

Aus dem Department für Pathobiologie
der Veterinärmedizinischen Universität Wien

Institut für Virologie

(Leiter: Univ. Prof. Dr. vet. med. Hans Tillmann Rümenapf)

**Molekularepidemiologische Charakterisierung von PRRSV
Feldstämmen in Österreich**

Diplomarbeit

Veterinärmedizinische Universität Wien

vorgelegt von

Kerstin Mayer

Wien, im Oktober 2019

Betreuer:

Univ.-Prof. Dr.med.vet. Hans Tillmann Rümenapf

Institut für Virologie

Department für Pathobiologie der Veterinärmedizinischen Universität

Wien

Betreuende Assistentin:

Dr. med. vet. Angelika Auer

Institut für Virologie

Department für Pathobiologie der Veterinärmedizinischen Universität

Wien

Begutachter:

Univ.-Prof., Priv.-Doz., Dr.med.vet. Andrea Ladinig, Dipl. ECPHM

Universitätsklinik für Schweine

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Historisches	1
1.2	Epidemiologie.....	2
1.3	Pathogenese.....	2
1.4	Klinik.....	3
1.4.1	Reproduktionsstörungen.....	3
1.4.2	Respiratorische Störungen	3
1.5	Das Genom	4
1.6	Erregerübertragung.....	4
1.6.1	Vertikale Übertragung.....	5
1.6.2	Horizontale Übertragung	5
1.7	Diagnostik.....	6
1.7.1	Direkter Erregernachweis.....	6
1.7.2	Indirekter Erregernachweis.....	7
1.8	Bekämpfung	7
1.8.1	Impfungen bei Sauen	7
1.8.2	Impfungen bei Ebern.....	8
1.8.3	Impfung bei Ferkeln	8
1.9	Konzept der Arbeit	8
2	Material und Methoden.....	8
2.1	Materialien	8
2.1.1	Probenmaterial.....	8
2.1.2	Verwendete Kits	8
2.1.3	Primer.....	9
2.2	Methoden.....	9

2.2.1	RNA Extraktion	9
2.2.2	RT-PCR	9
2.2.3	Kapillar-Elektrophorese mit QIAxcel	11
2.2.4	Direkte Aufreinigung der RT-PCR-Produkte für die Sequenzierung.....	11
2.2.5	Sequenzierung.....	11
2.2.6	Auswertende Verfahren.....	12
3	Ergebnisse	12
3.1	ORF7 sepzifische RT PCR	13
3.2	Ergebnisse der Kapillar-Elektrophorese mit QIAxcel	13
3.3	Ergebnisse des Nucleotide BLAST Programmes.....	17
3.4	Alignment und phylogenetischer Baum.....	25
4	Diskussion.....	27
5	Zusammenfassung.....	33
6	summary.....	34
7	Abkürzungsverzeichnis.....	35
8	Literaturverzeichnis.....	36
9	Tabellenverzeichnis.....	46
10	Abbildungsverzeichnis.....	47
11	Danksagung	48

1 Einleitung

1.1 Historisches

Mitte Jänner 1991 trat im Osten der Niederlande eine neue Schweinekrankheit auf, welche sich rasant in Gebieten mit intensiver Schweinehaltung ausbreitete (Wensvoort et al. 1991). Sie charakterisierte sich durch Spätabort und Totgeburten bei Sauen und durch Interstitielle Pneumonie in Mastschweinen und Ferkeln (Wensvoort et al. 1991). Es war das Porzine Respiratorische und Reproduktive Syndrom Virus (PRRSV), welches daraufhin das erste Mal in Lelystad isoliert wurde und demnach auch Lelystad Virus genannt wurde (Wensvoort et al. 1991). Damals wurde schon vermutet, dass es sich um ein behülltes Virus handelt (Wensvoort et al. 1991). Außerdem gelang es die Krankheit experimentell zu reproduzieren und es konnte herausgefunden werden, dass das Virus nur in porcinen Alveolarmakrophagen wächst (Wensvoort et al. 1991).

PRRSV führt zu hohen wirtschaftlichen Verlusten. Durchschnittlich sind das in den Niederlanden 126 € pro Sau und Ausbruchphase (Nieuwenhuis et al. 2012).

Schweine jeder Altersklasse sind empfänglich für eine PRRSV Infektion, jedoch variiert das klinische Erscheinungsbild stark in den unterschiedlichen Altersgruppen (van der Linden 2003). Zwei klinische Verlaufsformen werden grundsätzlich unterschieden: Reproduktionsstörungen bei Sauen (Terpstra et al. 1991) und respiratorische Probleme, welche hauptsächlich in der Aufzucht und Mast auftreten (Rossow et al. 1994). Das Virus kann vertikal (Terpstra et al. 1991) sowie auch horizontal übertragen werden (Bierk et al. 2001) und wird mit allen Exkreten und Sekreten ausgeschieden (Wills et al. 1997). Die diaplazentare Infektion der Feten wird als bedeutender Übertragungsweg beschrieben, vor allem weil intrauterin infizierte Ferkel über einen Zeitraum von zehn Wochen virämisch sein können (Große Beilage und Wendt 2013).

Bis heute ist die Herkunft des Virus nicht bekannt (Zimmerman et al. 2019). In den meisten schweineproduzierenden Ländern ist es mittlerweile endemisch verbreitet (Zimmerman et al. 2019). In Europa gelten folgende Länder als PRRS-frei: Norwegen (Grøntvedt et al. 2015), Finnland (Veijalainen und Tapiovaara 2000), Schweden (Carlsson et al. 2009) und die Schweiz (Nathues et al. 2016).

1.2 Epidemiologie

Ursprünglich wurde PRRSV in zwei Genotypen unterteilt: der in Europa vorherrschende Genotyp 1 (EU-Typ) und der in den USA verbreitete Genotyp 2 (US-Typ). Seit 2015 sind PRRSV-1 und auch PRRSV-2 eigene Spezies (Adams et al. 2017). Ihre Nukleotidsequenzen sind nur zu 63,4 % ident (Allende et al. 1999). PRRSV-1 kann in Subtypen 1, 2 und 3 unterteilt werden (Stadejek et al. 2008). Auch PRRSV-2 kann man in unterschiedliche Gruppen unterteilen (Shi et al. 2010). Beide Spezies, PRRSV-1 sowie auch PRRV-2 gehören zu der Gattung *Betaarterivirus* in der Familie der *Arteriviridae* in der Ordnung der *Nidovirales* (Adams et al. 2017). Das PRRSV ist ein behülltes Einzelstrang-RNA-Virus mit positiver Polarität (Zimmerman et al. 2019) und hat einen Durchmesser von 48-83 nm (Nanometer) (Benfield et al. 1992). Innerhalb der Spezies ist eine hohe genetische Diversität vorhanden (Murtaugh et al. 2010).

Folgende Informationen über in Österreich zirkulierende Feldstämme wurden bereits publiziert: eine vollständige ORF6 und eine unvollständige ORF7 Sequenz von 2002 "DV" (AF511526) (Revilla-Fernández et al. 2005). 21 ORF5 Sequenzen aus 2005 : AY875853 – AY875862, AY875853 – AY875862 (Indik et al. 2005). Sieben unvollständige ORF5 und vollständige ORF7 Sequenzen von 2008 ORF5: "LA1 – LA10" (KC522616 – KC522622) ORF7: "LA1 – LA10" (KF134447 – KF134453) (Jackova et al. 2012, Jackova et al. 2013). Drei ORF7 Sequenzen von 2007 "AUT1 – AUT3" (GU930371 - GU930373) (Balka et al. 2010). Eine ORF5 und eine ORF7 Sequenz aus 2013 "AUT13-883" (KT326148) und eine ORF5 und ORF7 Sequenz aus 2014 "AUT14-440" (KT334375) (Sinn, Zieglowski et al. 2016). Außerdem eine ORF2-7 Genom Sequenz aus 2015 "AUT15-33" (KU494019) (Sinn, Klingler et al. 2016).

1.3 Pathogenese

Nach oraler, intranasaler, intravenöser oder intrauteriner Infektion repliziert sich das Virus in lokalen Zellen wie Alveolarmakrophagen oder Gewebsmakrophagen. Die Virämie beginnt sehr schnell nach der Infektion und kann bis zu vier Wochen dauern (Murtaugh und Genzow 2011). Nach diesem akuten Stadium wird die Infektion persistent (Bierk et al. 2001). Das Virus repliziert sich, hauptsächlich im Lymphgewebe und kann für mindestens 2 Monate nach der Infektion übertragen werden (Bierk et al. 2001).

Der Prozess der diaplazentaren Infektion von Feten und anschließender fetaler Tod oder Abort ist bis jetzt nicht vollständig geklärt (Karniychuk und Nauwynck 2013). PRRSV durchquert die

Plazenta nur in der späten Trächtigkeit (Karniychuk und Nauwynck 2013). Potentielle Gründe wie z.B. zu wenige anfällige Zellen in der Plazenta oder Faktoren, die vor PRRSV Replikation im Endometrium schützen, müssen erst bewiesen werden (Karniychuk und Nauwynck 2013). Die durch PRRSV hervorgerufenen Reproduktionsstörungen in der späten Trächtigkeit, können noch nicht vollständig erklärt werden, es scheint aber eher ein Effekt der Gewebeschädigung in der Plazenta zu sein als ein direkter Effekt von Virus Wachstum im Fetus (Karniychuk und Nauwynck 2013). Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass es durch die Virusreplikation im fetalen Teil der Plazenta zu Schädigung des Mesenchyms kommt. Apoptose und Nekrose der Infizierten Zellen führen zu Degeneration der fetalen Plazenta wodurch sich der Fetus nicht normal entwickeln kann (Karniychuk und Nauwynck 2013). Es ist aber regelmäßig PRRSV Virus in den Feten nachzuweisen (Malgarin et al. 2019).

1.4 Klinik

Das klinische Erscheinungsbild zeigt sich von asymptomatisch bis seuchenhaft und hängt von vielen Faktoren ab, wie der Virulenz des Virusisolates (Tian et al. 2007), dem Alter der betroffenen Tiere (van der Linden et al. 2003), dem Immunstatus der Tiere (Wensvoort 1993), und Co-Infektionen (Harms et al. 2001).

1.4.1 Reproduktionsstörungen

Eine Infektion mit dem PRRSV-Virus kann zu Reproduktionsstörungen in der frühen und auch in der späten Trächtigkeit führen (Ladinig et al. 2014). In der Frühträchtigkeit kommt es zu Fruchttod (Prieto et al. 1997), in der späten Phase der Trächtigkeit kommt es zu Spätaborten, verkürzten Trächtigkeiten, mumifizierten Ferkeln und fetalem Tod. Auch treten lebensschwache, von Geburt an infizierte Ferkeln mit erhöhter Sterblichkeit auf (Mengeling et al. 1994). Vermehrtes Umrauschen bei Sauen (Alexopoulos et al. 2005) sowie verlängerte Trächtigkeit (Terpstra et al. 1991) kommen ebenfalls vor.

Neben den klassischen Anzeichen einer systemischen Erkrankung wie Anorexie und erhöhter innerer Körpertemperatur (Yaeger et al. 1993), kann es infolge einer PRRSV-Infektion von Ebern zur Reduktion der Samenqualität kommen (Prieto et al. 1996).

1.4.2 Respiratorische Störungen

Die Infektion mit PRRSV ähnelt in der Mast und bei Absetzferkeln anderen respiratorischen Erkrankungen (Thacker 2001). Sie ist gekennzeichnet durch erhöhte innere Körpertemperatur, Niesen, Dyspnoe, Husten, Lethargie (Rossow et al. 1994), verminderte Gewichtszunahme

(Klinge et al. 2009) und vermehrte Co-Infektionen (Wills et al. 2000). PRRSV ist außerdem am porcine respiratory disease complex (PRDC) beteiligt (Thacker 2001).

Eine akute PRRSV-Infektion kann sich unterschiedlich äußern: Apathie, Blässe, Schwäche, vereinzelt Muskelzittern, Grätschen und respiratorische Störungen nach intrauteriner Infektion (Terpstra et al. 1991) sowie Anorexie, Zyanosen (Stevenson et al. 1993), Fieber (Pol et al. 1991), Diarrhoe, periokuläre Ödeme, zentralnervöse Störungen (Rossow 1998) sowie deutlich erhöhte Mortalitätsraten (Terpstra et al. 1991).

1.5 Das Genom

Das Genom ist 13 - 16 kb (Kilobasenpaare) lang und enthält mindestens zehn offene Leseraster ORFs (open reading frames) (Firth et al. 2011). ORF1a und ORF1b machen 75 % des Genoms aus und kodieren die Nichtstrukturproteine (Fang und Snijder 2010).

Der Replikationsprozess beginnt mit der Translation von ORF1a und ORF1b durch Wirtsribosomen. Nach der autokatalytischen Spaltung bilden die Nichtstrukturproteine membranassoziierte Replikations- und Transkriptionskomplexe, die das Virusgenom amplifizieren und die subgenomischen mRNAs synthetisieren. Zuerst werden vollständige und subgenomische RNA-Moleküle mit negativer Polarität hergestellt, dann werden sie in ein positives virales Genom und in subgenomische mRNAs transkribiert. Die charakteristischen subgenomischen mRNAs werden anschließend in die Strukturproteine übersetzt. Das Nucleocapsid wird aus Molekülen zusammengesetzt, die das positiv wahrgenommene Virusgenom binden und dann an intrazellulären Membranen knospen. Hierdurch erhält es seine Hülle, die aus den anderen Strukturproteinen besteht. Die nachkommenden Virionen werden durch Exozytose freigesetzt (Faaberg 2008) (Yun und Lee 2013).

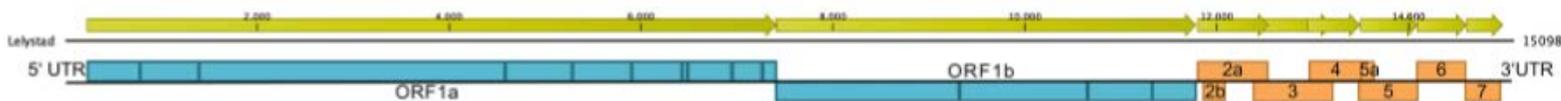


Abb. 1

Schematische Darstellung des PRRS-Virusgenoms (15 kb) (Sinn, Ziegowski et al. 2016).

1.6 Erregerübertragung

Die Infektion mit PRRSV wurde im Tierversuch bei Schweinen auf verschiedene Arten herbeigeführt: intramuskulär (Cano et al. 2009), perkutan (Baker, SR et al. 2012), intranasal

(Wills et al. 1997), intravenös (Mengeling et al. 1994) intrauterin (Christianson et al. 1992) und vaginal also über Samen (Gradil et al. 1996). Es ist abhängig vom Übertragungsweg, welche minimale Dosis nötig ist, um eine Infektion auszulösen (Hermann et al. 2005). Bei intramuskulärer Injektion sind weniger als $10^{2,2}$ TCID₅₀/ml (Tissue Culture Infection Dose 50/Milliliter) nötig, bei intranasaler Infektion $10^{4,0}$ TCID₅₀/ml und bei oraler Infektion $10^{5,3}$ TCID₅₀/ml (Hermann et al. 2005).

Innerhalb von zwölf Stunden post infectionem nach experimenteller oronasaler Infektion kommt es zur Virämie und ein positiver Erregernachweis in Tonsillengewebe, Makrophagen der Lunge und in der Nasenschleimhaut ist möglich (K. D. Rossow et al.).

1.6.1 Vertikale Übertragung

PRRSV kann diaplazentar von der Sau auf ihre Feten übertragen werden, was unter anderem zu fetalem Tod und zu lebensschwachen Ferkeln führt (Terpstra et al. 1991). Die intrauterine Übertragung wird gehäuft in der späten Trächtigkeit beobachtet (Kranker et al. 1998) ist aber während aller Trächtigkeitsstadien möglich (Christianson et al. 1993). Die Übertragung des Virus post partum von den Sauen auf ihre Ferkel erfolgt über ihre Milch (Cano et al. 2009) oder über alle anderen Ex- und Sekrete (Christianson et al. 1993, Wills et al. 1997)

1.6.2 Horizontale Übertragung

Direkte Übertragung

Da das Virus mit allen Ex- und Sekreten ausgeschieden wird, stellen diese potentielle Übertragungswege dar (Christopher-Hennings et al. 1995, Jane Christopher-Hennings et al. 1995, Wills et al. 1997). Die Ausscheidungsdauer variiert stark zwischen den Körperflüssigkeiten und die Ausscheidung ist intermittierend (Wills et al. 1997). PRRSV kann mittels Virusisolation 35 Tage p. i. (post infectionem) im Trachealsekret, 14 Tage p. i. im Urin und 42 Tage p. i. im Speichel nach intranasaler Infektion nachgewiesen werden (Wills et al. 1997). Christopher-Hennings et al. 1995 gelingt es an Tag 92 p. i. das Virus in Sperma zu detektieren. Aus Nasensekret kann das Virus bis zum 35. Tag p. i. isoliert werden (Wills et al. 1997). Bei Kot gibt es unterschiedliche Ergebnisse.

Indirekte Übertragung

PRRSV kann durch belebte und unbelebte Vektoren übertragen werden (Baker, SR et al. 2012, Otake et al. 2003). Baker, SR et al. 2012 gelingt es das Virus von infizierten auf naive Schweine durch ungereinigte Injektionskanülen zu übertragen. Auch durch intradermales

Impfen kann das Virus übertragen werden (Baker, SR et al. 2012). Ungenügend gereinigt, getrocknet und desinfizierte Transportfahrzeuge stellen auch eine potentielle Infektionsquelle dar (Dee et al. 2004). Aerogene Übertragung über größere Distanzen ist nicht eindeutig geklärt. Einfache Hygienemaßnahmen wie Wechsel der Stallkleidung und Stiefel sowie Händewaschen reichen aus, um die Übertragung zwischen Stallabteilen zu verhindern (Otake, Dee, Rossow, Deen et al. 2002). *Musca domestica* (Hausfliegen) (Otake et al. 2003) und *Aedes vexans* (Moskitos) (Otake, Dee, Rossow, Moon et al. 2002) können belebte Vektoren sein.

1.7 Diagnostik

Zur Bestätigung eines Verdachts einer PRRSV-Infektion wird ein direkter Erregernachweis empfohlen (Zimmerman et al. 2019).

1.7.1 Direkter Erregernachweis

Für den direkten Erregernachweis eignen sich BALF (bronchoalveolar lavage fluid), Tonsillenproben, Lymphknoten, Lungengewebe, oropharyngeale Geschabsel (Horter et al. 2002), Serumproben, OFS (oral fluid samples) (Wills et al. 1997), Fleischsaft (Große Beilage und Wendt 2013) und Spermaproben (Christopher-Hennings et al. 1995).

Folgende Verfahren stehen für den Nachweis des PRRS-Virus zur Verfügung: Die traditionelle Virusisolierung mit Hilfe von Zellkulturen (Wensvoort et al. 1991), IHC (Immunhistochemie) (Rossow et al. 1996), dFA (direct fluorescent antibody) an gefrorenen Lungen (Rossow et al. 1995) wird kaum mehr verwendet. Die Regel ist der spezifische PRRSV-Genomfragmente Nachweis durch: RT-PCR (Mardassi et al. 1994), real-time RT-PCR (Kleiboeker et al. 2005) und seltener ISH (In-situ-Hybridisierung) (Larochelle et al. 1996). Zum Nachweis von PRRSV mit RT-PCR (Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion) wird vor allem das ORF7 verwendet, da dies der am höchsten konservierte Bereich ist (Große Beilage und Wendt 2013). Der ORF5 Bereich ist sehr variabel und dient deshalb zu phylogenetischen Analysen (Zimmerman et al. 2019).

1.7.2 Indirekter Erregernachweis

Da nicht zwischen Impfantikörpern, maternalen Antikörpern oder Antikörpern durch Feldinfektion unterschieden werden kann, wird die Serologie vor allem dazu genutzt um den Status von ungeimpften Herden zu ermitteln (Gerber et al. 2014, Zimmerman et al. 2019). In der Routinediagnostik wird ein Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) als Mittel der Wahl für serologische Nachweisverfahren benutzt (Ge et al. 2019). Außerdem wären noch folgende serologische Testverfahren möglich: Serumneutralisationstest (Yoon et al. 1994), Immunchromatographie (Li et al. 2017), IFAT (indirect fluorescent antibody test) (Langenhorst et al. 2012) und IPMA (immunoperoxidase monolayer assay) (OIE - World Organisation for Animal Health 2012).

1.8 Bekämpfung

Die Prophylaxe bei PRRSV ist sehr wichtig, da es keine spezifische Therapie gibt, sondern nur symptomatisch behandelt werden kann. (Zimmerman et al. 2019). Impfungen (Linhares et al. 2012) und strenge Biosecurity sind wichtige Maßnahmen um Schweine vor einer PRRSV-Infektion zu schützen. (Cho und Dee 2006) Die hohe Variabilität des Virus und die persistierende Infektion der Tiere stellen dabei eine große Herausforderung in Bezug auf Kontrolle und Elimination der PRRSV-Infektion dar. (Zimmerman et al. 2019) Zukauf neuer Tiere sollte daher nur aus anerkannt freien Betrieben erfolgen, um die Kontamination eines gesunden Bestandes zu vermeiden. (Sinn, Leonie J. 2016) Außerdem sollten Hygieneregeln im Stallmanagement für Personal und Fahrzeuge berücksichtigt werden (Cho und Dee 2006).

Inaktivierte und auch attenuierte Vakzine stehen auf dem österreichischen Markt zur Verfügung. Sie können keinen Schutz vor der Infektion garantieren, sondern bewirken eine Reduktion des Krankheitsverlaufes, eine verkürzte Virämiedauer und eine verringerte Virusausscheidung (Kimman et al. 2009).

1.8.1 Impfungen bei Sauen

Bei Sauen werden PRRS-Impfungen durchgeführt um Reproduktionsstörungen vorzubeugen und zur Stabilisierung der Herde im Hinblick auf PRRSV-induzierter respiratorischer Erkrankungen beim Ferkel (Große Beilage und Wendt 2013). Übliche Impfschemata empfehlen eine Impfung alle 3-5 Monate oder am 60. Trächtigkeitstag und am 6. Tag nach der Geburt (Große Beilage und Wendt 2013). Dies bedeutet, dass die Sauen bis zu viermal im Jahr geimpft werden. Für Sauen sind inaktivierte als auch attenuierte Vakzinen zugelassen.

1.8.2 Impfungen bei Ebern

Für Eber gibt es derzeit keine zugelassenen Impfstoffe (Große Beilage und Wendt 2013).

1.8.3 Impfung bei Ferkeln

Für Ferkel sind ausschließlich attenuierte Impfstoffe zugelassen (Große Beilage und Wendt 2013). Laut Große Beilage und Wendt 2013 ist es am besten, die Ferkel in der 4. bis 6. Lebenswoche, nach dem Rückgang der maternalen Antikörper zu impfen. Mittlerweile gibt es allerdings einen neuen Impfstoff, der schon ab dem ersten Lebenstag zugelassen ist (Balasch et al. 2018).

1.9 Konzept der Arbeit

In dieser Arbeit wurden PRRSV positive Proben, die im Zeitraum vom Jänner 2017 bis Februar 2019 am Institut für Virologie der Veterinärmedizinischen Universität Wien eingingen, nach Bundesländern sortiert und im ORF7 Bereich sequenziert. Mit Hilfe der phylogenetischen Typisierung wurde bestimmt, welchen, in der NCBI GenBank publizierten PRRSV Stämmen österreichische Viren im Zeitraum 2017/2018 ähnlich sind und wie sie sich auf die Bundesländer Österreichs verteilen.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Probenmaterial

Von der Virologie der Vetmeduni Vienna wurden PRRSV positive Proben über den Zeitraum 2017 bis Februar 2019 zu Verfügung gestellt, welche zu diagnostischen Zwecken von der Universitätsschweineklinik der Vetmeduni Vienna an die Virologie geschickt wurden um den PRRSV Status von verschiedenen Betrieben zu bestimmen. Es wurden nur Proben berücksichtigt, von denen bereits Nukleinsäureextrakte vorlagen.

2.1.2 Verwendete Kits

Tab. 1

Kit	Hersteller

QIAamp Viral RNA Mini QIAcube Kit	Qiagen, Deutschland
OneTaq® One-Step RT-PCR Kit	New England Biolabs, USA
QIAxcel DANN Screening Kit (2400)	Qiagen, Deutschland
Quantum Prep® PCR Kleen Spin Columns	Bio-Rad, USA
Mix2Seq Kit	Eurofins, Deutschland

2.1.3 Primer

Für die PRRSV ORF7 RT-PCR wurden folgende Primer verwendet:

forward primer (PRS133): 5`-ATGGCCAGCCAGTCAATC-3`

reverse primer (PRS134): 5`-TCGCCCTAATTGAATAGGTG-3`

2.2 Methoden

2.2.1 RNA Extraktion

Wenn die Organ- oder Serumproben nicht sofort bearbeitet werden konnten, wurden sie zuerst bei -80 °C eingefroren. Eine 1 %ige Organ-Suspension in phosphatgepufferter Kochsalzlösung, wurde mittels TissueLyser der Firma Qiagen (Hilden, Deutschland) hergestellt, für 10 sec. gevortext und bei 13000 rpm 1 min zentrifugiert. 140 µl des Überstandes wird für die Nucleinsäureextraktion verwendet.

Für die Nucleinsäure Extraktion wurde das QIAamp Viral RNA Mini QIAcube Kit der Firma Qiagen (Deutschland) laut den Anweisungen des Herstellers verwendet. Wenn die Extrakte nicht sofort verwendet wurden, wurden sie bei -80 °C aufbewahrt.

2.2.2 RT-PCR

Mittels RT-PCR ist es möglich sehr kleine Mengen an DNA bzw. RNA zu vervielfältigen. Dazu benötigt man Primer, ein Template, eine Polymerase, Desoxyribonucleosidtriphosphate und einen Puffer. Die RT-PCR findet in einem Thermocycler statt. Der erste Schritt ist die Denaturierung der DNA. Dabei werden durch Hitze die Wasserstoffbrückenbindungen der DNA gelöst. Danach kommt das Annealing, hier lagern sich die Primer an ihre Bindungsstellen

der Einzelstränge an. Die letzte Phase ist die Elongation, hier bildet die Polymerase ausgehend von den Primern mit Desoxyribonucleosidtriphosphaten eine kompletäre Kopie der Matritze. Diese drei Schritte werden im Thermocycler immer wieder wiederholt. In dieser Arbeit 45 mal.

Bei der RT-PCR erfolgt die Amplifikation von RNA-Sequenzen nach der Umschreibung der RNA in einzelsträngige cDNA. Zur Durchführung der RT-PCR wurde die RNA laut Protokoll des OneTaq® One-Step RT-PCR Kit (New England Biolabs) aufbereitet. Dazu wurde der Mastermix mit 22,5 µl pro Probe wie folgt hergestellt:

Tab. 2

one taq one-step reaction mix	12,5 µl
RNAse freies H ₂ O	8,5 µl
one taq one-step enzyme mix	1 µl
Primergemisch F(40 µm) R(40 µm)	0,5 µl
Template	2,5 µl

Zur Durchführung der RT-PCR wurden folgende Geräteeinstellungen vorgenommen:

Tab. 3

Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklenanzahl
cDNA-Synthese	48 °C	20 min	1
RT-Inaktivierung	94 °C	1 min	1
Denaturierung	94 °C	15 sec	45
Annealing	54 °C	30 sec	
Elongation	68 °C	30 sec	
Dissoziation	68 °C	5 min	1

Zusätzlich zu den Proben wurden auch negativ Kontrollen untersucht. Diese wurden mit den Proben mitextrahiert und dienen dem Ausschluss einer Kreuzkontamination im Zuge der Extraktion und der RT-PCR.

2.2.3 Kapillar-Elektrophorese mit QIAxcel

Mit Hilfe des QIAxcel-System (Qiagen) werden die Amplifikate aus der RT-PCR mit Gelkartuschen vollautomatisch aufgetrennt. Die Daten können entweder in einem Elektropherogramm oder in einer Gelbildansicht dargestellt werden.

Die Kapillarelektrophorese ist eine trägerfreie elektrophoretische Trennmethode. Die Trennung der Analyte erfolgt in Glaskapillaren. Hauptkomponenten der Kapillar-Elektrophorese sind eine Elektrophoresekammer, welche die Kapillare enthält, 2 Pufferreservoirs, in welche die Kapillare eintaucht, eine Hochspannungsquelle, welche über 2 Platin-Elektroden mit den Puffergefäßen verbunden ist, ein Detektor sowie ein Datenerfassungssystem. Durch ein hydrodynamisches Injektionssystem werden die Analyte in die elektrolytgefüllte Kapillare injiziert. Durch das Anlegen einer hohen Feldstärke wandern die Analyte entsprechend ihrer elektrophoretischen Mobilität in diskreten Banden durch die Kapillaren und können registriert werden.

2.2.4 Direkte Aufreinigung der RT-PCR-Produkte für die Sequenzierung

Die direkte Aufreinigung der RT-PCR-Produkte dient der Entfernung von überschüssigen RT-PCR-Reagenzien wie Enzymen und Nukleotiden aus den RT-PCR-Produkten und ist die Voraussetzung für die nachfolgende Sequenzier-PCR. Die Aufreinigung wurde laut Anleitung des Herstellers mit den Quantum Prep® PCR Kleen Spin Columns von der Firma „BIO-RAD“ durchgeführt. Zuerst wurden die Spin Columns kurz gevortext, danach bei 3600 rpm 1 min abzentrifugiert. Anschließend wurde das Collection Tube entleert und der Vorgang wiederholt. Die Eppendorftubes wurden mit Proben-Nummern beschriftet. Dann wurden die Collection Tubes verworfen und die Spin Columns in die beschrifteten Eppendorftubes überführt. Die PCR-Produkte wurden auf die Filter pipettiert ohne diese dabei zu durchstechen. Anschließend wurden die Spin Columns mit den PCR-Produkten bei 3600 rpm für 2 min zentrifugiert. Dann wurden die Spin Columns nicht mehr gebraucht und können verworfen werden.

2.2.5 Sequenzierung

Bei nur schwach positiven Proben wurden 15 µl PCR-Produkt und 2 µl Primer PRRSV ORF7 (10mM) verwendet. Für die restlichen positiven Proben wurden 10 µl PCR-Produkt, 5 µl RNase freies H₂O und 2 µl Primer PRRSV ORF7 (10 mM) verwendet. Die beschriebenen Komponenten wurden in das „Mix2Seq Kit“ der Firma Eurofins pipetiert und verschickt. Die

Sequenzierung wurde von der Firma Eurofins durchgeführt. Die Sequenzen wurden mit BioEdit und CLC Sequence Viewer (Qiagen) analysiert.

2.2.6 Auswertende Verfahren

Die erhobenen Daten wurden durch die Verwendung von Microsoft Office Excel 2010 und dem Programm „CLC Sequence viewer“ (Qiagen,USA) analysiert und mit dem Programm Nucleotide BLAST des National Center for Biotechnology Information (USA) wurden die Sequenzen mit Sequenzen der NCBI-Gendatenbank verglichen. Anschließend wurde ein phylogenetischer Baum nach der Neighbor-joining method ebenfalls mit dem Programm „CLC Sequence viewer“ (Qiagen,USA) erstellt.

3 Ergebnisse

Ziel der Arbeit war eine vergleichende Zusammenstellung der PRRSV Isolate, die im Zeitraum 2017-2019 am Institut für Virologie eingegangen sind. Zu Beginn meiner Arbeit wurde die Probandenliste der Virologie nach positiven PRRSV Proben im Zeitraum vom 1. Jänner 2017 bis 28. Februar 2019 durchsucht. Die positiven Proben wurden in einer Excel Liste dokumentiert und nach Bundesländern sortiert. Außerdem wurde dazu notiert, ob von dieser Probe bereits eine ORF7 Sequenz, eine ORF5 Sequenz oder keine Sequenz vorhanden war.

Insgesamt waren von Jänner 2017 bis Februar 2019 244 als PRRSV positiv befundene Proben am Institut für Virologie eingegangen. Davon 150 im Jahr 2017, 82 im Jahr 2018 und zwölf in den Monaten Jänner und Februar 2019. Von den 244 Proben wurden bei 31 bereits eine ORF7 Sequenzierung durchgeführt und bei 35 eine ORF5 Sequenzierung. Die Herkunft aus den Bundesländern ist in Abb. 4 dargestellt: Steiermark 94, Kärnten 9, NÖ (Niederösterreich) 48, OÖ (Oberösterreich) 83, Burgenland 3, Salzburg 4, Tirol 1, Wien 2.

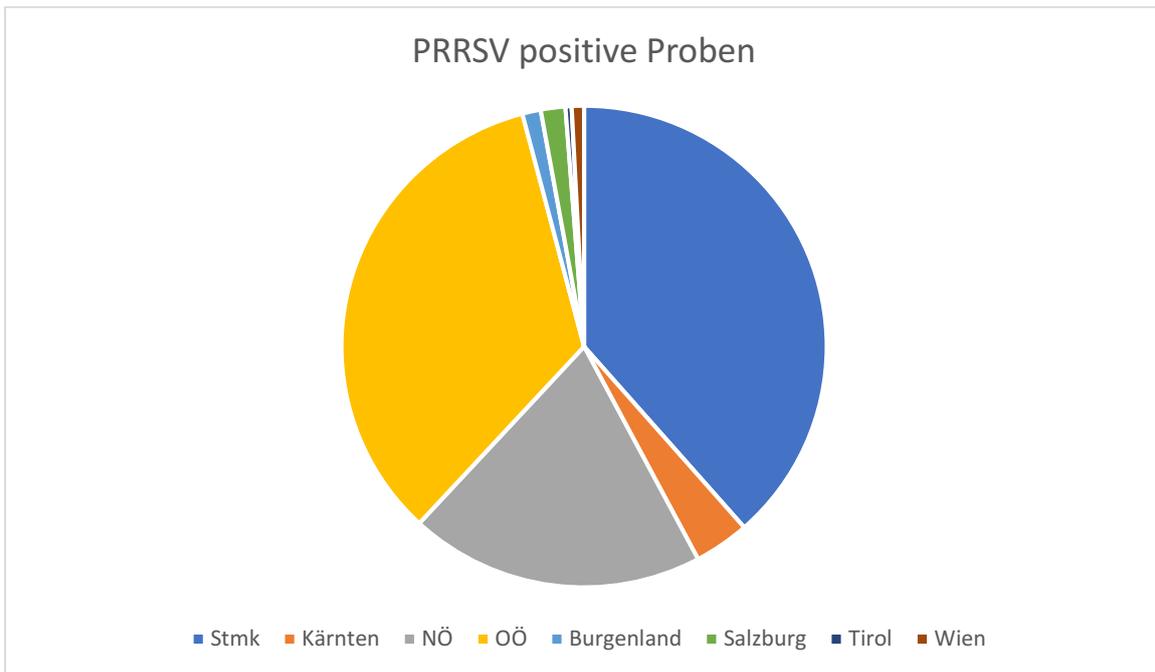


Abb. 2:

3.1 ORF7 spezifische RT PCR

Aus den 244 Proben wurden 78 ausgewählt, die in der diagnostischen PCR eine deutliche Bande erzeugten und die bislang nicht im ORF7 Bereich sequenziert worden sind.

Die bei -80 °C gelagerten Extrakte dieser 78 Proben wurden aufgetaut und als Template für eine ORF7 spezifische RT-PCR gemäß dem Standardprotokoll verwendet.

3.2 Ergebnisse der Kapillar-Elektrophorese mit QIAxcel

Die Elektrophorese mit dem QIAxcel ließ bei 59 der 78 Proben eine deutliche Bande, erkennen bei zehn Proben entstand nur eine schwache Bande und bei lediglich neun Proben entstand keine Bande (Abb.3). Diese neun Proben wurden anschließend auch nicht zur Sequenzierung verwendet. Aus Tabelle 4 kann entnommen werden, welche Probe welche Nummer im QIAxcel hatte und ob eine Bande entstand.

Tab. 4

Bundesland	QIAxcel Nummer	Proben Nummer	Bande
NÖ	1	103/17	ja
NÖ	2	622/17	ja
NÖ	3	1306/17	ja
NÖ	4	1314/17	nein
NÖ	5	1412/17	ja
NÖ	6	1610/17	ja
NÖ	7	633/17	ja
NÖ	8	1380/18	ja
	9	Positivkontrolle	ja
NÖ	10	1402/18	ja
NÖ	11	1671/18	ja
NÖ	12	2185/18	schwach
NÖ	13	2489/18	ja
Stmk (Steiermark)	14	35/17	nein
Stmk	15	302/17	ja
Stmk	16	523/17	ja
Stmk	17	528/17	ja
	18	Negativkontrolle	nein
Stmk	19	641/17	ja
Stmk	20	672/17	schwach
Stmk	21	703/17	ja
Stmk	22	747/17	ja
Stmk	23	904/17	schwach
Stmk	24	1084/17	ja
Stmk	25	1107/17	nein
Stmk	26	1328/17	zu hoch
	27	Positivkontrolle	ja
Stmk	28	192/18	ja
Stmk	29	297/18	ja
Stmk	30	354/18	ja

Stmk	31	723/18	ja
Stmk	32	1552/18	ja
Stmk	33	1720/18	ja
Stmk	34	2379/18	ja
Stmk	35	86/19	ja
	36	Negativkontrolle	nein
OÖ	37	4/17	nein
OÖ	38	10/17	nein
OÖ	39	110/17	ja
OÖ	40	155/17	ja
OÖ	41	323/17	schwach
OÖ	42	586/17	schwach
OÖ	43	740/17	ja
OÖ	44	743/17	ja
OÖ	45	838/17	nein
OÖ	46	864/17	ja
OÖ	47	874/17	ja
	48	Positivkontrolle	ja
OÖ	49	952/17	ja
OÖ	50	997/17	ja
OÖ	51	1041/17	ja
OÖ	52	1049/17	ja
OÖ	53	1311/17	ja
OÖ	54	1672/17	ja
OÖ	55	1703/17	ja
OÖ	56	1860/17	ja
	57	Positivkontrolle	ja
OÖ	58	1877/17	nein
OÖ	59	31/18	ja
OÖ	60	98/18	ja
OÖ	61	135/18	ja
OÖ	62	196/18	schwach
OÖ	63	554/18	ja

OÖ	64	598/18	ja
OÖ	65	641/18	ja
OÖ	66	813/18	schwach
OÖ	67	1022/18	ja
OÖ	68	1027/18	ja
OÖ	69	1049/18	ja
OÖ	70	1204/18	ja
OÖ	71	1317/18	ja
OÖ	72	1318/18	schwach
OÖ	73	1674/18	schwach
OÖ	74	1892/18	schwach
OÖ	75	1963/18	ja
OÖ	76	2280/18	ja
OÖ	77	76/19	ja
Kärnten	78	1014/17	nein
Kärnten	79	18/18	ja
Kärnten	80	330/18	ja
Burgenland	81	432/18	ja
Salzburg	82	30/17	ja
Salzburg	83	780/17	ja
Tirol	84	314/17	nein

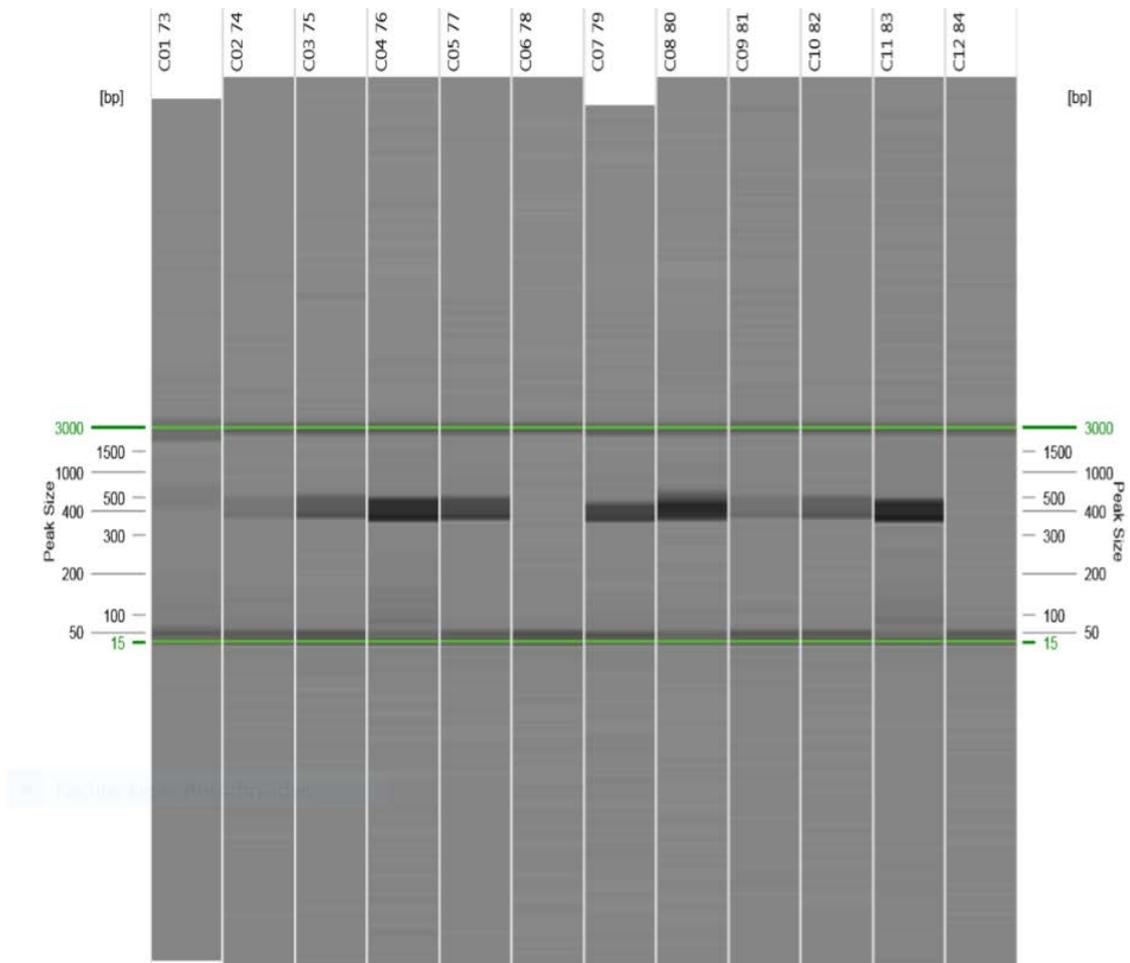


Abb. 3

Exemplarische Darstellung des Ergebnisses des QIAxcel: Die Proben 73, 74, 75, 76, 77, 79, 80, 81, 82, weisen PCR Produkte auf., die anschließend sequenziert wurden., 78 und 84 waren negativ.

3.3 Ergebnisse des Nucleotide BLAST Programmes

Die von der Sequenzierung (Eurofins) erhaltenen Elektropherogramme wurden mit dem Programm BioEdit Sequence Alignment Editor betrachtet und der zuverlässige Sequenzteil ausgewählt. Anschließend wurde dieser Teil mit dem Programm Nucleotide BLAST des National Center for Biotechnology Information (USA) mit der NCBI-Gendatenbank verglichen.

Die nachfolgende Tabelle zeigt die prozentuelle Übereinstimmung der sequenzierten Proben mit PRRS-Stämmen aus der GenBank.

Tab. 5

Bundesland	Proben Nummer	Größte Übereinstimmung	Trivialname	Ident
NÖ	103/17	KC862573,1	DK-2008-10-5-2	94,52 %
NÖ	622/17	KU494019,1	AUT15-33	98,52 %
NÖ	1306/17	KU494019,1	AUT15-33	98,52 %
NÖ	1412/17	KT326148,1	AUT13-883	93,47 %
NÖ	1610/17	KU494019,1	AUT15-33	98,52 %
NÖ	633/17	KU494019,1	AUT15-33	98,22 %
NÖ	1380/18	KU494019,1	AUT15-33	98,81 %
NÖ	1402/18	KU494019,1	AUT15-33	98,81 %
NÖ	1671/18	MG251835,1	EuroViet-03	100,00 %
NÖ	2185/18	KR296711,1	14432/2011	92,58 %
NÖ	2489/18	KF991509,2	Porcilis PRRS	100,00 %
Stmk	302/17	KU494019,1	AUT15-33	99,40 %
Stmk	523/17	KU494019,1	AUT15-33	99,41 %
Stmk	528/17	KU494019,1	AUT15-33	98,22 %
Stmk	641/17	KT988004,1	Ingelvac PRRSFLEX EU	100,00 %
Stmk	672/17	KT988004,1	Ingelvac PRRSFLEX EU	100,00 %
Stmk	703/17	KT988004,1	Ingelvac PRRSFLEX EU	100,00 %
Stmk	747/17	KU494019,1	AUT15-33	100,00 %
Stmk	904/17	KC862570,1	ESP-1991-Olot91	97,98 %
Stmk	1084/17	KU494019,1	AUT15-33	99,40 %
Stmk	192/18	KU494019,1	AUT15-33	98,22 %
Stmk	297/18	KF991509,2	Porcilis PRRS	99,41 %
Stmk	354/18	KU494019,1	AUT15-33	99,71 %
Stmk	723/18	KU494019,1	AUT15-33	97,01 %
Stmk	1552/18	KU494019,1	AUT15-33	97,61 %
Stmk	1720/18	KU494019,1	AUT15-33	97,62 %

Stmk	2379/18	KU494019,1	AUT15-33	96,42 %
Stmk	86/19	EU076704,1	HKEU16	95,55 %
OÖ	110/17	KC862574,1	DK-2012-01-05-2	94,93 %
OÖ	155/17	KF991509,2	Porcilis PRRS	94,03 %
OÖ	323/17	KF991509,2	Porcilis PRRS	95,10 %
OÖ	586/17	KT326148,1	AUT13-883	94,81 %
OÖ	740/17	KU494019,1	AUT15-33	93,24 %
OÖ	743/17	KC862573,1	DK-2008-10-5-2	94,33 %
OÖ	864/17	KU494019,1	AUT15-33	99,70 %
OÖ	874/17	KU494019,1	AUT15-33	97,91 %
OÖ	952/17	KF991509,2	Porcilis PRRS	94,93 %
OÖ	997/17	KC862573,1	DK-2008-10-5-2	92,54 %
OÖ	1041/17	MG251835,1	EuroViet-03	99,39 %
OÖ	1049/17	KT257944,1	14-60 US Stamm	96,69 %
OÖ	1311/17	GU067771,1	Amervac PRRS	100,00 %
OÖ	1672/17	KU494019,1	AUT15-33	99,70 %
OÖ	1703/17	FJ349261,1	KNU-07	94,93 %
OÖ	1860/17	DQ489311,1	SD01-08	91,10 %
OÖ	31/18	GU067771,1	Amervac PRRS	99,41 %
OÖ	98/18	GU067771,1	Amervac PRRS	99,40 %
OÖ	135/18	KT988004,1	94881	99,38 %
OÖ	196/18	KU494019,1	AUT15-33	99,4 %
OÖ	554/18	DQ489311,1	SD01-08	93,43 %
OÖ	598/18	KY434184,1	D40	92,84 %
OÖ	641/18	KT988004,1	Ingelvac PRRSFLEX EU	100,00 %
OÖ	813/18	KU494019,1	AUT15-33	98,84 %
OÖ	1022/18	GU067771,1	Amervac PRRS	99,10 %
OÖ	1027/18	KT334375,1	AUT14-440	95,85 %
OÖ	1204/18	KY129805,1	NOE nucleocapsid protein gene	97,68 %
OÖ	1317/18	KF991509,2	Porcilis PRRS	93,75 %
OÖ	1318/18	KF991509,2	Porcilis PRRS	93,77 %

OÖ	1674/18	KU494019,1	AUT15-33	97,99 %
OÖ	1892/18	KY434184,1	D40	92,60 %
OÖ	1963/18	MG251835,1	EuroViet-03	100,00 %
OÖ	2280/18	KT334375,1	AUT14-440	92,84 %
OÖ	76/19	KU494019,1	AUT15-33	98,81 %
Kärnten	18/18	KC862574,1	DK-2012-01-05-2	92,75 %
Kärnten	330/18	KC862570,1	ESP-1991-Olot91	94,02 %
Burgenland	432/18	KC862574,1	DK-2012-01-05-2	92,80 %
Salzburg	30/17	KF991509,2	Porcilis PRRS	95,39 %
Salzburg	780/17	KU494019,1	AUT15-33	98,21 %

Von den 67 sequenzierten Proben hatten im Bereich der ORF7 Sequenz drei Proben größte Ähnlichkeit zu „DK-2008-10-5-2“ (KC862573,1), 26 Proben hatten größte Ähnlichkeit zu „AUT15-33“ KU494019,1, 2 Proben hatten größte Ähnlichkeit zu „AUT13-883“ (KT326148,1), drei Proben hatten größte Ähnlichkeit zu „EuroViet-03“ (MG251835,1), eine Probe hatte größte Ähnlichkeit zu „14432/2011“ (KR296711,1), acht Proben hatten größte Ähnlichkeit zu dem Impfstoff „Porcilis PRRS“ der Firma MSD (USA) (KF991509,2), fünf Proben hatten größte Ähnlichkeit zu dem Impfstoff „Ingelvac PRRSFLEX EU“ der Firma Böhlinger Ingelheim (Deutschland), 2 Proben hatten größte Ähnlichkeit zu „ESP-1991-Olot91“ (KC862570,1), eine Probe hatte größte Ähnlichkeit zu „HKEU16“ (EU076704,1), eine Probe hatte größte Ähnlichkeit zu dem US Stamm „14-60“ (KT257944,1), 4 Proben hatten größte Ähnlichkeit zu dem Impfstoff „Amervac PRRS“ der Firma Hipra (Spanien) (GU067771,1), eine Probe hatte größte Ähnlichkeit zu „KNU-07“ (FJ349261,1), zwei Proben hatten größte Ähnlichkeit zu „SD01-08“ (DQ489311,1), eine Probe hatte größte Ähnlichkeit zu „D40“ (KY434184,1), zwei Proben hatten größte Ähnlichkeit zu „NOE nucleocapsid protein gene“ (KY129805,1), zwei Proben hatten größte Ähnlichkeit zu „AUT14-440“ (KT334375,1), drei Proben hatten größte Ähnlichkeit zu „DK-2012-01-05-2“ (KC862574,1). Die Aussage der größten Ähnlichkeit wurde verwendet, um die Tortendiagramme von Abb. 4 -7 zu gestalten.

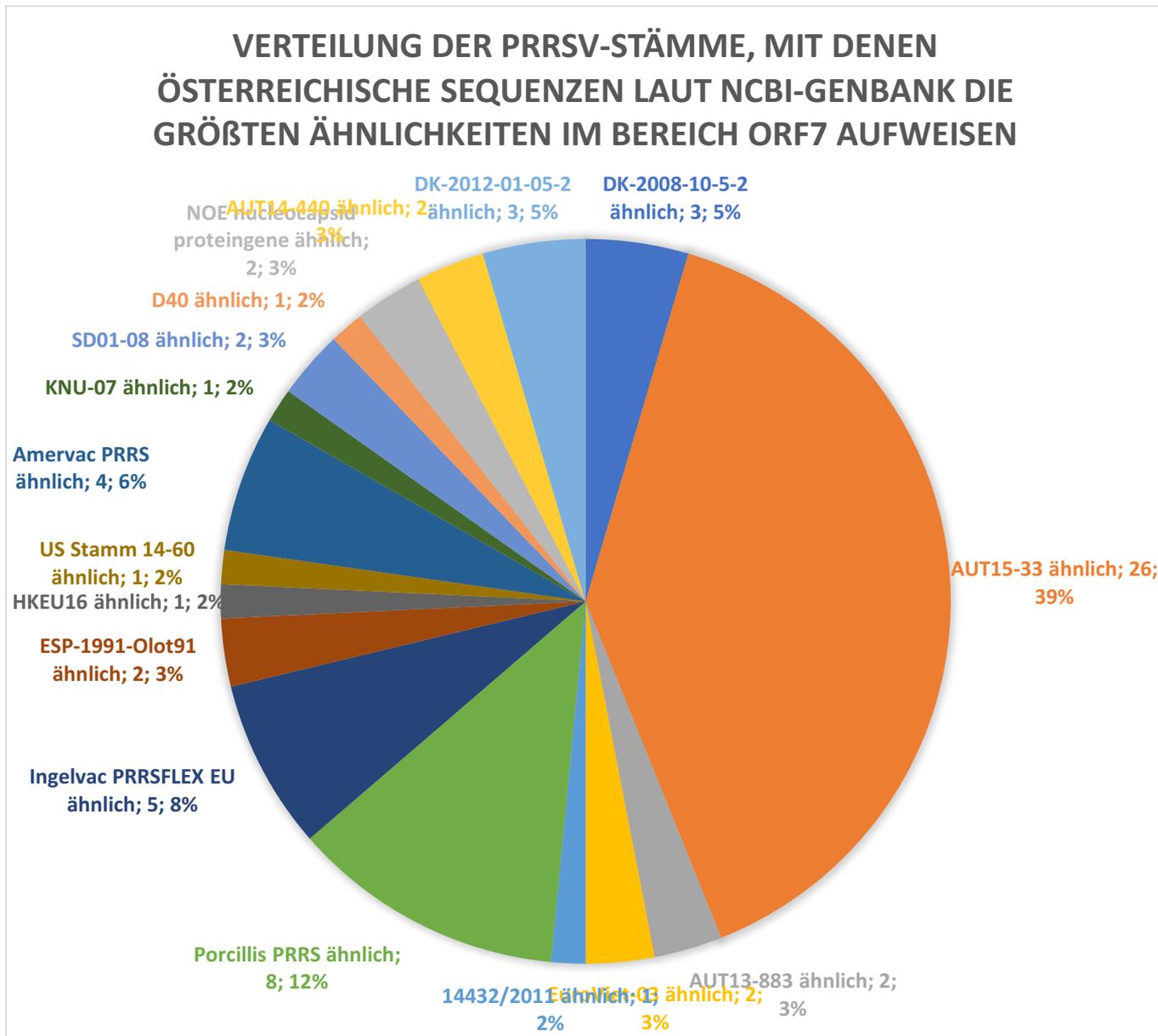


Abb. 4

Graphische Darstellung der Häufigkeiten verschiedener Stämme aus der NCBI Genbank, mit denen österreichische PRRSV-Sequenzen die größte Übereinstimmung im Bereich ORF7 aufwiesen.

Im ORF7 AUT15-33 nahestehende Isolate sind mit 39 % mit Abstand am häufigsten vorhanden. Danach folgen nahe Verwandte von Porcillis PRRS mit 12 %, Ingelvac PRRSFLEX EU mit 8 % und Amervac PRRS mit 6 %. Die restlichen Stämme befinden sich alle unter 5 %.

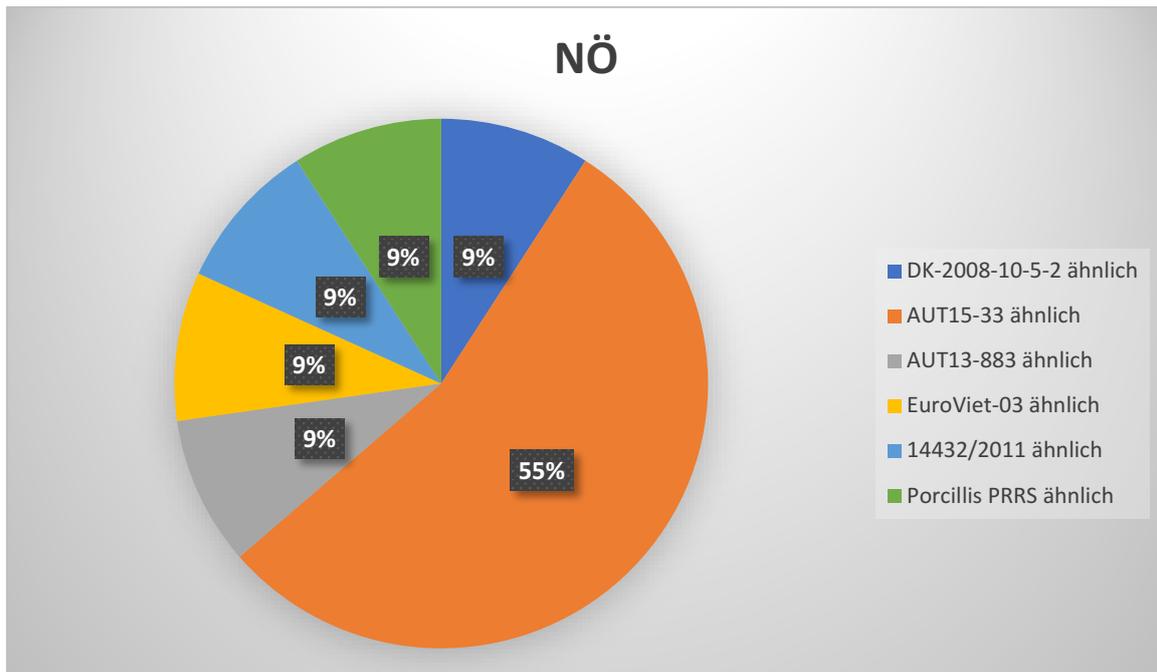


Abb. 5

Graphische Darstellung der Häufigkeiten verschiedener Stämme aus der NCBI Genbank, mit denen niederösterreichische PRRSV-Sequenzen die größte Übereinstimmung im Bereich ORF7 aufwiesen.

Auch in Niederösterreich sind ORF7 AUT15-33 ähnliche Isolate mit 55 % vorherrschend. Die restlichen vorhandenen Stämme sind mit jeweils 9 % gleichmäßig verteilt.

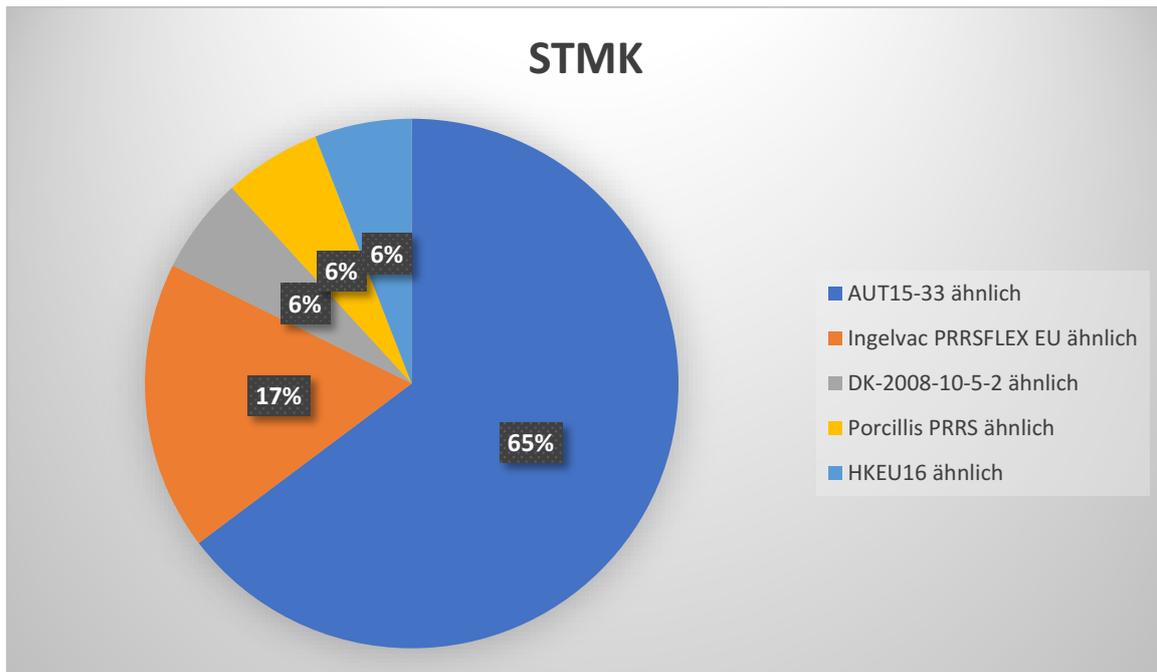


Abb. 6

Graphische Darstellung der Häufigkeiten verschiedener Stämme aus der NCBI Genbank, mit denen steirische PRRSV-Sequenzen die größte Übereinstimmung im Bereich ORF7 aufwiesen.

Im ORF7 sind AUT15-33 artige Stämme mit 65 % wieder am Häufigsten vorkommend. Danach folgen Ingelvac PRRSFLEX EU Verwandte mit 17 % und die restlichen drei gefundenen Stämme mit jeweils 6 %.

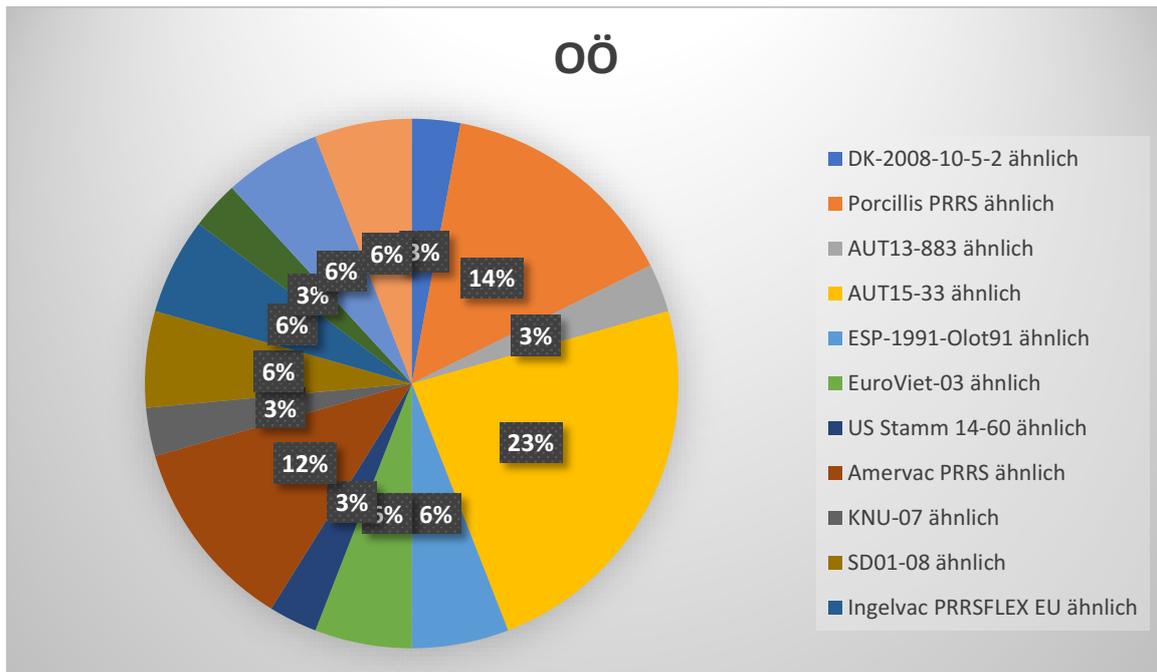


Abb. 7

Graphische Darstellung der Häufigkeiten verschiedener Stämme aus der NCBI Genbank, mit denen oberösterreichische PRRSV-Sequenzen die größte Übereinstimmung im Bereich ORF7 aufwiesen.

In Oberösterreich kommen Isolate die AUT15-33 am ähnlichsten sind, im ORF7 mit 23 % am häufigsten vor. Danach folgen Porcillis PRRS Verwandte mit 14 % und Amervac PRRS ähnliche mit 12 %. Außerdem wurde ein PRRSV 2 Stamm gefunden. Die restlichen Stämme bewegen sich zwischen 3 %-6 %.

Auf Grund der geringen Probenanzahl in Kärnten, Burgenland und Salzburg macht es keinen Sinn die Ergebnisse graphisch darzustellen. Es wurde eine Probe mit größter Ähnlichkeit zu „DK-2012-01-05-2“ (KC862574,1) und eine Probe mit größter Ähnlichkeit zu „ESP-1991-Olot91“ (KC862570,1) in Kärnten gefunden. Die Probe aus dem Burgenland hatte größte Ähnlichkeit mit „DK-2012-01-05-2“ (KC862574,1). Die beiden Proben aus Salzburg hatten größte Ähnlichkeit zu AUT15-33 und Porcillis PRRS.

3.4 Alignment und phylogenetischer Baum

Während die oben durchgeführte Analyse auf der einfachen Aussage der größten Ähnlichkeit in Blast beruhen, kann die phylogenetische Analyse auch die Verwandtschaft der sequenzierten ORF7 Bereiche untereinander darstellen. Die phylogenetische Analyse mit Dendrogramm erfolgte im „CLC sequence viewer“ Programm wobei nahe verwandte Sequenzen nahe zusammenliegen, aber der Grad der Homologie durch die Länge der Äste dargestellt wird. Dies ist viel differenzierter als nur die Angabe in % Homologie, denn es werden gleiche Austauschere zusammen gruppiert. Danach folgte das Alignment und das Erstellen des phylogenetischen Baumes.

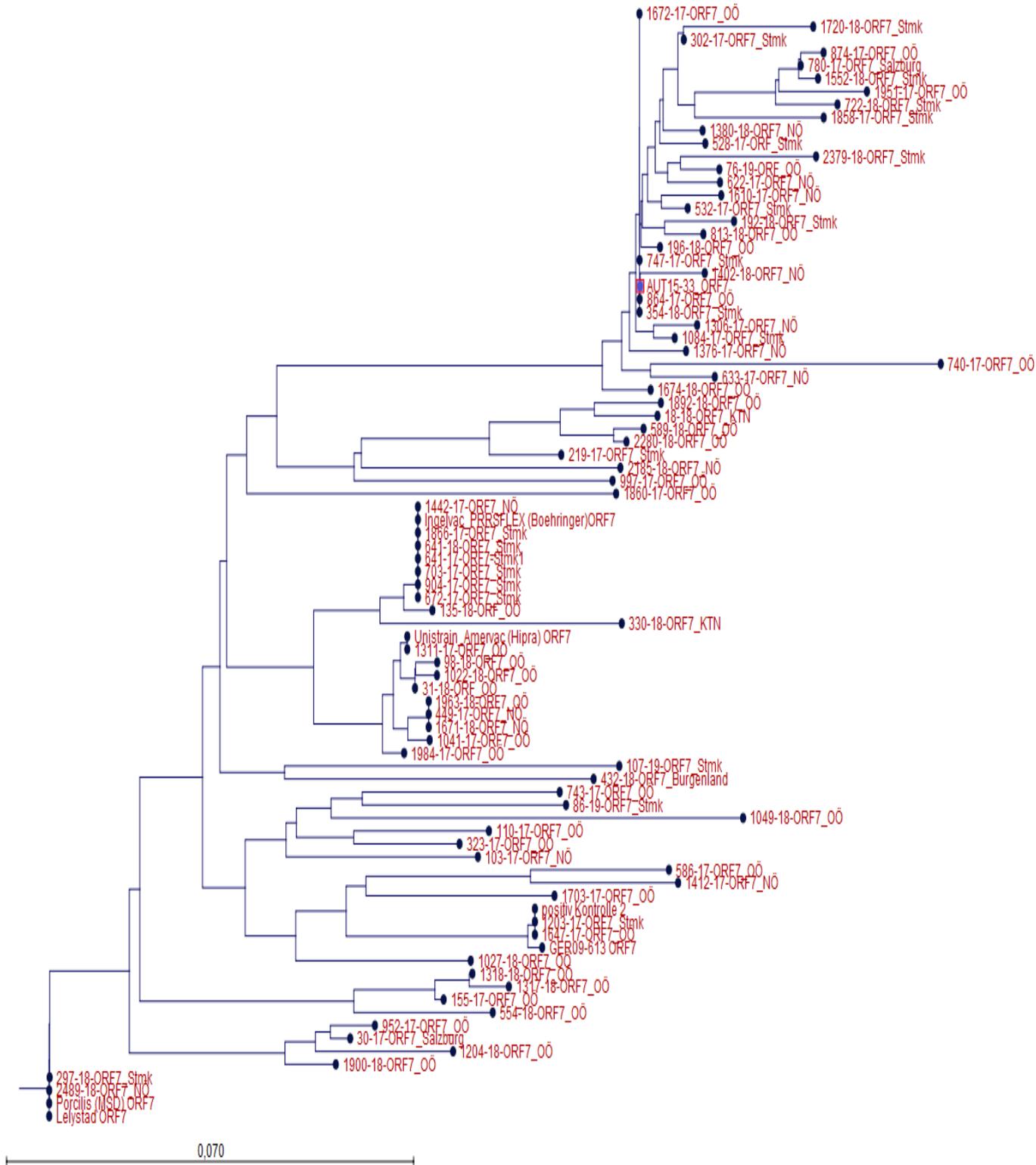


Abb. 8

4 Diskussion

2019 wurde das 30 jährige Jubiläum der Entdeckung von PRRSV begangen (Ladinig 2018). PRRSV wurde Ende der 1980iger Jahre als neue Krankheit beinahe zeitgleich in Europa (Wensvoort et al. 1991) und Nordamerika (Loula 1991) beobachtet. Seitdem stellt die Krankheit, die zeitweilig auch der Anzeigepflicht unterlag, ein ständiges Problem in der Schweinehaltung weltweit dar. Die Situation besserte sich durch die Entwicklung von Impfstoffen (Kimman et al. 2009), dennoch kann man nicht von einer kontrollierten Situation sprechen. Trotz der weiten Verbreitung in Österreich, die ersten Ausbrüche wurden 1994 dokumentiert (Krassnig et al. 1994) gibt es nur wenige epidemiologische Daten zur Prävalenz von PRRSV Isolaten in Österreich. Die Identität der Isolate ist insofern von Bedeutung als PRRSV sehr unterschiedliche Virulenzen haben kann (Murtaugh et al. 2010) und dazu die üblicherweise eingesetzten Lebendimpfstoffe sich auch im Bestand und darüber hinaus verbreiten können (Grosse Beilage et al. 2009). Hinzu kommt, dass Österreich an der Schwelle zwischen West- und Osteuropa liegt und acht Außengrenzen hat. Es führen wichtige Transitrouten für den internationalen (Tier-) Handel durch das Land. Diese geographische Lage begünstigt das Vorkommen von Pathogenen aus ganz Europa (Sinn, Leonie Janina 2016). In Teilen Osteuropas treten relevante Krankheiten wie z. B.: Afrikanische Schweinepest, Tollwut, Equine Infektiöse Anämie und auch PRRSV-1 Subtypen 2 und 3 oder PRRSV-2 auf (Sinn, Leonie Janina 2016). Deshalb ist die Krankheitsüberwachung nicht nur für Österreich selbst sondern auch für den Rest Europas sehr wichtig (Sinn, Leonie Janina 2016).

Für die Untersuchung wurde der zweijährige Zeitraum 2017 bis Februar 2019 ausgewählt, um die aktuelle Situation der PRRSV Isolate zu analysieren. Das Probenmaterial aus den Bundesländern Kärnten, Burgenland, Salzburg, Tirol, Wien, Vorarlberg war deutlich geringer, als aus den Bundesländern Steiermark, Niederösterreich und Oberösterreich. Die meisten positiven PRRSV Proben in dem berücksichtigten Zeitraum stammten aus der Steiermark, aus Vorarlberg standen dagegen keine Proben zur Verfügung. Dies lässt sich mit der regional intensiver ausgeübten Schweinehaltung erklären. Laut Statistik Austria wurden in den österreichischen Bundesländern 2018 die folgende Menge an Schweinen gehalten: im Burgenland 43585 Schweine, in Kärnten 111081, in Niederösterreich 761607, 1084318 in Oberösterreich, in Salzburg 9368, 748307 in der Steiermark, in Tirol 12850, in Vorarlberg 5309

und in Wien 149 Schweine. Zudem wurden auch nur Proben berücksichtigt, die ans Institut für Virologie über die Universitätsklinik für Schweine der Vetmeduni Vienna geschickt wurden. Hierbei handelt es sich oft um kompliziertere Fälle für die von niedergelassenen TierärztInnen, diagnostische Hilfe angefordert wird. Demzufolge ist die Auswahl der Proben nicht zufällig, sondern es handelt sich eher um klinisch auffällige PRRSV Infektionen von Schweinebeständen.

Im Institut für Virologie lagen bereits für einige der Proben Sequenzergebnisse für den ORF 7 vor. Zum Nachweis von PRRSV mit RT-PCR wird vor allem das ORF7 verwendet, da dies der am höchsten konservierte Bereich ist (Große Beilage und Wendt 2013). Da die Sequenzanalyse nicht Teil der Routinediagnostik ist, sondern eine nur auf Wunsch vorgenommenen weitere Untersuchung, wurden insgesamt 67 Proben neu sequenziert.

Dabei kam heraus, dass AUT15-33 ähnliche Isolate mit 39 % mit Abstand am häufigsten vorhanden sind. Danach folgen Porcilis PRRS ähnliche mit 12 %, Ingelvac PRRSFLEX EU ähnliche mit 8 % und Amervac PRRS ähnliche mit 6 %. Die restlichen Stämme befinden sich alle unter 5 %.

Nicht bei allen Proben gelang die erneute PCR Amplifikation, was vermutlich auf die RNA Degradation bei der Lagerung zurückzuführen sein könnte. Fehlende Proben wurden angesichts der Gesamtmenge toleriert und keine neuen Extrakte angefertigt.

Bei allen sequenzierten Proben konnte eine Ähnlichkeit zu einem PRRSV Stamm gezeigt werden (Tabelle 5) wobei die Homologie zwischen 92 % - 100 % im Bereich ORF7 lag. Bei neun Proben wurde sogar eine 100%ige Übereinstimmung mit in der Datenbank gespeicherten Sequenzen im ORF7 Bereich gefunden. Es muss berücksichtigt werden, dass der Impfstatus der Schweine von welchen die Proben stammen nicht bekannt war. Zwei Proben waren im ORF 7 Bereich zu 100 % ident mit MG251835,1, drei Proben zeigten 100%ige Identität in diesem Bereich mit dem Impfstoff Ingelvac PRRSFLEX EU der Firma Böhlinger Ingelheim (Deutschland). Jeweils ein PRRSV Stamm war in dem untersuchten Bereich 100 % ident mit dem Impfstoff Porcilis PRRS der Firma MSD (USA), dem Impfstoff Amervac PRRS der Firma Hipra (Spanien), dem Stamm Aut15-33 und dem Impfstoff Ingelvac PRRSFLEX EU der Firma Böhlinger (Deutschland).

Die Identitäten mit dem Impfstamm des Impfstoffes Ingelvac PRRSFLEX EU der Firma Böhlinger Ingelheim (Deutschland) lassen sich dadurch erklären, dass laut Packungsbeilage des Impfstoffes die geimpften Schweine das Impfvirus durch Kontakt mit ungeimpften

Schweinen bis zu drei Wochen nach der Impfung auf diese übertragen können. Geimpfte Schweine können das Impfvirus mit dem Kot und in einigen Fällen mit oralen Sekreten oder über Sperma ausscheiden. Deshalb sollten zur Vermeidung der Ausbreitung des Impfvirus von geimpften Tieren auf ungeimpfte Tiere geeignete Maßnahmen ergriffen werden. Zur optimalen Kontrolle von PRRSV sollen laut Hersteller alle Tiere einer Herde geimpft werden.

Auch in der Packungsbeilage des Impfstoffes Porcilis PRRS der Firma MSD (USA) wird darauf hingewiesen, dass sich das Impfvirus bis zu fünf Wochen nach der Impfung auf ungeimpfte Tiere durch Kontakt mit geimpften ausbreiten kann. Am Häufigsten erfolgt die Übertragung durch direkten körperlichen Kontakt, jedoch kann eine Ausbreitung des Virus laut Hersteller über kontaminierte Gegenstände oder über die Luft nicht ausgeschlossen werden. Auch über den Samen kann das Virus ausgeschieden werden. Deshalb sollte es vermieden werden, den Impfstamm in Gebieten einzubringen, in denen PRRS-Viren noch nicht vorkommen.

Im Produktdatenblatt des Impfstoffes Amervac PRRS der Firma Hipra (Spanien) wird nicht auf die mögliche Übertragung des Virus von geimpften auf ungeimpfte Schweine hingewiesen.

Diese drei Impfstoffe sind Lebendimpfstoffe. Die Vorteile der Impfung mit Lebendimpfstoffen zeigen sich durch Reduktion klinischer Anzeichen der Erkrankung, verbesserte Tageszunahmen, Verminderung von Lungenläsionen (Park et al. 2014) sowie verkürzte Virusausscheidung und Virämiedauer (Kimman et al. 2009). Die Infektion mit PRRSV und die Erregerausscheidung kann durch die Impfung aber nicht verhindert werden (Kimman et al. 2009).

Es konnte nachgewiesen werden, dass beide Genotypen in österreichischen Schweinebeständen auftreten, allerdings haben die bisher gefundenen PRRSV-2 Stämme große Ähnlichkeit zu PRRSV-2 Impfstämmen (Indik et al. 2005). Auch in meinen Untersuchungen konnte PRRSV 2 in Oberösterreich identifiziert werden. In anderen europäischen Ländern waren die gefundenen PRRSV-2 Stämme meistens zusammenhängend mit der Verwendung von PRRSV-2 MLV (modified live virus) Stämmen (Stadejek et al. 2013). Da in Österreich keine Impfstoffe verwendet werden, welche PRRSV 2 enthalten, ist die wahrscheinlichste Erklärung für das Vorkommen dieser Stämme, der Import von mit PRRSV 2 geimpften Schweinen aus dem Ausland (Indik et al. 2005).

In der vorliegenden Arbeit fällt auf, dass von gesamt 67 Sequenzen aus ganz Österreich, 26 (39 %) im ORF7 Bereich die größte Identität zu „AUT15-33“ zeigen, der auch als ACRO Stamm bezeichnet wird. Auch wenn man die Bundesländer einzeln betrachtet, sind „AUT15-33“

ähnliche Stämme im ORF 7 Bereich in NÖ mit 55 % in der STMK mit 17 % und in OÖ mit 23 % vorherrschend. Das zeigt, dass sich „AUT15-33“ seit dem ersten Ausbruch 2015 in Niederösterreich in ganz Österreich verbreitet hat. „AUT15-33“ zeigt eine große Ähnlichkeit zu kroatischen Stämmen von 2012, daher die Bezeichnung ACRO für **Austria-Croatia** (Sinn, Klingler et al. 2016). Überraschenderweise gibt es keine enge Verwandtschaft zu österreichischen Stämmen, welche schon früher gefunden wurden (Sinn, Klingler et al. 2016). Es ist fraglich, ob der Grund dafür die wenigen vorhandenen Sequenzen sind oder ob „AUT15-33“ 2015 in Niederösterreich das erste Mal auftrat. Laut (Sinn, Klingler et al. 2016) ist es wahrscheinlicher, dass „AUT15-33“ zum ersten Mal auftrat, weil es zur gleichen Zeit in mehreren Betrieben zirkulierte und hohe Verluste verursachte (Sinn, Klingler et al. 2016). Auf Grund der großen Ähnlichkeit zu kroatischen Stämmen ist ein Ursprung von „AUT15-33“ in Südosteuropa möglich, aber solange es nicht mehr Sequenzdaten von PRRSV Stämmen in Österreich und angrenzenden Ländern gibt, kann über die potentiellen Einführungsroueten von „AUT15-33“ bzw. ACRO nur spekuliert werden (Sinn, Klingler et al. 2016).

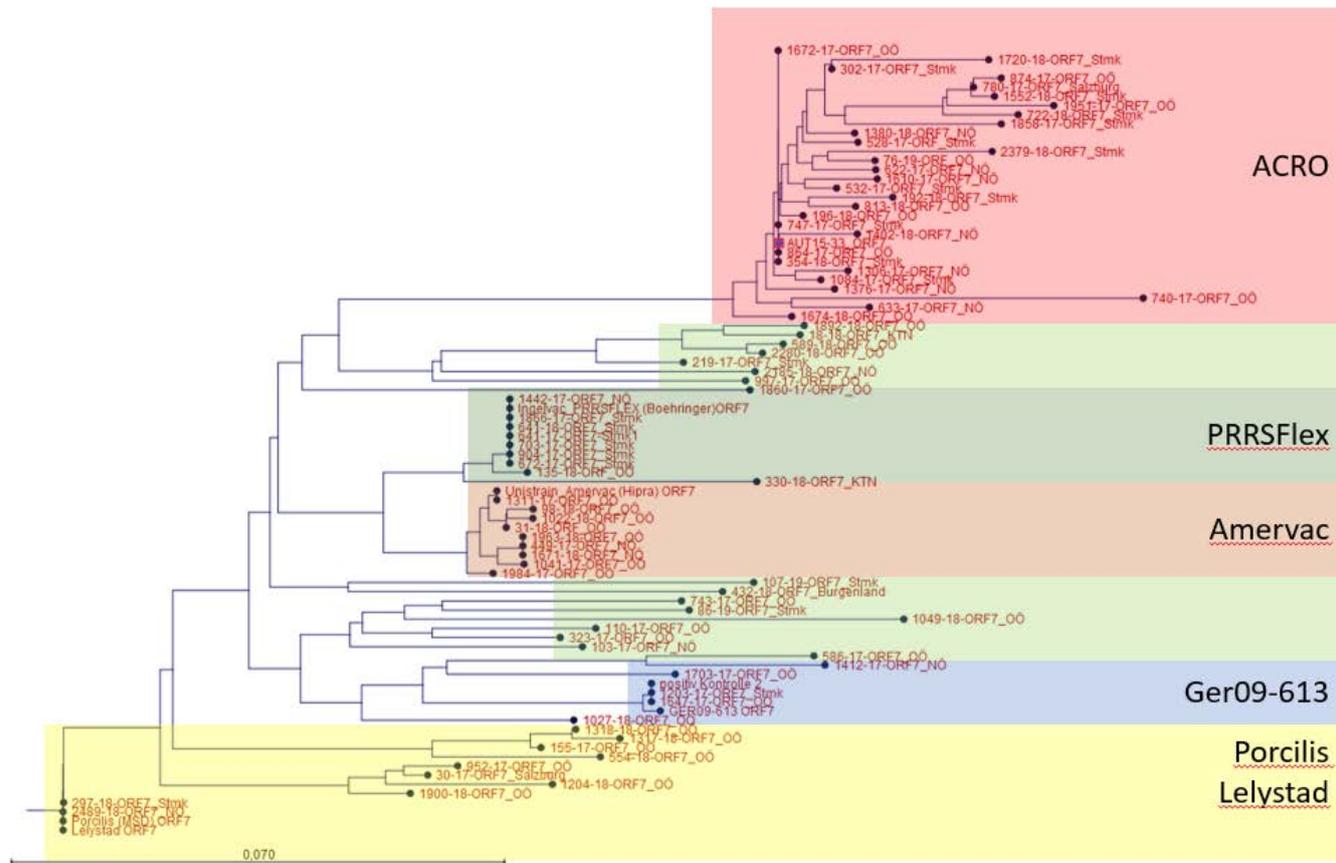


Abb. 9

Dieselbe phylogenetische Analyse wie in Abb. 8 aber die sequenzierten Stämme sind farblich in die wahrscheinlichen Verwandtschaftsgruppen und deren Ursprung unterteilt. Liegen die Isolate direkt übereinander, haben sie dieselbe Sequenz. Dadurch wird ersichtlich, dass z.B. 7 Isolate aus dem Feld tatsächlich mit Ingelvac PRRSflex ident sind und ein Stamm bereits geringe Abweichung zeigt.

In der vorliegenden Arbeit konnten PRRS Viren nachgewiesen werden, die im ORF7 Bereich zum Teil große Ähnlichkeit mit den in Österreich eingesetzten Impfstoffen aufweisen. Das sehr nahe mit dem Lelystad Virus verwandte Impfvirus Porcilis PRRS der Firma MSD erscheint in der Abb. 9 im gelb dargestellten Bereich. Zwar konnten hier auch zwischen 99 - 100% übereinstimmende Sequenzen im ORF7 Bereich in Betrieben nachgewiesen werden, allerdings lassen sich auch Sequenzen finden die sich vermutlich aus dem Lelystad Virus heraus entwickelt haben. Auch der Impfstoff Amervac der Firma Hipra war in einem Betrieb mit 100% Identität im ORF7 Bereich nachweisbar (oranges Feld), hier finden sich aber auch zahlreiche zum Teil sehr ähnliche aber nicht idente Sequenzen in österreichischen

Betrieben. Der in Österreich ebenfalls verwendete Impfstoff PRRSFlex von Böhlinger Ingelheim konnte auch mit 100%er Übereinstimmung im ORF7 Bereich nachgewiesen werden (dunkelgrünes Feld). Es ist zu vermuten, dass in diesen Betrieben der Impfstoff zum Einsatz gekommen ist. Desweiteren ist im blauen Feld zu sehen, dass in zwei Fällen ermittelte Sequenzen mit dem 2009 in Deutschland isolierten Ger09-613 (Sinn, Zieglowski et al. 2016) übereinstimmen da dieses klonierte Virus als positiv Kontrolle verwendet wurde, können hier Kontaminationen nicht ausgeschlossen werden. Die meisten ermittelten Sequenzen (39%) zeigen im ORF7 größte Übereinstimmung mit dem im Jahr 2015 in Niederösterreich gefundenen Stamm AUT15-33 (roter Bereich in Abb. 9). Aus diesem auch als „ACRO“ bekanntem, stark pathogenen Virus, scheinen sich zahlreiche neue Stämme entwickelt zu haben. In dieser Gruppe ist die größte Variabilität in den Sequenzen auch untereinander erkennbar. Es kann vermutet werden, dass diese „ACRO“ verwandten Viren der österreichischen Schweinemedizin auch weiterhin Probleme bereiten werden.

Die zwei in hellgrün hinterlegten Sequenz-Gruppen zeigen laut GenBank größte Übereinstimmung mit unterschiedlichen Isolaten, die keiner der vorher genannten Gruppen zuzuordnen sind.

5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden PRRSV positive Proben von Schweinen analysiert, welche von Jänner 2017 bis Februar 2019 im Institut für Virologie der Veterinärmedizinischen Universität Wien zur Untersuchung eingegangen sind. Weltweit verursacht das Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) schwere Schäden bei Sauen durch Reproduktionsstörungen und durch Atemwegserkrankungen bei Ferkeln und Mastschweinen. Es gehört zu den bedeutendsten Krankheitserregern in der industriellen Schweineproduktion. Die Schwere der Erkrankung kann je nach Virusstamm stark variieren. PRRSV-1 kommt hauptsächlich in Europa vor, PRRSV-2 vorwiegend in Nordamerika und Asien. Das Virus weist eine hohe Mutationsrate auf. Zum direkten Nachweis von PRRSV-Infektionen ist die RT-PCR üblich, oft wird eine anschließende Sequenzierung im ORF5 oder ORF7 Bereich durchgeführt. Für die Untersuchung wurden Proben ausgewählt, die aus unterschiedlichen Betrieben stammen und möglichst alle Bundesländer abdecken. Insgesamt wurden von 67 diagnostischen Proben erfolgreich ein RT-PCR Produkt im Bereich ORF7 erzeugt und anschließend sequenziert. Durch Vergleich mit Datenbanken wurden die erhaltenen Sequenzen zugeordnet. Die Homologien der untersuchten Sequenzen zur Datenbank lag zwischen 92 % - 100 %. Sequenzen, die dem Isolat „AUT15-33“ nahestehen, sind mit 39 % am häufigsten. Auch wenn die Bundesländer einzeln betrachtet werden, sind „AUT15-33“ ähnliche Isolate in NÖ mit 55 %, in OÖ mit 23 % und in der STMK mit 17 % vorherrschend was sich darauf zurückführen lässt, dass sich „AUT15-33“ nach dem Ausbruch in Niederösterreich 2015 in Österreich schnell verbreitet hat. Es setzte sich nicht nur in PRRSV freien Betrieben durch, sondern auch in geimpft Herden. Der häufige Nachweis von Impfviren (26 %) ist dadurch zu erklären, dass häufig Proben nach der Sanierung durch Impfung mit eingesandt werden, um die Prävalenz des ursprünglichen Feldvirus zu bestimmen. Der gefundene PRRSV-2 Stamm kann durch Einschleppung aus dem Ausland durch Import von Schweinen erklärt werden, da in Österreich keine Impfstoffe verwendet werden, welche PRRSV 2 enthalten.

6 summary

In this work, PRRSV positive samples of pigs were analyzed which were examined from January 2017 to February 2019 in the Institute of virology of the university of veterinary medicine, Vienna. Worldwide the porcine reproductive and respiratory syndrome virus causes heavy losses in sows with reproductive problems and in piglets and porker with respiratory problems. It is one of the most important pathogens in commercial pig farming and as a result of the correspondent disease, the porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS), it causes high economic losses. PRRSV-1 is mostly present in Europe, PRRSV-2 is mostly present in North America and Asia. The virus has a very high mutation rate. For the detection of a PRRSV infection usually RT-PCR or ELISA is used moreover sequencing of the ORF5 or ORF7 gen is common. For this study > 70 samples were selected, originating from different farms and covering as far as possible all federal states. A total of 67 samples successfully generated an RT-PCR product from ORF7 and subsequently sequenced. By comparison with databases, the sequences obtained were assigned. The homologies of the examined sequences to the database ranged between 92% - 100%. Sequences related to the isolate "AUT15-33" (also known as ACRO) are the most common (39%). Even if the federal states are considered individually, "AUT15-33" is predominant in Lower Austria with 55%, in Upper Austria with 23% and in Styria with 17%, which can be attributed to the fact that "AUT15-33" after the outbreak in lower Austria 2015 in Austria has spread quickly. It not only prevailed in PRRSV-free farms but also in vaccinated herds. The frequent detection of vaccine viruses (26%) is explained by the fact that samples are frequently sent in after rehabilitation by vaccination to determine the prevalence of the original field virus. The found PRRS 2 strain can be likely explained by import of vaccinated pigs, because PRRSV 2 based vaccines were never permitted in Austria.

7 Abkürzungsverzeichnis

°C	<i>Grad Celsius</i>
µl	<i>Mikroliter</i>
µm	<i>Mikrometer</i>
BALF	<i>bronchoalveolar lavage fluid</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
dFA	<i>direct fluorescent antibody</i>
IFAT	<i>indirect fluorescent antibody test</i>
IHC	<i>Immunhistochemie</i>
kb	<i>Kilobasenpaare</i>
km	<i>Kilometer</i>
min	<i>Minute</i>
ml	<i>Milliliter</i>
MLV	<i>modified live virus</i>
nm	<i>Nanometer</i>
NÖ	<i>Niederösterreich</i>
OFS	<i>oral fluid samples</i>
OÖ	<i>Oberösterreich</i>
ORF	<i>open reading frame</i>
p. i.	<i>post infectionem</i>
PRRSV	<i>Porcine reproductive and respiratory syndrome virus</i>
rpm	<i>revolutions per minute</i>
RT-PCR	<i>Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion</i>
sec	<i>Sekunden</i>
TCID ₅₀	<i>tissue culture infection dose 50</i>

8 Literaturverzeichnis

Adams MJ, Lefkowitz EJ, King AMQ, Harrach B, Harrison RL, Knowles NJ, Kropinski AM, Krupovic M, Kuhn JH, Mushegian AR, Nibert M, Sabanadzovic S, Sanfaçon H, Siddell SG, Simmonds P, Varsani A, Zerbini FM, Gorbalenya AE, Davison AJ. 2017. Changes to taxonomy and the International Code of Virus Classification and Nomenclature ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses (2017). *Archives of virology*, 162 (8): 2505–2538. DOI 10.1007/s00705-017-3358-5.

Alexopoulos C, Kritas SK, Kyriakis CS, Tzika E, Kyriakis SC. 2005. Sow performance in an endemically porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS)-infected farm after sow vaccination with an attenuated PRRS vaccine. *Veterinary microbiology*, 111 (3-4): 151–157.

Allende R, Lewis TL, Lu Z, Rock DL, Kutish GF, Ali A, Doster AR, Osorio FA. 1999. North American and European porcine reproductive and respiratory syndrome viruses differ in non-structural protein coding regions. *The Journal of general virology*, 80 (Pt 2): 307–315. DOI 10.1099/0022-1317-80-2-307.

Baker, SR, Mondaca E, Polson D, Dee SA. 2012. Evaluation of a needle-free injection device to prevent hematogenous transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Journal of Swine Health and Production*, 20 (3): 123–128.

Balasz M, Fort M, Taylor LP, Calvert JG. 2018. Vaccination of 1-day-old pigs with a porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) modified live attenuated virus vaccine is able to overcome maternal immunity. *Porcine Health Management*, 4: 25. DOI 10.1186/s40813-018-0101-x.

Balka G, Hornyák Á, Dán Á, Ladinig A, Biksi I, Rusvai M. 2010. PriProET based melting point analyses on PRRSV positive field samples. *Molecular and cellular probes*, 24 (6): 411–414.

Benfield DA, Nelson E, Collins JE, Harris L, Goyal SM, Robison D, Christianson WT, Morrison RB, Gorcyca D, Chladek D. 1992. Characterization of swine infertility and respiratory syndrome (SIRS) virus (isolate ATCC VR-2332). *Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*, 4 (2): 127–133. DOI 10.1177/104063879200400202.

Bierk MD, Dee SA, Rossow KD, Otake S, Collins JE, Molitor TW. 2001. Transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus from persistently infected sows to contact controls.

Canadian journal of veterinary research = Revue canadienne de recherche veterinaire, 65 (4): 261–266.

Cano JP, Dee SA, Murtaugh MP, Rovira A, Morrison RB. 2009. Infection dynamics and clinical manifestations following experimental inoculation of gilts at 90 days of gestation with a low dose of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. Canadian journal of veterinary research = Revue canadienne de recherche veterinaire, 73 (4): 303–307.

Carlsson U, Wallgren P, Renström LHM, Lindberg A, Eriksson H, Thorén P, Eliasson-Selling L, Lundeheim N, Nörregård E, Thörn C, Elvander M. 2009. Emergence of porcine reproductive and respiratory syndrome in Sweden: detection, response and eradication. Transboundary and emerging diseases, 56 (4): 121–131. DOI 10.1111/j.1865-1682.2008.01065.x.

Cho JG, Dee SA. 2006. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus. Theriogenology, 66 (3): 655–662.

Christianson WT, Choi CS, Collins JE, Molitor TW, Morrison RB, Joo HS. 1993. Pathogenesis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in mid-gestation sows and fetuses. Canadian journal of veterinary research = Revue canadienne de recherche veterinaire, 57 (4): 262–268.

Christianson WT, Collins JE, Benfield DA, Harris L, Gorcyca DE, Chladek DW, Morrison RB, Joo HS. 1992. Experimental reproduction of swine infertility and respiratory syndrome in pregnant sows. American Journal of veterinary research, 53 (4): 485–488.

Christopher-Hennings J, Nelson EA, Nelson JK, Hines RJ, Swenson SL, Hill HT, Zimmerman JJ, Katz JB, Yaeger MJ, Chase CC. 1995. Detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in boar semen by PCR. JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, 33 (7): 1730–1734.

Dee SA, Deen J, Otake S, Pijoan C. 2004. An experimental model to evaluate the role of transport vehicles as a source of transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus to susceptible pigs. Canadian journal of veterinary research = Revue canadienne de recherche veterinaire, 68 (2): 128–133.

Faaberg KS. 2008. Arterivirus structural proteins and assembly. In: . Nidoviruses. : American Society of Microbiology, 211–234.

- Fang Y, Snijder EJ. 2010. The PRRSV replicase: exploring the multifunctionality of an intriguing set of nonstructural proteins. *Virus research*, 154 (1-2): 61–76. DOI 10.1016/j.virusres.2010.07.030.
- Firth AE, Zevenhoven-Dobbe JC, Wills NM, Go YY, Balasuriya UBR, Atkins JF, Snijder EJ, Posthuma CC. 2011. Discovery of a small arterivirus gene that overlaps the GP5 coding sequence and is important for virus production. *The Journal of general virology*, 92 (Pt 5): 1097–1106. DOI 10.1099/vir.0.029264-0.
- Ge M, Li R-C, Gong W, Tu C. 2019. Determination of antibody induction by highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus (HP-PRRSV) vaccine: a comparison of two ELISA kits. *Journal of Veterinary Medical Science*: 18–482.
- Gerber PF, Giménez-Lirola LG, Halbur PG, Zhou L, Meng X-J, Opriessnig T. 2014. Comparison of commercial enzyme-linked immunosorbent assays and fluorescent microbead immunoassays for detection of antibodies against porcine reproductive and respiratory syndrome virus in boars. *Journal of virological methods*, 197: 63–66.
- Gradil C, Dubuc C, Eaglesome MD. 1996. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: seminal transmission. *The Veterinary record*, 138 (21): 521–522. DOI 10.1136/vr.138.21.521.
- Grøntvedt CA, Siri KS, Chiek E. 2015. The surveillance programme for specific viral infections in swine herds in Norway 2014.
- Grosse Beilage E, Heiko Nathues, Diana Meemken, Timm C. Harder, Marcus G. Doherr, Inga Grotha, Irene Greiser-Wilke. 2009. Frequency of PRRS live vaccine virus (European and North American genotype) in vaccinated and non-vaccinated pigs submitted for respiratory tract diagnostics in North-Western Germany. *Preventive Veterinary Medicine*, 92 (1): 31–37. DOI 10.1016/j.prevetmed.2009.07.010.
- Große Beilage E, Wendt M. 2013. Diagnostik und Gesundheitsmanagement im Schweinebestand. Band 1. Stuttgart: UTB GmbH, 508.
- Harms PA, Sorden SD, Halbur PG, Bolin, SR, Lager KM, Morozov I, Paul PS. 2001. Experimental reproduction of severe disease in CD/CD pigs concurrently infected with type 2 porcine circovirus and porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Veterinary Pathology*, 38 (5): 528–539.

Hermann JR, Muñoz-Zanzi CA, Roof MB, Burkhart K, Zimmerman JJ. 2005. Probability of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus infection as a function of exposure route and dose. *Veterinary microbiology*, 110 (1-2): 7–16. DOI 10.1016/j.vetmic.2005.06.012.

Horter DC, Pogranichniy RM, Chang C-C, Evans RB, Yoon K-J, Zimmerman JJ. 2002. Characterization of the carrier state in porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. *Veterinary microbiology*, 86 (3): 213–228.

Indik S, Schmoll F, Sipos W, Klein D. 2005. Genetic variability of PRRS virus in Austria: consequences for molecular diagnostics and viral quantification. *Veterinary microbiology*, 107 (3-4): 171–178. DOI 10.1016/j.vetmic.2005.01.024.

Jackova A, Vlasakova M, Leskova V, Vilcek S. 2012. Identification of a new unusual length polymorphism of the nucleocapsid protein in porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virus genes*, 45 (3): 590–592.

Jackova A, Vlasakova M, Mandelik R, Vilček S. 2013. Genetic typing of porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates from central European countries. *Acta virologica*, 57 (3): 363–368.

Jane Christopher-Hennings, Eric A. Nelson, Rebecca J. Hines, Julie K. Nelson, Sabrina L. Swenson, Jeff J. Zimmerman, Christopher C. L. Chase, Michael J. Yaeger, and David A. Benfield. Persistence of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus in Serum and Semen of Adult Boars.

K. D. Rossow, D. A. Benfield, S. M. Goyal, E. A. Nelson, J. Christopher-Hennings, and J. E. Collins. Chronological Immunohistochemical Detection and Localization of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus in Gnotobiotic Pigs.

Karniychuk UU, Nauwynck HJ. 2013. Pathogenesis and prevention of placental and transplacental porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. *Veterinary research*, 44 (1): 95.

Kimman TG, Cornelissen LA, Moormann RJ, Rebel JMJ, Stockhofe-Zurwieden N. 2009. Challenges for porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) vaccinology. *Vaccine*, 27 (28): 3704–3718.

Kleiboeker SB, Schommer SK, Lee S-M, Watkins S, Chittick W, Polson D. 2005. Simultaneous detection of North American and European porcine reproductive and respiratory syndrome virus using real-

time quantitative reverse transcriptase–PCR. *Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*, 17 (2): 165–170.

Klinge KL, Vaughn EM, Roof MB, Bautista EM, Murtaugh MP. 2009. Age-dependent resistance to Porcine reproductive and respiratory syndrome virus replication in swine. *Virology journal*, 6 (1): 177.

Kranker S, Nielsen J, Bille-Hansen V, Botner A. 1998. Experimental inoculation of swine at various stages of gestation with a Danish isolate of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). *Veterinary microbiology*, 61 (1-2): 21–31.

Krassnig VG, Krassnig R, Grammer H, Schweighardt H. 1994. Occurrence of the " porcine reproductive and respiratory syndrome"(PRRS) in Austria- case report. *Wiener Tierärztliche Monatsschrift*, 81 (10): 285–289.

Ladinig A. 2018. PRRSV - auch nach 30 Jahren immer noch ein herausfordernder Erreger. *News4Vet*.

Ladinig A, Wilkinson J, Ashley C, Detmer SE, Lunney JK, Plastow G, Harding JCS. 2014. Variation in fetal outcome, viral load and ORF5 sequence mutations in a large scale study of phenotypic responses to late gestation exposure to type 2 porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *PloS one*, 9 (4): e96104.

Langenhorst RJ, Lawson S, Kittawornrat A, Zimmerman JJ, Sun Z, Li Y, Christopher-Hennings J, Nelson EA, Fang Y. 2012. Development of a fluorescent microsphere immunoassay for detection of antibodies against porcine reproductive and respiratory syndrome virus using oral fluid samples as an alternative to serum-based assays. *Clinical and vaccine immunology : CVI*, 19 (2): 180–189. DOI 10.1128/CVI.05372-11.

Larochelle R, Mardassi H, Dea S, Magar R. 1996. Detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in cell cultures and formalin-fixed tissues by in situ hybridization using a digoxigenin-labeled probe. *Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*, 8 (1): 3–10.

Li H, Yang J, Bao D, Hou J, Zhi Y, Yang Y, Ji P, Zhou E, Qiao S, Zhang G. 2017. Development of an immunochromatographic strip for detection of antibodies against porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Journal of veterinary science*, 18 (3): 307–316.

Linhares DCL, Cano JP, Wetzell T, Nerem J, Torremorell M, Dee SA. 2012. Effect of modified-live porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSv) vaccine on the shedding of wild-type virus from an infected population of growing pigs. *Vaccine*, 30 (2): 407–413.

Loula T. 1991. Mystery pig disease. *Agri-practice*, 12 (1): 23–34.

Malgarin CM, Nosach R, Novakovic P, Suleman M, Ladinig A, Detmer SE, MacPhee DJ, Harding JCS. 2019. Classification of fetal resilience to porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) based on temporal viral load in late gestation maternal tissues and fetuses. *Virus research*, 260: 151–162. DOI 10.1016/j.virusres.2018.12.002.

Mardassi H, Wilson L, Mounir S, Dea S. 1994. Detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and efficient differentiation between Canadian and European strains by reverse transcription and PCR amplification. *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*, 32 (9): 2197–2203.

Mengeling WL, Lager KM, Vorwald AC. 1994. Temporal characterization of transplacental infection of porcine fetuses with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *American Journal of veterinary research*, 55 (10): 1391–1398.

Murtaugh MP, Genzow M. 2011. Immunological solutions for treatment and prevention of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS). *Vaccine*, 29 (46): 8192–8204.

Murtaugh MP, Stadejek T, Abrahante JE, Lam TTY, Leung FC-C. 2010. The ever-expanding diversity of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virus research*, 154 (1-2): 18–30. DOI 10.1016/j.virusres.2010.08.015.

Nathues C, Perler L, Bruhn S, Suter D, Eichhorn L, Hofmann M, Nathues H, Baechlein C, Ritzmann M, Palzer A, Grossmann K, Schüpbach-Regula G, Thür B. 2016. An Outbreak of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus in Switzerland Following Import of Boar Semen. *Transboundary and emerging diseases*, 63 (2): e251-61. DOI 10.1111/tbed.12262.

Nieuwenhuis N, Duinhof TF, van Nes A. 2012. Economic analysis of outbreaks of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in nine sow herds. *The Veterinary record*, 170 (9): 225. DOI 10.1136/vr.100101.

OIE - World Organisation for Animal Health. 2012. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. <http://www.oie.int/en/international-standard-setting/terrestrial-manual/access-online/>.

Otake S, Dee SA, Rossow KD, Deen J, Joo HS, Molitor TW, Pijoan C. 2002. Transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by fomites (boots and coveralls). *Journal of Swine Health and Production*, 10 (2): 59–65.

Otake S, Dee SA, Rossow KD, Moon RD, Pijoan C. 2002. Mechanical transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by mosquitoes, *Aedes vexans* (Meigen). *Canadian journal of veterinary research = Revue canadienne de recherche veterinaire*, 66 (3): 191–195.

Otake S, Dee SA, Rossow KD, Moon RD, Trincado C, Pijoan C. 2003. Transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by houseflies (*Musca domestica*). *The Veterinary record*, 152 (3): 73–76. DOI 10.1136/vr.152.3.73.

Park C, Seo HW, Kang I, Jeong J, Choi K, Chae C. 2014. A new modified live porcine reproductive and respiratory syndrome vaccine improves growth performance in pigs under field conditions. *Clin. Vaccine Immunol.*, 21 (9): 1350–1356.

Pol JMA, van Dijk JE, Wensvoort G, Terpstra C. 1991. Pathological, ultrastructural, and immunohistochemical changes caused by Lelystad virus in experimentally induced infections of mystery swine disease (synonym: porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (PEARS)). *The Veterinary quarterly*, 13 (3): 137–143.

Prieto C, Suarez P, Bautista JM, Sanchez R, Rillo SM, Simarro I, Solana A, Castro JM. 1996. Semen changes in boars after experimental infection with porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus. *Theriogenology*, 45 (2): 383–395.

Prieto C, Suarez P, Simarro I, Garcia C, Fernandez A, Castro JM. 1997. Transplacental infection following exposure of gilts to porcine reproductive and respiratory syndrome virus at the onset of gestation. *Veterinary microbiology*, 57 (4): 301–311.

Revilla-Fernández S, Wallner B, Truschner K, Benczak A, Brem G, Schmoll F, Mueller M, Steinborn R. 2005. The use of endogenous and exogenous reference RNAs for qualitative and quantitative detection of PRRSV in porcine semen. *Journal of virological methods*, 126 (1-2): 21–30.

Rossow DK, J E C, S M G, E A N, J C-H, D A B. 1995. Pathogenesis of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Infection in Gnotobiotic Pigs.

Rossow KD. 1998. Porcine reproductive and respiratory syndrome. *Veterinary Pathology*, 35 (1): 1–20.

Rossow KD, Bautista EM, Goyal SM, Molitor TW, Murtaugh MP, Morrison RB, Benfield DA, Collins JE. 1994. Experimental porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in one-, four-, and 10-week-old pigs. *Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*, 6 (1): 3–12.
DOI 10.1177/104063879400600102.

Rossow KD, Benfield DA, Goyal SM, Nelson EA, Christopher-Hennings J, Collins JE. 1996. Chronological immunohistochemical detection and localization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in gnotobiotic pigs. *Veterinary Pathology*, 33 (5): 551–556.

Shi M, Lam TT-Y, Hon C-C, Hui RK-H, Faaberg KS, Wennblom T, Murtaugh MP, Stadejek T, Leung FC-C. 2010. Molecular epidemiology of PRRSV: a phylogenetic perspective. *Virus research*, 154 (1-2): 7–17.
DOI 10.1016/j.virusres.2010.08.014.

Sinn LJ. 2016. PORCINE REPRODUCTIVE AND RESPIRATORY SYNDROME VIRUS IN AUSTRIA – CHARACTERIZATION OF CURRENT FIELD STRAINS.

Sinn LJ. 2016. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus in austria – charakterisation of current field strains.

Sinn LJ, Klingler E, Lamp B, Brunthaler R, Weissenböck H, Rümenapf T, Ladinig A. 2016. Emergence of a virulent porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) 1 strain in Lower Austria. *Porcine Health Management*, 2 (1): 28.

Sinn LJ, Zieglowski L, Koinig H, Lamp B, Jansko B, Mößlacher G, Riedel C, Hennig-Pauka I, Rümenapf T. 2016. Characterization of two Austrian porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) field isolates reveals relationship to East Asian strains. *Veterinary research*, 47: 17.
DOI 10.1186/s13567-015-0293-x.

Stadejek T, Oleksiewicz MB, Scherbakov AV, Timina AM, Krabbe JS, Chabros K, Potapchuk D. 2008. Definition of subtypes in the European genotype of porcine reproductive and respiratory syndrome

- virus: nucleocapsid characteristics and geographical distribution in Europe. *Archives of virology*, 153 (8): 1479–1488. DOI 10.1007/s00705-008-0146-2.
- Stadejek T, Stankevicius A, Murtaugh MP, Oleksiewicz MB. 2013. Molecular evolution of PRRSV in Europe: current state of play. *Veterinary microbiology*, 165 (1-2): 21–28. DOI 10.1016/j.vetmic.2013.02.029.
- Stevenson GW, van Alstine WG, Kanitz CL, Keffaber KK. 1993. Endemic porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection of nursery pigs in two swine herds without current reproductive failure. *Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*, 5 (3): 432–434.
- Terpstra C, Wensvoort G, Pol JM. 1991. Experimental reproduction of porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (mystery swine disease) by infection with Lelystad virus: Koch's postulates fulfilled. *The Veterinary quarterly*, 13 (3): 131–136. DOI 10.1080/01652176.1991.9694297.
- Thacker EL. 2001. Immunology of the porcine respiratory disease complex. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 17 (3): 551–565.
- Tian K, Yu X, Zhao T, Feng Y, Cao Z, Wang C, Hu Y, Chen X, Hu D, Tian X. 2007. Emergence of fatal PRRSV variants: unparalleled outbreaks of atypical PRRS in China and molecular dissection of the unique hallmark. *PloS one*, 2 (6): e526.
- van der Linden I. 2003. Virological kinetics and immunological responses to a porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection of pigs at different ages. *Vaccine*, 21 (17-18): 1952–1957. DOI 10.1016/S0264-410X(02)00822-8.
- van der Linden IFA, Voermans JJM, van der Linde-Bril EM, Bianchi ATJ, Steverink P. 2003. Virological kinetics and immunological responses to a porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection of pigs at different ages. *Vaccine*, 21 (17-18): 1952–1957.
- Veijalainen P-L, Tapiovaara H. 2000. No Aujeszky's disease or PRRS in Finland. *Veterinary research*, 31 (1): 153–154.
- Wensvoort G. 1993. Lelystad virus and the porcine epidemic abortion and respiratory syndrome. *Veterinary research*, 24 (2): 117–124.

Wensvoort G, Terpstra C, Pol JM, ter Laak EA, Bloemraad M, Kluiver EP de, Kragten C, van Buiten L, den Besten A, Wagenaar F. 1991. Mystery swine disease in The Netherlands: the isolation of Lelystad virus. *The Veterinary quarterly*, 13 (3): 121–130. DOI 10.1080/01652176.1991.9694296.

Wills RW, Gray JT, Fedorka-Cray PJ, Yoon K-J, Ladely S, Zimmerman JJ. 2000. Synergism between porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) and *Salmonella choleraesuis* in swine. *Veterinary microbiology*, 71 (3-4): 177–192.

Wills RW, Zimmerman JJ, Yoon KJ, Swenson SL, Hoffman LJ, McGinley MJ, Hill HT, Platt KB. 1997. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: routes of excretion. *Veterinary microbiology*, 57 (1): 69–81.

Yaeger MJ, Prieve T, Collins J, Christopher-Hennings J, Nelson E, Benfield D. 1993. Evidence for the transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in boar semen. *Swine Health Prod*, 1 (5): 7–9.

Yoon J, Joo HS, Goyal SM, Molitor TW. 1994. A modified serum neutralization test for the detection of antibody to porcine reproductive and respiratory syndrome virus in swine sera. *Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*, 6 (3): 289–292.

Yun S-I, Lee Y-M. 2013. Overview: Replication of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Journal of microbiology (Seoul, Korea)*, 51 (6): 711–723. DOI 10.1007/s12275-013-3431-z.

Zimmerman JJ, Derald J H, Michael P. Murtaugh, Thomas S, Gregory WS, Montserrat T, Hanchun Y, Jianqiang Z, Hrsg. 2019. *Diseases of swine*. Elfteth edition. Hoboken NJ: Wiley-Blackwell, 1108.

9 Tabellenverzeichnis

Tab. 1.....	8
Tab. 2.....	10
Tab. 3.....	10
Tab. 4.....	14
Tab. 5.....	18

10 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	4
Abb. 2:	13
Abb. 3	17
Abb. 4	21
Abb. 5	22
Abb. 6	23
Abb. 7	24
Abb. 8	26
Abb. 9	31

11 Danksagung

Ich danke Herrn Professor Dr. Rümenapf und Dr. Angelika Auer die mir ermöglicht haben diese Arbeit am Institut für Virologie zu verfassen und mit Rat und Tat zur Seite standen wenn ich diese benötigte.

Da die Abgabe dieser Arbeit die baldige Fertigstellung meines Studiums bedeutet möchte ich mich auch bei meinen Eltern bedanken, die mir das Studium ermöglichten.

Außerdem bei meinen Großeltern, die vermutlich verantwortlich dafür sind, dass ich schon als Kind diesen Berufswunsch hatte.

Ich möchte mich auch bei meinem Freund bedanken der mich im letzten Studienjahr zum lachen gebracht hat obwohl die letzten Prüfungen das ein oder andere Mal an meinen Nerven gezerrt haben.

Danke an meine Freunde für jedes aufbauende und unterstützende Wort das ich von euch bekommen habe.