führte zur Unterscheidung in das apathogene PCV-1 und das pathogene PCV-2 (Allan et al, 1999). Weltweit registrierte man in den nächsten Jahren zahlreiche PMWS-Ausbrüche. Parallel zu PMWS wurden weitere mit PCV-2 assoziierte Krankheiten beschrieben:

- Porcines Dermatitis und Nephropathie Syndrom (PDNS) (Segales et al., 1998a; Rosell et al., 2000b)
- Proliferative Nekrotisierende Pneumonie (PNP) (Pesch et al., 2000; Allan und Ellis, 2000; Rosell et al., 2000b)
- PCV-2-assoziierte Reproduktionsstörungen (Ladekjaer-Mikkelsen et al., 2001; O'Connor et al., 2001; West et al., 1999)
- PCV-2-induzierter kongenitaler Tremor (Stevenson et al., 2001)
- PCV-2-assoziierte zerebelläre Enzephalopathie der Absetzferkel (Bürgmann et al., 2003)

Diese Erkrankungen werden heute unter dem Begriff *porcine circovirus diseases* (PCVD) (Allan et al., 2002; Seagles et al., 2005a) oder *porcine circovirus associated diseases* (PCVAD) (AASV, 2007) zusammengefasst.

2.2 Taxonomie, Morphologie und Eigenschaften

Nach seiner Entdeckung durch Tischer et al. im Jahre 1974 wurde das porcine Circovirus als ein einzelsträngiges, unbehülltes DNA-Virus mit zirkulär vorliegendem Genom klassifiziert (Tischer, 1982; Buhk, 1985; Meehan et al., 1997).

Einige Jahre später wurde dann die Unterscheidung in das apathogene PCV-1 mit einer Genomgröße von 1758 Basen und das pathogene PCV-2 mit einer Genomgröße von 1768 Basen eingeführt (Hamel et al., 1998; LaRochelle et al., 1999; Fenaux et al., 2000).

Tabelle 1: Taxonomie der Familie Circoviridae (ICTV 9th report)

Genus Circovirus	<i>Beak and feather disease virus (BFDV)</i>
	<i>Pigeon circovirus</i>
	Porcines Circovirus 1 und 2
	<i>Goose circovirus</i>
	<i>Canary circovirus</i>
Genus Gyrovirus	<i>Chicken anemia virus</i>

Die Größe des unbehüllten ikosaedral angeordneten Nukleokapsids beträgt nur 17 nm; somit handelt es sich bei Circoviren um die zurzeit kleinsten bekannten, auf DNA basierenden, Säugetierviren (Tischer, 1987). PCV-2 ist sehr stabil gegen Umwelteinflüsse, hält einem pH-Wert von 3, hohen Temperaturen (70°C über 15 Minuten) und Chloroform stand (Allan et al., 1994).

Somit ist eine ausreichende Desinfektion gegen PCV relativ schwierig. Desinfektionsmittel auf Basis von Chlorhexidin, Formaldehyd, Jod und Alkohol zeigen kaum Wirkung (Royer et al., 2001). Desinfektionsmittel auf Basis von Phenolen, quartären Ammoniumsalzen, Natronlauge und oxidierenden Agenzien reduzieren die PCV-Belastung bei *in-vitro*-Versuchen (Royer et al., 2001).

2.3 Genetische Charakterisierung porciner Circoviren

Die Nukleotidsequenzen von PCV-1 und PCV-2 sind seit den 90er Jahren identifiziert und wurden in verschiedenen Studien miteinander verglichen.

Diese Homologiestudien zeigten, dass es zwischen den Spezies PCV-1 und PCV-2 eine Homologie von 80 % gibt (Hamel et al., 1998, Meehan et al., 1998). Die Homologie innerhalb der Spezies hingegen liegt bei mehr als 96 % (Meehan et al., 1998). Besonders groß sind die Unterschiede im Bereich des ORF2, der für das Kapsidprotein kodiert. Hier beträgt die Homologie auf Nukleotidebene lediglich 67 % nach Morozov et al. (1998) und 62 % nach Meehan et al. (1998). Auch neuere Studien ziehen den variablen ORF2 immer wieder für phylogenetische Studien heran, so

beruhen die Einteilungen nach Olvera und Segales (Olvera et al., 2006; Segales et al., 2008) beide auf diesem Abschnitt.

Für die Replikation im Zellkern benötigt PCV aufgrund seiner geringen Genomgröße und der daraus folgenden geringen Kodierungskapazität wahrscheinlich Proteine der Wirtszellen (Mankertz et al., 2004). Untersuchungen der Replikationsmechanismen und der Genomsequenz zeigen, dass PCV mit Hilfe des sogenannten *rolling circle*-Mechanismus repliziert wird (Mankertz et al., 1997; Mankertz et al., 1998). Dieses Replikationsprinzip findet sowohl bei Viren als auch bei Plasmiden Anwendung. Bei Vorliegen einer Doppelstrang-DNA wird dabei ein Strang von einer Endonuklease aufgebrochen. Im Fall der porcinen Circoviren wird der DNA-Einzelstrang vorher in einen DNA-Doppelstrang umgewandelt und dann geschnitten. Bei Geminiviren, die sich ebenfalls nach dem *rolling circle*-Mechanismus replizieren, ist es Forschungsgruppen gelungen, die genaue Schnittstelle der Endonuklease zu lokalisieren (Palmer, 1998; Hanley-Bowdoin et al., 2000). Bei den Circoviren ähnelt die Schnittstellensequenz der der Geminiviren. Das Schneiden zur Erzeugung eines DNA-Plus-Stranges erfolgt bei PCV-2 ebenfalls zwischen den Nukleotiden T und A.

Die Replikation findet ihren Ursprung in der hoch konservierten intergenischen Region, die einen *stem-loop* ausbildet (Mankertz et al., 1997; Meehan et al., 1997). In der Regel wird hierfür ein multifunktionelles Rep-Protein benötigt. Das porcine Circovirus stellt hier eine Ausnahme dar, da es zwei Proteine benötigt, nämlich Rep und Rep' (Hanley-Bowdoin et al., 2000).

Die hochkonservierte Region des *stem-loop* besteht bei den porcinen Circoviren aus vier Hexamer-Wiederholungen und einem hoch konservierten Nonamer an der Spitze, welches zwischen den beiden *open reading frames* (ORF) 1 und 2 liegt. Bei PCV-1 besteht der *loop* aus 12, bei PCV-2 aus 10 Nukleotiden. Essentiell für die Replikation ist ein Octanukleotid innerhalb der *loop*-Sequenz (AGTATTAC). In der Sequenz dieses Octanukleotids gibt es essentielle und nicht-essentielle Nukleotide. Werden essentielle Nukleotide ausgetauscht, so findet keine Replikation statt. Beim Austausch nicht-essentieller Nukleotide läuft die Replikation ohne Beeinträchtigung ab (Cheung, 2004b). Die nicht-essentiellen Nukleotide befinden sich an Position zwei und fünf innerhalb des Octanukleotids (AxTAXTAC).

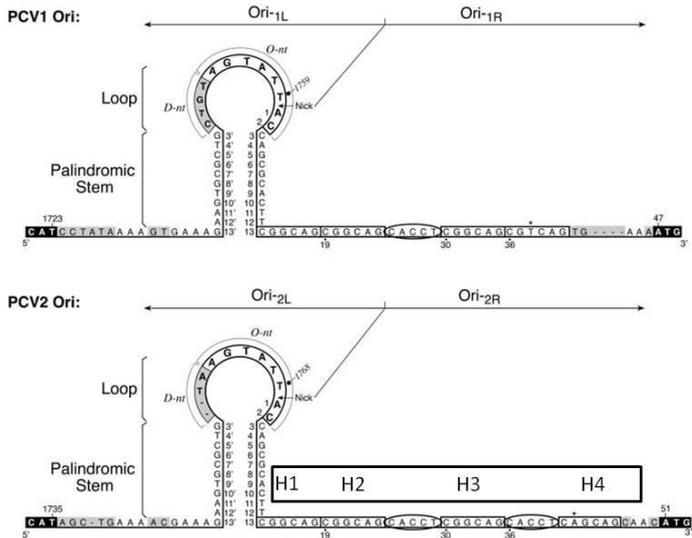


Abbildung 1: Schematische Darstellung des *stem-loop* bei PCV-1 (Access.-No.: AY184287) und PCV-2 (Access.-No.: AY094619) (Cheung, 2004b)

Eine Schlüsselstellung während der Replikation nimmt der als *stem* bezeichnete Stiel des *loops* ein, welcher als palindromische Sequenz vorliegt (Mankertz et al., 1997; Cheung, 2004a). Mankertz und Hillenbrand konnten 2002 bei *in vitro*-Versuchen zeigen, dass der rechte Teil des *loops*, sowie H1 und H2, als minimale Bindungsstelle von Rep und Rep' fungieren. Bei *in vivo*-Untersuchungen konnten hingegen keine spezifischen Bindungen am rechten Arm festgestellt werden (Cheung, 2004a). Jedoch kann die Bindung von Rep und Rep' an H1 und H2 als entscheidender Schritt für die Initialisierung der Replikation angesehen werden (Mankertz und Hillenbrand, 2002). Rep und Rep' werden durch ORF1 kodiert, wobei Rep eine Größe von 312 Aminosäuren aufweist. Für die Bildung des kleineren, nur 168 Aminosäuren großen Proteins Rep' findet während der Replikation ein *splicing* statt (Steinfeldt et al., 2001; Mankertz und Hillenbrand, 2002). Fehlt eines der beiden Proteine, findet keine Replikation statt (Steinfeldt et al., 2001). Dass beide Proteine für die Replikation benötigt

werden ist ungewöhnlich, da bei allen anderen Viren, die diesen Replikationsmechanismus benutzen, nur ein multifunktionelles Rep-Protein gebildet wird (Hanley-Bowdoin et al., 2000).

Der zweitgrößte Leserahmen ORF2 kodiert für das Capsidprotein (Cap) (Nawagitgul et al., 2000). Für die Synthese des Capsidproteins werden nach Mankertz et al. (2004) wahrscheinlich wirtseigene Enzyme verwendet. Das gebildete Protein ist Arginin-reich, umfasst 234 Aminosäuren und hat einen basischen N-Terminus (Fenaux et al., 2000; Mankertz und Hillenbrand, 2002). Elektronenmikroskopisch konnte von Nawagitgul et al. (2000) nachgewiesen werden, dass dieses Protein das Capsid formt. .

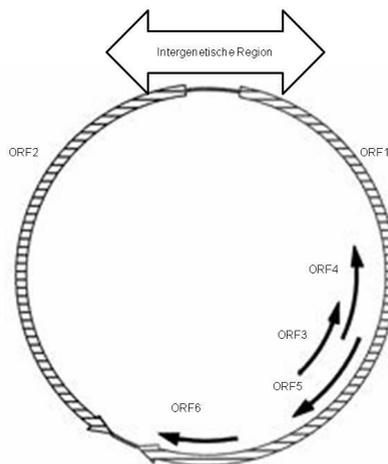


Abbildung 2: Schema des ringförmigen PCV-2-Genoms mit den Leserahmen ORF1 bis ORF6 (Knell, 2005)

Tabelle 2: *Open reading frames* (ORF) bei PCV-2

ORF	Lokalisation	Länge (Bp)
1	53- 998	945
2	1721- 1052	669
3	671- 359	312
4	614- 293	321
5	279- 723	444
6	987- 824	163

ORF3 enthält eine hochvariable Region am 5'-Ende (Segales et al., 2008) und das hiervon abgeleitete Protein spielt bei der Apoptose eine entscheidende Rolle (Liu et al., 2006).

Nach neuestem Kenntnisstand interagiert dieses Protein mit dem Schweinehomologen Pirh2 (pPirh2), einem p53 regulierenden Gen. Karuppannan et al. (2010) zeigten in ihrer Arbeit, dass das ORF3-Protein und p53 um die Bindung an pPirh2 konkurrieren. Diese Wechselwirkung führt zu einer Veränderung der physiologischen zellulären Lokalisation von pPirh2 und zu einer Destabilisierung von pPirh2. Dadurch kommt es zu einer Deregulation von p53 durch pPirh2, was zu erhöhten p53-Spiegeln in der Zelle führt und die Apoptose der infizierten Zelle zur Folge hat.

2.3.1 Definition bekannter PCV-2 Typen und Subtypen

Das Porcine Circovirus 2 kann aufgrund seiner genetischen Struktur, innerhalb des ORF 2, in verschiedene Subtypen unterschieden werden. ORF2 wird als epidemiologischer und phylogenetischer Marker genutzt, da es ausgesprochen variabel ist und sich mit seiner Hilfe Stammbäume erstellen lassen, die mit denen auf Gesamtgenombasis deckungsgleich sind (Larochelle et al., 2002b; Todd et al., 2002; Olvera et al., 2007).

Zurzeit sind je nach Literatur zwei (Segales et al., 2008) bzw. drei (Kim et al., 2009) Subtypen bekannt. Die derzeit offizielle Nomenklatur orientiert sich an Segales und Olvera und nennt drei Subtypen: 2a, 2b und 2c. Die Subtypen werden weiter untergliedert in die Typen: 1A, 1B, 1C, 2A, 2B, 2C, 2D und 2E.

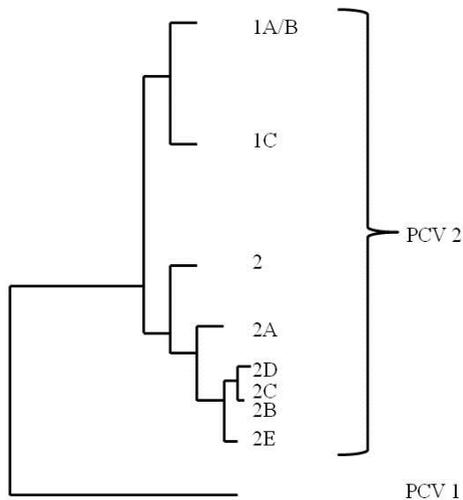


Abbildung 3: PCV-Stammbaum (schematische Darstellung)

2.4 Epidemiologie

Seit der Entdeckung von PCV im Jahre 1974 (Tischer et al., 1974) werden immer neue Studien zur Verbreitung von PCV veröffentlicht. Nachdem Clark 1997 erstmals die Pathogenität von PCV-2 nachwies, konzentrieren sich die Studien vornehmlich auf PCV-2.

Erste Untersuchungen wurden Ende der 70er, Anfang der 80er Jahre bei Hauschweinen an Schlachthöfen in Nord- und Ostdeutschland, sowie bei im Grunewald geschossenen Wildschweinen, durchgeführt. Die auf serologischer Basis erfolgten Nachweise sprachen für eine hohe Prävalenz (77,5 % - 99,5 %) (Tischer et al., 1986). In den nachfolgenden Jahren wurden weitere serologische Studien in Neuseeland, Nordirland, Kanada und Großbritannien durchgeführt, welche die hohen Prävalenzen bestätigten (Edwards und Sands, 1994; Allan et al., 1994; Horner, 1991; Dulac und Afshar, 1989). Weitere serologische Studien wurden von Sanchez (2001a) in Belgien und von Cotrell et al. (1999) unter der Fragestellung einer altersabhängigen Seroprävalenz durchgeführt. Dabei fanden beide heraus, dass im Saugferkelal-

ter etwa 80 % der Tiere positiv sind. Harding et al. (1999) stellten fest, dass dieser Prozentsatz mit steigendem Alter (Absetzferkelalter) signifikant sinkt. In einem Alter von etwa 13 bis 14 Wochen kommt es zu einem erneuten Anstieg der Seroprävalenz (Allan et al., 1994). Bei Untersuchungen von älteren Tieren wurden Seroprävalenzen von bis zu 100 % gefunden (Hassing et al., 2001, Sanchez, 2001b, Harding et al., 1999).

Bei allen vor 1995 durchgeführten serologischen Studien ist zu berücksichtigen, dass diese mittels Immunperoxidase Monolayer Assay (IPMA) oder Immunfluoreszenz Assay (IFA) durchgeführt wurden. Eine Unterscheidung zwischen PCV-1 und PCV-2 ist mit diesen Techniken nicht möglich; daher lassen solche Studien nur eine Aussage über das generelle Vorkommen porciner Circoviren zu.

Im Jahr 2004 wurden erste Untersuchungen zum Einfluss der Variabilität des PCV-2-Genoms auf den Grad der Virulenz durchgeführt; sie zeigten, dass in PMWS-freien Beständen, in denen plötzlich PMWS auftritt, die Variabilität höher liegt. Jedoch konnte man das plötzliche Auftreten nicht auf eine bestimmte PCV-2-Variante zurückführen (DeBoisson et al., 2004). Bei der Untersuchung von 120 Passagen in PK15-Zellen wurden im Bereich des ORF2 nur zwei Mutationen (Nukleotidposition 328 und 573) gefunden. Durch diese Mutationen konnten bei einem Infektionsversuch eine verringerte Wachstumsfähigkeit und eine Abschwächung des Virus *in vivo* nachgewiesen werden (Fenaux et al., 2004b).

Die ältesten Gewebeproben von Schweinen, die auf PCV-DNA untersucht wurden, stammen aus dem Jahr 1963. Sie wurden mittels PCR untersucht und anschließend die Amplifikate mit Hilfe von *restriction fragment length polymorphism* (RFLP) in PCV-1 und PCV-2 differenziert (Hamel et al., 2000). Fünfundfünzig Prozent (931) der Tiere wurden mittels PCR positiv auf PCV getestet und alle PCV-positiv getesteten Tiere erwiesen sich in der RFLP als porcines Circovirus Typ 2 (Hamel et al., 2000).

In Spanien wurden im Jahr 2002 Serumproben und Lymphknoten von 135 Schweinen auf PCV-1 und PCV-2 untersucht. Die Tiere waren zum Teil PMWS positiv. In der Studie wurden sowohl PCR als auch *in situ*-Hybridisierung (ISH) verwendet. PCV-1 spielte bei dieser Studie eine untergeordnete Rolle, wohingegen PCV-2 in 52 % der Serumproben und bei 66 % der Lymphknoten gefunden wurde (Calsamiglia et

al., 2002b). In Deutschland wurde eine ähnliche Untersuchung von Ritzmann et al. (2002) in Bayern durchgeführt. Dabei wurden 335 Schweine aus 156 Betrieben auf PCV-2 untersucht, insgesamt waren 141 Tiere (42 %) positiv. Darüber hinaus stellte Ritzmann fest, dass PCV-2 in allen Betriebsformen vorkommt, die Prävalenz jedoch mit der Betriebsform stark variiert. So waren nur 35 % der Ferkel erzeugenden Betriebe positiv, bei geschlossenen Betrieben waren es 61 % und bei Ferkelaufzucht- oder Mastbetrieben waren es schließlich 81 % bzw. 85 % (Ritzmann et al., 2002). Bei anderen Studien wurden sogar Herdprävalenzen von 100 % angegeben (Rose et al., 2001; Sibula et al., 2001).

Die bisher ältesten mit TaqMan® PCR untersuchten Proben stammen aus den 70er Jahren aus Großbritannien (Grierson et al., 2004). Bei dieser Studie gelang in acht von 25 Fällen (32 %) ein positiver Nachweis für PCV-2. Ein Nachweis PMWS-typischer Läsionen konnte erst in Proben aus 1986 geführt werden.

PCR-Studien kamen bei Wildschweinen zu relativ hohen Prävalenzen (Spanien: Vincent et al., 2004; Deutschland: Knell et al., 2005b; Ungarn: Csagola et al., 2006). Bei serologischen Studien wurden Prävalenzen von 20 % bis 48 % (Belgien: Sanchez et al., 2001a; Spanien: Vicente et al., 2004; Ruiz-Fons et al., 2006; Tschechien: Sedlak et al., 2008) gefunden, was für eine hohe Verbreitung von PCV-2 bei Wildschweinen spricht (Ruiz-Fons et al., 2008). Trotz dieser hohen Seroprävalenz sind Berichte über PMWS bei Wildschweinen sehr selten und beziehen sich entweder nur auf einzelne Tiere oder auf kleine Gruppen (Nordamerika: Ellis et al., 2003; Deutschland: Schulze et al., 2003; Spanien: Vicente et al., 2004; Kroatien: Lipej et al., 2008; Griechenland: Sofia et al., 2008; und Italien: Petrini et al., 2009).

2.4.1 Impfung zur Vorbeugung einer PCV-2-Infektion

Grundsätzlich stehen zwei unterschiedliche Verfahren bei der Impfung gegen PCV-2 zur Auswahl. Zum einen können die Muttersauen vor dem Ferkeln geimpft werden, was zu einer passiven Immunisierung bei den Ferkeln durch die Aufnahme von Kolostrum führt. Zum anderen besteht seit 2010 auch die Möglichkeit, die Ferkel mit Hilfe einer sogenannten *One Shot*-Impfung aktiv zu immunisieren.

Die Muttertierimpfung der Firma Merial besteht aus inaktivierten PCV-2-Partikeln, die Ferkelimpfstoffe der Firmen Intervet und Boehringer Ingelheim hingegen aus einem Antigen der ORF2-Untereinheit. Somit handelt es sich bei den drei Impfstoffen um Totimpfstoffe. Totimpfstoffe weisen im Allgemeinen geringere Nebenwirkungen auf als Lebendimpfstoffe und können aufgrund der Tatsache, dass sie nicht repliziert werden, auch nicht ausgeschieden werden. Ein Nachteil von Totimpfstoffen ist jedoch, dass der Impfschutz schneller nachlässt als bei Lebendimpfstoffen, was gerade bei der Muttertierimpfung regelmäßige Auffrischungsimpfungen nötig macht.

Die Dauer und der Beginn der Immunität variieren bei beiden Impfstoffen erheblich. So sind Ferkel, die von geimpften Muttertieren stammen, ab der Geburt und bis zu einem Alter von ca. fünf Wochen geschützt, wohingegen die Ferkelimpfungen ab der dritten Lebenswoche (Intervet) bzw. ab der zweiten Lebenswoche (Boehringer Ingelheim) durchgeführt werden können. Die Tiere weisen eine Immunität ab der fünften bis zur 22. Lebenswoche (Intervet), respektive eine Immunität von der vierten bis 17. Lebenswoche (Boehringer Ingelheim), auf (Herstellerangaben). Somit werden von den Herstellern unterschiedliche Zeiträume abgedeckt und die Wahl des Impfstoffes richtet sich nach den speziellen Betriebsbedingungen.

Daraus ergibt sich, dass der Impfstoff der Firma Merial besonders für Ferkelerzeuger geeignet ist, welche PCV-2-bedingte Verluste haben. Nach Sibila et al. (2004) kommt es in ferkelerzeugenden Betrieben, in denen PMWS auftritt, zu einer Verschiebung der Infektionsspitzen bei ein bis fünf Wochen alten Tieren. Gerade in solchen Fällen zeigt die Muttertierimpfung sehr gute Erfolge, da so die Verluste durch Aborte und Totgeburten deutlich reduziert werden können (Joisel et al., 2006; Nauwynck et al., 2007). Der Impfstoff der Firma Intervet eignet sich aufgrund seiner relativ langanhaltenden Immunität speziell für Betriebe mit Problemen in Aufzucht oder Mast. Eine Zulassung für die Immunisierung tragender Tiere liegt nicht vor.

Takahagi et al. (2009) zeigen in ihrer Arbeit, dass die Wirksamkeit der Impfung von den vorherrschenden PCV-2-Genotypen abhängig ist. In der Studie wurde in japanischen Betrieben die Wirksamkeit der PCV-2-Impfung (Porcillus PCV, Intervet) untersucht. Durch den Einsatz der Impfung konnte in vielen Betrieben eine deutliche Reduktion der Verluste erreicht werden, wenn PCV-2 vom Typ 2a-2 und 2b vorlag. Bei Infektionen mit PCV-2 Typ 2a-1 wurde hingegen kein Rückgang der Verluste durch

PCV-2 festgestellt. Die Typen wurden anhand einer RFLP erstellt. Dadurch ergab sich eine Aufspaltung des Typs 2a.

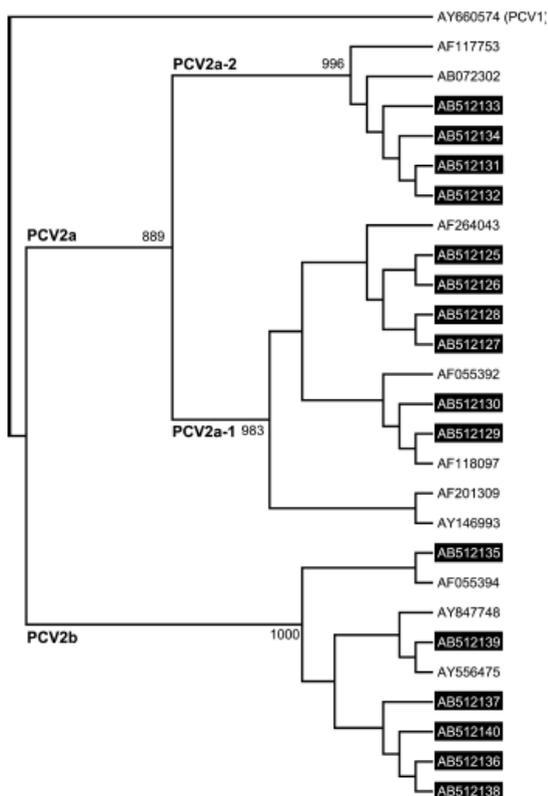


Abbildung 4: Der Stammbaum zeigt die genetische Distanz der in der Studie von Takahagi et al. (2009) untersuchten PCV-2-Stämme. Dabei entspricht PCV2a-2 dem Cluster -2A der Olvera-Klassifikation.

2.5 PCV-2 beim Wildschwein

Bis zur vorliegenden Arbeit waren nur wenige Ergebnisse zur Verbreitung von PCV-2 bei Wildschweinen verfügbar. Erste Untersuchungen stammen aus dem Jahr 1986. Zu diesem Zeitpunkt wurden hauptsächlich Proben von Schlachtschweinen und einige wenige Wildschweine auf PCV-Antikörper untersucht. Zu beachten ist, dass bei dieser Untersuchung keine Unterscheidung zwischen PCV-1 und PCV-2 durchgeführt wurde. Die Antikörpertiter der Wildschweine lagen bei 1:2, 1:10, 1:20 und 1:80 (Tischer et al., 1986). Die festgestellten Titer deuten auf eine vorhandene, aber geringe Infektionsbelastung hin.

Obwohl bekannt war, dass PCV-2 bei Wildschweinen vorkommt, dauerte es einige Jahre bis erstmals PCV-2 sicher identifiziert werden konnte. Im Jahr 2003 gelang es Ellis et al. (2003) bei in Gattern aufgezogenen Wildschweinen PCV-2 mittels Immunhistochemie und *in situ*-Hybridisierung nachzuweisen. Eine Sequenzierung ergab eine Homologie von 96,7 % für ORF 2 (Ellis et al., 2003). Klinisch waren die Tiere aufgrund von Kümern und einer Enteritis auffällig.

Neuere Studien über die Verbreitung von PCV-2 bei Wildschweinen stammen aus europäischen, amerikanischen und asiatischen Ländern, u.a. aus Spanien, Ungarn, Belgien, Tschechien, Nordamerika, Korea, Kroatien, Griechenland, Italien und Deutschland.

Serologische Untersuchungen in Belgien (Sanchez et al., 2001a) ergaben eine Seroprävalenz von 34,6 % (9 von 26 Tieren), in Spanien (Segales et al., 2002c) lag sie bei 35,6 % (100 von 281 Tieren). Die größte bis jetzt durchgeführte serologische Studie stammt aus dem Jahr 2004, in der Vicente et al. (2004) 656 Wildschweine aus Spanien untersuchten. Die Tiere stammten aus verschiedenen Populationen. Er ermittelte bei diesen Tieren eine durchschnittliche Seroprävalenz von 47,9 %, mit einer Abweichung von +/- 1,9 %. Dabei war ein klarer Einfluss der Haltungs-/ Lebensbedingungen der Tiere auf die Seroprävalenz und die Titerhöhe erkennbar.

Obwohl aus Deutschland und der näheren Umgebung nur wenige Daten vorliegen, liegen doch zwei gut beschriebene PMWS-Fälle vor. In Brandenburg wurde ein abgemagerter, etwa 10 Monate alter Keiler gefunden, der petechiale Blutungen aufwies. Bei der histologischen Untersuchung wurden die typischen Veränderungen für PMWS gefunden, wie lymphozytäre Depletion in Lymphknoten, Milz, Lunge, ebenso fanden sich histiozytäre Infiltrationen und synzytiale Riesenzellen, welche sich auf die Lymphknoten beschränkten. Ebenfalls wies das Tier bei der Obduktion eine Pneumonie und herdförmige Nekrosen in der Leber auf. Bei der mikrobiologischen Untersuchung fanden sich gramnegative Stäbchen, welche als *Salmonella choleraesuis* var. Kunzendorf klassifiziert werden konnten. Mit Hilfe des Elektronenmikroskops konnten in der Immunfluoreszenzmikroskopie mehrere Circoviruspartikel dargestellt werden. Die in der semi-quantitativen PCR bestimmte Virusbelastung ergab relativ hohe Werte, die sogar über den Werten von an PMWS erkrankten Hausschweinen lagen (Schulze et al., 2003). Ein anderes ebenfalls aus Brandenburg stammendes

Kreuzungstier aus Haus- und Wildschwein, wurde von Segales untersucht. Dieses Tier wies im Gegensatz zum oben beschriebenen Tier nur geringgradige Veränderungen des Lymphgewebes auf. Aufgrund der niedrigen PCV-2-Belastung wurde dieser Fall als ein moderater Fall von PMWS eingestuft (Segales et al., 2003b).

In einer aktuellen Studie zur PCV-2-Verbreitung bei deutschen Wildschweinen kommt Knell mittels PCR zu Prävalenzen von 21,9 % für PCV-1 und 18,1 % für PCV-2 in Gewebeproben (Knell, 2005b). Dabei ist jedoch der relativ kleine Probenumfang wie auch die räumliche Eingrenzung zu beachten.

2.6 Pathogenese

Da es sich bei durch PCV-2 verursachten Erkrankungen um eine Vielzahl verschiedener Krankheitsbilder handelt, wird die Pathogenese anhand einer bekannten Krankheitsform, dem PMWS (Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome), erläutert.

Auch bei PMWS ist die Pathogenese nur teilweise bekannt. Gefunden wurde PCV-2 in Nasen- und Augentupfern (Krakowka et al., 2000b), Sperma (LaRoche et al., 2000b) und Kot (Tischer et al., 1986; Yan et al., 2003). Darüber hinaus fand sich PCV-2 bei Neugeborenen (Tschachtschal, 2000), sowie in abortierten Feten (West et al., 1999). Diese Befunde lassen Raum für die Vermutung, dass sowohl eine horizontale als auch eine vertikale Übertragung denkbar ist (Allan et al., 1995; Kim et al., 2004).

PCV-2 kann in vielen Sekreten und Exkreten von Schweinen gefunden werden, obwohl nicht immer eine klinisch manifeste Infektion vorliegen muss (Krakowka et al., 2005). Diese Aussage unterstreicht die Ergebnisse von Sibila et al. (2001), die in Nasentupfern PCV-2 nachweisen konnten, obwohl bei den Tieren weder klinische Symptome noch eine Virämie vorlagen. Zusammenfassend kann man daraus schließen, dass für den Ausbruch von PMWS eine bestimmte Menge Virus erforderlich ist (Olvera et al., 2004).

Bei einem Infektionsversuch wurden Ferkel intranasal, oral und intravenös mit PCV-2 infiziert. Bereits einen Tag post infectionem (p.i.) konnte Virus mit Hilfe der indirekten

Immunfluoreszenz in Thymuszellen nachgewiesen werden (Allan et al., 1995). Am Tag drei p.i. waren die Mesenteriallymphknoten, Lunge, Leber und Milz positiv für Virusantigen. Am Tag fünf war zusätzlich der Dünndarm positiv. Bei Tieren innerhalb dieses Versuchs, die nur intranasal infiziert waren, zeigte sich ein vergleichbares Verteilungsmuster. Zu den Zielzellen von PCV-2 gehören in allen Geweben die Makrophagen (Allan, et al., 1995). Nach Sanchez (2003) sind die Makrophagen vermutlich ein Transportmittel und Rückzugsort (Persistenz). PCV-2 benötigt für die Replikation aktive, sich teilende Zellen, da es für keine eigene DNA-Polymerase kodiert (Tischer et al., 1987). Gilpin et al. (2003) führen den hohen Virusgehalt der Makrophagen auf die phagozytierenden Eigenschaften dieser Zellen zurück.

Um eine maximale Replikationseffizienz zu erreichen, werden sich häufig teilende Zellen benötigt. Daraus resultiert, dass sich die Zielzellen mit zunehmendem Alter der Tiere verändern. Meist tritt PMWS im Alter von sieben bis fünfzehn Wochen auf. Da die Serokonversion in der Regel zwei bis vier Wochen dauert (Opriessing et al., 2004; Magar et al., 2000), muss die Infektion wahrscheinlich in den ersten Wochen der Aufzucht stattfinden. In der Anfangsmast und bei den Läufer-schweinen erreicht die Seroprävalenz annähernd Werte um 100 %, wobei die Morbidität zwischen null % und 20 % liegt.

Obwohl es bisher nicht wissenschaftlich belegt ist, gilt die Transmission auf oronasalem Weg als am wahrscheinlichsten (Rosell et al., 1999; Krakowka et al., 2003). Nach Eintritt durch die Nase oder den Rachenraum befällt das Virus als erstes das lokale Lymphgewebe (Tonsillen und regionale Lymphknoten) - hier findet die primäre Vermehrung statt. Wie die Verbreitung im gesamten Organismus abläuft, ist noch weitestgehend unklar. Entweder wird das Virus intrazellulär in Makrophagen oder anderen Antigen präsentierenden Zellen verbreitet oder es ist frei in Lymphe und Blut (Segales et al., 2004) oder wird gleichzeitig über beide Wege verbreitet. Nach Calsamiglia et al. (2002a) kommt es im Anschluss an die primäre Vermehrung zu einer bis zu 28 Wochen dauernden Virämie. Die Virämie steht nicht in direktem Zusammenhang mit einem PMWS-Ausbruch. Mit Hilfe der *in situ*-Hybridisierung und der Immunhistologie war es möglich, virales Antigen / virale DNA in verschiedenen Zellen nachzuweisen. Am häufigsten waren sie per Immunhistologie in den bereits erwähnten Makrophagen, sowie in mehrkernigen Riesenzellen, in Alveolarmakrophagen,

Kupfferschen - Sternzellen und dendritischen Zellen zu finden (Alla und Ellis, 2000; Rosell et al., 1999). Die primären Zielzellen sind jedoch die Lymphozyten, welche infolge der Infektion zugrunde gehen. Die Makrophagen nehmen die Zellreste auf und werden so Antigenträger (Reiner et al., 2008). Im Verlauf der Infektion scheinen Darmepithelzellen, Hepatozyten, vaskuläre Endothelien, Kupffersche-Sternzellen, sowie interstitielle histiozyten-ähnliche Zellen als Quelle für neues Virusmaterial eine essentielle Rolle zu spielen, da in ihnen das virale Nukleocapsid vorzufinden ist (Krakowka et al., 2003).

Es scheint einen Zusammenhang zwischen hohen Titern und Ausbruch der PDNS zu geben (Wellenberg et al., 2004). Verschiedene Autoren beschreiben einen Zusammenhang zwischen dem Ausbruch von PMWS und einer kritischen Infektionsdosis (Morozov et al., 1998; Liu et al., 2000; Shibara et al., 2000; Darwich et al., 2002; Olvera et al., 2004), darüber hinaus scheinen die klinischen Symptome von PMWS mit der Virusbelastung der Gewebe zu korrelieren (Olvera et al., 2004). Segales gibt einen Schwellenwert für den Ausbruch von PCVD von $3 \cdot 10^6$ PCV-2 DNA-Äquivalenten pro μg extrahierter DNA an (Segales 2002d; Segales et al., 2005b). Dieser Wert ist mit Werten aus anderen Arbeiten vergleichbar. Bei Brunborg et al. (2004) wird ein Wert von $2 \cdot 10^7$ PCV-2 DNA-Äquivalenten pro μg DNA angegeben.

Kommt es zu einem Ausbruch von PMWS, stehen die lymphozytäre Depletion im Blut wie auch in den lymphoiden Geweben (Rosell et al., 1999; Segales et al., 2000; Drawich et al., 2003), sowie die histiozytären Infiltrationen im Vordergrund des Geschehens. Dies erklärt den immunsupprimierenden Effekt von PMWS (Chianini et al., 2003). Die immunsupprimierende Wirkung von PCV-2 erleichtert die Infektion mit Koerregeren. Am häufigsten tritt eine Vergesellschaftung mit PRRSV (51,9 %) und *Mycoplasma hyopneumoniae* (35,5 %) auf (Pallares et al., 2002). In einer anderen Studie wurde ebenfalls PRRSV (42 %) als häufigster Koerreger (Pogranichniy et al., 2002) isoliert.

2.7 PCV-2-assoziierte Krankheitsbilder

Im Zusammenhang mit PCV-2 sind verschiedene Krankheiten bekannt, von denen einige im Folgenden näher erläutert werden. Die wichtigsten Krankheitsformen sind PMWS (Harding, 1996), PDNS (Segales et al., 1998a), respiratorische Probleme (Pesch et al., 2000) und Reproduktionsstörungen (Pensaert et al., 2001). Seit einiger Zeit spricht man bei durch PCV-2 verursachten Krankheiten entweder von *porcine circovirus diseases* (PCVD) (Allan et al., 2002; Segales et al., 2005) oder von *porcine circovirus associated diseases* (PCVAD) (AASV, 2007).

2.7.1 Postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS)

2.7.1.1 Klinik

Beim *Postweaning multisystemic wasting syndrome* handelt es sich um die bislang wichtigste durch PCV-2 verursachte Krankheit. Erstmals wurde sie von Harding in Kanada beschrieben (Harding, 1996). Vor allem erkrankten Tiere im Alter zwischen sieben und 15 Wochen – abgesetzte Ferkel und Läufer Schweine - (Harding 1998, Segales et al., 2002d), seltener erkrankten Saugferkel (Harding 1996; Le Cann et al., 19997; Clark and Harding, 1998; Domingo and Segales, 1999; Pallares et al., 2002). Bei der Morbidität und Mortalität liegen die Werte im Durchschnitt bei drei % bzw. 70 % (Segales and Domingo, 2002), in Einzelfällen (Neuausbrüche) werden auch deutlich höhere Werte beschrieben (Le Cann et al., 1997; Harding and Clark, 1997).

Das Leitsymptom für das PMWS ist das Kümmern, ein über Wochen anhaltender Gewichtsverlust (Daft et al., 1996; Harding, 1996; Le Cann et al., 1997; Segales et al., 1997; Harding et al., 1999). Des Weiteren findet man vergrößerte Inguinallymphknoten, Blässe, Tachypnoe und Dyspnoe (Cottrelle et al., 1999; Harding et al., 1998; Harding and Clark, 1997). Seltener wurden Fieber, Husten, Durchfall, Ikterus, zentralnervöse Störungen, Magengeschwüre und plötzliche Todesfälle beobachtet (Daft et al., 1996; Le Cann et al., 1997; Wellenberg et al., 2000). Im Verlauf der ersten Krankheitstage verstirbt ein Teil der Tiere, andere erholen sich von der Erkrankung. Einen wichtigen Einfluss auf den Verlauf und die Schwere der Krankheit haben Managementfehler, wie z. B. Überbelegung, Zugluft sowie die Rückführung von kranken

Tieren nach Genesung (Harding and Clark, 1997). Zum anderen beeinflussen Sekundärerreger und Koinfektionen den Krankheitsverlauf (Ellis et al., 2004) und sind für hohe Verluste verantwortlich (Domingo und Segales, 1999).

2.7.1.2 Pathomorphologie

Die Pathomorphologie kann man in makroskopische (Sektionsbefunde) und histologische Befunde aufteilen. In der Sektion fallen bei an PMWS erkrankten Tieren der Kümmerhabitus mit Kachexie, seröse Atrophie des Fettes und Muskelatrophie auf (Segales et al., 2004; Clark, 2006). Des Weiteren findet man vergrößerte Lymphknoten, eine generalisierte Lymphadenopathie und meist auch eine nicht kollabierte, dunkel gefleckte Lunge (Le Cann et al., 1997; Clark und Harding, 1998; Kennedy et al., 1998; Segales et al., 1999; Rosell et al., 1999). Die betroffenen Lymphknoten weisen im Anschnitt eine weiße homogene Fläche auf (Rosell et al., 2000). In seltenen Fällen findet man im Anschnitt multifokale, konfluierende nekrotische Bereiche (Segales et al., 2000). Bei näherer Betrachtung der Lunge fällt ihre fleischige Konsistenz auf. Ihre Oberfläche besitzt ein lobuläres Muster, welches ein unphysiologisches (grau-bräunlich) bis physiologisches (rosa) Farbspektrum aufweist (Le Cann et al., 1997; Clark und Harding, 1998; Segales et al., 1999). Darüber hinaus findet sich bei einem Teil der Tiere ein stark ausgeprägtes interstitielles Ödem (Segales und Domingo, 2002). Weiterhin sind teilweise die Spitzenlappen durch bakterielle Sekundärinfektionen verhärtet. Die Magenschleimhaut weist in der *Pars oesophagea* Magenulzera auf, in deren Folge es gelegentlich zu Blutungen ins Lumen kommt (Clark und Harding, 1998). Die Magenulzera sind dabei keine direkte Folge einer PCV-2-Infektion, sondern beruhen eher auf bakteriellen Infektionen. Möglicherweise können die Ulzera zur Erklärung der Todesfälle bei an PMWS erkrankten Tieren mit herangezogen werden, da sie zu einer Anämie beitragen (Segales et al., 2000). Jedoch wurden auch Anämien bei Tieren ohne Ulzera beschrieben (Darwich et al., 2003). Der Inhalt des Magen-Darm-Traktes erscheint aufgrund der Enteritis oft wässrig (Clark und Harding, 1998). Seltener kommt es zu Veränderungen der Nieren und der Leber. Die Nieren können eine normale Größe aufweisen oder vergrößert sein. Sowohl im Mark als auch in der Rinde der Niere ist oft eine interstitielle Nephritis zu beobachten. Im Nierenbecken findet man häufig ödematisiertes Bindegewebe (Clark, 1996). Leberveränderungen finden sich nur bei 3,3 % der untersuchten Tiere. Die

Größe der Leber variiert von atrophisch bis normal. Das Gewebe hat eine oft nur blasse Farbe und die Oberfläche ist marmoriert (Clark, 1996). In Tabelle 3 werden die verschiedenen pathologischen Veränderungen aufgeführt.

Tabelle 3: Durch PMWS hervorgerufene pathologische Veränderungen in verschiedenen Organen (Segales et al., 2004)

Pathomorphologischer Befund	Anzahl n=396	Prozent [%]
Kümmern/ Kachexie	318	80,3
Nicht kollabierte, fleckig marmorierte Lunge	255	64,4
Bronchopneumonie	235	59,3
Vergrößerung mindestens eines Lymphknotens (Lymphadenopathie)	209	52,8
Magenulcus der <i>Pars oesophagea</i>	113	28,5
Serositis (mono/poly-)	99	25
Seröse Atrophie	90	22,7
Interstitielle Nephritis	73	18,4
Dünnflüssige Ingesta	44	11,1
Leberatrophie	13	3,3
Fibrinös-nekrotisierende Kolitis	13	3,3
Ikterus	12	3
Lymphknotennekrose	9	2,3
Nekrotisierende Pneumonie	8	2
Hepatomegalie	2	0,5

Bei den mikroskopischen Untersuchungen fallen vor allem Veränderungen in den lymphatischen Organen auf (Segales et al., 2004). Charakteristisch für PMWS ist dabei die ausgeprägte lymphozytäre Depletion mit Verlust der physiologischen lymphozytären Architektur in allen lymphoiden Geweben (Clark, 1996; Clark, 1997; Kennedy et al., 1998; Segales et al., 1999; Allan et al., 2004). Die Depletion betrifft sowohl die B-Zell- als auch die T-Zell-Areale (Clark, 1996) und die Antigen-präsentierenden Zellen (Chianini et al., 2003). Die Veränderungen können als pathognomonisch angesehen werden (Segales et al., 2004). Meist sind diese Veränderungen mit einer multifokalen bis diffusen, gering- bis hochgradigen histiozytären und multinukleären Riesenzellinfiltration vergesellschaftet. In der Regel treten diese in den subkapsulären Bereichen und im Mark Sinus, sowie in den Lymphfollikeln, auf (Clark, 1997; Segales et al., 1999).

Tabelle 4: Histologische Befunde von 396 Schweinen mit PMWS (Segales et al., 2004)

Pathohistologische Befunde	Absolute Anzahl der Tiere (n=396)	Anteil der Tiere (%)
Lymphatische Gewebe		
Depletion der Lymphozyten	353	89,1
Infiltration histiozytärer Zellen	305	77
Zytoplasmatische basophile Einschlusskörperchen	137	34,6
Mehrkernige Riesenzellen	113	28,5
Koagulationsnekrose	39	9,9
Lunge		
Interstitielle Pneumonie	304	76,8
Katarrhalisch-eitrige Bronchopneumonie	218	55,1
Nekrotisierende Pneumonie	26	4
Leber (Grad basierend auf der Einteilung von Rosell et al., 2000a)		
Grad 1	131	33,1
Grad 2	34	8,6
Grad 3	8	2
Grad 4	5	1,3
Niere		
Multifokale interstitielle Nephritis	149	37,6
Kolon		
Lymphoplasmazelluläre Kolitis	68	15
Fibrinös-nekrotisierende Kolitis	17	3,8

Bei schwerwiegenden Fällen finden sich zusätzlich runde und basophile Einschlusskörperchen unterschiedlicher Größe im Zytoplasma von mehrkernigen Riesenzellen und Makrophagen (Clark, 1996). Eine weitere Besonderheit stellen die fokalen Koagulationsnekrosen mit ausgeprägter Karyorrhesis in einigen Lymphknoten dar. In diesen Nekrosen sind meist auch vaskuläre Thromben vorhanden, welche bisher pathogenetisch nicht zugeordnet werden konnten (Segales et al., 2004).

Fast so häufig wie Veränderungen der Lymphknoten sind Veränderungen des Lungengewebes (Tabelle 4) (Clark, 1997; Segales, 2004). Meist kommt es im Lungengewebe zu einer interstitiellen Pneumonie (76,8 %) oder einer katarrhalisch-eitrigen Bronchopneumonie (55,1 %). Mit einer Häufigkeit von 4 % tritt im Rahmen von PMWS außerdem eine nekrotisierende Pneumonie auf (Rosell et al., 1999; Segales et al., 1999; Allan et al., 2004). Die interstitielle Pneumonie wird durch die Infiltration mit histiozytären und multinukleären Riesenzellen in den verbreiterten Alveolarsepten

gekennzeichnet. Die gleichen Entzündungszellen sind ebenfalls in der Nähe der Bronchien und Bronchiolen zu finden (Clark, 1997; Segales et al., 1999). Die katarrhalisch-eitrige Bronchopneumonie ist makroskopisch mit einer kranio-ventralen Lungenverfestigung kombiniert, die durch polymorphkernige Neutrophilegranulozyten im Lumen der Alveolen, Bronchiolen und der Bronchien charakterisiert wird (Segales et al., 1999).

Als drittes werden Veränderungen im Lebergewebe beobachtet, die anhand ihres Schwere- und Verteilungsgrades in vier Stadien eingeteilt werden können (Rosell et al., 2000a). Allen gemein ist eine periportale lymphohistiozytäre Infiltration. Vereinzelt kommt es zur Nekrose einzelner Leberzellen, sowie zur Schwellung des Zytoplasmas und einer Vakuolisierung (Clark, 1997). Bei hochgradigen Läsionen kommt es zu einer generalisierten perilobulären Fibrose, die mit einer Zerstörung der lobulären Struktur einhergeht und mit Verlust an Hepatozyten verbunden ist (Clark und Harding, 1998; Segales et al., 1999).

Ähnlich häufig wie Veränderungen der Leber ist die schwere, subakute bis chronische interstitielle Nephritis (37,6 %), die in der Regel mit einer hohen PCV-2-Belastung des Gewebes einhergeht (Segales et al., 2004).

Am seltensten findet sich eine Kolitis. Die gefundenen Entzündungen sind entweder von lymphoplasmazellulärer (15 %) oder von fibrinösem-nekrotisierendem Charakter (Segales et al., 2004).

2.7.2 Porcines Dermatitis und Nephropathie Syndrom - PDNS

2.7.2.1 Klinik

Charakteristisch für dieses Krankheitsbild ist sein Auftreten bei Tieren in der Vor- und Mittelmast mit einem Gewicht von 20 kg bis 70 kg (Helie et al., 1995; Higgins, 1993; Smith et al., 1993). Nach Untersuchungen von Smith liegt die Morbidität bei unter einem Prozent (Smith et al., 1993). Die Letalität hingegen erreicht mehreren Autoren zufolge annähernd 100 %. Wenige Tage nach dem Auftreten der ersten Symptome verenden die Tiere, nur wenige Tiere erholen sich spontan. Als erstes fallen bei an PDNS erkrankten Tieren Hautveränderungen an den Hintergliedmaßen, sowie dem

Flanken- und dem Perianalbereich auf. Die Hautveränderungen sind durch anfangs kleine rote Papeln gekennzeichnet, die im Verlauf der Erkrankung zu ekchymosen Plaques konfluieren (Rosell et al., 2000b; Thibault et al., 1998; Duran et al., 1997; Smith et al., 1993; White und Higgins, 1993). Die Plaques können sich im weiteren Verlauf der Erkrankung zu schwarz-roten Krusten verändern, die auf eine nekrotisierende Dermatitis hinweisen. Bei den Tieren, die sich spontan wieder erholen, heilen die Läsionen ohne weiteres wieder ab, bei schwereren Fällen bleiben narbige Veränderungen zurück. Weitere Symptome sind Blässe, Fieber, Anorexie, ein schwankender Gang und Parese (Segales et al., 1998a). Des Weiteren fallen Abweichungen bei den blutchemischen Untersuchungen auf. Die erhöhten Harnstoff- und Kreatininwerte sprechen in Verbindung mit der beobachteten Proteinurie für ein Nierenversagen (Segales et al., 1998a; Duran et al., 1997; White und Higgins, 1993).

2.7.2.2 Pathogenese

Bei PDNS handelt es sich nach aktuellem Wissensstand um eine immunkomplexvermittelte Erkrankung (Segales et al., 1998a). Mehrere Autoren klassifizieren die zu beobachtende nekrotisierende Vaskulitis, welche vor allem in der Niere und der Haut zu beobachten ist, als eine Hypersensibilitätsreaktion vom Typ III (Segales et al., 1998a; Rosell et al., 2000b; Wellenberg et al., 2004). Im Allgemeinen ist eine Hypersensibilitätsreaktion durch das Vorkommen von Immunglobulinen und Komplementfaktoren gekennzeichnet. Verschiedenen Autoren ist es gelungen, Immunglobuline vom Typ IgG, IgM und IgA, sowie Komplementfaktoren in den Läsionen zu isolieren (Dorlet et al., 1999; Rosell et al., 2000b; Wellenberg et al., 2004). Durch die Reaktion mit Immunglobulinen bei ausbleibender Vernetzung können die Komplexe aus Viren und Antikörpern nicht mehr phagozytiert werden. Diese lagern sich an den Gefäßwänden und in den Glomerula ab und führen dort zu einer massiven Komplementvermittelten Entzündungsreaktion.

2.7.2.3 Pathomorphologie

Im Vordergrund stehen bei der makroskopischen Untersuchung die Hautbefunde, welche sich in erster Linie an den Hintergliedmaßen und dem Perianal-/ Flankenbereich manifestieren. In besonders schweren Fällen kann auch die ganze Körperoberfläche Veränderungen aufweisen. Zu Beginn der Infektion sind nur kleine rote Papeln zu finden, welche sich über ekchymatöse Plaques, bis hin zu einer nekrotisierenden Dermatitis entwickeln können. Bei schweren Verläufen ohne Todesfolge und bei chronischen Verläufen bleiben oft vernarbte Hautareale zurück (White und Higgins, 1993; Duran et al., 1997; Segales et al., 1998a; Dorlet et al., 1999). In der Histologie stehen Hämorrhagien im Korium im Vordergrund, welche im Bereich der Hintergliedmaßen oft von subkutanen Ödemen begleitet werden (Thomson et al., 2002). Bei der Untersuchung der Gefäße in diesen Bereichen findet man eine nekrotisierende Vaskulitis und eine fibrinoide Nekrose der Ateriolen (Thomson et al., 2002). Die eingangs erwähnte nekrotisierende Dermatitis wird oft durch eine Kruste aus Keratin, nekrotischem Debris und sero-zellulärem Material gebildet (Thomson et al., 2002). Die nekrotisierende Vaskulitis ist nicht alleine auf die Haut beschränkt, sie findet sich auch in vielen anderen Organen wie der Milz, dem Herz, dem Magen, der Blase, dem Darm, sowie dem Gehirn und den Lymphknoten (Segales et al., 1998a; Thomson et al., 2002). Die untersuchten Lymphknoten weisen zudem eine für PMWS typische, lymphatische Depletion in unterschiedlichen Ausprägungsgraden auf (Segales und Domingo, 1999).

Den zweiten Hauptbefund bei PDNS stellt die diffuse, fibrinöse bis exsudative Glomerulonephritis dar, welche bei chronischen Verläufen in eine glomeruläre Sklerose, interstitielle Nephritis oder eine tubuläre Atrophie münden kann (Segales et al., 1998a; Thomson et al., 2002). In den Räumen der Glomeruli, wie auch in denen der Tubuli finden sich Fibrin, neutrophile Granulozyten und Erythrozyten (Segales et al., 1998a).

Häufig kommt es im Verlauf der Erkrankung auch zur Manifestierung einer interstitiellen Pneumonie (Segales et al., 1998a).

2.7.3 Poliferativ Nekrotisierende Pneumonie – PNP

Unter dem Begriff PNP versteht man eine poliferativ nekrotisierende Pneumonie, die 1990 in Kanada als eine neue Form der Pneumonie beschrieben wurde (Morin et al., 1990). Die Entdeckung von PNP korrelierte zeitlich mit dem Auftreten einer neuen Erkrankung, die erstmals als *mystery swine disease* bezeichnet wurde. Später wurde die *mystery swine disease* als porcines reproduktives und respiratorisches Syndrom (PRRS) bezeichnet.

Histologische Kriterien bilden bei der Diagnostik von PNP die Grundlage. Denn bei an PNP erkrankten Tieren finden sich in der Lunge nekrotische Zellen, Makrophagen, proteinhaltiges Material in den Alveolen, Proliferationen von Typ II Pneumozyten, hyaline Membranen, sowie eine nekrotisierende Bronchiolitis in Kombination mit einer lymphohistiozytären interstitiellen Pneumonie (Morin et al., 1990, Segales et al., 2004).

Bei der Entdeckung von PNP wurde ursprünglich vermutet, dass es sich bei dem Erreger um Influenza A-Viren handelt (Girard et al., 1992). Spätere Untersuchungen zeigten, dass es häufig zu einer Assoziation von PRRSV und PNP kommt (LaRochele et al., 1994). Manche Autoren vermuteten auch eine Doppelinfection von PCV-2 und PRRSV als Ursache für das klinische Bild von PNP (Ellis et al., 1999b; Pesch et al., 2000). Eine eindeutige Aussage zur Ätiologie von PNP kann bis heute jedoch nicht getroffen werden. Aufgrund von Feldstudien gilt es jedoch als sicher, dass es häufig zu einer Vergesellschaftung von PRRSV, PCV-2 und Influenza A Virus kommt und dies das Risiko von PNP deutlich erhöht (LaRochele et al., 1999; Drolet et al., 2003). Bei allen in dieser Feldstudie erfassten Fällen wurde PRRSV gefunden, wohingegen PCV-2 nur bei 33 % bis 42 % der Fälle auftrat.

2.7.4 PCV-2-assoziierte Reproduktionsstörungen

Kommt es während der Trächtigkeit zu einer Infektion der Feten mit PCV-2, so hat dies sehr unterschiedliche Folgen. Von Aborten, Totgeburten bis hin zur Geburt von lebensschwachen Ferkeln ist alles möglich (West et al., 1999; O'Connor et al., 2001; Kim et al., 2004).

Die ätiologische Bedeutung von durch PCV-2 verursachten Reproduktionsstörungen ist noch nicht endgültig geklärt. Die meisten Untersuchungen stammen aus Kanada aus der Zeit nach 1995. Dabei wurde in einer retrospektiven Studie (1995 – 1998) Abortmaterial von Schweinefeten auf PCV-2 untersucht. Obwohl zu dieser Zeit nachweislich PMWS endemisch auftrat, konnte in keinem Untersuchungsmaterial PCV-2 nachgewiesen werden (Bogdan et al., 2001). Bei einer anderen Studie aus dem Jahr 2003 wurde Serum von 171 totgeborenen Feten untersucht. Bei 28 Proben konnten Antikörper gegen PCV-2 nachgewiesen werden und in 13 dieser Proben wurde auch PCV-2 mittels PCR nachgewiesen (MacDonald et al., 2003). Auch in weiteren Studien lag die Prävalenz für PCV-2 bei totgeborenen Ferkeln nicht deutlich höher (Kim et al., 2004).

Die klinischen Symptome variieren zum Teil erheblich. So wurden bei den Sektionen lymphohistiozytäre Myokarditiden, sowie Lungenveränderungen von gering- bis mittelgradigem Ausmaß gefunden (West et al., 1999; Kim et al., 2004).

Des Weiteren konnten mittels der *in situ*-Hybridisierung in vielen Organen positive Nachweise für PCV-2 geführt werden. Besonders häufig waren Lunge, Thymus, Leber, Milz und Lymphknoten betroffen (Kim et al., 2004).

2.7.5 PCV-2-induzierter Kongenitaler Tremor

Der kongenitale Tremor ist definiert als eine angeborene Bewegungsstörung, die mit unwillkürlichen, streng rhythmischen und sich wiederholenden Kontraktionen antagonistischer Muskelgruppen einhergeht. Die ersten Untersuchungen zu dieser Erkrankung wurden von Stevenson et al. im Jahre 2001 durchgeführt. Der Tremor ist auf die quergestreifte Muskulatur beschränkt und tritt bilateral auf. In besonders schweren Fällen kann sogar die Nahrungsaufnahme der Tiere behindert sein, so dass sie verhungern. Überstehen die erkrankten Tiere die erste Lebenswoche, so heilt der Tremor in Normalfall innerhalb von drei bis vier Wochen aus. Während der Ruhezeiten können die Symptome sogar teilweise bis ganz verschwinden. Werden die Ferkel jedoch übermäßiger Wärme oder Kälte ausgesetzt, verstärkt sich die Klinik (Stevenson et al., 2001).

Wenn man vom kongenitalen Tremor spricht, ist zu beachten, dass es verschiedene Formen gibt. Sie werden als Typ A und Typ B bezeichnet. Zum Typ A werden alle Formen mit morphologischen Läsionen gezählt. Alle anderen gehören dem Typ B an.

Der durch PCV-2 induzierte kongenitale Tremor wird dem Typ A II zugeordnet. Der kongenitale Tremor vom Typ A II beruht auf einer verzögerten Myelinisierung des Rückenmarks. Stevenson et al. (2001) gelang es mit Hilfe der *in situ*-Hybridisierung und der Immunfluoreszenz PCV-2 in den großen Neuronen und in Makrophagen im nicht-neurogenen Gewebe nachzuweisen. Die Abwesenheit von PMWS-typischen granulomatösen Entzündungen erklärte er mit der frühen intrauterinen Infektion. Durch die Infektion vor Erlangen der Immunkompetenz bleiben Entzündungen aus (Stevenson et al., 2001).

2.7.6 PCV-2-assoziierte zerebelläre Enzephalopathie der Absetzferkel

An der PCV-2-assoziierten zerebellären Enzephalopathie erkranken vor allem Absetzferkel mit einem Gewicht von 5 – 20 kg. Die klinischen Symptome reichen von Nystagmus über tonisch-klonische Krämpfe bis zum Opisthotonus und Seitenlage. Oft sind die Tiere abgemagert, zeigen Muskelatrophie und haben ein langes Haarleid (Brüggmann et al., 2003).

Die am häufigsten angetroffenen makroskopischen Auffälligkeiten sind vergrößerte Körper- und Organlymphknoten, sowie hochgradige, leptomeningeale und enzephalopetechiale Blutungen. In den besonders stark betroffenen Mesenteriallymphknoten kommt es neben einer ausgeprägten großflächigen Hyperämie zu scharf demarkierten, trockenen, nekrotischen Arealen. Die petechialen Blutungen der Hirnhäute und im Gehirngewebe konzentrieren sich hauptsächlich auf die Kleinhirnregion (Brüggmann et al., 2003).

Bei der mikroskopischen Betrachtung der veränderten Lymphknoten fallen sowohl die ausgeprägte lymphatische Depletion als auch die fibrinös-nekrotisierende Lymphadenitis auf (Brüggmann et al., 2003). Beide Befunde sind typisch für PCV-2-bedingte Infektionen (Segales et al., 2004). Ebenso typisch sind die zahlreichen, basophilen Einschlusskörperchen in den Makrophagen. Die histologische Untersu-

chung des ZNS zeigt Ringblutungen, die häufig mit einer nekrotisierenden und/oder einer lymphohistiozytären Vaskulitis der Venen und der Arterien hergeht. Diese Vaskulitis erklärt die ausgeprägten Blutungen im enzephalen und leptomenigalen Bereich. Weitere zu beobachtende Veränderungen sind die Neuronendegenerationen und die Neuronennekrose im Kleinhirn (Brüggmann et al., 2003).

Der Erregernachweis gelang sowohl mittels ISH als auch mit PCR aus Lunge, Lymphknoten, Gehirn und anderen Organen. Die meisten positiven Zellen innerhalb des Gehirns sind gefäß-assoziierte Zellen, wie Endothelzellen und perivaskuläre Entzündungszellen (wahrscheinlich Makrophagen) (Brüggmann et al., 2003).

2.8 Nachweisverfahren

Die Identifizierung von PCV-2-positiven Tieren nimmt bei der Bekämpfung von PCV-2-assoziierten Krankheiten einen großen Stellenwert ein. Es wurden verschiedene Nachweisverfahren für PCV-2 etabliert, von denen hier die wichtigsten vorgestellt werden sollen.

2.8.1 Virusanzüchtung

Die Anzucht stellt eine der ältesten Methoden zum Nachweis von Viren dar. Das Vorliegen einer Virusinfektion kann dabei ohne Zuhilfenahme anderer Methoden nur über den cytopathische Effekt (CPE) nachgewiesen werden. Eine Identifizierung des in der untersuchten Probe vorliegenden Virus kann anschließend, z.B. über Immunfluoreszenz (IFT) oder mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern (MAK), erfolgen (Allan et al., 1998).

Da PCV-2 keinen CPE aufweist, ist die Anzucht als diagnostisches Mittel nicht sehr verbreitet. Jedoch ist es möglich PCV-2 in verschiedenen Zelllinien zu kultivieren (Allan et al., 1994; McNeilly et al., 1996). In der von Tischer et al. (1987) erstmals verwendeten PK15-Zelllinie lassen sich die besten Ergebnisse erzielen. Auch in humanen Zelllinien können PCV-1 und PCV-2 persistieren (Hattermann et al., 2004).

2.8.2 Elektronenmikroskopie

Am besten lassen sich die Viruspartikel in PK15-Zellen vermehren und anschließend elektronenmikroskopisch untersuchen (Stevenson et al., 1999). Die infizierten Zellen zeigen elektronendichte Einschlüsse von unterschiedlicher Größe und runder bis ovaler Form. Die Einschlüsse lassen sich anhand ihrer Größe in zwei unterschiedliche Typen einteilen. Die einen sind sehr klein (0,1 bis 0,5 μm) und enthalten lockere Aggregate von ikosahedralen Nukleokapsiden mit einem Durchmesser von 10 bis 14 nm. Die anderen sind deutlich größer (0,5 bis 5 μm) und sind von einer trilaminaren Membran umgeben. Im Inneren befinden sich unterschiedliche Mengen von Virionen und elektronendichte myelinoide, kristalline Lamellen.

Einschlüsse im Inneren von Zellkernen weisen keine Wandhaftung auf und sind meist mit Heterochromatin-Aggregaten und Nukleoli assoziiert. Die Einschlüsse können von unregelmäßiger Gestalt und Größe (10 bis 12 nm) sein oder eine runde Form (0,1 bis 1 μm) mit scharf abgegrenztem Rand besitzen (Stevenson et al., 1999).

2.8.3 Antikörpernachweis

Eine indirekte Methode beruht auf dem Nachweis von Antikörpern gegen PCV-2, diese treten in der Regel 7-14 Tage nach der Infektion auf. Der Nachweis von IgG-Antikörpern deutet auf eine weiter zurückliegende Infektion hin, während der Nachweis von IgM-Antikörpern für eine akute Infektion spricht. Dieses Verfahren wird heutzutage teilweise kommerziell eingesetzt.

2.8.3.1 Indirekter Immunfluoreszenztest und indirekter Immunperoxidasetest

Bei diesen beiden Methoden werden Antikörper gegen PCV-1 und PCV-2 nachgewiesen. Allan et al. (1998) beschreiben sowohl einen indirekten Immunfluoreszenztest als auch einen indirekten Immunperoxidasetest, mit dessen Hilfe zwischen PCV-1- und PCV-2-Antikörpern unterschieden werden kann. Dennoch räumen sie ein,

dass Kreuzreaktionen nicht ausgeschlossen werden können, wenn auch die Titer gegen PCV-1 vergleichsweise niedrig sind. Aufgrund weiterer, aus mehreren Studien bekannten Kreuzreaktionen von PCV-1 mit PCV-2 (Dulac und Afshar, 1989, Rodriguez-Arriola et al., 2000; Calsamiglia et al., 2002b), muss davon ausgegangen werden, dass hohe PCV-1-Titer oftmals falsch eingeschätzt wurden.

2.8.3.2 Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

In der Literatur ist ein ELISA beschrieben, der auf dem Nachweis von IgG-Antikörpern beruht, die spezifisch gegen PCV-2 gerichtet sind (Harding, 1999). Nach Walker et al. (2000) liegt die Sensitivität dieses ELISA's bei 99,58 % und die Spezifität bei 97,14 %. Der Test scheint auch dazu geeignet, Antikörper in Seren anderer Tierspezies nachzuweisen. Ein anderes ELISA-System beruht auf dem Nachweis von Antikörpern, die gegen ein rekombinantes Hauptkapsidprotein gerichtet sind (Nawagitgul et al., 2002).

2.8.4 Antigennachweis

Der Antigennachweis weist, in der Probe befindliches Antigen (Virusbestandteile) nach. Durch diese Methode ist es möglich, schon sehr früh im Infektionsgeschehen einen positiven Erregernachweis zu führen.

2.8.4.1 *In situ*-Hybridisierung (ISH)

Die *in situ*-Hybridisierung ermöglicht es, PCV-2 direkt im Schnittpräparat sichtbar zu machen. Mit dieser Methode kann DNA auch in formalinfixierten und paraffineingebetteten Proben nachgewiesen werden.

Für ISH werden Sonden (künstlich hergestellte markierte Nukleinsäuresequenzen) verwendet, die in der Lage sind, an Nukleinsäuresequenzen des nachzuweisenden

Erregers zu binden. Für den Nachweis von PCV-2 sind sowohl Sonden, die das ganze Genom umfassen (1759 Bp; Allan et al., 1998; McNeilly et al., 1999; Nawagitgul et al., 2000), als auch bedeutend kürzere Sonden beschrieben (40 Bp; Rosell et al., 2000a).

Mit Hilfe der ISH konnte PCV-2 in vielen verschiedenen Geweben nachgewiesen werden. Besonders betroffen waren vor allem lymphatische Gewebe, die Leber, Lunge, Niere, Herz, Dünn- und Dickdarm. Bei den am häufigsten positiven Zellen handelt es sich um Makrophagen, mehrkernige Riesenzellen und histiozytäre Zellen (Rosell et al., 1999; Allan und Ellis, 2000). Die Stärke des Signals ist dabei ein Hinweis auf das Ausmaß der Depletion (Darwich et al., 2002).

Die Sensitivität ist bei dieser Methode nicht sehr hoch, jedoch korrelieren die Ergebnisse deutlich besser mit PMWS-typischen Läsionen als die konventionelle PCR (Calsamiglia et al., 2002c).

2.8.4.2 Immunhistochemie (IHC)

Bei der Immunhistochemie handelt es sich um eine Antigen-Antikörperreaktion, bei der das histologische Schnittpräparat mit einer Antikörperlösung überschichtet wird. Die Antikörper, die in der Regel von der Maus oder vom Kaninchen stammen, sind entweder schon markiert, oder werden im Rahmen der Aufbereitung mit einer zweiten Schicht markierter Antikörper überschichtet. Im positiven Fall kommt es durch Bindung von farblich markierten Antikörper zu einer farblichen Kennzeichnung.

Für die IHC werden sowohl polyklonale (Ellis et al., 1998; McNeilly et al., 1999) als auch monoklonale Antikörper (Ellis et al., 1998; McNeilly et al., 1999, 2001; Grierson et al., 2004) verwendet. Spezielle monoklonale Antikörper aus der Maus, die sich gegen das Kapsidprotein (ORF2) richten, beschreiben Grierson et al. (2004).

2.8.4.3 Fluoreszenz-Antikörper-Test im Gefrierschnitt (FAT)

Der Fluoreszenz-Antikörper-Test im Gefrierschnitt wird analog zur Immunhistochemie durchgeführt. Der Unterschied ist, dass beim FAT das Gewebe nur eingefroren wird

und nicht aufbereitet werden muss. Die Gewebeprobe wird bei -15°C bis -20°C in 5 μm dünne Schichten geschnitten und mit Antikörpern überschichtet. Die Auswertung der Schnitte erfolgt mit dem Fluoreszenz-Mikroskop (Allan et al., 1999).

2.8.4.4 Polymerase Chain Reaction (PCR)

Die Polymerase Chain Reaction (Polymerase Kettenreaktion; PCR) ist in der heutigen Zeit eine der wichtigsten Methoden zum Nachweis von PCV-2. Mit Hilfe der PCR kann PCV-2 aus vielen verschiedenen Probenmaterialien nachgewiesen werden, wie z.B. Nasen-, Augen-, Bronchial-, Tonsillensekret, Samen, Urin und Kot (Krakowka et al., 2000b; Hamel et al., 2000; Calsamiglia et al., 2002c). Aufgrund der hohen Spezifität der eingesetzten Primer ist es mit Hilfe dieser Methode möglich, zwischen PCV-1 und PCV-2 zu differenzieren (Allan et al., 1999; Kim et al., 2001; Deboisseon et al., 2004).

Im Vergleich zur ISH weist die PCR eine wesentlich höhere Sensitivität auf, sodass selbst kleinste Mengen an PCV-2 in einer Probe nachgewiesen werden können, die nicht unbedingt mit dem Auftreten klinischer Symptome assoziiert sein müssen. Daher müssen für eine eindeutige Diagnostik von PCVD stets die histologischen Befunde berücksichtigt werden (Segales und Domingo, 2002), oder es muss eine quantitative PCR durchgeführt werden, mit deren Hilfe die genaue Bestimmung der PCV-2-Belastung möglich ist (Olvera et al., 2004; Rovira et al., 2002; Liu et al., 2000).

3 Eigene Untersuchungen

3.1 Material

Als Untersuchungsmaterial dienten Gewebeproben von Wild- und Hausschweinen.

Die Wildschweine wurden bei Jagden im gesamten Bundesgebiet beprobt (Stadtstaaten Hamburg und Bremen ausgenommen), die Hausschweine an Schlachthöfen in Köln, Andernach, Würzburg, Gießen und Kupferzell.

3.1.1 Probenmaterial

Bei den beprobten Haus- und Wildschweinen handelte es sich um willkürlich ausgewählte Tiere, die als klinisch unauffällig anzusehen waren.

Bei den Wildschweinen wurden die Proben in der Jagdsaison 2004/2005 (n=186), 2005/2006 (n=175) und 2006/2007 (n= 170), bei den Hausschweinen in 2007/2008 (n=308) genommen.

Bei den Hausschweinen wurden zusätzlich 32 Tiere beprobt, die als „nicht für den menschlichen Verzehr geeignet“ klassifiziert und aussortiert wurden.

Die Verteilung der Reviere in Deutschland, innerhalb derer die Tiere beprobt wurden, ist in der Abbildung 5, der Probenumfang in Tabelle 5 dargestellt.

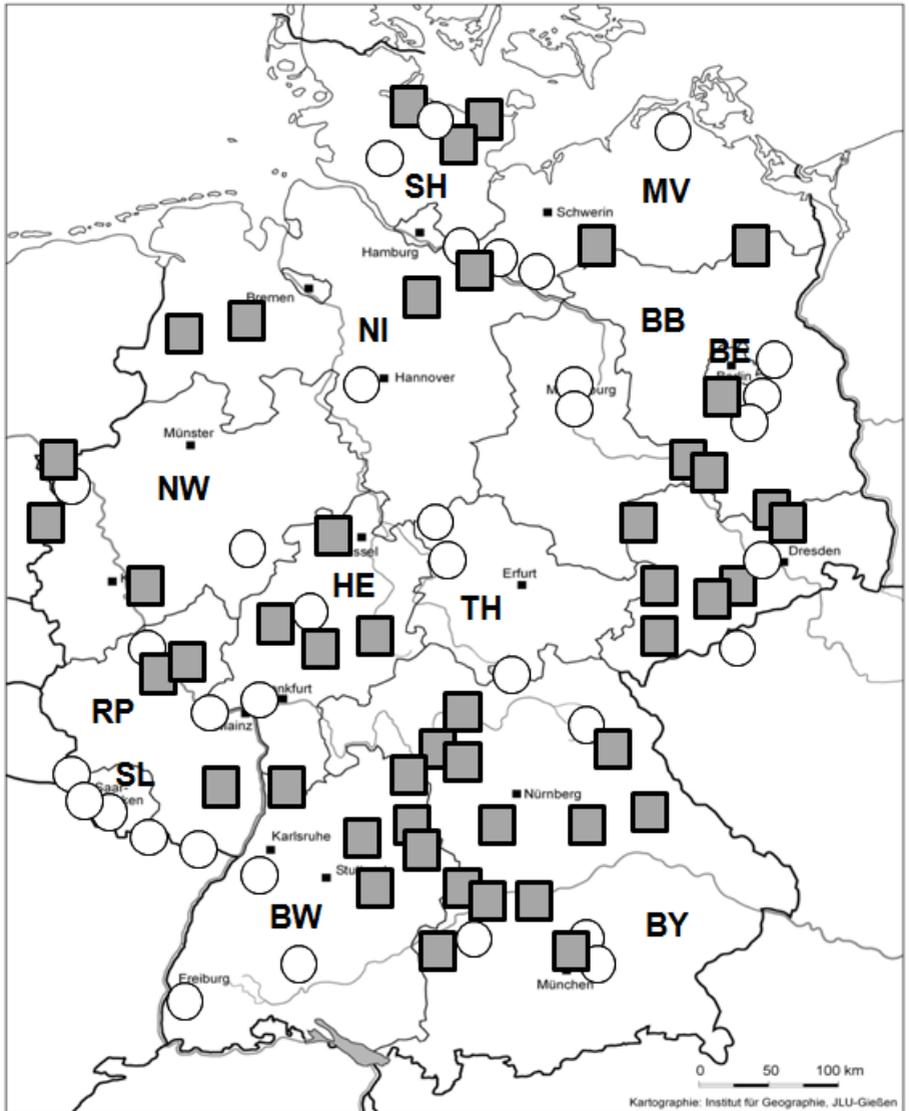


Abbildung 5: Verteilung der Reviere in Deutschland, in denen die Tiere beprobt wurden (weiße Kreise: Wildschweinerkunft, graue Vierecke: Hausschweinerkunft)

Tabelle 5: Anzahl der pro Bundesland beprobten Wild- und Hausschweine

Bundesland	Bundesland (Abkürzung)	Wildschweine			Hausschweine		
		04/05	05/06	06/07	gesund	krank	Gesamt
Baden-Württemberg	BW	22	8	12	47	20	67
Bayern	BY	15	15	13	43	8	51
Saarland	SL	19	11	17	0	0	0
Rheinland-Pfalz	RP	19	11	16	17	1	18
Hessen	HE	17	13	10	27	2	29
Thüringen	TH	6	20	13	18	0	18
Sachsen	SN	10	11	14	29	0	29
Nordrhein-Westfalen	NW	15	15	10	29	0	29
Sachsen-Anhalt	ST	8	21	9	11	1	12
Niedersachsen	NI	18	12	12	24	0	24
Brandenburg	BB	15	10	9	24	0	24
Berlin	BE	4	0	9	0	0	0
Mecklenburg-Vorpommern	MV	10	17	13	16	0	16
Schleswig-Holstein	SH	8	11	13	23	0	23
Gesamt		186	175	170	308	32	340

Für die Untersuchung wurden Tonsille, Lunge, Lungenlymphknoten, Milz und ab 2005/2006 zusätzlich Mesenteriallymphknoten entnommen.

Die Lungengewebeproben stammten immer aus dem rechten dorsalen Lungenlappen.

Da es aus zeitlichen Gründen im laufenden Schlachtbetrieb nicht immer möglich war, von jedem Tier jedes Organ zu entnehmen, ergibt sich folgende Organverteilung der Proben (Tabelle 6).

Tabelle 6: Organverteilung der Proben

	Tonsille	Lunge	Lungenlymph- Knoten	Darmlymph- knoten	Milz
Wildschwein¹	273	307	250	170	297
Hausschwein	340	340	335	325	340

¹Es werden nur Organproben der Wildschweinjahrgänge 2004/2005 und 2006/2007 berücksichtigt.

3.1.2 Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller / Lieferant
Skalpell-Klingen Nr. 23	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
PCR-Platten, 96 well Thermo-Fast 96 Detection Plate	ThermoFisher Scientific, Schwerte
Abdeckfolien – Absolute QPCR Seal	ThermoFisher Scientific, Schwerte
Stahlkugeln 5mm	Retsch, Düsseldorf
PSQ-Platten, 96 Well (Pyrosequencing)	Biotage/Qiagen, Hilden, Deutschland

3.1.3 Geräte

Bezeichnung	Hersteller / Lieferant
Zentrifuge – Biofuge fresco	Heraeus, Hanau
Zentrifuge – Labofuge 400	Heraeus, Hanau
Thermo-Cycler – TGradient 96	Biometra GmbH, Göttingen
Thermo-Cycler – Tpersonal 48	Biometra GmbH, Göttingen
Bildanalysesystem – BioDocAnalyse	Biometra GmbH, Göttingen
Gelektrophorese – Horizon 58	Biometra GmbH, Göttingen
Photometer – UltraSpec 1100pro	GE Healthcare, München
Photometer- nanodrop 1000	Thermo Scientific
Rüttelplatte – Monoshake	Thermo Electron LED GmbH, Langenselbold
PyroMark Vacuum Prep Tool	Biotage/Qiagen, Hilden
PyroMark ID	Biotage/Qiagen, Hilden
Kugelmühle – Retsch MM300	Retsch, Düsseldorf
7300 Real Time PCR System	Applied Biosystems, Darmstadt
Trockenschrank – Memmert Typ UM 400	Memmert, Schwalbach
Laminar Air Flow Gelaire Class 100	Heraeus, Hanau

3.1.4 Reaktionskits

Bezeichnung	Hersteller / Lieferant
Viral RNA Mini Kit enthält: Lysispuffer AVL; Waschpuffer AW 1 und AW 2; Elutionspuffer AVE; Extraktionssäulen	Qiagen, Hilden
Pyro Gold SQA Reagents Mit Nukleotide (NTP), Enzym-Mix, Substrat-Mix	Biotage/Qiagen, Hilden
Multiplex PCR Mastermix	Qiagen, Hilden

3.1.5 Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller / Lieferant
Annealing-Puffer	Biotage/Qiagen, Hilden
Binding-Puffer	Biotage/Qiagen, Hilden
Wasch-Puffer	Biotage/Qiagen, Hilden
Streptavidin-Sepharose TM	GE Healthcare, München
DNA-Leiter 100bp	Applichem, Darmstadt
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Absolute Blue QPCR Mastermix	ThermoFisher Scientific
Agarose	Biozym, Hessisch Oldendorf
Tris	Roth, Karlsruhe
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
EDTA	Roth, Karlsruhe
Orange G	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Saccharose	Roth, Karlsruhe
NaCl	Roth, Karlsruhe
Tris-HCl	Roth, Karlsruhe
Tris-Acetat	Roth, Karlsruhe
Tween 20	Roth, Karlsruhe
Mg-Acetat	Roth, Karlsruhe
NaOH	Roth, Karlsruhe
Oligonukleotide	Biomers, Ulm

3.1.6 Computerprogramme

Bezeichnung	Hersteller / Lieferant
7300 Sequence Detection Software Version 1.4	Applied Biosystems, Carlsbad, USA
Detection Software PyroMark ID 1.0	Biotage/Qiagen, Hilden, Deutschland
Statistical Package for Social Sciences“ (SPSS, version 15.0)	SPSS, Chicago, Illinois, USA
Clustal X 1.8	Science Foundation Ireland, Irland
nBLAST	http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi
Oligo 4.0	Molecular Biology Insights, USA
BioDocAnalyze 2	Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland
Microsoft Excel	Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Deutschland
GenBank®	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/

3.2 Methoden

3.2.1 Probenentnahme

Bei den Wildschweinen fand die Probenentnahme bei jeder Jagd an einer zentralen Sammelstelle statt. Die Hausschweine wurden während des normalen Schlachtablaufs beprobt.

Bei allen Tieren wurden jeweils frische, latexfreie, sterile Einmalhandschuhe und sterile, einzeln verpackte Skalpellklingen verwendet, um Kreuzkontaminationen zwischen Folgetieren zu vermeiden.

Für die statistische Auswertung wurden von jedem Tier die Herkunft (Wildschweine: Revier; Hausschweine: Herkunfts-Landkreis), das Alter (Wildschwein: Zahnalterschätzung) und das Gewicht aufgenommen.

3.2.2 Zahnaltersschätzung

Für die Altersschätzung beim Wildschwein wurde die Methode nach Stubbe (2001) verwendet (Tabelle 7). Bei den Hausschweinen kam die Methode nach Dyce et al. (1991) zum Einsatz.

Da am Schlachtband aus Zeitgründen keine eingehende Beurteilung des Zahnstatus möglich war, wurden die Hausschweine in Altersgruppen von 0-1 Monate, 1-2 Monate, 2-3 Monate und über 3 Monate eingeteilt (Tabelle 8).

3.2.3 Gewichtsbestimmung

Bei den Wildschweinen wurde das Gewicht entweder geschätzt oder mit Hilfe einer Federwaage ermittelt.

Für die Gewichtsbestimmung der Mastschweine (Alter ca. 6 Monate) und Spanferkel wurden die Fleischkontrollausdrucke von den jeweiligen Schlachthöfen zur Verfügung gestellt.

3.2.4 Lagerung der Proben

Die Proben wurden nach der Entnahme in sterile Plastikpetrischalen mit eindeutiger Kennzeichnung gegeben und bei 4 - 8°C für maximal 24 Stunden gelagert.

Im Labor der Klinik für Schweine wurden die Proben in 2 ml-Eppendorf-Gefäße aliquotiert und dort bis zur weiteren Bearbeitung bei -20°C eingelagert.

Tabelle 7: Zahnaltersschätzung beim Wildschwein nach Stubbe, 2004

Alter in Monaten	Beschreibung
<1	i3 und c im Unterkiefer vorhanden
1	p4 durch Zahnfleisch durchgebrochen
2	i1 voll entwickelt
3	p3 voll entwickelt
4	i2 voll entwickelt
5,5	M1 voll entwickelt (für Alter 6 Monate keine sichere Differenzierung möglich, daher Mittel von 5,5 Monaten)
7	c oder i3 wackelt
8	i3 ausgefallen
9	c ausgefallen
10	I3 voll entwickelt oder M2 im Zahnfleisch erstastbar, P1 voll entwickelt
11	M2 durch Zahnfleisch durchgebrochen
12	C voll entwickelt
13	i1 wackelt
14	i1 ausgefallen
15	I1 voll entwickelt oder p2-4 ausgefallen
16	P4 hat mindestens die halbe Höhe des M1 erreicht
17,5	P2-4 voll entwickelt (für Alter 18 Monate keine sichere Differenzierung möglich, daher Mittel von 17,5 Monaten)
19	i2 wackelt, M3 im Zahnfleisch tastbar
20	i2 ausgefallen
21	I2 voll entwickelt
24	M1 beginnt flächige Zahnabnutzung im OK und UK
26	M3 durchgebrochen
30	M3 voll entwickelt
36	M2 Beginn der flächigen Abnutzung
48	M1 flächige Abnutzung im UK
60	M2 im OK und M3 im UK beginnt flächige Abnutzung
72	M1 im OK flächig abgenutzt
84	M2 im UK flächige Abnutzung
96	M2 im OK flächig abgenutzt, M3 im OK beginnt flächige Abnutzung
108	M3 im UK flächig abgenutzt

Großbuchstaben: Dauerzähne

Kleinbuchstaben: Milchzähne

I/i Dentes incisivi

C/c Dentes canini

P/p Dentes praemolares

M/m Dentes molares

Tabelle 8: Zahnaltersschätzung beim Hausschwein nach Dyce et al., 1991

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

Großbuchstaben: Dauerzähne

Kleinbuchstaben: Milchzähne

I/i Dentes incisivi

C/c Dentes canini

P/p Dentes praemolares

M/m Dentes molares

3.3 Probenaufbereitung

Zur Isolierung der Nukleinsäuren aus den Gewebeproben wurde ein auf Silicagel basierendes Verfahren verwendet, bei dem in Gegenwart chaotroper Salze die Nukleinsäure an die Silicageloberfläche gebunden wird. Nach dem Waschen mit alkoholhaltigen Waschpuffern wird die Nukleinsäure unter Nidrigsalzbedingungen von der Silicagelmembran eluiert.

Die DNA wurde mit dem Qiagen Viral RNA Mini Kit aus den verschiedenen Geweben isoliert. Diese Methode zeigte auch für die Isolation von DNA, gegenüber Vergleichsmethoden, überlegene Ergebnisse. Hierzu wurden 25-50 mg Gewebe in ein 2 ml Eppendorf-Gefäß überführt. Nach Zugabe von 560 µl AVL-Puffer und einer 5 mm Stahlkugel wurde das Gewebe in der Kugelmühle bei 25 Hz für 2 min zerkleinert. Die Stahlkugel wurde entfernt und die Suspension für mindestens 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 560 µl Ethanol zugegeben, gemischt und zur Abtrennung fester Bestandteile bei 16.000 x g für 3 min zentrifugiert. Der Überstand wurde komplett auf eine Extraktionssäule mit Silicagelmembran gegeben und bei 8.000 x g für eine Minute zentrifugiert. Danach erfolgten zwei Waschschrte mit jeweils 500 µl Waschpuffer AW1 bzw. AW 2 und einer Zentrifugation bei 8000 x g für eine Minute (AW1) bzw. 16000 x g für 3 min (AW2). Zur Elution der Nukleinsäuren

von der Silicagelmembran wurden 60 µl AVE-Puffer auf die Säule pipettiert, 5 Minuten inkubiert und die Säulen bei 8.000 x g für eine Minute zentrifugiert.

Die eluierte DNA/RNA wurde bei – 20°C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert.

3.4 Nested PCR

Die PCV-spezifische DNA wurde mit Hilfe einer nested PCR (nPCR) nachgewiesen. Die dafür verwendeten Primer sind in Tabelle 9 aufgeführt.

Die erste PCR wurde in einem 20 µl-Ansatz durchgeführt, der 10 µl 2x Multiplex Mastermix, 2 µl Primermix (PCVS/ PCVAS1/ PCVAS2; f.c. 0,6 µM), 6 µl Wasser und 2 µl Proben-DNA (ca. 200 ng) enthielt. Die Primer waren gegen das Capsid-Gen gerichtet und spezifisch für PCV, differenzierten allerdings nicht zwischen PCV-1 und PCV-2.

Die Zyklusbedingungen waren wie folgt: initiale Aktivierung der DNA-Polymerase für 15 min bei 95°C, gefolgt von 35 Zyklen bestehend aus Denaturierung bei 94°C für 30 sec, Annealing bei 61°C für 90 sec und Extension bei 72°C für 1 min, gefolgt von der finalen Extension bei 72°C für 10 min.

Der Ansatz für die zweite (nested) PCR hatte ein Gesamtvolumen von 10 µl, bestehend aus 5 µl 2x Multiplex Mastermix, 1 µl Primermix (PCV1S/ PCV1AS/ PCV2IS/ PCV2IAS; f.c. 0.8 µM), 3 µl Wasser und 1 µl des 1/100 mit TE-Puffer verdünnten PCR-Produktes aus der ersten PCR. Die Primer der zweiten PCR dienten der Differenzierung zwischen PCV-1 und PCV-2.

Die Zyklusbedingungen waren wie folgt: Initiale Aktivierung der DNA-Polymerase bei 95°C für 15 min, gefolgt von 35 Zyklen bestehend aus Denaturierung bei 94°C für 30 sec, Annealing bei 61°C für 90 sec und Extension bei 72°C für 1 min, gefolgt von der finalen Extension bei 72°C für 10 min.

3.4.1 Gelelektrophorese

Für die Gelelektrophorese wurden 5 µl des PCR-Produktes auf einem 2%igen Ethidiumbromid-haltigen (0,4 - 0,5 µg/ml Gel) Agarose-Gel analysiert. Die Elektrophorese erfolgte in TAE-Puffer bei 15 V/cm Gel für 20 min.

Als Größenstandard diente eine 100 Bp-Leiter.

Die Gele wurden unter UV-Licht fotografiert, digitalisiert und anschließend archiviert und ausgewertet.

3.5 Realtime PCR

Zur quantitativen Bestimmung der Viruslast in den Gewebeproben wurde eine Realtime-PCR (quantitative PCR, qPCR) etabliert.

Bei der qPCR kann die Entstehung des PCR-Produktes anhand von Fluoreszenzsignalen in Echtzeit verfolgt werden. Dabei ist die Fluoreszenzintensität direkt proportional der gebildeten Menge an PCR-Produkt. Das Prinzip der qPCR ist in Abb. 5 dargestellt. Zum quantitativen Nachweis von PCV-2 wurde eine Hydrolysesonde (Taqman-Sonde) eingesetzt. Die Taqman-Sonde besitzt am 5'-Ende einen Reporter in Form eines Fluoreszenzfarbstoffes (6-FAM) und am 3'-Ende einen Rhodaminfarbstoff (TAMRA) als Quencher (Auslöscher). Solange Reporter (R) und Quencher (Q) unmittelbar benachbart sind, wird die von dem Reporter emittierte Fluoreszenz durch den Quencher ausgelöscht. Bindet die Sonde jedoch an die Ziel-DNA, so wird sie während der Verlängerungsphase der Primer durch die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der Taq-Polymerase abgebaut. Dadurch werden Reporter und Quencher räumlich voneinander getrennt. Dies hat zur Folge, dass Fluoreszenz emittiert wird, die geräteseitig registriert und in Echtzeit (Realtime) in einen Rechner übertragen wird.

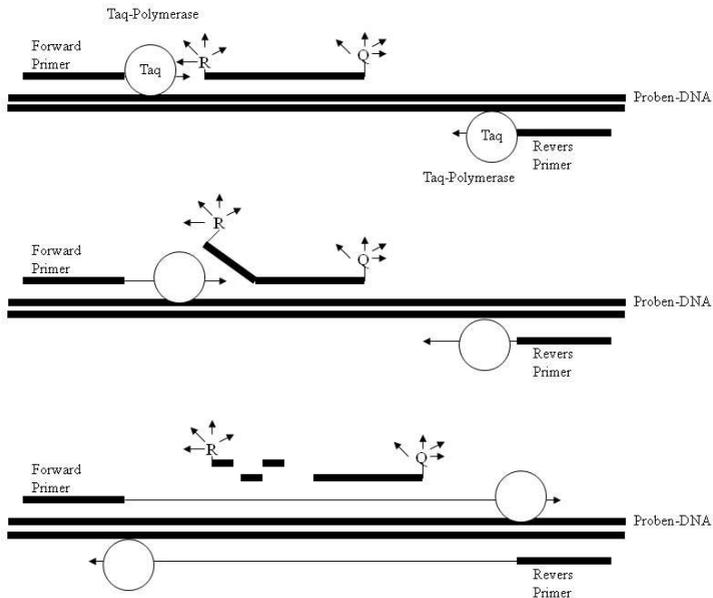


Abbildung 6: Funktionsprinzip der Realtime-PCR

Für die quantitative, PCV-2-spezifische PCR (qPCR) verwendeten wir einen 25 μ l Ansatz, bestehend aus 12,5 μ l 2x Absolute Blue QPCR Master Mix, 9 μ l Primermix (PCV2F/ PCV2R; f.c. 1,8 μ M; siehe Tabelle 9), 1 μ l Sonde (PCV2S; f.c. 0,2 μ M) und 2,5 μ l Proben-DNA (75- 150 ng/ μ l). Die Primer waren gegen Sequenzen des Capsidgens von PCV-2 gerichtet.

Die Zyklusbedingungen waren wie folgt: initiale Aktivierung der DNA-Polymerase bei 95°C für 15 min, gefolgt von 40 Zyklen mit einer Denaturierung bei 94°C für 30 sec und einem kombinierten Annealing- und Extentionschritt bei 60°C für 1 min.

Die Daten wurden mit dem 7300 Real Time PCR System gesammelt und anschließend mit der *Sequence Detecion Software 1.4* ausgewertet.

Die Virusmenge wurde anhand einer Standardkurve, bestehend aus PCV-2-DNA von $1 \cdot 10^7$ bis $1 \cdot 10^2$ Kopien pro PCR-Reaktion, bestimmt.

Tabelle 9: Primer für die konventionelle (nPCR) und quantitative PCR (qPCR)

Primername	Sequenz (5´-3´)	Amplifikatlänge in Bp	Position ¹	Literatur
PCVS	CGG GAG GAG TAG TTW AYA TAG G	389	1323-1343, fwd ²	Reiner et al. (2010)
PCVAS 1	CAT CTT GGA AAC ATC CTC C		1667-1685, rev ³	
PCVAS 2	CAT CTT GGC CAG ATC CTC			
PCV1A S	CCT TCA GAA ACC GTT ACA GAT GG	327	1628 – 1650, rev ³	
PCV1S	AGG GGT CAT AGG CCA AGT TG		1321-1340, fwd ²	
PCV2IS	TAG GTT AGG GCT GTG GCC TT	264	1322 – 1341, fwd ²	LaRochelle et al. (2000a)
PCV2IA S	CCG CAC CTT CGG ATA TAC TG		1566 – 1585, rev ³	
PCV2F	CCA GGA GGG CGT TGT GAC T	98	1535-1553, fwd ²	Olvera et al. (2004)
PCV2R	CGC TAC CGT TGG AGA AGG AA		1614-1633, rev ³	
PCV2S	6-Fam 5´-AAT GGC ATC TTC AAC ACC CGC CTC T-3´ Tamra		1589-1609, fwd ²	

¹ Position in der PCV-2-Sequenz mit der Acc.No. AY094619

² fwd, forward; ³ rev, reverse

3.5.1 Verifikation der PCR-Produkte

Um die Amplifikate zu verifizieren, wurden drei Proben von Wildschweinen aus der qPCR exemplarisch ausgewählt und sequenziert (GATC Biotech AG, Konstanz). Die Sequenzen der Amplifikate wurden mit Hilfe des Programmes BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) mit PCV-2-Sequenzen aus der Nukleotid-Datenbank (GenBank[®]) verglichen.

3.6 Pyrosequenzierung

Die Pyrosequenzierung ist eine Methode um kurze DNA-Abschnitte bis 100 Bp zu sequenzieren. Sie wurde 1996 von Pal Nyrèn und Mostafa Ronaghi in Stockholm entwickelt. In dieser Arbeit dient die Pyrosequenzierung zur Sequenzanalyse von zwei DNA-Abschnitten auf dem PCV-2-Genom, die eine Genotypisierung der porcinen Circoviren zulassen.

Im Gegensatz zur Sanger-Sequenzierung wird bei der Pyrosequenzierung das freigesetzte Pyrophosphat, das beim Einbau eines Nukleotids durch die DNA-Polymerase entsteht, in einer enzymatischen Reaktion quantitativ gemessen. Vor der eigentlichen Pyrosequenzierung müssen folgende Vorbereitungen getroffen werden:

1. Amplifikation des zu untersuchenden DNA-Abschnittes mittels PCR, wobei einer der beiden Primer biotinyliert ist
2. Immobilisierung der biotinylierten PCR-Produkte an Streptavidin-Kügelchen
3. Abspalten des nicht-biotinylierten Stranges durch Denaturierung mit Natronlauge
4. Waschen und Neutralisieren des immobilisierten Stranges
5. Pyrosequenzierung

Die Pyrosequenzierungsreaktion (Abbildung 7) läuft in 4 Schritten ab, an denen insgesamt vier Enzyme beteiligt sind.

Der **erste Schritt** ist die Hybridisierung des Sequenzierungsprimers an den immobilisierten, biotinylierten DNA-Strang.

Im **zweiten Schritt** wird das erste Nukleotid eingespritzt. Ist dieses komplementär zu der Base des gegenüberliegenden Stranges, so wird es von der DNA-Polymerase eingebaut. Durch den Einbau wird Pyrophosphat (PPi) freigesetzt.

Das Pyrophosphat wird im **dritten Schritt** durch die ATP-Sulfurylase in Gegenwart von Adenosin-5'-phosphosulfonat quantitativ zu ATP umgewandelt. In einer Folgereaktion wird mit Hilfe des gebildeten ATPs Luciferin mittels Luciferase in Oxyluciferin umgewandelt und dabei Licht erzeugt, dessen Intensität proportional zur Menge des ATPs ist. Das Licht wird über eine CCD-Kamera aufgenommen und als Peak im Pyrogramm dargestellt.

Im **vierten Schritt** werden überschüssige Nukleotide durch Apyrase abgebaut und das nächste Nukleotid wird eingespritzt. Die Reaktion beginnt von vorn (Schritt zwei).

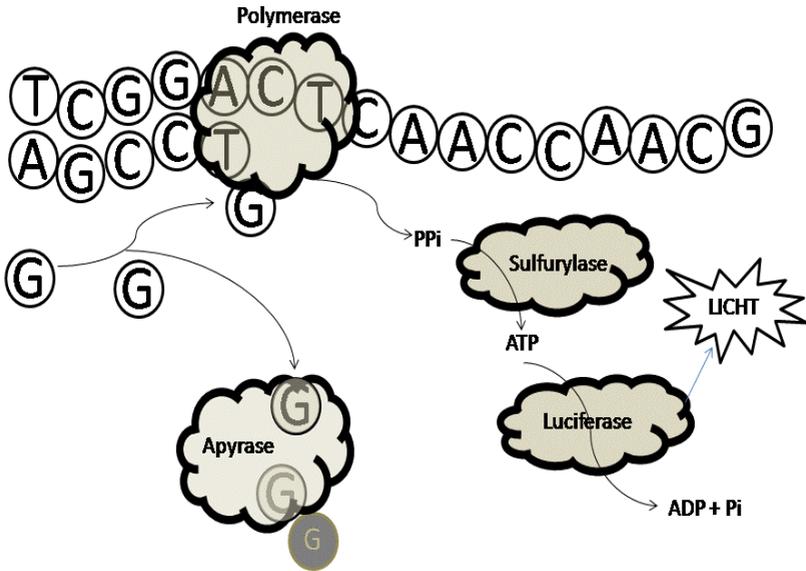


Abbildung 7: Funktionsprinzip der Pyrosequenzierung

3.6.1 Durchführung der Pyrosequenzierung

Um die eigentliche Pyrosequenzierungs-Reaktion durchführen zu können, musste die Proben-DNA zunächst in einer vorgeschalteten PCR mit einem biotinylierten Primer amplifiziert werden.

Die einzelnen Schritte werden im Folgenden gezeigt (Abb. 8):

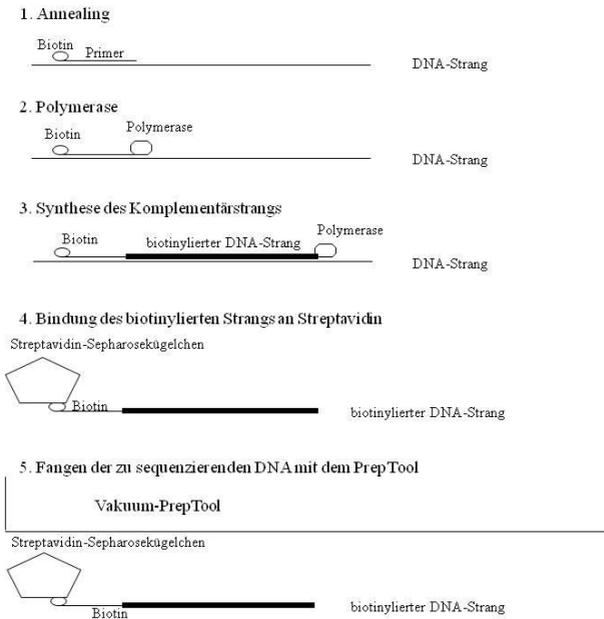


Abbildung 8: Vorbereitende Arbeitsschritte für die Pyrosequenzierung

Die Biotinylierungs-PCR wurde in einem 40 µl-Ansatz durchgeführt, bestehend aus 20 µl 2x Multiplex Mastermix (Qiagen, Hilden), 4 µl Primermix (ORF2: Pyro-PCV2-F, Pyro-PCV2-R; ORF3: ORF3F, ORF3R; f.c. 0,4 µM; siehe Tabelle 10), 12 µl Wasser und 4 µl Probe.

Die PCR-Bedingungen waren wie folgt: initiale Aktivierung der DNA-Polymerase für 15 min bei 95°C, gefolgt von 35 Zyklen bestehend aus Denaturierung bei 94°C für 30 sec, Annealing bei 52°C (ORF2) bzw. 59°C (ORF3) für 90 sec und Extension bei 72°C für 30 sec, gefolgt von einer finalen Extension bei 72°C für 10 min.

Die PCR-Produkte wurden stichprobenartig auf ein 2%iges Agarosegel aufgetragen und analysiert (Kap. 3.4.2).

Die PCR-Produkte wurden in eine 96-well PCR-Platte überführt und mit aq. bidest. auf 40 µl aufgefüllt. Anschließend wurden Streptavidin-Sepharosekügelchen in Bindungspuffer (40 µl) dazugegeben.

Zum Binden der biotinylierten PCR-Produkte an die Streptavidin-Sepharosekügelchen wurde die 96-well PCR-Platte bei Raumtemperatur für 5-10 min auf einer Rüttelplatte inkubiert.

Nach der Inkubation wurden die Streptavidin-Sepharosekügelchen mit dem sog. Preptool gefangen. Dieses besteht aus 96 Sonden, die an ihrer Spitze eine Membran besitzen und beim Anlegen eines Vakuums als Saugarme fungieren. Nachfolgend wurden die Proben jeweils für 5 sec in 70%igem Ethanol, 0,2 M NaOH und 10 mM Tris-Acetat gewaschen. Danach wurden die Proben in eine 96-well PSQ-Platte überführt, in die bereits 40 µl Sequenzierungsprimer (ORF2: Pyro-PCV2-S; ORF3: ORF3S); f.c. jeweils 0,4 µM) in Annealing-Puffer (Tabelle 10) vorgelegt wurde. Anschließend wurde die PSQ-Platte bei 80°C 2 min inkubiert. Dadurch wurde ein spezifisches Annealing der Sequenzierungsprimer an den biotinylierten DNA-Strang erreicht.

Tabelle 10: Primer für die Pyrosequenzierung

Primername	Sequenz (5'-3')	Amplifikationslänge in Bp	Position ¹	Literatur
Pyro-PCV2-F	GCCCTGAATTTCCATATGAAA TAA	104	964-987	Reiner et al. (2010)
Pyro-PCV2-R	Biotin-5'- ATTTAATCTTAAA- GACCCCCCACT-3'		1044- 1068	
Pyro-PCV2-S	TTTATCACTTCGTAATGG		1001- 1019	
ORF3F	ATTGTTGGCGAGGAGGGTAA	318	180-199	
ORF3R	Biotin-5'- CCCGCGAAAATTTCTGAC-3'		480-497	
ORF3S	GTAAGAAGGCAACTTAC		343- 360	

¹ Position in der PCV-2-Sequenz mit der Acc.No. AY424403

Nach Abkühlen der PSQ-Platte wurde diese in das PyroMark ID System eingesetzt.

Eine Cartridge wurde mit Nukleotiden, Enzymmix und Substrat befüllt und ebenfalls in das PyroMark ID System installiert und das System gestartet.

Nach Abschluss der Pyrosequenzierung wurde die Sequenz der PCR-Produkte mit der Analyse-Software *Pyro-Mark ID 1.0* bestimmt.

3.7 Genotypisierung von PCV-2

Die Genotypisierung der PCV-2-positiven Proben und der in der Datenbank eingestellten PCV-2-Sequenzen erfolgte nach Segales et al. (2008). Zusätzlich wurde eine Genotypisierung anhand des ORF3 von PCV-2 vorgenommen, der eine hochvariable Region am 3'-Ende besitzt.

3.7.1 Analyse der aus der Datenbank extrahierten PCV-2-Sequenzen

Die GenBank® (Stand August 2009) wies 520 Einträge von kompletten PCV-2 ORF2- und ORF3-Sequenzen auf, davon stammen 124 von PCV-2-Stämmen europäischer

Schweine, mit nur fünf Sequenzen von Hausschweinen aus Deutschland aus den Jahren 1999/2000. Desweiteren wurden sechs Sequenzen von europäischen Wildschweinen veröffentlicht. Die restlichen Einträge stammen hauptsächlich aus den USA und China. Diese Einträge werden mittels ClustalX miteinander verglichen.

Die PCV-2-Genotypen wurden anhand der von Olvera et al. (2007) und Segales et al. (2008) beschriebenen ORF2-Sequenzen klassifiziert. Die Einteilung der ORF3-Typen erfolgte anhand des Alignments der in der GenBank® (Stand August 2009) vertretenen Einträge (siehe Kapitel 4.6.3).

Abbildung 9 und Abbildung 10 zeigen die Lokalisation der Primer und die zu sequenzierende Region im PCV-2-Genom.

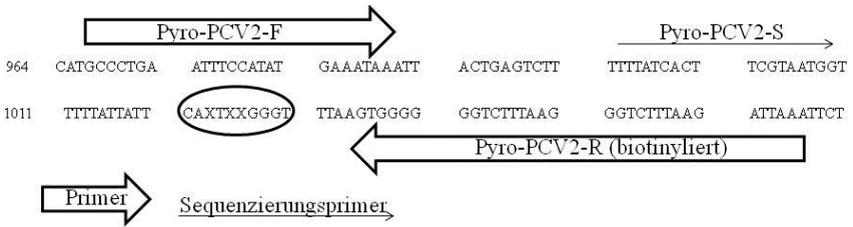


Abbildung 9: Position der ORF2-Pyrosequenzierungs-Reaktion und mögliche Variablen in der untersuchten Sequenz (**X=variable Position**)

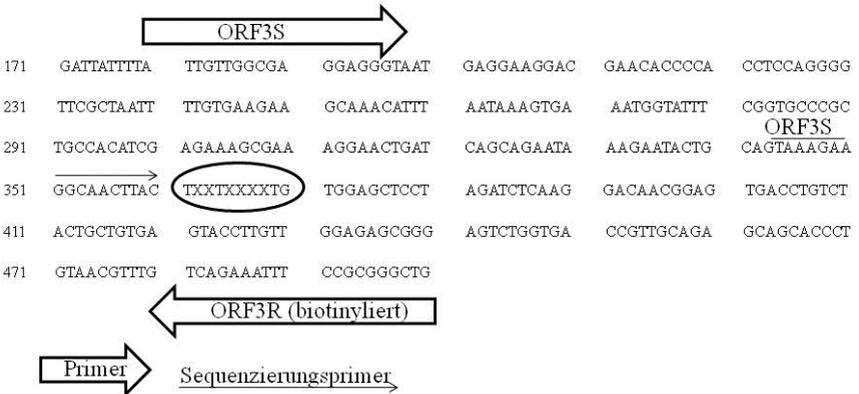


Abbildung 10: Position der ORF3-Pyrosequenzierungs-Reaktion und mögliche Variablen in der untersuchten Sequenz (**X=variable Position**)

Bei den aus der GenBank® extrahierten PCV-2-Sequenzen von Hausschweinen dominieren die ORF2/ORF3-Genotypen 2b/1 und 2b/3, alle anderen Genotypen kommen sehr selten vor.

Die in der GenBank® veröffentlichten PCV-2-Sequenzen von Wildschweinen zeigen verschiedene Genotypen - 2b/1, 2a/1, 2b/2, 2b/4 und 2a/10.

3.8 Verteilung der PCV-2 Belastung und dem Vorkommen von PCVD

Die in dieser Arbeit untersuchten Gewebeproben wurden im Rahmen einer weiteren Dissertation im Fachbereich Pathologie von Frau Dr. Corinna Hohloch immunhistologisch und histologisch untersucht. Die Daten wurden freundlicherweise zur weiteren Verwendung zur Verfügung gestellt.

3.8.1 Immunhistologie (Dissertation Frau Dr. Corinna Hohloch)

Für die Immunhistologie wurden die Gewebeproben in drei µm dicke Schnitte auf SuperFrost® Plus-slides (R. Langenbrinck, Emmendingen) gelegt, bei Raumtemperatur getrocknet, anschließend in Xylene deparaffinisiert und in einer abgestuften Alkoholreihe rehydriert. Die endogene Peroxidase-Aktivität wurde durch Inkubation in Methanol mit 0,5% Wasserstoffperoxid für 30 Minuten gehemmt. Um die Sperrungsreaktion durchzuführen, wurden die Schnitte für 60 min. in unverdünntem Pferdeserum inkubiert. Danach wurde die 1/500 Tris-Puffer-Lösung mit 1% Rinder-Serum-Albumin verdünnt, welches mit PCV-2 spezifischen, primären, monoklonalen Antikörpern (ORF2) (Ingenasa^(R), Spanien) versehen war. Die Schnitte wurden über Nacht bei 4°C inkubiert. Biotinyliertes Pferde-anti-Maus-IgG wurde 1/100 in TBS verdünnt und die Proben 30 min. damit inkubiert. Anschließend wurden sie mit Peroxidase-konjugiertem Streptavidin (1/500 in TBS) für weitere 30 min. inkubiert. Die Schnitte wurden mit Diaminobenzidine in Imidazol und Wasserstoffperoxid gegeben und so nach Papanicolaou gefärbt.

Bei der Herstellung der Negativ-Kontrolle wurde der primäre Antikörper weggelassen. Als Positiv-Kontrolle diente eine Lymphknotenprobe eines von PCVD betroffenen Hausschweins.

3.8.2 Klassifizierung von PCVD

Schweine wurden als PCVD betroffene (moderate bis schwere Lymphozyten-depletion, granulomatöse Entzündung des lymphatischen Gewebes und moderate bis hohe Mengen an PCV2-Genom-Äquivalenten [mindestens $10^{6,5}$ Kopien PCV2 DNA/ ng DNA-Extrakt in mindestens einem Gewebe]) oder als subklinisch mit PCV2 infizierte (keine oder leichte lymphoide Veränderungen, wie oben beschrieben, und nur eine geringe Menge virales Genom) und als nicht- PCVD Tiere (keine lymphatischen Läsionen [IHC] und negative qPCR) (Segales, 2002; Segales et al., 2005b) klassifiziert. Der Schwellenwert von $10^{6,5}$ PCV2 DNA-Kopien pro μg extrahierter DNA entspricht dem Wert von 10^7 Kopien aus anderen Studien, da sie weniger DNA benutzen. (Brunborg et al., 2004 : 500ng).

3.9 Statistische Analyse

Die statistische Analyse wurde mit dem Softwarepaket *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS, Version 15.0) durchgeführt. Signifikanzniveaus der Unterschiede in den Häufigkeiten der Genotypen wurden mit dem Chi²-Test ermittelt. Die Unterschiede in den mittleren Genotypfrequenzen zwischen den Gruppen wurden mittels ANOVA berechnet. Verteilungsungleichgewichte zwischen PCV-Infektionsstatus, Alters- und Gewichtsmerkmalen wurden mittels Kruskal-Wallis-Test auf Signifikanz überprüft.

4 Ergebnisse

4.1 Alter und Gewicht der Tiere

Insgesamt wurden im Rahmen der Doktorarbeit 531 Wildschweine und 340 Hausschweine untersucht.

Die untersuchten Wildschweine hatten ein durchschnittliches Gewicht von $35 \text{ kg} \pm 18,9 \text{ kg}$ (5 bis 120 kg) und waren $11 \pm 9,3$ Monate alt (1 - 84 Monate). Bei den Hausschweinen lag das Gewicht bei $32,4 \text{ kg} \pm 32,1 \text{ kg}$ (4 bis 117 kg) und das Alter bei $3,1 \pm 1,6$ Monaten (1 bis 6 Monate).

Tabelle 11 (Wildschwein) und Tabelle 12 (Hausschwein) zeigen den Probenumfang, das durchschnittliche Alter und das Durchschnittsgewicht der einzelnen Tiere für jedes Bundesland.

Tabelle 11: Alter und Gewicht der Wildschweine nach Bundesländern

Bundesland Abk.	Anzahl	Alter (Monate)				Gewicht (kg)			
		Mittelwert	Standardabweichung	Min	Max	Anzahl	Standardabweichung	Min	Max
BW	42	12,9	7,1	3	25	40,3	18,1	10	85
BY	43	12,3	10,9	4	66	39,5	19,5	12	106
SL	47	9,4	6,8	1,5	26	33,1	20,0	6	85
RP	46	9,4	7,5	3	24	28,5	14,9	6	60
HE	40	8,3	5,7	2	24	29,3	16,8	10	67
TH	39	8,2	4,2	1	24	33,7	18,0	6	95
SN	35	10,0	4,5	5	24	34,9	12,3	20	65
NW	40	11,5	11,6	2	60	30,6	14,4	5	78
ST	38	12,9	8,7	5	36	36,4	17,0	15	85
NI	42	10,1	6,1	4	36	38,3	20,1	15	120
BB	34	13,0	11,7	3	60	36,9	21,4	14	85
BE	13	15,3	22,5	4	84	39,6	34,2	15	110
MV	40	12,5	13,9	2	72	33,6	22,4	7	113
SH	32	10,8	6,9	4	24	39,8	18,6	20	95
Deutschland	531	11,0	9,3	1	84	35,0	18,9	5	120

Tabelle 12: Alter und Gewicht der Hausschweine nach Bundesländern

Bundesland Abk.	Anzahl	Mittelwert	Alter (Monate)			Anzahl	Gewicht (kg)		
			Standardabweichung	Min	Max		Standardabweichung	Min	Max
BW	47	2,3	0,5	2	4	16	4,7	4	28
BY	43	4,1	1,9	2	6	49,1	39,6	6	108
SL	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.
RP	17	4,9	1,8	2	6	70,1	38,3	14	107
HE	27	4,5	2,0	2	6	63,6	39,3	12	117
TH	18	1,6	0,5	1	2	10,4	4,5	6,4	22,4
SN	29	2,2	0,5	2	4	15,8	3,1	13	26,9
NW	29	4,5	2,0	2	6	66,6	40,7	12	104
ST	12	2,0	0,0	2	2	15,9	2,4	12	22
NI	24	2,4	0,5	2	3	18	3,1	13,1	26,5
BB	23	2,3	0,7	1	3	17,3	6,6	5,9	32,1
BE	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.
MV	16	2,3	0,4	2	3	16,3	2,9	11,1	21,5
SH	23	2,6	0,6	2	4	21,3	5,4	13	30,3
Deutschland	308 ¹	3,1	1,6	1	6	32,4	32,1	4	117

¹zusätzlich wurden 32 Tiere untersucht, die aufgrund von Krankheitserscheinungen von der Schlachtung ausgeschlossen wurden

Die Tiere der beiden Gruppen unterschieden sich signifikant ($p < 0,001$) bezüglich des Alters und des Gewichts innerhalb und zwischen den Bundesländern.

4.2 Vorversuche

4.2.1 Validierung der qPCR

Die Validierung der quantitativen PCR erfolgte in Anlehnung an die „Verfahrensanweisung zur Methodvalidierung“, herausgegeben vom Institut für Medizinische Virologie, Universitätsklinikum Frankfurt (2006). Dabei wurden zur Bestimmung der Präzision sowohl ein Intraassay- als auch ein Interassay-Vergleich durchgeführt. Außerdem wurden die Sensitivität, die Spezifität, die Linearität und ein gegebenenfalls auftretender Matrixeffekt untersucht.

Die Nachweisgrenze (LOD) lag bei diesem Testverfahren bei 10 DNA-Äquivalenten und die Bestimmungsgrenze (LOQ) bei $1 \cdot 10^2$ DNA-Äquivalenten pro 100 ng DNA. Der lineare Bereich erstreckte sich von $1 \cdot 10^2$ bis $1 \cdot 10^9$ DNA-Äquivalenten pro 100 ng

DNA. Die Nachweisgrenze (LOD) gibt an, ab welcher Konzentration ein Nachweis (qualitative Bestimmung) möglich ist, wohingegen die Bestimmungsgrenze (LOQ) angibt, ab welcher Konzentration eine quantitative Bestimmung möglich ist.

In den Abbildungen 12 und 13 sind eine typische PCV-2-Standardgerade (Abb. 12) und ihre zugehörigen Amplifikationskurven (Abb. 13) dargestellt.

Für die Auswertbarkeit der qPCR wurden zwei Kriterien festgelegt, einmal sollte das Bestimmtheitsmaß r^2 , das die Güte der Anpassung der Punkte an eine Gerade beschreibt, $\geq 0,99$ sein, und zum anderen sollte die Steigung der Geraden, die eine Aussage über die Effektivität der PCR macht, im Bereich von -3,58 (90% Effektivität) und -3,10 (110% Effektivität) liegen.

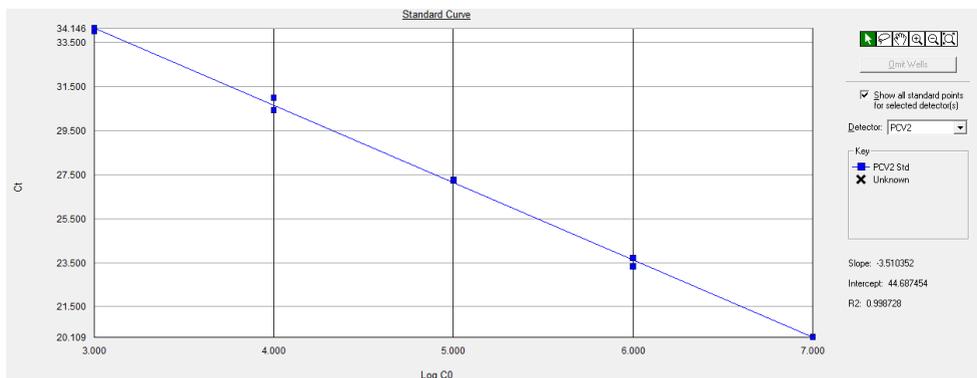


Abbildung 11: PCV-2-Standardgerade einer qPCR (Slope: Steigung, Intercept: Achsenabschnitt, R2: Bestimmtheitsmaß)



Abbildung 12: Amplifikationskurven zu der Standardgeraden aus Abb. 8 (Delta Rn: relative Fluoreszenzwerte, Cycle Number: Anzahl der PCR-Zyklen)

4.2.2 Vorversuche zur Pyrosequenzierung

Im Rahmen der Vorversuche zur Pyrosequenzierung wurden Proben mit einer unterschiedlichen PCV-2-Viruslast eingesetzt, um zu testen, welche Minimal-Viruslast notwendig ist, um noch auswertbare Signale in der Pyrosequenz zu erhalten. Dabei zeigte sich, dass das Probenmaterial mindestens eine Konzentration von 1×10^4 PCV-2 DNA-Äquivalenten pro 100 ng DNA aufweisen muss, um die Signale in der Pyrosequenz sicher interpretieren zu können. Abbildung 13 zeigt ein Beispiel-Pyrogramm. Auf der x-Achse ist die sogenannte Dispensions-Reihenfolge dargestellt, die anzeigt, welche Nukleotide und in welcher Reihenfolge sie eingespritzt wurden. Auf der y-Achse ist die gemessene Lichtintensität angegeben.

Aufgrund der gemessenen Lichtintensität kann bestimmt werden, ob und wie viele Nukleotide von der jeweiligen Sorte in das Amplifikat eingebaut werden konnten. Vereinfacht gesagt bedeutet eine große Lichtintensität mehrere eingebaute Nukleotide, wobei zu beachten ist, dass das Nukleosid Adenosin einen stärkeren Impuls verursacht als die Übrigen.

Aufgrund dieser Tatsache lautet die Sequenz für das Beispiel-Pyrogramm in Abbildung 13:

ATTCCCTCGG

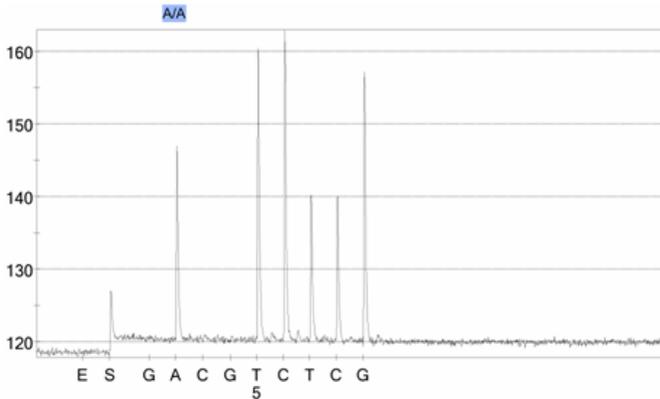


Abbildung 13: Pyrogramm

4.3 PCV-2-Prävalenz

4.3.1 PCV-2-Prävalenzen bei Wild- und Hausschweinen ermittelt mit der nested PCR

Von den insgesamt 522 untersuchten Wildschweinen wurden 335 Tiere in mindestens einem Organ positiv auf PCV-2 getestet.

Dies entspricht bei den Wildschweinen einer Prävalenz von 63,1 % für den gesamten Untersuchungsraum.

Bei den Hausschweinen waren alle untersuchten Tiere in mindestens einem Organ PCV-2-positiv. Dies entspricht einer Prävalenz von 100 %.

Die Prävalenzen der Wildschweine variierten in den einzelnen Bundesländern von Jahrgang zu Jahrgang zum Teil erheblich. In der Saison 04/05 lag die Prävalenz für Deutschland bei 67,2 %, in 05/06 bei 51,4 % und in 06/07 bei 70,6 %.

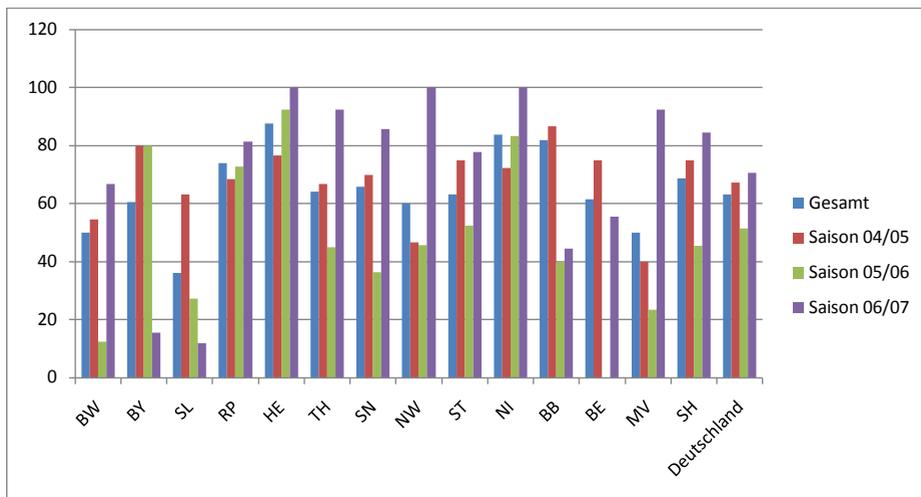


Abbildung 14: Grafische Darstellung der prozentualen Verteilung der mittels nested PCR positiv getesteten Wildschweinproben in den einzelnen Bundesländern und für Deutschland

Tabelle 13: Anteile (%) mit nested PCR getesteter PCV-2-positiver Wildschweine in Deutschland, sowie in den einzelnen Bundesländern

Bundesland Abk.	Gesamt		Saison 04/05		Saison 05/06		Saison 06/07	
	Anzahl	%	Anzahl	%	Anzahl	%	Anzahl	%
BW	21	50,0	12	54,5	1	12,5	8	66,7
BY	26	60,5	12	80,0	12	80,0	2	15,4
SL	17	36,2	12	63,2	3	27,3	2	11,8
RP	34	73,9	13	68,4	8	72,7	13	81,3
HE	35	87,5	13	76,5	12	92,3	10	100,0
TH	25	64,1	4	66,7	9	45,0	12	92,3
SN	23	65,7	7	70,0	4	36,4	12	85,7
NW	24	60,0	7	46,7	7	46,7	10	100,0
ST	24	63,2	6	75,0	11	52,4	7	77,8
NI	35	83,3	13	72,2	10	83,3	12	100,0
BB	21	61,8	13	86,7	4	40,0	4	44,4
BE	8	61,5	3	75,0			5	55,6
MV	20	50,0	4	40,0	4	23,5	12	92,3
SH	22	68,8	6	75,0	5	45,5	11	84,6
Deutschland	335	63,1	125	67,2	90	51,4	120	70,6

Die PCV-2-Prävalenzen in den Wildschweinpopulationen variierten auch innerhalb der einzelnen Jahrgänge von Bundesland zu Bundesland zum Teil erheblich (Tabelle 13). Im Jahr 04/05 lagen die Prävalenzen zwischen 40 und 86,7 %, im Jahr 05/06

hingegen wurden Werte zwischen 12,5 und 92,3 % erreicht. Die Werte in der Saison 06/07 schwankten zwischen 11,8 und 100 %.

4.3.2 PCV-2-Prävalenzen bei Wild- und Hausschweinen ermittelt mit der quantitativen PCR

Für die Untersuchung mittels qPCR wurden nur Organe ausgewählt, die bereits in der nested PCR positiv waren. Die PCV-2-Gehalte der einzelnen Tiere variierten zum Teil erheblich. Tabelle 14 (Wildschwein) und Tabelle 15 (Hausschwein) geben eine Übersicht über die durchschnittlichen PCV-2-Gehalte der Proben aus den einzelnen Bundesländern und für Gesamtdeutschland.

Tabelle 14: PCV-2-Gehalte je μg DNA (Werte logarithmiert), gemittelt über alle Gewebe (Tonsille, Lunge, Milz, Lnn mediastinales) bei Wildschweinen in Deutschland und in den einzelnen Bundesländern

BundeslandAbk.	Anzahl Proben	Mittelwert+/- Standard- abweichung	Maximum
BW	34	1,18 \pm 1,72	5,29
BY	28	0,39 \pm 0,99	4,09
SL	36	0,42 \pm 1,07	5,04
RP	30	0,87 \pm 1,26	3,77
HE	23	0,91 \pm 1,07	2,80
TH	17	1,23 \pm 1,54	4,57
SN	21	1,10 \pm 1,13	2,98
NW	17	0,68 \pm 0,87	2,07
ST	15	1,49 \pm 1,51	4,47
NI	25	3,02 \pm 2,24	6,50
BB	22	2,76 \pm 2,37	6,41
BE	12	0,26 \pm 0,91	3,14
MV	17	0,90 \pm 1,87	5,13
SH	19	0,21 \pm 0,66	2,54
Deutschland	316	1,11 \pm 1,66	6,50

Tabelle 15: PCV-2-Gehalte je μg DNA (Werte logarithmiert), gemittelt über alle Gewebe (Tonsille, Lunge, Milz, Lnn mediastinales) bei Hausschweinen in Deutschland und in den einzelnen Bundesländern

Bundesland Abk.	Probenzahl	Mittelwert+/- Standard- abweichung	Min.	Max.
BW	67,0	4,72±1,61	0,28	8,46
BY	51,0	4,32±1,65	1,18	7,67
SL	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.
RP	18,0	3,40±1,78	0,65	6,67
HE	29,0	4,88±1,39	2,59	8,00
TH	18,0	2,79±1,06	1,77	6,72
SN	29,0	5,53±2,21	1,59	9,00
NW	29,0	4,56±1,14	1,86	6,30
ST	12,0	6,07±1,15	4,83	8,67
NI	24,0	2,51±1,29	1,42	7,15
BB	24,0	3,98±2,00	1,43	7,94
BE	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.
MV	16,0	2,20±0,92	0,00	4,46
SH	23,0	3,58±1,36	1,40	6,58
Deutschland	340,0	4,23±1,84	0,00	9,00

N.u. nicht untersucht

In allen Bundesländern wiesen die beprobten Wildschweine nur geringe Virusmengen in den verschiedenen Organen auf und lagen zum Teil unterhalb der Nachweisgrenze der qPCR. Bei den Hausschweinen zeigte sich ein gänzlich anderes Verteilungsmuster. Hier fanden sich in nahezu allen Bundesländern Tiere mit deutlichen PCV-2-Belastungen.

In den Bundesländern Nordrhein-Westfalen und Schleswig-Holstein waren bei den Wildschweinen und in Mecklenburg-Vorpommern, Niedersachsen und Thüringen bei den Hausschweinen die geringsten PCV-2-Belastungen zu finden.

Die höchsten PCV-2-Belastungen fanden sich in Niedersachsen und Brandenburg bei den Wildschweinen und in Sachsen bei den Hausschweinen.

Die Variabilität der Wildschweinproben spiegelt sich auch in Abbildung 15 wider. Abbildung 15 zeigt, dass die meisten Wildschweinorgane in der qPCR PCV-2-negativ und nur vereinzelte Proben deutlich positiv waren.

In Abbildung 15 und Abbildung 16 lässt sich der geringe Unterschied zwischen den einzelnen Organen der jeweiligen Gruppen erkennen. Bei den Hausschweinen lagen

die Mediane bei Werten um 3,5 bis 3,7 \log_{10} , wohingegen sie bei den Wildschweinen einen Wert von Null nicht überschritten.

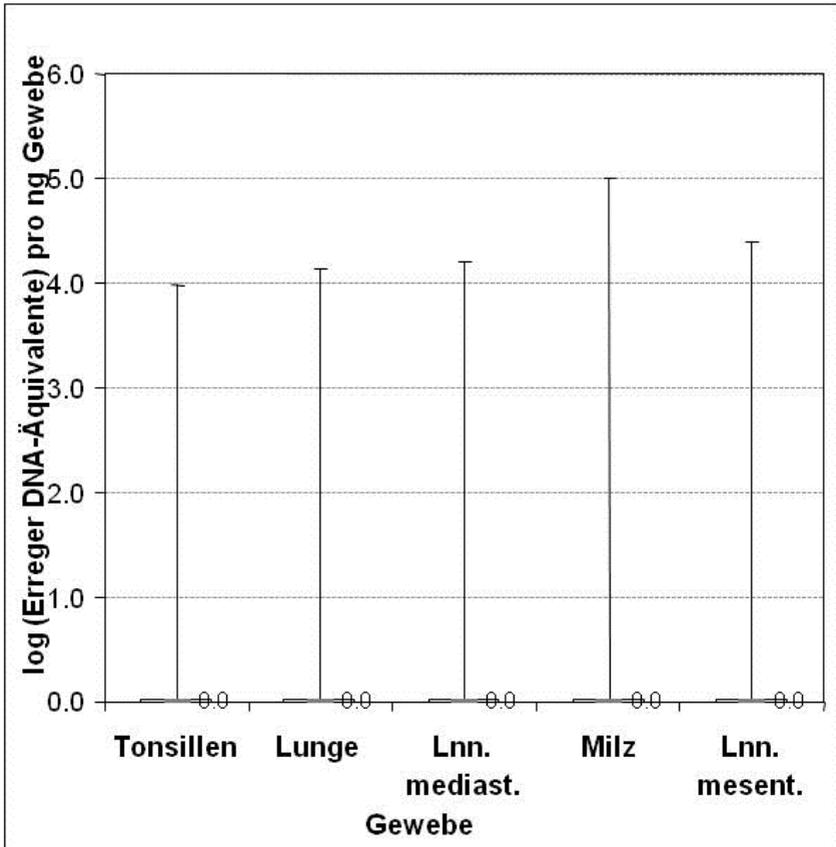


Abbildung 15: Boxplots der logarithmierten PCV-2- Gehalte bei verschiedenen Geweben vom Wildschwein

Tabelle 16: Numerische Werte für Boxplot (Abb.16)

Wildschwein	Tonsillen	Lunge	Milz	Lnn. mediast.	Lnn. mesent.
Anzahl	273	307	297	250	170
P5%	0	0	0	0	0
P25%	0	0	0	0	0
Median	0	0	0	0	0
P75%	0	0	0	0	0
P95%	4,0	4,1	4,2	5,0	4.4

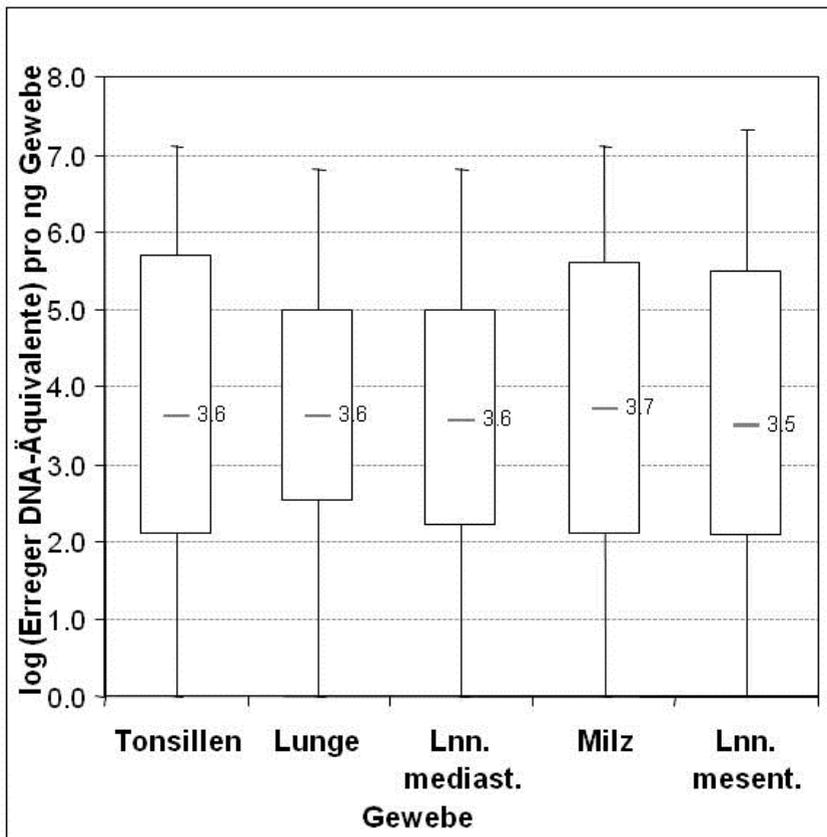
**Abbildung 16:** Boxplots der logarithmierten PCV-2- Gehalte in verschiedenen Geweben beim Hausschwein

Tabelle 17: Numerische Werte für Boxplot (Abb.17)

Hausschwein	Tonsillen	Lunge	Milz	Lnn. mediast.	Lnn. mesent.
Anzahl	344	346	348	335	325
P5%	0	0	0	0	0
P25%	2,1	2,5	2,2	2,1	2,1
Median	3,6	3,6	3,6	3,7	3,5
P75%	5,7	5,0	5,0	5,6	5,5
P95%	7,1	6,8	6,8	7,1	7,3

4.3.3 Vergleich der PCV-2-Viruslast bei Wild- und Hausschweinen

Beim Vergleich von Haus- und Wildschwein zeigte sich, dass in der Wildschweinpopulation eine deutlich geringere Belastung mit PCV-2 vorlag als bei den Hausschweinen (Abbildung 17). Ausnahmen bildeten hier die Bundesländer Niedersachsen und Brandenburg. In diesen beiden Bundesländern war der Median der PCV-2-Belastung bei Haus- und Wildschweinen nahezu gleich. In allen anderen Bundesländern war der Median der PCV-2-Belastung der Hausschweine höher als der der Wildschweine.

Die mediane Belastung der Wildschweine betrug maximal $3,39 \log_{10}$ PCV-2-DNA-Kopien pro μg DNA in Brandenburg. Bei den Hausschweinen lag der niedrigste Median bei $2,17 \log_{10}$ (Niedersachsen) und der höchste Median bei $5,8 \log_{10}$ PCV-2-DNA-Kopien pro μg DNA (Sachsen-Anhalt).

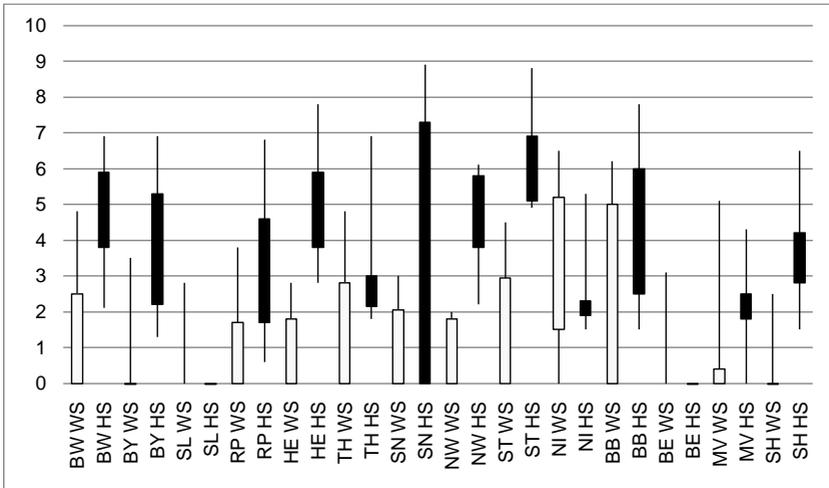
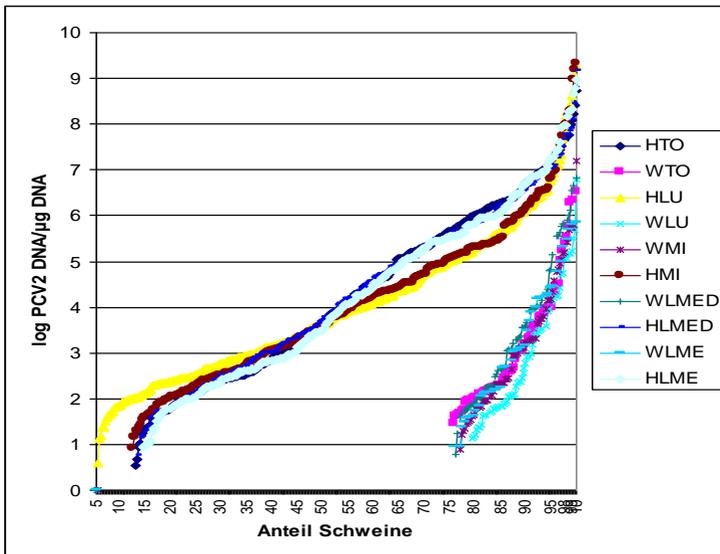


Abbildung 17: Nichtparametrische Darstellung der \log_{10} PCV-2-Gehalte (Durchschnitt der Gewebe) nach Bundesländern, differenziert zwischen Haus (HS)- und Wildschwein (WS). Unterschiede im PCV-2-Gehalt zwischen Haus- und Wildschwein sind mit Ausnahme der Länder NI und BB statistisch signifikant mit $P = 0,006$ (TH), $P = 0,002$ (BE) und $P < 0,0001$ (alle übrigen Länder).

4.4 PCV-2-Belastung der einzelnen Organe bei Haus- und Wildschweinen

PCV-2 zeigte weder bei Haus- noch bei Wildschweinen einen ausgesprochenen Organ-Tropismus, vielmehr waren alle untersuchten Organe gleichmäßig mit PCV-2 belastet (Abbildung 18). Große Unterschiede zwischen Haus- und Wildschweinen waren jedoch in der Quantität der Erregerlast zu finden. Ein Großteil der Organe bei den Wildschweinen war nur sehr gering mit PCV-2 belastet, während die meisten Hausschweine hohe Belastungen an PCV-2 aufwiesen. Auch die Maximalbelastung mit PCV-2 war bei den Hausschweinen mit mehr als $1 \cdot 10^9$ PCV-2 DNA-Kopien/ μg DNA um Faktor 100 höher als bei den Wildschweinen (ca. $1 \cdot 10^7$ PCV-2 DNA-Kopien/ μg DNA).



(HTO – Hausschwein Tonsille; WTO – Wildschwein Tonsille; HLU – Hausschwein Lunge; WLU – Wildschwein Lunge; HMI – Hausschwein Milz; WMI – Wildschwein Milz; HLMED – Hausschwein Mediastinallymphknoten; WLMED – Wildschwein Mediastinallymphknoten; HLME – Hausschwein Lungenlymphknoten; WLME – Wildschwein Lungenlymphknoten)

Abbildung 18: PCV-2 DNA-Titer bei Haus- und Wildschweinen nach Geweben und Anteil der Tiere

4.5 ORF2

Bei den ORF2-Genotypen bestanden signifikante Unterschiede in der Verteilung zwischen PCV-2 Isolaten von Haus- und Wildschweinen (Tabelle 18, Tabelle 19). Obwohl PCV-2b sowohl bei Haus- als auch bei Wildschweinen am häufigsten vorkam, gab es dennoch signifikante Unterschiede in der Genotypfrequenz. Noch deutlicher war der Unterschied in der Genotypfrequenz für PCV-2a (Tabelle 19). Dieser Genotyp kam bei Hausschweinen nur sehr selten vor (4,8 %), während er bei Wildschweinen mit 57,5 % eine Häufigkeit in der Größenordnung von PCV-2b (70,0 %) aufwies. Weiterhin war bei Wildschweinen eine Kombination beider Genotypen signifikant häufiger vorzufinden als bei den Hausschweinen (27,5 % vs. 3,2 %).

Tabelle 18: Verteilung der von PCV-2 abgeleiteten ORF2-Genotypen auf die Bundesländer, getrennt nach Haus- und Wildschwein

Bundesland	PCV-2b				PCV-2a				PCV-2a/PCV-2b			
	Anzahl		% je Land		Anzahl		% je Land		Anzahl		% je Land	
	WS	HS	WS	HS	WS	HS	WS	HS	WS	HS	WS	HS
BW	3	8	60,0	100,0	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	2	n.u.	40,0	n.u.
BY	n.u.	6	n.u.	85,7	1	n.u.	100,0	n.u.	n.u.	1	n.u.	14,3
SL	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	1	n.u.	100,0	n.u.
RP	2	7	66,7	100,0	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	1	n.u.	33,3	n.u.
HE	n.u.	6	n.u.	75,0	n.u.	1	n.u.	12,5	n.u.	1	n.u.	12,5
TH	2	4	50,0	100,0	2	n.u.	50,0	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.
SN	1	1	20,0	100,0	4	n.u.	80,0	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.
NW	n.u.	7	n.u.	100,0	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.
ST	4	6	80,0	100,0	1	n.u.	20,0	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.
NI	1	2	16,7	100,0	2	n.u.	33,3	n.u.	3	n.u.	50,0	n.u.
BB	3	6	50,0	100,0	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	3	n.u.	50,0	n.u.
BE	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.
MV	1	1	33,3	100,0	1	n.u.	33,3	n.u.	1	n.u.	33,3	n.u.
SH	n.u.	5	n.u.	100,0	1	n.u.	100,0	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.
Deutschland	17	59	42,5	95,2	12	1	30,0	1,6	11	2	27,5	3,2

n.u.: nicht untersucht

Tabelle 19: Gesamtvariabilität von PCV-2 Genotypen zwischen Wild- und Hausschwein (in %)

PCV-2 ORF2- Genotypen ¹	Sequenz (5'-3')	Wildschwein	Hausschwein	P ³
2b	TGATCGAGTG	70,0	98,4	<0,001
2a	TTATTGAGTG	57,5	4,8	<0,001
total ²		127,5	103,2	<0,001

¹basierend auf Segales et al., 2008²Beide Genotypen können innerhalb eines Tieres auftreten, daher ergeben sich Werte über 100%³Signifikanz

4.6 ORF3

Anhand der in der GenBank® veröffentlichten und der im Probenmaterial bestimmten PCV2-Sequenzen wurden insgesamt 18 verschiedene ORF3-Genotypen identifiziert (Tabelle 20), von denen neun (1 – 6, 9, 10 und 12) bei den hier untersuchten PCV2-Sequenzen der Haus- und Wildschweine vorkamen (Abbildung 19).

Tabelle 20: ORF3-Genotypen und die von ihnen kodierten Aminosäuren

ORF3- Genotyp	ORF3-Sequenz (5'-3')	Aminosäuren
1	GAT GGA GTG	ASP GLY VAL
2	GAT GGA ATG	ASP GLY MET(Start)
3	GAT CGA GTG	ASP ARG VAL
4	GAT TGA GTG	ASP STOP VAL
5	GGT GGA GTG	GLY GLY VAL
6	GAT AGA GTG	ASP ARG VAL
7	GAT AGA ATG	ASP ARG MET(Start)
8	GAT TGG ATG	ASP TRP MET(Start)
9	GAT CGA ATG	ASP ARG MET(Start)
10	TAT TGA GTG	TYR STOP VAL
11	TAT GGA GTG	TYR GLY VAL
12	TAT TGA ATG	TYR STOP MET(Start)
13	TAT CGA GTG	TYR ARG VAL
14	TAT GGA ATG	TYR GLY MET(Start)
15	TAT ACA GTG	TYR THR VAL
16	TAT CGA ATG	TYR ARG MET(Start)
17	TGT GGA GTG	CYS GLY VAL
18	GGT TGA ATG	GLY STOP MET(Start)

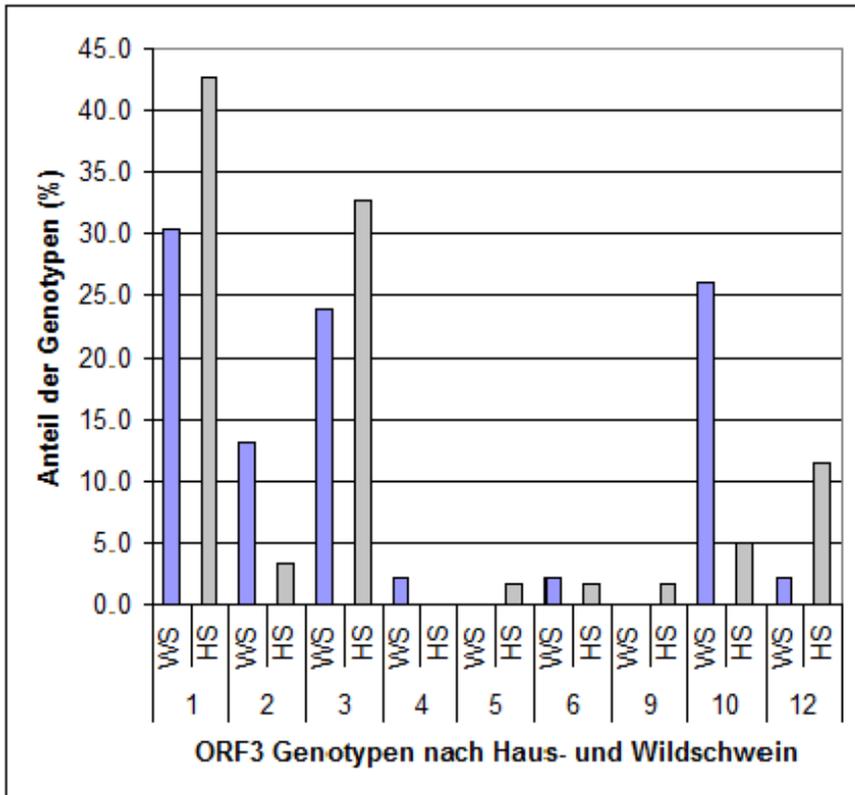


Abbildung 19: Verteilung der ORF3-Genotypen innerhalb Deutschlands, nach Wild-(WS) und Hausschweinen (HS) getrennt.

Es fällt auf, dass die Verteilung der ORF3-Genotypen bei Wild- und Hausschweinen sehr unterschiedlich war (Tabelle 21). Lediglich die ORF3-Genotypen 1 und 3 kamen bei beiden häufig vor, wenn auch in unterschiedlichen Bundesländern. ORF3-Genotyp 1 war bei den Wildschweinen vor allem in Baden-Württemberg, Niedersachsen, Rheinland-Pfalz, Hessen und Mecklenburg-Vorpommern vertreten, während er bei Hausschweinen in Baden-Württemberg, Sachsen-Anhalt, Schleswig-Holstein, Brandenburg und Bayern vorkam. Der Genotyp 3 konnte bei den Wildschweinen in fünf Bundesländern identifiziert werden. Auffällig war hier, dass mehr als die Hälfte (54,5 %) dieser Tiere aus Brandenburg stammten. Bei den Hausschweinen aus Brandenburg war dieser Genotyp nur mit einer Prävalenz von 5 % vertreten. In ande-

ren Bundesländern wies der Genotyp 3 hingegen bei den Hausschweinen höhere Prävalenzen auf als bei den Wildschweinen, z. B. in Hessen, Bayern und Baden-Württemberg. ORF3-Genotypen 2 und 10 kamen bei den Wildschweinen signifikant häufiger vor als bei den Hausschweinen, während ORF3-Genotyp 12 fast ausschließlich bei Hausschweinen identifiziert wurde.

4.7 ORF2-/ORF3-Genotypkombinationen bei Wild- und Hausschweinen

Bei den Hausschweinen dominierten die ORF2-/ORF3-Genotypkombinationen 2b/1 und 2b/3 (Tabelle 22 und Abbildung 20), andere Kombinationen waren selten (2b/2, 2b/5, 2b/6, 2b/9, 2b/10, 2a/3 and 2a/10) oder nicht vorhanden (2b/4, 2b/12, 2a/1, 2a/2). Bei den Wildschweinen hingegen wurden neben den häufigen Genotypkombinationen 2b/1 und 2b/3 hohe Prävalenzen für 2a/1, 2a/2, 2a/3, 2a/10 und 2b/2 gefunden, die signifikant weniger häufig (außer 2b/2 und 2a/3) bei den Hausschweinen vorkamen (Tabelle 22 und Abbildung 20).

Tabelle 21: Verteilung der ORF3-Genotypen innerhalb Deutschlands und der einzelnen Bundesländer nach Wild- und Hausschweinen

Bundes- land ¹	1		2		3		4		5		6		9		10		12	
	WS	HS	WS	HS	WS	HS	WS	HS	WS	HS	WS	HS	WS	HS	WS	HS	WS	HS
BW	100,0	75,0	n.u.	n.u.	n.u.	25,0	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.								
BY	33,3	42,9	n.u.	n.u.	n.u.	57,1	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	66,7	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.
SL	n.u.	n.u.	100,0	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.
RP	40,0	25,0	60,0	n.u.	n.u.	50,0	n.u.	25,0	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.						
HE	66,7	n.u.	n.u.	14,3	33,3	42,9	n.u.	n.u.	n.u.	14,3	n.u.	14,3	n.u.	n.u.	n.u.	14,3	n.u.	n.u.
TH	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	25,0	n.u.	50,0	100,0	25,0	n.u.							
SN	n.u.	n.u.	20,0	n.u.	n.u.	14,3	n.u.	n.u.	n.u.	20,0	n.u.	20,0	n.u.	n.u.	60,0	n.u.	n.u.	85,7
NW	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	100,0	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.								
ST	20,0	85,7	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	20,0	n.u.	60,0	n.u.	n.u.	14,3						
NI	50,0	n.u.	16,7	n.u.	33,3	100,0	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.								
BB	n.u.	66,7	n.u.	16,7	100,0	16,7	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.								
BE	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	100,0	n.u.	n.u.	n.u.
MV	66,7	100,0	n.u.	n.u.	33,3	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.
SH	n.u.	100,0	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	100,0	n.u.	n.u.	n.u.
Deutsch- land	30,4	42,6	13,0	3,3	23,9	32,8	2,2	n.u.	1,6	2,2	1,6	2,2	1,6	n.u.	4,9	2,2	11,5	n.u.

n.u. = nicht untersucht

Tabelle 22: PCV-2 ORF2- und ORF3-Genotypkombinationen bei Haus- und Wildschweinen (Angaben in %)

ORF2-/ ORF3-Genotypen ¹	Wildschweine	Hausschweine	P ³
2b/1	18,4	47,2	0,007
2b/2	10,5	3,8	n.s.
2b/3	26,3	37,7	n.s.
2b/4	2,6	0	n.s.
2b/5	0	1,9	n.s.
2b/6	2,6	1,9	n.s.
2b/9	0	1,9	n.s.
2b/10	5,2	3,8	n.s.
2b/12	2,6	0	n.s.
2a/1	13,2	0	0,011
2a/2	10,5	0	0,028
2a/3	13,2	3,8	n.s.
2a/10	21,1	1,9	0,004
Total ²	126,2	103,9	<0,001

¹ORF 2: basierend auf Segales et al., 2008; ORF 3: basierend auf Reiner et al., 2010

² Wert größer 100%, da Kombinationen aus a und b möglich sind

³ Signifikanz

Die Karte, Abbildung 20, zeigt die unterschiedlichen Herkunftsregionen der Wildschweine und die der Hausschweine, die zur Sequenzierung verwendet wurden. Bei den Hausschweinproben dominieren bundesweit die Genotypen 2b/1 und 2b/3. Andere Allele wurden vornehmlich in Mitteldeutschland (Hessen) gefunden. Die Ergebnisse der Wildschweine fielen deutlich heterogener aus, wobei die Verteilung der PCV-2-Genotypen zwischen den Haus- und Wildschweinen aus dem Norden (Schleswig-Holstein, Niedersachsen), dem Osten (Sachsen-Anhalt, Brandenburg und Sachsen) und dem Südwesten (Rheinland-Pfalz, Saarland und Baden-Württemberg) signifikant ($P < 0,05$) verschieden waren. In Mitteldeutschland (Hessen, Thüringen, Nord-Bayern und Nord-Baden-Württemberg), gab es zwischen den von Wild- und Hausschweinen isolierten Sequenzen kaum Unterschiede.

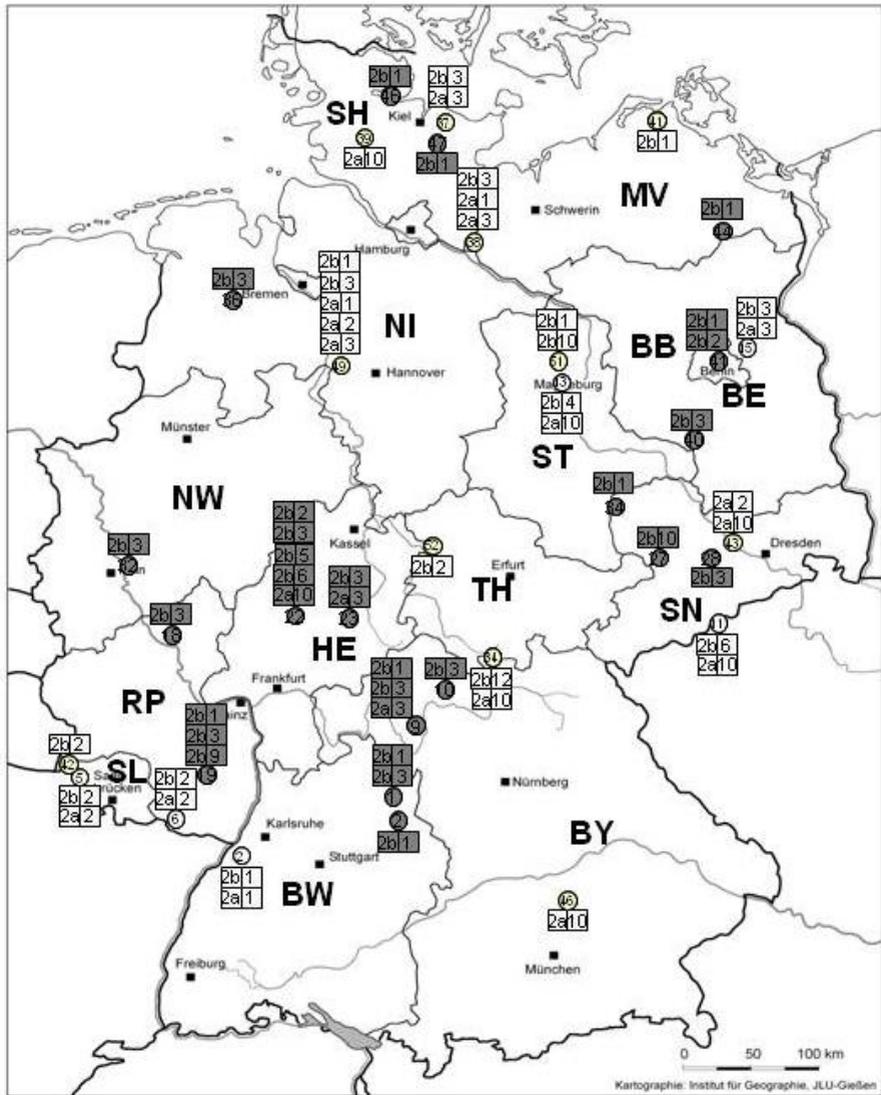


Abbildung 20: Geographische Verteilung der ORF2-/ORF3-Genotypkombinationen bei Wild- und Hausschweinen in Deutschland. Weiße Kreise: Nummer des Jagdgrundes; graue Kreise: Nummer der Herkunftsregion der Hausschweine; weiße und graue Kästen: Kombination von ORF2- (links) und ORF3-Genotyp (rechts) für jeweils Wild- (weißer Kasten) und Hausschwein (grauer Kasten).

4.8 Vergleich der gefundenen Genotypen mit Ergebnissen aus der GenBank®

Beim Vergleich der europäischen Sequenzen mit den Sequenzen der Tiere aus dieser Studie zeigte sich eine gute Übereinstimmung. Bei beiden Gruppen dominierten die Genotypen 2b/1 und 2b/3. Alle anderen Genotypkombinationen waren in beiden Gruppen selten. Zusätzlich fanden sich in der GenBank® sechs Sequenzen von europäischen Wildschweinen. Die sechs Sequenzen der europäischen Wildschweine repräsentierten jeweils einen anderen Genotyp, dennoch stimmten sie mit den wichtigsten Genotypen 2b/1, 2a/1, 2b/2, 2b/4 und 2a/10 der vorliegenden Studie überein. Die Häufigkeiten der Genotypen 2b/1 und 2b/3 bei den Wildschweinen der vorliegenden Studie waren mit denen der europäischen Hausschweine, die aus der GenBank® abgeleitet wurden, vergleichbar. Die Genotypen 2a/1, 2b/2, 2a/3 und 2a/10 wiesen bei den Wildschweinen dieser Studie zusammen eine Prävalenz von 58 % auf, wohingegen die Hausschweine dieser Studie bei diesen Genotypen eine Prävalenz von nur 9,5 % erreichten. Dies deckte sich mit dem Ergebnis aus der Genbank®, bei dem die europäischen Hausschweine für diese Genotypen eine Häufigkeit von 8 % aufwiesen. Desweiteren waren die Genotypen 2a/1, 2b/2 und 2a/10 weltweit sehr selten (7,5 %) und der Genotyp 2a/3 war bei keinem der 520 GenBank®-Einträge zu finden.

Tabelle 23: Vergleich der Genbankdaten mit Sequenzen aus der Pyrosequenzierung

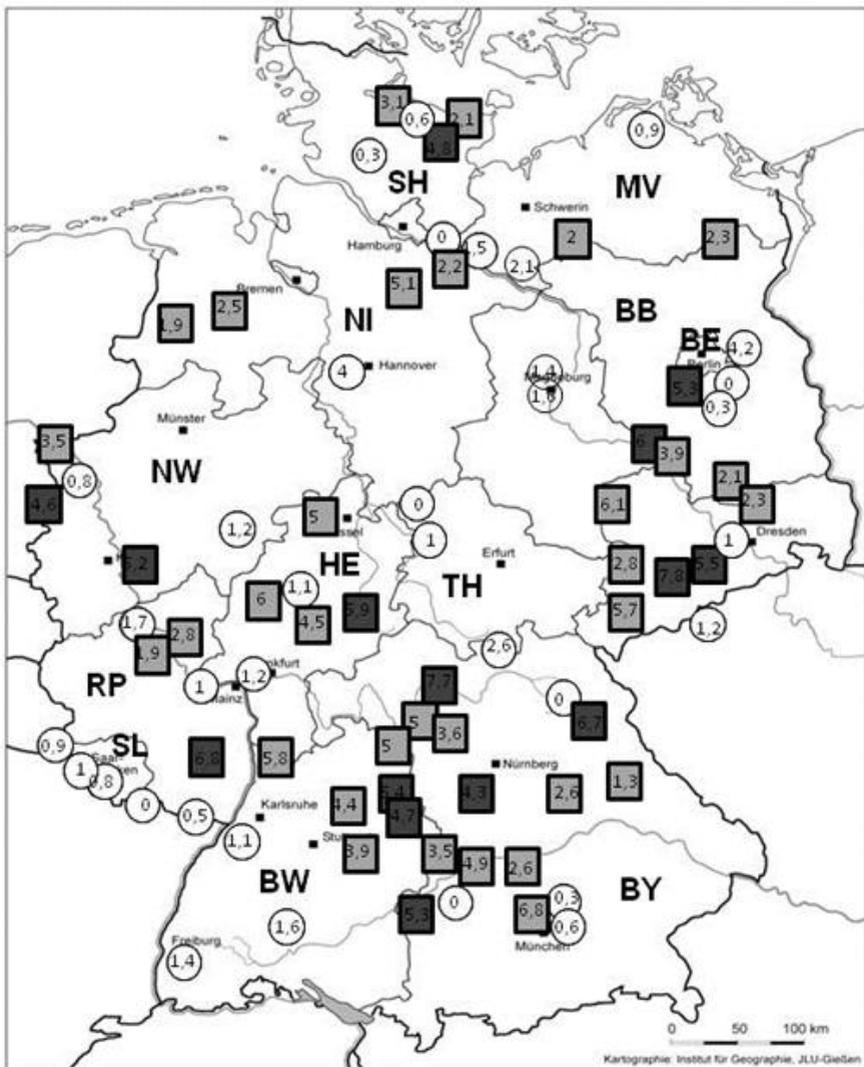
Genotyp	ORF 3	Hausschweine											Wildschweine		
		Genbankdaten											eigene Untersuchung		Genbankdaten
		R	NA	AS	SA	AF	AU	Total	EU	D	HS	WS			
		N	66	308	13	1	8	520	124	5	60	40	6		
2b	1		7,6	30,8	23,1			30,2	42,7		47,2	18,4	33,4		
2a	1			1,3				1,2	1,6			13,2	16,7		
2b	2			5,6				3,6	1,6		3,8	10,5	16,7		
2a	2		1,5	0,3			75	3,5	8	20					
2b	3			10,4				13,1	29		37,7	26,3			
2a	3							0,0			3,8	13,2			
2b	4		43,9	1	38,5			7,5	1,6			2,6	16,7		
2b	5				15,4			0,4			1,9				
2b	6							0,2	0,8		1,9	2,6			
2b	7			14,6				8,7							
2b	8			0,3				0,2							
2b	9			10,9				6,8	0,8		1,9				
2a	9			0,3				0,2							
2b	10			1,0				0,8	0,8		3,8	5,2			
2a	10		4,5	0,9	7,7			2,7	4,8	40	1,9	21,1	16,7		
2b	11			1,2				1,2	0,6						
2b	12			0,3				0,2							
2a	12		40,9	3,9	15,4	100	12,5	8,3							
2b	13			0,6				0,1							
2a	13			3,2				1,9							
2a	14			0,3				0,2							
2a	15		1,5					0,2							
2b	16			0,6				0,4							
2b	17							0,2	0,8						
2a	18							0,2	0,8						
2b	19			11,3				6,7							
2a	19			0,6				1,4	4	40					

N: Anzahl R: (Herkunftsregionen der untersuchten Proben): NA: Nordamerika ; AS: Asien ; SA: Südamerika ; AF: Afrika ; AU: Australien ; EU: Europa ; D: Deutschland ; HS: Hausschwein; WS: Wildschwein

4.9 Ergebnisse der Dissertation Hohloch

Die histologische Untersuchung der Proben ergab, dass alle Wildschweine PCVD-frei waren, obwohl zum Teil PCV-2-Belastungen von mehr als $5 \log^{10}$ PCV-2 DNA-Äquivalente/ μg DNA nachgewiesen wurden (Abbildung 21). Auf der anderen Seite zeigten viele Hausschweine mit hohen PCV-2-Belastungen aus verschiedenen Regionen Anzeichen von PCVD, allerdings gab es keinen eindeutigen Zusammenhang zwischen PCV-2-Belastung und dem Vorkommen von PCVD. So waren auch Hausschweine mit hohen PCV-2-Belastungen PCVD-frei, während andere mit geringeren PCV-2-Belastungen Anzeichen von PCVD aufwiesen.

Bei den untersuchten Wildschweinen war keines der Tiere PCVD auffällig, obwohl PCV-2 Äquivalente in vielen Regionen vorkamen. Die untersuchten Hausschweinproben waren durchgängig positiv für PCV-2 und ungefähr ein Drittel der beprobten Regionen waren PCVD verdächtig. Bei Betrachtung der Verteilung sind anhand der Grafik weder regionale Häufungen für PCVD, noch für die Virusbelastung, zu finden.



- Haussweinerherkunft ohne PCVD
 Wildschweinjagdgrund ohne PCVD
 Haussweinerherkunft mit PCVD
 Wildschweinjagdgrund mit PCVD

Abbildung 21: Darstellung der Herkunftsregionen der Wild- und Hausschweine (die Zahlen in den Kreisen geben die Virusbelastung in log PCV-2 DNA-Äquivalente pro µg DNA an).

5 Diskussion

Antikörper gegen PCV-2 wurden bei Wildschweinen in Nordamerika und in verschiedenen europäischen Ländern bei serologischen Studien (Sanchez et al., 2001a; Vicente et al., 2004; Ruiz-Fons et al., 2006; Sedlak et al., 2008) mit einer Prävalenz von 20 bis 50 % gefunden. Bisher war wenig über die Prävalenz von infizierten Wildschweinen in Verbindung mit der Inzidenz von PCVD bekannt.

Obwohl PCV-2 in hoher Zahl in der Wildschweinpopulation zu zirkulieren scheint, wurde der direkte Erregernachweis bisher nur in wenigen Studien verfolgt (Vicente et al., 2004; Knell et al., 2005b; Csagola et al., 2006). Vor allem PMWS wurde nur in vereinzelt Fällen bei getöteten Wildschweinen und bei der Untersuchung kleiner Gruppen gefunden (Ellis et al., 2003; Schulze et al., 2003; Vicente et al., 2004; Lipej et al., 2007; Sofia et al., 2008; Petrini et al., 2009).

PCV-2-infizierte und PCVD-betroffene Wildschweine könnten ein wichtiges PCV-2 Erreger-Reservoir für Hausschweine darstellen. Andererseits könnte auch die PCV-2 Infektion der Wildschweine auf Immissionen aus der Schweinehaltung beruhen. Um diese Zusammenhänge besser beurteilen zu können, ist es wichtig, mehr über die Verbreitung von PCV-2 und das Auftreten von PCVD bei Wildschweinen, sowie die Verwandtschaft der von Wild- und Hausschweinpopulationen isolierten Circoviren untereinander, zu erfahren. Mit der vorliegenden Studie sollten daher die qualitative und quantitative Verteilung von PCV-2 und die Häufigkeit von PCVD bei deutschen Wildschweinen beurteilt werden. Diese Ergebnisse sollten mit denen von Hausschweinen aus den gleichen Regionen verglichen werden. Hierzu wurden die Proben der Haus- und Wildschweine in einer zweiten Arbeit von Frau Dr. Hohloch aus dem Institut für Veterinärpathologie der Justus-Liebig-Universität histologisch und immunhistologisch untersucht. Die Ergebnisse Ihrer Arbeit wurden dazu verwendet, den PCVD-Status der untersuchten Schweine und Wildschweine zu erfassen.

5.1 PCV-2 bei Wild- und Hausschweinen

Bei der Auswertung der Proben fiel auf, dass alle 349 Hausschweine und 63,1 % der Wildschweine ähnlich hohe Virusbelastungen in Tonsille, Lunge, Milz und Lymphknoten aufwiesen. Die Prävalenz von PCV-2-Infektionen bei den Wildschweinen war deutlich höher als es die bislang bekannten serologischen Studien vermuten ließen (Sanchez et al., 2001a; Vicente et al., 2004; Ruiz-Fons et al., 2006; Sedlak et al., 2008). Diese Diskrepanz lässt sich vermutlich durch drei Faktoren erklären: die geografische Lage der Gebiete, der Zeitpunkt der Untersuchung und die unterschiedlichen Untersuchungsmethoden. Eine Studie von Knell et al. (2005a, b) beschrieb eine PCV-2-Prävalenz von 5 bis 27 % für Wildschweine. Die Proben für diese Untersuchung stammten von zehn Jagdgebieten aus Rheinland-Pfalz und Baden-Württemberg, und wurden ungefähr ein Jahr vor den Proben für die vorliegende Studie genommen. Daher können Auswirkungen auf die Prävalenz des Erregers aufgrund verschiedener Herkunftsregionen und Zeitpunkte nicht ausgeschlossen werden. Den größten Unterschied zwischen der vorliegenden Studie und der Studie von Knell et al. liegt in der verwendeten Untersuchungsmethode. Knell et al. verwendeten eine konventionelle PCR. Damit war diese Studie um etwa eine Größenordnung weniger sensitiv, bezogen auf den PCV-2-Virusgehalt, als vorliegende Studie. Diese nPCR wurde gewählt, um PCV-2 Träger mit einer möglichst hohen Sensitivität zu erkennen, unabhängig von der potentiell nur geringen Bedeutung geringer Erregerlast für das klinische Geschehen.

In der vorliegenden Studie gelang es mit Hilfe der quantitativen PCR zu zeigen, dass die meisten positiven Wildschweine nur eine sehr niedrige PCV-2-Belastung haben. Diese geringen PCV-2-Belastungen reichen in den meisten Fällen nicht aus, um eine PCVD auszulösen. Dies lässt sich mit den Befunden der Histopathologie bestätigen (Hohloch, 2012). Auch die Literatur beschreibt, dass Wild- und Hausschweine nur subklinisch infiziert sind und nur geringe Mengen an Virus im Gewebe, den Sekreten und den Exkreten aufweisen (Krakowka et al., 2005; Caprioli et al., 2006; Grau-Roma et al., 2009).

5.2 Prävalenz von PCVD

Seit einigen Jahren werden PCV-2 assoziierte Krankheiten unter den Sammelbegriffen PCVD oder PCVAD zusammengefasst. Diese beiden Sammelbegriffe vereinen alle Symptom-Komplexe mit einer Beteiligung von PCV-2. Die international akzeptierten Kriterien für die PMWS Diagnose beinhalten (i) das Vorhandensein von klinischen Anzeichen, wie Abmagerung oder Lungenfunktionsstörungen, (ii) eine moderate bis starke Lymphozytendepletion mit granulomatösen Entzündungen in den Lymphknotenproben und (iii) den Nachweis von moderaten bis hin zu hohen Virusbelastungen (Segales et al., 2002d, 2005a).

In der vorliegenden Studie waren alle Wildschweine und die meisten (90,5 %) der Hausschweine unverdächtig für PCVD. Eine kleine Gruppe von 40 Tieren wurde in diese Studie aufgenommen, da sie als Kümmerer von der Schlachtung ausgeschlossen wurden. Die Häufigkeit von histopathologischen Veränderungen und die Anzahl von PCV-2 DNA-Kopien waren in beiden Gruppen nahezu gleich. Dieser Befund bestätigt die Feststellung von Harding (1996), dass nur die Hälfte aller PMWS-auffälligen Tiere wirkliche PMWS-Fälle darstellen. Weiterhin können subklinisch infizierte Schweine milde PMWS-bedingte histologische Veränderungen aufweisen. Ein Drittel der spanischen und dänischen gesunden Schweine haben einen histopathologischen Score $>0,2$ (Graun-Roma et al., 2009). Dies bedeutet, dass viele Tiere mit PCV-2 infiziert sind, aber nur wenige histopathologische Veränderungen aufweisen. Das Problem bei der Identifizierung von PCVD-Tieren liegt in der Überschneidung der Krankheitserscheinungen und an der Dynamik des Krankheitsverlaufes bei jedem einzelnen Tier (Graun-Roma et al., 2009). Tiere, die eine hohe PCV-2-Belastung aber keine oder nur geringe histopathologische Veränderungen aufweisen, sind wahrscheinlich noch in der initialen Krankheitsphase (Segales et al., 2002a). Weiterhin hat die individuelle Resistenzlage der Tiere Einfluss auf den Verlauf. Je früher die Infektion stattfindet, desto höher ist das Risiko zur Entwicklung von PMWS (Rose et al., 2003; Lopez-Soria et al., 2005). Die vorliegende Studie zeigt keinen signifikanten Effekt des Alters auf PCVD oder auf die Virusbelastung bei Wild- und Hausschweinen. Ein Grund dafür könnte sein, dass junge Wildschweine kaum gejagt werden und daher nur wenige Tiere unter drei Monaten für die Untersuchung zur Verfügung standen. Bei allen klinischen Fällen von PMWS bei Wildschweinen

betrug das Alter der Tiere vier bis zehn Monate (Ruiz-Fonds et al., 2008). Die individuelle Resistenz gegen PCV-2-Infektionen (PCVD) wird durch die Hygiene und Koinfektionen erheblich beeinflusst (Segales, 2002b), und ist auch von der Genetik abhängig (Opriessnig et al., 2006). In der vorliegenden Studie waren jedoch keine entsprechenden Daten für Wild- und Hausschweine verfügbar.

Eine zunehmende PCV-2-Belastung scheint der kritische Schritt für die Entwicklung einer schweren PCVD zu sein, oder zumindest mit einer PCVD einherzugehen (Brunborg et al., 2004; Segales et al., 2005b; Harding et al., 2008). Generell wird ein Wert von 10^6 bis 10^7 DNA-Kopien pro 500 ng DNA als eine markante Schwelle angesehen. Diese Hilfsschwelle gibt einen Anhaltspunkt um PMWS-betroffene von unauffälligen Schweinen zu unterscheiden (Brunborg et al., 2004; Olvera et al., 2004; Harding et al., 2008; Grau-Roma et al., 2009). In der vorliegenden Studie liegt der Grenzwert zwischen PCVD-betroffenen Tieren und subklinischen Tieren bei 10^6 bis 10^7 Genom-Kopien pro 500 ng. Diese Werte passen sehr gut mit den bereits veröffentlichten Ergebnissen aus den zuvor genannten Studien zusammen. Obwohl die Schwelle zwischen subklinischen Infektionen und PCVD nicht genau abgegrenzt ist (Grau-Roma et al., 2009), kann die quantitative PCV-2-spezifische PCR als eine ergänzende Untersuchung zur histochemischen PCVD-Diagnostik angesehen werden (Brunborg et al., 2004; Grau-Roma et al., 2009).

Um einen besseren Bezug zwischen den untersuchten Geweben und den ermittelten Ergebnissen zu erhalten, sind die Ergebnisse dieser Arbeit immer auf die extrahierte DNA-Menge bezogen. Dies gewährleistet gerade bei Geweben mit unterschiedlichen Zellkerndichten, wie z. B. Lungengewebeproben und Lymphknotenproben, eine Konstante auf deren Grundlage ein Vergleich stattfinden kann (Yang et al., 2007; Brunborg et al., 2004). Die Gewebeproben aus der Lunge weisen deutlich weniger Zellkerne und damit DNA auf, als Proben aus Lymphknoten. Somit dürfte ein, rein auf die Einwaage bezogenes Ergebnis gerade bei sich in Zellkernen vermehrenden Viren, wenig aussagekräftig sein.

Die niedrige Frequenz von PCVD-betroffenen Wild- und Hausschweinen war zu erwarten, da die Studie, bis auf 40 von der Schlachtung ausgeschlossene Tiere, nur auf klinisch unauffälligen Tieren beruhte.

Das Fehlen von deutlichen Unterschieden in der Histologie, der IHC und in den PCV-2-Lasten zwischen den gesunden und den kranken Schweinen, deckt sich mit den Ergebnissen anderer Untersuchungen (z. B. Harding et al., 2008; Ruiz-Fonds et al., 2009).

In den Bundesländern Niedersachsen und Brandenburg fanden sich bei den Wildschweinen die höchsten Virusbelastungen, dies könnte ein Hinweis auf einen Zusammenhang zwischen Infektionen bei Wildschweinen und der Produktionsdichte der Hausschweine sein. Andererseits können die Ergebnisse aufgrund der zur Verfügung stehenden Tierzahlen nicht als repräsentativ, bezogen auf die Bundesländer, angesehen werden.

5.3 Genotypen

5.3.1 Zusammenhang von ORF2 und ORF3

Für die Untersuchung der PCV-2-Genotypen wurde in dieser Arbeit das Schema nach Olvera und Segales für den ORF2-Typ verwendet, zusätzlich wurde das hochvariable 3'-Ende des ORF3 für eine weitere Differenzierung herangezogen. Die Unterscheidung in PCV-2 Typ a, b und c gilt als wissenschaftlich (Segales et al., 2008) anerkannt und wurde ausgewählt, um einen Vergleich und einen Bezug zu anderen Untersuchungen zu ermöglichen. Der ORF3 wurde bisher in der Literatur noch nicht für eine Klassifizierung herangezogen. Da er jedoch essentiell an der Apoptose der Wirtszelle beteiligt ist, erscheint es mehr als wichtig eine zusätzliche Klassifizierung anhand des ORF3 vorzunehmen (Liu et al., 2007; Karuppanan et al., 2010; Juhan et al., 2010). Aus diesem Grund wurde die hochvariable 3'-Endregion des ORF3 für die Differenzierung gewählt, welche mit ihren 18 Varianten, zum Zeitpunkt der Untersuchung, den größtmöglichen Erfolg für die Entdeckung von Pathogenitätsbeeinflussenden Varianten verspricht.

Karuppanan et al. (2010) vermutet in seiner Arbeit, dass gerade die Deletionen im mittleren Bereich des Proteins Einfluss auf die Pathogenität haben. Somit bleibt unklar, ob die hochvariable Region im Endbereich des ORF3 an der Apoptose beteiligt sein kann oder nicht. Mit Hilfe weiterer Forschung muss nun überprüft werden, wel-

che der 18 ORF3-Varianten Abweichungen im mittleren Sequenzbereich aufweisen, welche Einfluss auf die Pathogenität haben.

5.3.2 Genotypen bei Wild- und Hausschweinen

Da sowohl Wildschweine als auch Hausschweine empfänglich für PCV-2 sind, könnten Wildschweine theoretisch als Reservoir für die Hausschweine in Frage kommen. Zum gegenwärtigen Zeitpunkt sehen einige Autoren das Wildschwein als Reservoir für PCV-2 (Ruiz-Fons et al., 2008), wohingegen andere Autoren diese Meinung nicht teilen (Vicente et al., 2004). Um dieser Frage nachzugehen, wurden Teilsequenzen von ORF2 und ORF3 von 40 Wildschweinen und 60 Hausschweinen aus vier größeren Gebieten Deutschlands untersucht (Norden, Osten, Süd-Westen und Mitte). Dabei fanden sich signifikante Unterschiede in den Genotyp-Frequenzen. Die Anzahl der Proben ist nicht als repräsentativ anzusehen; dennoch erlauben sie einen guten Überblick über die Interaktion zwischen Haus- und Wildschwein, da die beiden Spezies ortsübergreifend und weitgehend zeitnah beprobt werden konnten.

Vergleichbare Studien sind weder für Wild- noch für Hausschweine verfügbar. In dieser Studie dominiert der ORF2-Genotyp 2 b bei den Hausschweinen. Nur 4,8 % der Schweine tragen den Genotyp 2 a. Die gefundenen Genotypen passen gut mit den europäischen PCV-2-Sequenzen aus der GenBank® zusammen (Stand: August 2009, n=124), aber sie unterscheiden sich deutlich von den fünf hinterlegten Sequenzen deutscher Hausschweine. Diese fünf Hausschweinsequenzen stammen aus den Jahren 1999/2000. So ist eine deutliche Differenz zwischen diesen und den Sequenzen der vorliegenden Studie zu beobachten. Diese Diskrepanz weist auf einen Gendrift seit dem Jahr 2003 von PCV-2 Genotyp 2 a nach Genotyp 2 b hin. Auch Dupont et al. (2008) beschreiben diesen Wandel in ihrer Arbeit. Die Übereinstimmung der Hausschweinsequenzen aus der vorliegenden Studie mit den europäischen Sequenzen aus der GenBank® belegt hingegen die Allgemeingültigkeit der vorliegenden Studie. Unterschiede und Übereinstimmungen von Wildschwein - PCV-2 - Genotypen und Hausschwein - PCV-2 - Genotypen aus dieser Studie mit den europäischen PCV-2 GenBank® - Einträgen zeigen, dass Wild- und Hausschweine trotz eines geringen Austausches an PCV-2-Viren nebeneinander existieren. Mehr als 50 % der Wildschwein- PCV-2 - Genotypen sind extrem selten bei Hausschweinen in

Deutschland (Studie), Europa (GenBank®) und sogar weltweit, dies weist auf eine gewisse Unabhängigkeit von Wildschwein- und Hausschwein- PCV-2 - Genotypen hin. Im Gegensatz dazu weisen die Genotypen 2b / 1 und 2b / 3 auf einen Austausch hin. Auch die Tatsache, dass der Genotyp 2 a bei den Wildschweinen weit verbreitet ist (57,5 %), wohingegen er bei Hausschweinen selten (4,8 %) ist, unterstützt diese Aussage. Der Genotyp 2 b ist bei den Hausschweinen der weitest verbreitete Genotyp. Diese Tatsache spricht für die Hypothese, dass ein Austausch von PCV-2 zwischen den Arten stattfindet, wobei der Austausch in erster Linie vom Hausschwein zum Wildschwein vorkommt, aber auch in umgekehrter Richtung möglich ist. Eine mögliche Erklärung liegt in den unterschiedlichen Virusbelastungen, die von Reiner et al. (2010) beschrieben wurden. Die Daten von Albina et al. (2000) unterstreichen die Hypothese indirekt. Diese Autoren vermuten, dass Virusinfektionen von Schweinen, wahrscheinlich von Hausschweinen auf Wildschweine übergehen, und die umgekehrte Richtung die Ausnahme ist. Bei im Freiland gehaltenen Hausschweinen ist die Wahrscheinlichkeit für Infektionsübertragungen von Wild- zu Hausschweinen höher.

PCV-2 zeigt eine hohe Variabilität innerhalb und zwischen den Haus- und Wildschweinpopulationen. Einige Genotypen können ausschließlich bei Wildschweinen gefunden werden. Dies zeigt eine gewisse Unabhängigkeit von PCV-2 -Infektionen in beiden Gruppen und spricht dafür, dass Hausschweine nur eine geringe Chance haben, sich mit PCV-2 aus Wildschweinherkunft zu infizieren. Auf der anderen Seite kommen Hausschwein spezifische PCV-2 - Genotypen bei Wildschweinen mit einer niedrigen Frequenz vor, was für eine Übertragung von Haus- zu Wildschweinen spricht.

5.3.3 Veränderungen von PCV-2 bei Wild- und Hausschwein

Im Laufe der letzten Jahre kam es innerhalb des PCV-2-Genotyps zu einer Verschiebung der vorherrschenden Subtypen. Während der PCV-2 Typ 2 a in der Hausschweinpopulation seit dem Jahr 2003 immer weiter zurückging, nahm die Bedeutung von PCV-2 Typ 2 b zu. Gerade bei den Hausschweinen dominiert von diesem Zeitpunkt an bis heute der Typ b. Dies deckt sich sowohl mit der Auswertung der GenBank[®]-Einträge (Stand August 2009), als auch mit den Ergebnissen dieser Doktorarbeit.

Bei diesem genetischen Wandel ist auffallend, dass die Wildschweinpopulation für den PCV-2 Typ a noch eine Prävalenz von bis zu 47,5 % aufweist. Daraus lässt sich schließen, dass sich diese Veränderung in erster Linie in der Hausschweinpopulation abspielt, da diese für den Typ 2a nur noch eine Prävalenz von weniger als 6 % aufweist. Diese Entwicklung lässt vermuten, dass die genetische Entwicklung von PCV-2 innerhalb der Wildschwein- und innerhalb der Hausschweinpopulation unabhängig von einander abläuft.

6 Zusammenfassung

6.1 Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Wild- und Hausschweingewebeproben aus den Jahren 2005 bis 2008 mittels nested PCR (nPCR) auf das Vorkommen von PCV-2 untersucht und die positiv getesteten Proben mittels Realtime PCR (qPCR) quantifiziert. Zusätzlich wurden die Proben im Institut für Pathologie der Justus-Liebig-Universität histologisch und immunhistologisch untersucht (Dissertation Hohloch). Ziel war es, das Vorkommen von PCV-2 und die Häufigkeit PCV-2-assoziiierter Erkrankungen bei Haus- und Wildschwein zu beschreiben und zu vergleichen, sowie eine Aussage bezüglich des Austausches von PCV-2 zwischen Haus- und Wildschwein anzustellen. Die Variabilität und Verwandtschaft der verschiedenen PCV2-Stämme wurden anhand von Abschnitten im ORF2 und ORF3 mittels Pyrosequenzierung dargestellt und mit Daten der GenBank® abgeglichen.

Die Wildschweinproben wurden bei verschiedenen über alle Bundesländer, außer Bremen und Hamburg, verteilten Jagden entnommen. Die Proben der Hausschweine wurden auf einem zentralen Schlachthof in Süddeutschland, insbesondere von gesunden Spanferkeln, entnommen. Darüber hinaus standen auch Tiere zur Verfügung, die aufgrund ungenügender Körperentwicklung verworfen wurden. Die Herkunftsbereiche der Haus- und Wildschweine zeigen weitgehende Übereinstimmungen.

Bei der nPCR waren alle Hausschweine positiv für PCV-2. Bei den Wildschweinen wurde mittels nPCR eine Prävalenz von 63,1 % ermittelt. Die qPCR ergab für die Hausschweine eine Prävalenz von 98,8 % und 45,5 % für die Wildschweine. Die PCV-2 Virusbelastungen der Wild- (Mittelwert: $10^{2,8}$) und Hausschweine (Mittelwert: $10^{4,2}$) waren signifikant verschieden. Der Virusgehalt der Hausschweine war damit signifikant höher als der der Wildschweine. Unterschiede zwischen geschlachteten und verworfenen Schweinen konnten nicht auf PCVD zurückgeführt werden.

Im dritten Teil der Arbeit wurden Teilabschnitte des ORF2 und des ORF3 mittels Pyrosequencing sequenziert und mit Daten aus der GenBank® abgeglichen. Insgesamt

samt wurden 40 Wildschweine und 60 Hausschweine untersucht. Bei den Hausschweinen dominierte der PCV-2 Subtyp 2b, mit dem 98,4 % der Tiere infiziert waren, während auf den Typ 2a nur 4,8 % entfielen. Bei den Wildschweinen lag die Verteilung bei 58 % (2b) zu 70 % (2a). In Verbindung mit den ORF3-Genotypen zeigte sich, dass mehr als 50 % der Wildschwein-PCV-2-Genotypen bei deutschen und europäischen Hausschweinen selten sind. Gleichzeitig kamen Hausschwein typische PCV-2-Genotypen auch bei den Wildschweinen vor, wenngleich mit niedriger Prävalenz. Diese Ergebnisse sprechen für einen geringen Infektionsdruck vom Wild- aufs Hausschwein, aber auch dafür, dass PCV-2 vom Haus- aufs Wildschwein übertragen werden kann.

Die vorliegende Untersuchung ist die erste Studie, die die deutschlandweite Verteilung von PCV-2 bei Wild- und Hausschweinen qualitativ und quantitativ untersucht. Der qualitative Nachweis von PCV-2-DNA in Geweben von Wild- und Hausschweinen zeigt die weite Verbreitung der Infektion an, die jedoch in den meisten Fällen ohne Krankheitsfolge bleibt. Die qPCR erlaubt eine fundierte Aussage über die klinische Relevanz der PCV-2 Infektion. Vorliegende Studie zeigt zum ersten Mal, dass die Wildschweine bezüglich PCV-2 Infektionen nur eine untergeordnete Rolle für Infektionen bei Hausschweinen spielen.

6.2 Summary

Wild and domestic pig tissue samples from 2005 to 2008 were examined for the presence of PCV-2 using nested PCR (nPCR). Positive samples were consecutively quantified by real-time PCR (qPCR). All tissue samples were examined by histological, immunohistology and immunohistochemistry at the Institute of Pathology, Justus-Liebig-University (Diss. Hohloch). The aim was to investigate the distribution of PCV-2 and PCVD in the two populations. In the third part of the work, sections of the ORF2 and ORF3 were sequenced using pyrosequencing and compared with data from GenBank®, to investigate the hypothesis that wild boars serve as a reservoir for PCV-2 infection in domestic pigs.

The wild pig samples were taken during various hunts in the federal states of Germany, except for Bremen and Hamburg. In domestic pigs, the samples were taken from healthy piglets slaughtered at a body weight around 35 kg. A small subset of piglets was excluded from slaughter because of bad body conditions. Geographic origins of domestic pigs and wild boars overlapped widely.

Nested PCR detected PCV-2 DNA in all domestic pigs and in 63.1% of the wild boars. With a slightly lower sensitivity than the nPCR, qPCR detected PCV-2 in 98.8% of the domestic pigs and in 45.5% of the wild boars. The PCV-2 viral loads of the wild boar (mean: $10^{2.8}$) and domestic pigs (mean: $10^{4.2}$) were significantly different. Virus DNA content did not differ between healthy and excluded domestic piglets. Despite of a high prevalence of PCV-2 infection, PCVD was rare in domestic pigs and not detected in wild boars, except for one boar. Sequencing of the ORF2 and ORF3 by pyrosequencing and comparing the results with data from GenBank® for a total of 40 wild boars and 60 domestic pigs, detected PCV-2 subtype 2b in 98.4% and subtype 2a in 4.8% of the domestic pigs. In the wild boar, the distribution was 58% (2b) and 70% (2a). Most of ORF3 genotypes typical for wild boars were extremely rare or could not be detected in German and European domestic pigs. At the same time, domestic pig sequences were found at low prevalence in wild boar samples. Thus, the hypotheses of wild boars as a reservoir for domestic pig PCV-2 has to be rejected. On the contrary, domestic pigs seem to be a source of PCV-2 wild boar infection.

The present study was the first investigation on the nationwide prevalence of PCV-2 in domestic pigs and wild boar. The results showed ubiquitous distribution of PCV-2 in both subspecies. The occurrence of PCVD was sparse, especially in wild boars. Quantitative PCR was well suited to detect PCV-2 loads of clinical relevance. Genotype results provide clear evidence against the role of wild boars as a reservoir for domestic pig PCV-2.

7 Literaturverzeichnis

- AASV, 2007, American Association of Swine Veterinarians board approves porcine circovirus position statement – porcine circovirus associated disease: PCVAD case definition. *J Swine Health Prod* 15, 45
- Albina, E., A. Mesplede, G. Chenut, M.F. Le Potier, G. Bourbao, S. Le Gal, and Y. Leforban, 2000, A serological survey on classical swine fever (CSF), Aujeszky's disease (AD) and porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus infections in French wild boars from 1991 to 1998. *Vet Microbiol* 77, 43-57
- Allan, G.M., K.V. Phenix, D. Todd, and M.S. McNulty, 1994, Some biological and physico-chemical properties of porcine circovirus. *Zentralbl Veterinärmed, A* 41, 17-26
- Allan, G.M. and J. Ellis, 2000, Porcine circoviruses. A Review. *J Vet Diagn Invest* 12, 3-14
- Allan, G., S. Krakowka, J.A. Ellis, 2002, PCV-2: ticking time bomb. *Pig Prog* 18, 14-15
- Allan, G.M., F. McNeilly, B. Meehan, I. McNair, J. Ellis, S. Krakowka, C. Fossum, E. Watrang, P. Wallgren, and B. Adair, 2003, Reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs experimentally inoculated with a Swedish porcine circovirus 2 isolate. *J Vet Diagn Invest* 15, 553-560
- Allan, G.M., S. Kennedy, F. McNeilly, J.C. Foster, J.A. Ellis, S. Krakowka, B.M. Meehan, and B. Adair, 1999, Experimental reproduction of severe wasting disease by co-infection of pigs with porcine circovirus and porcine parvovirus. *J Comp Pathol* 121, 1-11
- Allan, G.M., F. McNeilly, S. Kennedy, B. Daft, E.G. Clarke, J.A. Ellis, D.M. Haines, B.M. Meehan, and B.M. Adair, 1998, Isolation of porcine circovirus-like viruses from pigs with a wasting disease in the USA and Europe. *J Vet Diagn Invest* 10, 3-10
- Allan, G.M., F. McNeilly, S. Kennedy, B. Meehan, D. Moffett, F. Malone, J. Ellis, and S. Krakowka, 2000b, PCV-2-associated PDNS in Northern Ireland in 1990. Porcine dermatitis and nephropathy syndrome. *Vet Rec* 146 711-712

- Allan, G.M., F. McNeilly, J. Ellis, S. Krakowka, A. Botner, K. McCullough, H. Nauwyck, S. Kennedy, B.M. Meehan, and C. Charreyre, 2004, PMWS: experimental model and co-infections. *Vet Microbiol* 98(2), 165-168
- Allan, G.M., F. McNeilly, S. Kennedy, B. Meehan, J. Ellis, and S. Krakowka, 2000c, Immunostimulation, PCV-2 and PMWS. *Vet Rec* 147, 170-171
- Allan, G.M., F. McNeilly, J.P. Cassidy, G.A. Reilly, B. Adair, W.A. Ellis, and M.S. McNulty, 1995, Pathogenesis of porcine circovirus; experimental infections of colostrum deprived piglets and examination of pig foetal material. *Vet Microbiol* 44, 49-64
- Armstrong, D., S. Bishop., 2004, Does genetics or litter effect influence mortality in PMWS. *Proceedings of International Pig Veterinary Society Congress* 809
- Balasz, M., J. Segales, C. Rosell, M. Domoingo, A. Mankertz, A. Urniza, and J. Plana-Duran, 1999, Experimental inoculation of conventional pigs with tissue homogenates from pigs with post-weaning multisystemic wasting syndrome. *J Comp Pathol* 121, 139-148
- Baradel, J.M., J. Barrat, J. Blaunchou, J.M. Boutin, C. Chastel, G. Dannacher, D. Delmore, Y. Gerard, J.M. Gourreau, V. Kihm, B. Larenaudie, C. Legoff, P.P. Pastoret, P. Perreau, A. Schwers, E. Thiry, D. Trap, G. Uilenberg, and P. Vannier, 1988, Results of a serological survey of wild mammals in France. *Revue Scientifique et Technique* 7, 873-883
- Bassami, M.R., D. Berryman, G.E. Wilcox, and S.R. Raidal, 1998, Psittacine beak and feather disease virus nucleotide sequence analysis and its relationship to porcine circovirus, plant circoviruses, and chicken anaemia virus. *Virology* 249, 453-459
- Baudouard, M.A., J. P. Buffereau, R. Vinet, P. Adam, P. Lamanda, L. Mieli, P. Blanchard, C. De Boissesson, D. Mahe, and A. Jestin, 2001, PCV-2, PPV and PRRSV detection in lungs of aborted fetuses. In: *Int. Conf. ssDNA Viruses of Plants, Birds and Primates, Saint - Malo 2001, Proc* 123
- Blanchard, P., D. Mahe, R. Cariolet, A. Keranflech, M.A. Baudouard, P. Cordioli, E. Albina, and A. Jestin, 2003a, Protection of swine against post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) by porcine circovirus type 2 (PCV-2) proteins. *Vaccine* 21, 4565-4575

- Blanchard, P., D. Mahe, R. Cariolet, C. Truong, M. LeDimna, C. Arnauld, N. Rose, E. Eveno, E. Albina, F. Madec, and A. Jestin, 2003b, An ORF2 protein-based ELISA for porcine circovirus type 2 antibodies in post-weaning multisystemic wasting syndrome. *Vet Microbiol* 94, 183-194
- Blanchard, P., D. Mahe, R. Cariolet, C. Truong, M. LeDimna, C. De Boisseson, N. Rose, E. Eveno, F. Madec, and A. Jestin, 2001, Detection of porcine circovirus type 2 (PCV-2) specific antibodies in post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) studies. In: *Int. Conf. ssDNA Viruses of Plants, Birds and Primates, Saint - Malo 2001, Proc 104*
- Boevink, P., P.W. Chu, and P. Keese, 1995, Sequence of subterranean clover stunt virus DNA: affinities with the geminiviruses. *Virology* 207, 354-361
- Brunborg, I.M., T. Moldal, C. M. Jonassen, 2004, Quantitation of porcine circovirus type 2 isolated from serum/plasma and tissue samples of healthy pigs and pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome using a TaqMan-based real-time PCR. *J Virol Methods* 122, 171-178
- Brügmann, M., P. Wohlsein, W. Baumgärtner, 2003, Charakterisierung einer PCV 2-assoziierten, vaskulär-bedingten Enzephalopathie mit zerebellärer Manifestation beim Schwein, 46. Tagung der Fachgruppe Pathologie der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft, Bamberg
- Buffereau, J.P., M.A. Baudouard, R. Vinet, F. Adam, N. Amena, H. Morvan, P. Blanchard, C. Truong, D. Mahe, and A. Jestin, 2001, PCV-1 and PCV-2 detection by PCR and in situ hybridisation in the diagnostic laboratory. In: *Int. Conf. ssDNA Viruses of Plants, Birds and Primates, Saint - Malo 2001, Proc 107*
- Buhk, H.J., I. Tischer u. M. A. Koch, 1985, Cloning and sequencing of the porcine circovirus PCV genome. *Zentralbl Bakteriol Org A* 260, 465-472
- Calsamiglia, M., J. Segales, J. Fraile, C. Rosell, M. Martin, E. Mateu, M. Domingo, 2002a, Epidemiologic study of porcine circovirus type 2 (PCV2) and porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in a porcine integration system, *Proceedings of the 17th International Pig Veterinary Society Congress (Iowa, USA)*, 115
- Calsamiglia, M., J. Segales, J. Quintana, C. Rosell, M. Domingo, 2002b, Detection of porcine circovirus types 1 and 2 in serum and tissue of pigs with and without postweaning multisystemic wasting syndrome, *J Clin Microbiol* 40, 1848-1850

- Calsamiglia, M., M. Sibila, J. Segales, C. Rosell, M. Domingo, 2002c, Detection of porcine circovirus type 2 in different routes of excretion: possible transmission routes and correlation with presence of postweaning multisystemic wasting syndrome characteristic lesions, Proceedings of the 17th International Pig Veterinary Society Congress (Iowa, USA), 28
- Caprioli, A., F. McNeilly, I. McNair, P. Lagan-Tregaskis, J. Ellis, S. Krakowka, J. McKillen, F. Ostanello, G. Allan, 2006, PCR detection of porcine circovirus type 2 (PCV2) DNA in blood, tonsillar and faecal swabs from experimentally infected pigs. *Res in Vet Sci* 81, 287-292
- Cariolet, R., P. Blanchard, M. LeDimina, D. Mahe, J. P. Jolly, C. De Boissesson, C. Truong, P. Ecobichon, F. Madec u. A. Jestin, 2001a, Experimental infection of pregnant SPF sows with PCV-2 through tracheal and muscular routes. In: *Int. Conf. ssDNA Viruses of Plants, Birds and Primates, Saint - Malo, Proc 128*
- Cariolet, R., P. Blanchard, M. Le Dimna, D. Mahe, A. Keranflec'h, P. Julou, B. Beaurepaire, C. De Boissesson, C. Truong u. A. Jestin, 2001b, Consequences of PCV-2 experimental infection of non immune SPF sows using the intrauterine route. In: *Int. Conf. ssDNA Viruses of Plants, Birds and Primates, Saint – Malo, Proc 129*
- Celer Jr., V., and P. Carasova, 2001, Evidence of porcine circovirus type2 infection of pigs in the Czech Republic. In: *Int. Conf. ssDNA Viruses of Plants, Birds and Primates, Saint - Malo, Proc 125*
- Charreyere, C., S. Bésème, A. Brun, M. Bublot, B. Lapostolle, P. Sierra, and A. Vaganay, 2006a, Virological protection of piglets against a PCV-2 experimental challenge by vaccinating piglets with an inactivated adjuvanted PCV-2 vaccine. *Proceedings of 19th IPVS congress, Copenhagen, Denmark, 30*
- Charreyre, C., S. Bésème, A. Brun, B. Lapostolle, P. Sierra, and A. Vaganay, 2006b, Post-Weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) protection of pigs born to sows vaccinated with an inactivated PCV-2 vaccine under field conditions. *Proceedings of 19th IPVS congress, Copenhagen, Denmark, 27*
- Cheung, A.K., 2003a, Comparative analysis of the transcriptional patterns of pathogenic and nonpathogenic porcine circoviruses. *Virology* 310, 41-49

- Cheung, A.K., 2003b, Transcriptional analysis of porcine circovirus type 2. *Virology* 305, 168-180
- Cheung, A.K., 2003c, The essential and nonessential transcription units for viral protein synthesis and DNA replication of porcine circovirus type 2. *Virology* 313, 452- 459
- Cheung, A.K., 2004a, Detection of template strand-switching during initiation and termination of DNA replication of porcine circovirus. *J Virol* 78, 4268-4277
- Cheung, A.K., 2004b, Identification of an octanucleotide motif sequence essential for viral protein, DNA, and progeny virus biosynthesis at the origin of DNA replication of porcine circovirus type 2. *Virology* 324, 28-36
- Cheung, A.K., S.R. Bolin, 2002, Kinetics of porcine circovirus type 2 replication. *Arch Virol* 147, 43-58
- Chianini, F., N. Majo, J. Segales, J. Dominguez, M. Domingo, 2003, Immunohistochemical characterisation of PCV-2 associate lesions in lymphoid and non-lymphoid tissues of pigs with natural postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Vet Immunol Immunopathol* 94, 63-75
- Choi, C., C. Chae, 1999, In-situ hybridization for the detection of porcine circoviruses with postweaning multisystemic wasting syndrome. *J comp Pathol* 121, 263-270
- Choi, J., G.W. Stevenson, M. Kiupel, B. Harrach, L. Anothayanontha, C.L. Kanitz, and S.K. Mittal, 2002, Sequence analysis of old and new strains of porcine circovirus associated with congenital tremors in pigs and their comparison with strains involved with postweaning multisystemic wasting syndrome. *Can J Vet Res* 66, 217-224
- Clark, E., 1997, Post - weaning multisystemic wasting syndrome. 28th Ann. Meet. Am. Assoc. Swine Pract., Quebec City 1997, 499 -501 Clark, E., J.C. Harding, 1998, Porcine circovirus and post-weaning multisystemic wasting syndrome. 29th Ann. Meet. Am Assoc Swine Pract, Boston, Proc 445-446
- Cotrell, T.S., R.M. Friendship, C.E. Dewey, 1999, Epidemiology of postweaning multisystemic wasting syndrome in Ontario. In: 30th Ann. Meet. Am. Assoc. Swine Pract, St. Paul, Proc 389-390Csagola, A., S. Kecskemeti, G. Kardos, I. Kiss, T. Tuboly, 2006, Genetic characterization of type 2 porcine circoviruses detected in Hungarian wild boars. *Arch Virol* 151, 495- 507

- Daft, B., R.W. Nordhausen, K.S. Latimer, and F.D. Niagro, 1996, Interstitial pneumonia and lymphadenopathy associated with circoviral infection in a sixweek-old pig. 39th Ann. Meet. Am. Assoc. Vet. Lab. Diag., Little Rock, Proc. 32-39
- Darwich, L., S. Pie, A. Rovira, J. Segales, M. Domingo, I.P. Oswald, E. Mateu, 2003, Cytokine mRNA expression profiles in lymphoid tissues of pigs naturally affected by postweaning multisystemic wasting syndrome. *J Gen Virol* 84, 2217-2125
- Darwich, L., J. Segales, M. Domingo, and E. Mateu, 2002, Changes in CD4+, CD8+, CD4+/CD8+ and immunoglobulin M-positive mononuclear cells of postweaning multisystemic wasting syndrome-affected pigs and age-matched uninfected wasted and healthy pigs correlate with lesions and porcine circovirus type 2 load in lymphoid tissues. *Clin Diag Lab Immunol* 9, 236-242
- Darwich, L., J. Segales, E. Mateu, 2004, Pathogenesis of postweaning multisystemic wasting syndrome caused by Porcine circovirus 2: an immune riddle. *Arch Virol* 149, 857-874
- Deboisseson, C., V. Beven, L. Bigarre, R. Thiery, N. Rose, E. Eveno, F. Madec, A. Jestin, 2004, Molecular characterization of porcine circovirus type 2 isolates from postweaning multisystemic wasting syndrome-affected and non-affected pigs. *J Gen Virol* 85, 293-304
- Del Pozo, M., 1999, Klinische Symptomatologie des PMWS. Circovirus und porcine Circovirose, Vortragszusammenfassung einer Tagung der Veterinärmedizinischen Fakultät der Autonomen Universität Barcelona, dt. Übersetzung von Dr. H. Kästner, Interessengemeinschaft Tierärztl. Bestandsbetreuung - Schwein im BPT, 6-8
- Domingo, M., J. Segales, 1999, Geschichte und aktuelle Probleme des porcinen Circovirus - Ätiologie, Klinik, Diagnose. Vortragsveranstaltung Schwein: Themenkreis porcines Circovirus und Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome. BPT-Kongress, Nürnberg, 117-121
- Dulac, G.C., A. Afshar, 1989, Porcine circovirus antigens in PK-15 cell line (ATCC CCL-33) and evidence of antibodies to circovirus in Canadian pigs. *Can J Vet Res* 53, 431-433
- Dupont, K., E. O. Nielsen, P. Baekbo, L. E. Larsen, 2008, Genomic analysis of PCV-2 isolates from Danish archives and a current PMWS case-control study supports a shift in genotypes with time. *Vet Microbiol* 128, 56-64

- Drolet, R., R. LaRochelle, M. Morin, B. Delisle, R. Magar, 2003, Detection rates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, porcine circovirus type 2 and swine influenza virus in porcine proliferative and necrotizing pneumonia. *Vet Pathol* 40, 143-148
- Duran, M., F. Ramos-Vrvar, D. Render, 1997, Porcine dermatitis nephropathy syndrome: a new condition to include into the differential diagnosis list for skin discoloration in swine. *Swine Health Prod* 5, 5241-5245
- Dyce, K. M., W. O. Sack, C. J. G. Wensing, 1991, *Anatomie der Haustiere: Lehrbuch für Studium und Praxis*, Enke Verlag, Stuttgart
- Edwards, S., J. J. Sands, 1994, Evidence of circovirus infection in British pigs. *Vet Rec* 134, 680-681
- Ellis, J., A. Bratanich, E.G. Clark, G. Allan, B. Meehan, D.M. Haines, J. Harding, K.H. West, S. Krakowka, C. Konoby, K. Hassard, K. Martin, F. McNeilly, 2000, Coinfection by porcine circoviruses and porcine parvovirus in pigs with naturally acquired postweaning multisystemic wasting syndrome. *J Vet Diagn Invest* 12, 21-27
- Ellis, J., S. Krakowka, M. Lairmore, D. Haines, A. Bratanich, E. Clark, G. Allan, C. Konoby, L. Hassard, B. Meehan, K. Martin, J. Harding, S. Kennedy, and F. McNeilly, 1999, Reproduction of lesions of postweaning multisystemic wasting syndrome in gnotobiotic piglets. *J Vet Diagn Invest* 11, 3-14
- Ellis, J., M. Spinato, C. Yong, K. West, F. McNeilly, B. Meehan, S. Kennedy, E. Clark, S. Krakowka, and G. Allan, 2003, Porcine circovirus 2-associated disease in Eurasian wild boar. *J Vet Diagn Invest* 15, 364-368
- Exel, B., Steineck, W. Sipos, M. Schuh, M. Schmoll, 2004, Evidence of porcine circovirus type 1, type 2 and porcine parvovirus in wild boars in Austria. *Proceedings of the 18th IPVS Congress, Hamburg, Germany*, 1, 106
- Fenaux, M., P. Halbur, M. Gill, T.E. Toth, and X.-J. Meng, 2000, Genetic characterization of Type 2 Porcine Circovirus (PCV-2) from Pigs with Multisystemic Wasting Syndrome in Different Geographic Regions of North America and Development of a Differential PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Assay To Detect and Differentiate between Infections with PCV-1 and PCV-2. *J Clin Microbiol* 38, 2494-2503

- Fenau, M., P.G. Halbur, G. Haqshenas, R. Royer, P. Thomas, P. Nawagitgul, M. Gill, T.E. Toth, and X.J. Meng, 2002, Cloned genomic DNA of type 2 porcine circovirus is infectious when injected directly into the liver and lymph nodes of pigs: characterization of clinical disease, virus distribution, and pathologic lesions. *J Virol* 76, 541-551
- Fenau, M., T. Opriessnig, P.G. Halbur, F. Elvinger, and X.J. Meng, 2004a, A Chimeric Porcine Circovirus (PCV) with the Immunogenic Capsid Gene of the Pathogenic PCV Type 2 (PCV-2) Cloned into the Genomic Backbone of the Non-pathogenic PCV-1 Induces Protective Immunity against PCV-2 Infection in Pigs. *J Virol* 78, 6297-6303
- Fenau, M., T. Opriessnig, P.G. Halbur, F. Elvinger, and X.J. Meng, 2004b, Two amino acid mutations in the capsid protein of type 2 porcine circovirus (PCV-2) enhanced PCV-2 replication in vitro and attenuated the virus in vivo. *J Virol* 78, 13440-13446
- Fenau, M., T. Opriessnig, P.G. Halbur, and X.J. Meng, 2003, Immunogenicity and pathogenicity of chimeric infectious DNA clones of pathogenic porcine circovirus type 2 (PCV-2) and nonpathogenic PCV-1 in weanling pigs. *J Virol* 77, 11232- 11243
- Garcia-Briones, M.M., G. C. Russell, R. A. Oliver, C. Tami, O. Taboga, E. Carrillo, E. L. Palma, F. Sobrino, E. J. Glass, 2000, Association of bovine DRB3 alleles with immune response to FMDV peptides and protection against viral challenge. *Vaccine* 19, 1167-1171
- Gibbs, M.J., G.F. Weiller, 1999, Evidence that a plant virus switched hosts to infect a vertebrate and then recombined with a vertebrate-infecting virus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96, 8022-8027
- Girard, C., M. Morin, Y. Elazhary, 1992, Experimentally induced proliferative and necrotizing pneumonie with an influenza A virus. *Vet Rec* 130, 206-207
- Grau-Roma, L., P.M. Heegaard, C. K. Hjulsager, M. Sibila, C.S. Kristensen, A. Allepuz, M. Pineiro, L.E. Larsen, J. Segales, L. Fraile, 2009, Pig-major acute phase protein and haptoglobin serum concentrations correlate with PCV2 viremia and the clinical course of postweaning multisystemic wasting syndrome. *Vet Microbiol* 138, 53-61

- Grierson, S.S., D.P. King, S. Sandvik, D. Hicks, Y. Spencer, T.W. Drew, M. Banks, 2004, Detection and genetic typing of type 2 porcine circovirus in archived pig tissues from the UK, *Arch Virol* 149, 1171-1183
- Hamel, A.L., L.L. Lin, G.P. Nayar, 1998, Nucleotide sequence of porcine circovirus associated with postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs. *J Virol* 72, 5262-5267
- Handa, A., B. Dickstein, N.S. Young, K.E. Brown, 2000, Prevalence of the newly described human circovirus, TTV, in United States blood donors. *Transfusion* 40, 245-251
- Hanley-Bowdoin, L., S.B. Settlage, B.M. Orozco, S. Nagar, D. Robertson, 2000, Geminiviruses: models for plant DNA replication, transcription and cell cycle replication. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 35, 105-140
- Harding, J.C., 1996, Post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS): preliminary epidemiology and clinical presentation. 27th Ann. Meet. West. Can. Assoc. Swine Pract, Saskatoon, 21
- Harding J. C., C. D. Backer, A. Tumber, K. A. McIntosh, S. E. Parker, D. M. Middleton, J. E. Ellis, S. Krakowka, 2008, Porcine circovirus-2 DNA concentration distinguishes wasting from nonwasting pigs and is correlated with lesion distribution, severity and nucleocapsid staining intensity. *J Vet Diagn Invest* 20, 274-282
- Harding, J.C., E.G. Clark, J.A. Ellis, 1999, The clinical expression of porcine circovirus. Allen D. Leman Swine Conference, Univ Minnesota, 252-254
- Harding, J.C., E. G. Clark, J. H. Strokappe, P. I. Willson, J. A. Ellis, 1998, Postweaning multisystemic wasting syndrome: epidemiology and clinical presentation. *Swine Health Prod* 6, 249-254
- Harding, R.M., T.M. Burns, G. Hafner, R.G. Dietzgen, J.L. Dale, 1993, Nucleotide sequence of one component of the banana bunchy top virus genome contains a putative replicase gene. *J Gen Virol* 74, 323-328
- Harms, P.A., P.G. Halbur, S. Sorden, 2002, Three cases of porcine respiratory disease complex associated with porcine circo virus type 2 infection. *J Swine Health Prod* 10, 27-30
- Hassing, A.-G., A. Botner, A.-S. Ladekjaer-Mikkelsen, P. Baekbo, S.E. Jorsal, V.

- Bille-Hansen, 2001, PMWS in Denmark? In: Int. Conf. ssDNA Viruses of Plants, Birds and Primates, Saint - Malo, Proc 93
- Hattermann, K., C. Roedner, C. Schmitt, T. Finsterbusch, T. Steinfeldt, A. Mankertz, 2004, Infection studies on human cell lines with porcine circovirus type 1 and porcine circovirus type 2. *Xenotransplantation* 11, 284-294
- Heinritzi, K., K. Aigner, M. Erber, C. Kersjes, and B. Wangenheim, 1999, Brucellose und Aujeszky-Krankheit in einem Wildschweingatter. Fallbeschreibung. *Tierärztl Praxis G* 27, 41-46
- Helle, P., R. Drolet, M.C. Germain, A. Bourgault, 1995, Systemic necrotizing vasculitis and glomerulonephritis in grower pigs in southwestern Quebec. *Can Vet J* 36, 150-154
- Hermodson, M., C. Abad-Zapatero, S.S. Abdel-Meguid, S. Pundak, M.G. Rossmann, J.H. Tremaine, 1982, Amino acid sequence of southern bean mosaic virus coat protein and its relation to three dimensional structure of the virus. *Virology* 5, 133-149
- Higgins, R.J., 1993, Glomerulo – nephropathy syndrome. *Pig Veterinary J* 31, 160-163
- Hinrichs, U., V.F. Ohlinger, S. Pesch, L. Wa Ng, R. Tegeler, F. Delbeck, M. Wendt, 1999a, Erster Nachweis einer Infektion mit dem porcinen Circovirus Typ 2 in Deutschland. *Tierärztl Umsch* 54, 255-258
- Hjulsager, C.K., Grau-Roma, L., Sibila, M., 2009, Inter-laboratory and inter-assay comparison on two real-time PCR techniques for quantification of PCV-2 nucleic acid extracted from field samples. *Vet Microbiol* 133 (1-2)
- Jacobsen, B. et al., 2009, Retrospective study on the occurrence of porcine circovirus 2 infection and associated entities in Northern Germany. *Vet Microbiol* 138
- Joisel, F., S. Randoux, S. Longo, A. Schade, 2006, Field evaluation of the effects of a PCV-2 vaccine (Circovac) in Germany during the exceptional license process. *Proceedings of 19th IPVS congress, Copenhagen, Denmark*, 26
- Juhan, N.M., T. LeRoith, T. Opriessnig, X.J. Meng, 2010, The open reading frame 3 (ORF3) of porcine circovirus type 2 (PCV2) is dispensable for virus infection but evidence of reduced pathogenicity is limited in pigs infected by an ORF3-null PCV2 mutant. *Virus res* 147, 60-66

- Kamstrup, S., A.M. Barfoed, T.H. Frimann, A.S. Ladekjaer-Mikkelsen, and A. Botner, 2004, Immunisation against PCV-2 structural protein by DNA vaccination of mice. *Vaccine* 22, 1358-1361
- Karuppannan, A.K., S. Liu, Q. Jia, M. Selvaraj, J. Kwang, 2010, Porcine circovirus type 2 ORF3 protein competes with p53 in binding to Pirh2 and mediates the deregulation of p53 homeostasis. *Virology* 398, 1-11
- Kato, A., M. Fujino, T. Nakamura, A. Ishihama, and Y. Otaki, 1995, Gene organization of chicken anemia virus. *Virology* 209, 480-488
- Katul, L., E. Maiss, S.Y. Morozov, and H.J. Vetten, 1997, Analysis of six DNA components of the faba bean necrotic yellows virus genome and their structural affinity to related plant virus genomes. *Virology* 233, 247-259
- Kekarainen, T., K. McCullough, M. Fort, C. Fossum, J. Segales, G. M. Allan, 2010, Immune responses and vaccine-induced immunity against Porcine circovirus typ 2. *Vet Immunol Immunopathol* 15, 136
- Kennedy, S., G. Allan, F. Mc Neilly, B.M. Adair, A. Hughes, P. Spillane, 1998, Porcine circovirus infection in Northern Ireland. *Vet Rec* 142, 495-496
- Kennedy, S., D. Moffett, F. McNeilly, B. Meehan, J. Ellis, S. Krakowka, G.M. Allan, 2000, Reproduction of lesions of postweaning multisystemic wasting syndrome by infection of conventional pigs with porcine circovirus type 2 alone or in combination with porcine parvovirus. *J Comp Pathol* 122, 9-24
- Kim, J., K. Jung, C. Chae, 2004, Prevalence of porcine circovirus type 2 in aborted fetuses and stillborn piglets. *Vet Rec* 155, 489-492
- Kim, J.H., Y.S. Lyoo, 2002, Genetic characterisation of porcine circovirus-2 field isolates from PMWS pigs. *J Vet Sci* 1, 31-39
- Kim H.H., S.I. Park, B.H. Hyun, S.J. Park, Y.J. Jeong, D.J. Shin, Y.H. Chun, M. Hosmillo, B.J. Lee, M.I. Kang, K.O. Cho, 2009, Genetic diversity of porcine circovirus type 2 in Korean pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome during 2005- 2007, *J Vet Med Sci* 71, 349-353
- Knell S. Willems H. Hertrampf B. Reiner G., 2005a, Comparative genetic characterization of Porcine Circovirus type 2 samples from German wild boar populations. *Vet Microbiol* 109, 169-177

- Knell, S., Willems, H., Hertrampf, B., Reiner, G., 2005b, Prävalenzen porciner Circoviren in ausgewählten deutschen Wildschweinpopulationen. *Tierärztl Praxis* 33(G), 247-253
- Konnai, S., S.N. Takeshima, S. Tajima, S.A. Yin, K. Okada, M. Onuma, Y. Aida, 2003, The influence of ovine MHC class II DRB1 alleles on immune response in bovine leukemia virus infection. *Microbiol Immunol* 47, 223-232
- Krakovka, S., J.A. Ellis, F. Mc Neilly, S. Ringler, D.M. Rings, G. Allan, 2001, Activation of the immune system is the pivotal event in the production of wasting disease in pigs infected with porcine circovirus-2 (PCV-2). *Vet Pathol* 38, 31-42
- Krakovka, S., J.A. Ellis, F. McNeilly, B. Meehan, D.M. Rings, K. McCullough, A. Botner, H. Nauwynck, C. Charreyere, G. Allan, 2003, The pathogenesis of PCV-2- associated postweaning multisystemic wasting syndrome in swine. In: *Proceedings of the 4th Int. Symp. Emerging and Re-emerging Pig Diseases*, Rome, 143-147
- Krakovka, S., J.A. Ellis, B. Meehan, S. Kennedy, F. McNeilly, and G. Allan, 2000b, Viral wasting syndrome of swine: experimental reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome in gnotobiotic swine by coinfection with porcine circovirus 2 and porcine parvovirus. *Vet Pathol* 37, 254-263
- Krakovka, S., J.A. Ellis, F. McNeilly, D. Gilpin, B. Meehan, K. McCullough, G. Allan, 2002, Immunologic features of porcine circovirus type 2 infection. *Viral Immunol* 15, 567-582
- Krakovka, S., J.A. Ellis, F. Mc Neilly, S. Ringler, D.M. Rings, G. Allan, 2001, Activation of the immune system is the pivotal event in the production of wasting disease in pigs infected with porcine circovirus-2 (PCV-2). *Vet Pathol* 38, 31-42
- Krakovka, S., J.A. Ellis, F. McNeilly, C. Waldner, G. Allan, 2005, Features of porcine circovirus-2 disease: correlations between lesions, amount and distribution of virus, and clinical outcome. *J. Vet. Diagn Invest* 17, 213-222
- LaRochelle, R., A. Bielanski, P. Muller, R. Magar, 2000a, PCR detection and evidence of shedding of porcine circovirus type 2 in boar semen. *J Clin Microbiol* 38, 4629-4632

- LaRochelle, R., A. Bielanski, P. Müller, R. Magar, 2000b, Evidence of shedding of porcine circovirus type 2 (PCV-2) in boar semen following experimental infection. In: 16th Int. Pig Vet Soc Congr, Melbourne, Proc 580
- LaRochelle, R., A. Bielanski, P. Müller, R. Magar, 2002a, PCR detection and evidence of shedding of Porcine Circovirus Type 2 in boar semen. *J Clin Microbiol* 38, 4629-4632
- LaRochelle, R., R. Magar, S. D'Allaire, 2002b, Genetic characterization and phylogenetic analysis of porcine circovirus type 2 (PCV-2) strains from cases presenting various clinical conditions. *Virus Res* 90, 101-112
- LaRochelle, R., R. Magar, S. D'Allaire, 2003, Comparative serologic and virologic study of commercial swine herds with and without postweaning multisystemic wasting syndrome. *Can J Vet Res* 67, 114-120
- LaRochelle, R., M. Morin, M. Antaya, R. Magar, 1999, Identification and incidence of porcine circovirus in routine field cases in Quebec as determined by PCR. *Vet Rec* 145, 140-142
- Le Cann, P., E. Albina, F. Madec, R. Cariolet, A. Jestin, 1997, Piglet wasting disease. *Vet Rec* 141, 660
- Lekcharoensuk, P., I. Morozov, P. Paul, N. Thangthumnyiom, W. Wajjawalku, X.J. Meng, 2004, Epitope mapping of the major capsid protein of type 2 porcine circovirus (PCV-2) by using chimeric PCV-1 and PCV-2. *J Virol* 78, 8135-8145
- Lipej Z., J. Segales, L. Jemersic, A. Olvera, B. Roic, D. Novosel, Z. Mihaljevic, L. Manojlovic, 2007, First description of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in wild boar (*Sus scrofa*) in Croatia and phylogenetic analysis of partial PCV-2 sequences. *Acta Vet Hung* 55, 389-404
- Liu, Q., L. Wang, P. Wilson, L.A. Babiuk, 2000, Quantitative, competitive PCR analysis of porcine circovirus DNA in serum from pigo with post weaning multisystemic wasting syndrome. *J Clin Microbiol* 38, 3474-3477
- Liu J., Y. Zuh, I. Chen, J. Hau, F. He, A. Lau, Z. Wang, A. K. Karuppanan, J. Kwang, 2007, The ORF3 protein of porcine circovirus type 2 interacts with porcine ubiquitin E3 ligase Pirh2 and facilitates p53 expression in viral infection. *J Virol* 81, 9560-9567
- Lopez-Soria, S., J. Segales, N. Rose, M.J. Vinas, P. Blanchard, F. Madec, A. Jestin, J. Casal, M. Domingo, 2005, An exploratory study on risk factors for postwean-

- ing multisystemic wasting syndrome (PMWS) in Spain. *Prev Vet Med* 69, 97-107
- Lukert, P., G.F. DeBoer, J.L. Dale, 1995, The Circoviridae. In: Murphy, F.A., C.M. Fauquet u. D.H.L. Bishop (Hrsg.) *Virus taxonomy*. Sixth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Springer Verlag, Wien und New York, 166-168
- MacDonald, W.F., K.C. Young, M.G. Sgar, S.J. Han, 2003, Isolation and characterization of porcine circovirus type-2 from sera of stillborn fetuses. *Can J Vet Res* 67, 108-113
- Madec, F., E. Eveno, P. Morvan, L. Hamon, P. Blanchard, R. Cariolet, N. Amenna, H. Morvan, C. Truong, D. Mahé, E. Albina, A. Jestin, 2000, Post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs in France: clinical observations from follow-up studies on affected farms. *Livest. Prod Sci* 63, 223-233
- Magar, R., P. Müller, R. LaRochelle, 2000, Retrospective serological survey of antibodies to porcine circovirus type 1 and type 2. *Can J Vet Res* 64, 184-186
- Mahe, D., P. Blanchard, C. Truong, C. Arnauld, P. Le Cann, R. Cariolet, F. Madec, E. Albina, A. Jestin, 2000, Differential recognition of ORF2 protein from type 1 and 2 porcine circoviruses and identification of immunorelevant epitopes. *J Gen Virol* 81, 1815-1824
- Mankertz, A., R. Caliskan, K. Hattermann, B. Hillenbrand, P. Kurzendoerfer, B. Mueller, C. Schmitt, T. Steinfeldt, T. Finsterbusch, 2004, Molecular biology of Porcine circovirus: analyses of gene expression and viral replication. *Vet Microbiol* 98, 81-88
- Mankertz, A., M. Domingo, J.M. Folch, P. LeCann, A. Jestin, J. Segales, B. Chmielewicz, J. Plana-Duran, D. Soike, 2000a, Characterisation of PCV-2 isolates from Spain, Germany and France. *Virus Res* 66, 65-77
- Mankertz, A., K. Hattermann, B. Ehlers, D. Soike, 2000b, Cloning and sequencing of columbid circovirus (coCV), a new circovirus from pigeons. *Arch Virol* 145, 2469-2479
- Mankertz, A., B. Hillenbrand, 2002, Analysis of transcription of Porcine circovirus type 1. *J Gen Virol* 83, 2743-2751
- Mankertz, A., F. Persson, J. Mankertz, G. Blaess, H.J. Buhk, 1997, Mapping and characterization of the origin of DNA replication of porcine circovirus. *J Virol* 71, 2562-2566

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

- Can Vet J 40, 277-278
- Morozov, I., T. Sirinarumitr, S.D. Sorden, P.G. Halbur, M.K. Morgan, K.J. Yoon, P.S. Paul, 1998, Detection of a novel strain of porcine circovirus in pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *J Clin Microbiol* 36, 2535-2541
- Mullis, K.B., F.A. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn, H. Erlich, 1986, Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Quant Biol* 51, 263-273
- Nauwynck, H., S. Glorieux, H. Favoreel, M. Pensaert, 2007, Cell biological and molecular characteristics of pseudorabies virus infections in cell cultures and pigs with emphasis on the respiratory tract. *Vet res* 38, 229-241
- Nawagitgul, P., P.A. Harms, I. Morozov, B.J. Thacker, S.D. Sorden, C. Lekcharoen-suk, P.S. Paul, 2002, Modified indirect porcine circovirus (PCV) type 2-based and recombinant capsid protein (ORF2)-based enzyme-linked immunosorbent assays for detection of antibodies to PCV. *Clin Diagn Lab Immunol* 9, 33-40
- Nawagitgul, P., I. Morozov, S.R. Bolin, P.A. Harms, S.D. Sorden, P.S. Paul, 2000, Open reading frame 2 of porcine circovirus type 2 encodes a major capsid protein. *J Gen Virol* 81, 2281-2287
- Nayar, G.P., A.L. Hamel, L. Lin, C. Sachvie, E. Grudeski, G. Spearman, 1999, Evidence for circovirus in cattle with respiratory disease and from aborted bovine fetuses. *Can Vet J* 40, 277-278
- Nei, M., 1996, Phylogenetic analysis in molecular evolutionary genetics. *Annu Rev Gen* 30, 371-403
- Niagro, F.D., A.N. Forsthoefel, R.P. Lawther, 1998, Beak and feather disease virus and porcine circovirus genomes: intermediates between the geminivirus and plant circoviruses. *Arch Virol* 143, 1723-1744
- Nishizawa, T., H. Okamoto, K. Konishi, H. Yoshizawa, Y. Miyakawa, 1997, A novel DNA virus (TTV) associated with elevated transaminase levels in posttransfusion hepatitis of unknown etiology. *Biochem. Biophys Res Commun* 241, 92-97
- O'Connor, B., H. Gauvreau, K. West, J. Bogdan, M. Ayroud, E.G. Clark, C. Konoby, G. Allan, J.A. Ellis, 2001, Multiple porcine circovirus 2-associated abortions and reproductive failure in a multisite swine production unit. *Can Vet J*, 551-553

- Olvera, A., M. Cortey, J. Segales, 2007, Molecular evolution of porcine circovirus type 2 genomes: phylogeny and clonality. *Virology* 357, 175-185
- Olvera, A., M. Sibila, M. Calsamiglia, J. Segales, M. Domingo, 2004, Comparison of porcine circovirus type 2 load in serum quantified by a real time PCR in post-weaning multisystemic wasting syndrome and porcine dermatitis and nephropathy syndrome naturally affected pigs. *J Virol Methods* 117, 75-80
- Onuki, A., K. Abe, K. Togashi, K. Kawashima, A. Taneichi, H. Tsunemitsu, 1999, Detection of porcine Circovirus from lesions of a pig with wasting disease in Japan. *J Vet Med Sci* 61, 1119-1123
- Opriessnig, T., M. Fenau, M. Thomas, M. Hoogland, M.F. Rothschild, X.J. Meng, P.G. Halbur, 2006, Evidence of breed dependent differences in susceptibility to Porcine Circovirus Type-2-associated disease and lesions. *Vet Pathol* 43, 281-293
- Opriessnig, T., E.L. Thacker, S. Yu, M. Fenau, X.J. Meng, P.G. Halbur, 2004, Experimental reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs by dual infection with *Mycoplasma hyopneumoniae* and porcine circovirus type 2, *Vet Pathol* 41, 624-640
- Oriessnig, T., S. Yu, J.M. Gallup, R.B. Evans, M. Fenau, F. Pallares, E.L. Thacker, C.W. Brockus, M.R. Ackermann, P. Thomas, X.J. Meng, P.G. Halbur, 2003, Effect of vaccination with selective bacterins on conventional pigs infected with type 2 porcine circovirus. *Vet Pathol* 40, 521-529
- Oslage, U., J. Dahle, T. Muller, M. Kramer, D. Beier, B. Liess, 1994, Prevalence of antibodies against the viruses of european swine fever, aujeszky's disease and "porcine respiratory and reproductive syndrome" in wild boars in the federal states Sachsen-Anhalt and Brandenburg. *Dtsch Tierarztl Wochenschr.* 101, 33-38
- Pallares, F.J., P.G. Halbur, T. Opriessnig, S.D. Sorden, D. Villar, B.H. Janke, M. Yaeger, J.D. Larson, J.K.J. Schwartz, K.J. Yoon, L.J. Hoffman, 2002, Porcine circovirus type 2 (PCV-2) coinfections in US field cases of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *J Vet Diagn Invest* 14, 515-519
- Palmer, K.E., 1998, The molecular biology of mastreviruses. *Adv Virus Res* 50, 183-234

- Pastor, J., J. Segales, R. Cuenca, M. Balasch, 1998, Gastric ulcers and haematological disorders in post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) affected pigs. 15th Int. Pig Vet. Soc. Congr., Birmingham, Proc 397
- Pensaert, M.B., R.E. Sanchez, H.J. Nauwynck, 2001, Transmission of porcine circovirus type 2 from the sow to the litter. In: Int. Conf. ssDNA Viruses of Plants, Birds and Primates, Saint - Malo, Proc 84
- Peritogianni, V., 2000, Clinical presentation of combined postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) and porcine nephropathy syndrome (PDNS) case in a three site production system in Great Britain (GB). In: 16th Int. Pig Vet. Soc. Congr., Melbourne, Proc 345
- Pesch, S., U. Schmidt, V.F. Ohlinger, 2000, Proliferative necrotizing pneumonia (PNP) is a result of coinfection with porcine reproductive and respiratory disease virus (PRRSV) and porcine circovirus type 2 (PCV-2). In: Proceedings of the 16th International Congress on Pigs Veterinary Society, 581
- Petrini, S., S. Barocci, S. Gavaudan, R. Villa, S. Briscolini, M. Sabbatini, C. Matozzi, F. Barchiesi, S. Salamida, M. Ferrari, M. Paniccia, G. Pezzotti, 2009, Detection of porcine circovirus type 2 (PCV-2) from wild boars in central Italy. *Eur J Wildl Res* DOI 10.1007/210344-009-0262-7
- Phenix, K.V., J.H. Weston, I. Ypelaar, A. Lavazza, J.A. Smyth, D. Todd, G.E. Wilcox, S.R. Raidal, 2001, Nucleotide sequence analysis of a novel circovirus of canaries and its relationship to other members of the genus *Circovirus* of the family *Circoviridae*. *J Gen Virol* 82, 2805-2809
- Quintana, J., J. Segales, C. Rosell, M. Calsamiglia, G.M. Rodriguez-Arriola, F. Chianini, J.M. Folch, J. Maldonado, M. Canal, J. Plana-Duran, M. Domingo, 2001, Clinical and pathological observations of pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *Vet Rec* 149, 357-361
- Reiner, G., S. Bronnert, C. Hohloch, C. Fresen, I. Haak, H. Willems, M. Reinacher, 2010a, Qualitative and quantitative distribution of PCV-2 in wild boars and domestic pigs in Germany. *Vet Microbiol* 145, 1-8
- Reiner, G., S. Bronnert, C. Hohloch, M. Reinacher, H. Willems, 2011, Distribution of ORF2 and ORF3 genotypes of porcine circovirus type 2 (PCV-2) in wild boars and domestic pigs in Germany. *Vet Microbiol* 148, 372-376
- Resendes, A., J. Segales, M. Balasch, M. Calsamiglia, M. Sibila, H. Ellerbrok, E. Mateu, J. Plana-Duran, A. Mankertz, M. Domingo, 2004, Lack of an effect of a

- commercial vaccine adjuvant on the development of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in porcine circovirus type 2 (PCV-2) experimentally Infected conventional pigs. *Vet Res* 35, 83-90
- Ritzmann, M., K. Vorbucher, M. Majzoub, W. Hermanns, K. Heinritzi, K. Geißler, and U. Truyen, 2002, Untersuchungen zur Verbreitung des porcinen Circovirus Typ 2 in Bayern. *Tierärztl Praxis G* 30, 386-391
- Rodriguez-Arrijoja, G.M., J. Segales, M. Balasch, C. Rosell, J. Quintana, J.M. Folch, J. Plana-Duran, A. Mankertz, M. Domingo, 2000, Serum antibodies to porcine circovirus type 1 and type 2 in pigs with and without PMWS. *Vet Rec* 146, 762-764
- Rodriguez-Arrijoja, G.M., J. Segales, M. Domingo, J. Plana-Duran, 2003, Lack of PCV-2 Infection in porcine species in Spain. *Vet Rec* 152, 371-372
- Rohde, W., J.W. Randles, P. Langridge, D. Hanold, 1990, Nucleotide sequence of a circular single-stranded DNA associated with coconut foliar decay virus. *Virology* 176, 648-651
- Royer, R. L., P. Nauwagitgul, P.G. Halbur, P. S. Paul, 2001, Susceptibility of porcine circovirus type 2 to commercial and laboratory disinfectants. *Journal of Swine Health Production* 9, 281-284
- Rose, N., G. Larour, G. LeDigerher, E. Eveno, J.P. Jolly, P. Blanchard, A. Oger, M. LeDimna, A. Jestin, F. Madec, 2003, Risk factors for porcine post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in 149 French farrow-to-finish herds. *Prev Vet Med* 61, 209-225
- Rosell, C., J. Segalés, M. Domingo, 2000a, Hepatitis and staging of hepatic damage in pigs naturally infected with porcine circovirus type 2. *Vet Pathol* 37, 687-692
- Rosell, C., J. Segalés, J. Plana-Durán, M. Balasch, G.M. Rodriguez-Arrijoja, S. Kennedy, G.M. Allan, F. McNeilly, K.S. Latimer, M. Domingo, 1999, Pathological, immunohistochemical, and in situ hybridization studies of natural cases of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs. *J Comp Pathol* 120, 59-78
- Rosell, C., J. Segalés, J.A. Ramos-Vara, J.M. Folch, G.M. Rodriguez-Arrijoja, C.O. Duran, M. Balasch, J. Plana-Durán, M. Domingo, 2000b, Identification of porcine circovirus in tissues of pigs with porcine dermatitis and nephropathy syndrome. *Vet Rec* 146, 40-43

- Rossmann, M.G., J.E. Johnson, 1989, Icosahedral RNA virus structure. *Annu Rev Biochem* 58, 533-573
- Rovira, A., M. Balasch, J. Segales, L. Garcia, J. Plana-Duran, C. Rosell, H. Ellerbrok, A. Mankertz, M. Domingo, 2002, Experimental inoculation of conventional pigs with porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus 2. *J Virol* 76, 3232-3239
- Ruiz-Fons, F., J. Segales, C. Gortazar, 2008, a review of viral diseases of the European wild boar: effects of population dynamics and reservoir role. *Vet J* 176, 158-169
- Ruiz-Fons, F., J. Vicente, D. Vidal, U. Hofle, D. Villanua, C. Gauss, J. Segales, S. Almeria, V. Montoro, C. Gortazar, 2000, Seroprevalence of six reproductive pathogens in European wild boar (*Sus scrofa*) from Spain: the effect on wild boar female reproductive performance. *Theriogenology* 65, 731-743
- Sambrook, J., M.J. Gething, 1989, Protein structure. Chaperones, paperones. *Nature* 342, 224-225
- Sanchez, R., H. Nauwynck, M. Pensaert, 2001a, Serological Survey of PCV-2 Antibodies in domestic and feral pig populations in Belgium. *Proc. SsDNA viruses of plants, birds, pigs and primates. St.Malo (France)*, 122
- Sanchez, R.E., H.J. Nauwynck, F. McNeilly, G.M. Allan, M.B. Pensaert, 2001b, Porcine circovirus 2 infection in swine fetuses inoculated at different stages of gestation. *Vet Microbiol* 83 169-176
- Sanchez, R.E.J., P. Meerts, H.J. Nauwynck, M.B. Pensaert, 2003, Change of porcine circovirus 2 target cells in pigs during development from fetal to early postnatal life. *Vet Microbiol* 95, 15-25
- Sano, Y., M. Wada, Y. Hashimoto, T. Matsumoto, M. Kojima, 1998, Sequences of ten circular ssDNA components associated with the milk vetch dwarf virusgenome. *J Gen Virol* 79, 3111-3118
- Schmoll, F., T. Opriessnig, B. Leeb, 2001, First report of post-weaning multisystemic wasting syndrome in pigs in Austria. In: *Int. Conf. ssDNA Viruses of Plants, Birds and Primates, Saint - Malo, Proc* 92
- Schulze, C., G. Neumann, I. Grutze, A. Engelhardt, C. Mirle, F. Ehlert, A. Hlinak, 2003, Case report: Porcine circovirus type 2 infection in an European wild boar (*Sus scrofa*) in the state of Brandenburg Germany. *Dtsch Tierärztl Wochenschr* 110, 426-428

- Sedlak K., E. Bartova, J. Machova, 2008, Antibodies to selected viral disease agents in wild boars from the Czech Republic. *J Wildl Dis* 44, 777-780
- Segales, J., 2002a, Update on postweaning multisystemic wasting syndrome and porcine dermatitis and nephropathy syndrome diagnostics. *J Swine Health Prod* 10, 227-281
- Segales, J., G.M. Allan, M. Domingo, 2005a, Porcine circovirus diseases. *Anim Health Res Rev* 6, 119-142
- Segales, J., M. Calsamiglia, A. Olvera, M. Sibilía, L. Badiella, M. Domingo, 2005b, Quantification of porcine circovirus type 2 (PCV-2) DNA in serum and tonsillar, nasal, tracheo-bronchial, urinary and faecal swabs of pigs with and without postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Vet Microbiol* 111, 223-229
- Segales, J., M. Domingo, 2002b, Postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs. A review *Vet Q* 24, 109-124
- Segales, J., M. Domingo, K.S. Latimer, 1998, Porcine circovirus is present in cases of porcine dermatitis and nephropathy syndrome (PDNS). In: 15th Int. Pig Vet. Soc. Congr., Birmingham, Proc 215
- Segales, J., C. Gortazar, J. Vicente, M. Domingo, 2003, First Description of post weaning multisystemic wasting syndrome in the wild boar (*Sus scrofa*) in Europe. 4th international Symposium on Emerging and Re-emerging Pig diseases, Rome, 177-178
- Segales, J., F. Madec, M. Domingo, 2002c, Postweaning multisystemic wasting syndrome and porcine circovirus type 2: the European perspective. In: Zimmerman, J.J., Yoon, K.J., Morilla, A. (Eds.), *Trends in Emerging Viral Diseases of Swine*. Iowa State University Press, Iowa, 397
- Segales, J., I. Marco, M. Calsamiglia, 2002d, Evidence of porcine circovirus type 2 infection in wild boar (*Sus scrofa*) in Spain. Proc. 17th IPVS Congress, Ames (USA), 397
- Segales, J., A. Olvera, L. Grau-Roma, C. Charreyre, H. Nauwynck, L. Larsen, K. Dupont, K. McCullough, J. Ellis, S. Krakowka, A. Mankertz, M. Fredholm, C. Fossum, S. Timmusk, N. Stockhofe-Zurwieden, V. Beattie, D. Armstrong, B. Grassland, P. Baekbo, G. Allan, 2008, PCV-2 genotype definition and nomenclature. *Vet Rec* 162, 867-868

- Segales, J., J. Pastor, R. Cuenca, M. Domingo, 1999a, Pathologie des porcinen Circovirus. Circovirus und porcine Circovirose, Vortragszusammenfassung einer Tagung der Veterinärmedizinischen Fakultät der Autonomen Universität Barcelona, dt. Übersetzung von Dr. H. Kästner, 8-10
- Segales, J., J. Pastor, R. Cuenca, M. Domingo, 2000, Haematological parameters in PMWS-affected pigs. *Vet Rec* 146, 675-676
- Segales, J., J. Piella, E. Marco, E.M. Mateu-De-Antonio, M. Domingo, 1998b, Porcine dermatitis nephropathy syndrome in Spain. *Vet Rec* 142, 483-486
- Segales, J., C. Rosell, M. Domingo, 2004, Pathological findings associated with naturally acquired porcine circovirus type 2 associated disease. *Vet Microbiol* 98, 137-149
- Segales, J., M. Sitjar, M. Domingo, 1997, First report of postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs in Spain. *Vet Rec* 141, 600-601
- Shibara, T., K. Sato, Y. Ishikawa, K. Kadota, 2000, Porcine circovirus induces B lymphocyte depletion in pigs with wasting disease. *J Vet Med Sci* 62, 1125-1131
- Sibila, M., M. Calsamiglia, J. Segales, P. Blanchard, L. Badiella, M. Le Dimna, A. Jestin, M. Domingo, 2004, Use of a polymerase chain reaction assay and an ELISA to monitor porcine circovirus type 2 infection in pigs from farms with and without postweaning multisystemic wasting syndrome. *Am J Vet Res* 65, 88-92
- Sibila, M., M. Calsamiglia, J. Segalés, A. Jestin, M. Domingo, 2001, Detection of porcine circovirus type 2 genome in nasal swabs and serum samples from naturally infected pigs using polymerase chain reaction. *J Vet Diagn Invest* 12, 562-565
- Sierra, M.A., J.M. DeLas Mulas, R.F. Molenbeek, C. Van Maanen, M. Quezada, E. Gruys, 1997, Porcine immune complex glomerulonephritis dermatitis (PIGD) syndrome. *Vet Pathol* 3, 63-70
- Sipos, W., J.C. Duvigneau, M. Willheim, F. Schilcher, R.T. Hartl, G. Hofbauer, B. Exel, P. Pietschmann, F. Schmoll, 2004, Systemic cytokine profile in feeder pigs suffering from natural postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) as determined by semiquantitative RT-PCR and flow cytometric intracellular cytokine detection. *Vet Immunol Immunopathol* 99, 63-71
- Smith, W.J., J.R. Thomson, S. Done, 1993, Dermatitis/nephropathy syndrome of pigs. *Vet Rec* 132, 47

- Sofia, M., Billinis, C., Psychas, V., Birtsas, P., Sofianidis, G., Leontides, L., Knowles, N., Spyrou, V., 2008, Detection and genetic characterization of porcine circovirus 2 isolates from the first cases of postweaning multisystemic and wasting syndrome in wild boars in Greece. *J Wild Dis* 44, 864-870
- Sorden, S., P. Harms, P. Nawagitgul, D. Cavanaugh, P. Paul, 1999, Development of a polyclonal-antibody-based method for the detection of type 2 porcine circovirus in formalin-fixed, paraffin embedded tissue. *J Vet Diagn Invest* 11, 528-530
- Sorden, S.D., 2000, Update on porcine circovirus and postweaning multisystemic wasting syndrome. *Swine Health Prod* 8, 133-136
- Spillane, P., S. Kennedy, B. Meehan, G. Allan, 1998, Porcine circovirus infection in the Republic of Ireland. *Vet Rec* 144, 511
- Steinfeldt, T., T. Finsterbusch, A. Mankertz, 2001, Rep and Rep' protein of porcine circovirus type 1 bind to the origin of replication in vitro. *Virology* 291, 152-160
- Stevenson, G.W., M. Kiupel, S.K. Mittal, J. Choi, K.S. Latimer, C.L. Kanitz, 2001, Ultrastructure of porcine circovirus in persistently infected PK-15-cells. *Vet Pathol* 36, 368-378
- Stubbe, C, 2001, Vom Frischling zum Hauptschwein. *Wildbiologische Erkenntnisse*. Dt. Landwirtschaftsverlag (Hrsg.):Schwarzwild. *Unsere Jagd Special*, 22-27
- Suh, D.K., C.S. Johnson, B.K. Park, H.S. Joo, 1998, Seroepidemiology of porcine circovirus infection in Midwestern U.S. swine farms. In: 15th Int Pig Vet Soc Congr, Birmingham, Proc 214
- Takahagi, Y., Toki, S., Nishiyama, Y., Morimatsu, F., Murakami, H., 2009, Differential Effects of Porcine Circovirus Typ 2 (PCV-2) Vaccination on PCV-2 Genotypes at Japanese Pig Farms. *J Vet Med Sci* 72, 35-41
- Takahashi, K., Y. Iwasa, M. Hijikata, S. Mishiro, 2000, Identification of a new human DNA virus (TTV-like mini virus, TLMV) intermediately related to TT virus and chicken anemia virus. *Arch virol* 145, 979-993
- Teifke, J.P., V. Kaden, U. Polster, 2001, Spontan aufgetretene progressive atrophische Rhinitis (PAR) bei europäischen Wildschweinen. Ein Fallbericht. *tierärztl Praxis G* 29, 157-162
- Thacker, B., E. Thacker, 2000, The PRDC battle continues. *Pig Prog* 16-18

- Thibault, S., R. Drolet, M.C. Germain, S. D'Allaire, R. LaRochelle, R. Magar, 1998, Cutaneous and systemic necrotizing vasculitis in swine. *Vet Pathol* 35, 108-116
- Thomas, P., T. Opriessnig, N. McKeown, X.-J. Meng, P. Halbur, 2005, Effect of PCV-2 passive antibody levels on immunization with chimeric PCV-1-2 vaccine and challenge with wild-type PCV-2. *Proceedings of the American Association of Swine Veterinarians Meeting*, Toronto, Ontario, Canada, 23-25
- Thomson, J.R., R.J. Higgins, W.J. Smith, S.H. Done, 2002, Porcine dermatitis and nephropathy syndrome. Clinical and pathological features of cases in the United Kingdom (1993-1998). *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med* 49, 430-437
- Thomson, J.R., A. Lainson, N. Thomson, W. Donachie, 1998, A study of *Pasteurella multocida* as a possible aetiological agent in porcine immune complex glomerulonephritis and dermatitis syndrome. In: 15th Int. Pig Vet. Soc. Cong., Birmingham, Proc 396
- Tischer, I., L. Bode, J. Apodaca, H. Timm, D. Peters, R. Rasch, S. Pociuli, E. Gerike, 1995, Presence of antibodies reacting with porcine circovirus in sera of humans, mice, and cattle. *Arch Virol* 140, 1427-1439
- Tischer, I., H. Gelderblom, W. Vettermann, M.A. Hoch, 1982, A very small porcine virus with a circular single-stranded DNA. *Nature* 295, 64-66
- Tischer, I., W. Miels, D. Wolff, M. Vagt, W. Griem, 1986, Studies on epidemiology and pathogenicity of porcine circovirus. *Arch Virol* 91, 271-276
- Tischer, I., D. Peters, R. Rasch, S. Pociuli, 1987, Replication of porcine circovirus: induction by Glucosamine and cell cycle dependence. *Arch Virol* 96, 39-57
- Tischer, I., R. Rasch, G. Tochtermann, 1974, Characterization of papovavirus- and picornavirus-like particles in permanent pig kidney celllines. *Zentralbl Bakteriell Org A* 226, 153-176
- Tood, D., A.N. Scott, N.W. Ball, B.J. Borghmans, B.M. Adair, 2002, Molecular basis of the attenuation exhibited by molecularly cloned highly passaged chicken anemia virus isolates. *J Virol* 76, 8472-8474
- Tschachtschal, J., 2000, Epidemiologie, klinische Erscheinungsformen, Pathomorphologie und Diagnostik der porcinen Circovirusinfektion. Hannover, Tierärztl Hochsch, Diss
- Vicente, J., J. Segales, U. Hofle, M. Balasch, J. Plana-Duran, M. Domingo, and C. Gortazar, 2004, Epidemiological study on porcine circovirus type 2 (PCV-2)

- infection in the European wild boar (*Sus scrofa*). *Vet Res* 35, 243-253
- Walker, I.W., C.A. Konoby, V.A. Jewhurst, I. McNair, F. McNeilly, B.M. Meehan, T.S. Cottrell, J.A. Ellis, G.M. Allan, 2000, Development and application of competitive enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of serum antibodies to porcine circovirus type 2. *J Vet Diagn Invest* 12, 400-405
- Wellenberg, G.J., N. Stockhofe-Zurwieden, M.F. de Jong, W.J. Boersma, A.R. Elbers, 2004, Excessive porcine circovirus type 2 antibody titres may trigger the development of porcine dermatitis and nephropathy syndrome: a case-control study. *Vet Microbiol* 99, 203-214
- West, K.H., J.M. Bystrom, C. Wojnarowicz, N. Shantz, M. Jacobson, G.M. Allan, D.M. Haines, E.G. Clark, S. Krakowka, F. McNeilly, C. Konoby, K. Martin, J.A. Ellis, 1999, Myocarditis and abortion associated with intrauterine infection of sows with porcine circovirus 2. *J. Vet Diagn Invest* 11, 530-532
- White, M., R.J. Higgins, 1993, Dermatitis nephropathy syndrome of pigs. *Vet Rec* 132, 199
- Yang, J.S., D.S. Song, S.Y. Ki, K.S. Lyoo, B.K. Park, 2003, Detection of porcine circovirus type 2 in feces of pigs with or without enteric disease by polymerase chain reaction. *J Vet Diagn Invest* 15, 369-373
- Yang, Z.Z., M. Habib, J.B. Shuai, W.H. Fang, 2007, Detection of PCV-2 DNA by SYBR Green I-based quantitative PCR. *Journal of Zhejiang University Science*, 8, 162-169
- Zupancic, Z., B. Jukic, M. Lojic, Z. Cac, 2002, Prevalence of Antibodies to Classical Swine Fever, Aujeszky's Disease, Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome, and Bovine Viral Diarrhoea Viruses in Wild Boars in Croatia. *J Vet Med* 49, 253-256, 8 Anhang

8 Anhang

8.1 Ansätze für Lösungen

Bezeichnung	Mengenangaben	Stoffe
1xTE	10mM	Tris
	1mM	EDTA
50xTAE (Elektrophorese-puffer)	242,28g	Tris
	18,61g	EDTA
	60,05g	Essigsäure
	ad 1000ml	aq. bidest
Auftragspuffer	0,3g	Orange G
	25g	Saccharose
	ad100ml	aq. Bidest
Natronlauge	0,2M	NaOH
Binding-Puffer (pH 7,6)	10mM	Tris-HCl
	2M	HCl
	1mM	EDTA
	0,1%	Tween 20 (Polyoxyethylen-20-sorbitanmonolaurat)
Annealing-Puffer (pH 7,6)	20mM	Tris-Acetat
	2mM	Mg-Acetat
Washing-Puffer	10mM	Tris-Acetat

8.2 Primer

8.2.1 Primer für Pyrosequenzierung

Primername	Sequenz (5'-3')	Amplifikatlänge [Bp]	Position ¹	Literatur
Pyro-PCV-2-F	GCCCTGAATTTCCATATGAAATAA	104	964-988	diese Studie
Pyro-PCV-2-R	Biotin-5'- ATTTAATCTTAAAGACCCCCCACT- 3'		1044-1048	
Pyro-PCV-2-S	TTTATCACTTCGTAATGG			
Orf3F	ATTGTTGGCGAGGAGGGTAA	318	180-200	
Orf3R	Biotin-5'- CCCGCGGAAATTTCTGAC-3'		480-548	
Orf3S	GTAAAGAAGGCAACTTAC			

8.2.2 Primer für nPCR und qPCR

Primernamen	Sequenz (5´- 3´)	Amplifikat- länge in Bp	Position ¹	Literatur
PCV S	CGG GAG GAG TAG TTW AYA TAG G	389	1323- 1343, fwd ²	Willems
PCV AS1	CAT CTT GGA AAC ATC CTC C		1667- 1685, rev ³	Willems
PCV AS2	CAT CTT GGC CAG ATC CTC			
PCV-1 AS	CCT TCA GAA ACC GTT ACA GAT GG	327	1628 – 1650, rev ³	Willems
PCV-1S	AGG GGT CAT AGG CCA AGT TG		1321- 1340, fwd ²	
PCV-2 IS	TAG GTT AGG GCT GTG GCC TT	264	1322 – 1341, fwd ²	Laro- chelle et al., 2000b
PCV-2 IAS	CCG CAC CTT CGG ATA TAC TG		1566 – 1585, rev ³	
PCV-2 F	CCA GGA GGG CGT TGT GAC T	98	1535- 1553, fwd ²	diese Studie
PCV-2 R	CGC TAC CGT TGG AGA AGG AA		1614- 1633, rev ³	
PCV-2 S	6-Fam 5´-AAT GGC ATC TTC AAC ACC CGC CTC T-3´ Tamra		1589-1609, fwd ²	

9 Danksagung

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

Mein Dank gilt insbesondere folgenden Personen:

Meinem Doktorvater Prof. Dr. Dr. habil. Gerald Reiner für die Überlassung der Arbeit und für die hervorragende und nette Betreuung.

Den Mitgliedern des molekularbiologischen Labors der Professur für Schweinekrankheiten unter Leitung von Herrn PD Dr. Hermann Willems für die interessante, lehrreiche und schöne Zeit und natürlich für die Hilfe, ohne die das Projekt nicht zu bewältigen gewesen wäre.

PD Dr. Hermann Willems für die Hilfe bei der Behebung von Problemen und der Entwicklung von Ideen für diese Arbeit.

Den Mitarbeitern der verschiedenen Schlachthöfe, ohne die es nicht möglich gewesen wäre die Proben zu sammeln.

Ein besonderes Dank auch all denen, die meine Arbeit immer wieder gelesen und korrigiert haben.

Meiner Freundin, die mich immer wieder motiviert hat und viele Stunden mit dem Lesen meiner Arbeit verbracht hat.

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

10 Erklärung

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

Bastian Balthasar Marcel Bronnert

ISBN 978-3-86345-214-8



**Verlag: Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft Service GmbH
35392 Gießen · Friedrichstraße 17 · Tel. 0641 / 24466 · Fax: 0641 / 25375
E-Mail: info@dvj.de · Internet: www.dvj.de**