

Aus dem Department für Pathologie der
Veterinärmedizinischen Universität Wien

Institut für Virologie

Leiter: Univ. Prof. Dr. Till Rümenapf

**Molekularepidemiologische
Untersuchung von Isolaten des
atypischen porzinen Pestivirus (APPV)
aus österreichischen Schweinebetrieben**

2016 - 2018

Diplomarbeit

Veterinärmedizinische Universität Wien

vorgelegt von

Stephanie Kurz

Wien, im Januar 2020

Betreuerin und 1. Begutachterin	Dr. med. vet. Christiane Riedel Institut für Virologie Department für Pathologie Veterinärmedizinische Universität Wien
Mitbetreuende Assistentin	Mag. med. vet. Kerstin Seitz Institut für Virologie Department für Pathobiologie Veterinärmedizinische Universität Wien
2. Begutachter	Univ. Prof. Dr. Andrea Ladinig Universitätsklinik für Schweine Department für Nutztiere und öffentliches Gesundheitswesen in der Veterinärmedizin

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Thema und Konzept dieser Arbeit	1
1.2	Die Familie <i>Flaviviridae</i>	2
1.3	Allgemeines über die Gattung Pestivirus	2
1.4	Myoklonia congenita	6
1.5	Das Krankheitsbild der APPV Infektion	7
1.6	Diagnostische Tests zum Nachweis von APPV	9
1.7	Geographische Verbreitung von APPV	9
1.8	APPV bei Wildschweinen	10
2	Material und Methoden	12
2.1	Material	12
2.1.1	Verwendete Proben	12
2.1.2	Verwendetes PCR Gerät	13
2.1.3	Verwendete Primer	13
2.1.4	Verwendete Marker	13
2.1.5	Verwendete Kits	14
2.1.6	Weitere verwendete Programme und Firmen	14
2.2	Methoden	15
2.2.1	Polymerase – Kettenreaktion (PCR), reverse – Transkriptase – PCR (RT – PCR)	15
2.2.2	PCR Protokolle für diese Diplomarbeit	15
2.2.3	Agarose – Gelelektrophorese von DNA – Fragmenten	18
2.2.4	Sanger Sequenzierung	19
2.2.5	Vergleich der Sequenzen	19
3	Ergebnisse	21
3.1	Ergebnisse der PCR	22
3.2	Nukleotididentität	26

3.3	Phylogenie	28
4	Diskussion	30
5	Zusammenfassung	32
6	Summary	33
7	Literaturverzeichnis.....	34
8	Abbildungsverzeichnis	39
9	Tabellenverzeichnis	40

Abkürzungsverzeichnis

APPV	Atypisches porzines Pestivirus
bp	Basenpaar
BVD	Bovine Virusdiarröhö
CDD	Conserved Domain Database
KSF	Klassische Schweinepest
FSME	Frühsommermeningitisenzephalitis
HE	Hämatoxylin – Eosin
kb	Kilo-Basenpaar
LFB	Luxol Fast Blue
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NEB	New England Biolabs
nm	Nanometer
NSP	Nichtstrukturprotein
RT – PCR	Reverse Transkriptase – Polymerase Kettenreaktion
qPCR	quantitative PCR
SP	Strukturprotein

1 Einleitung

1.1 Thema und Konzept dieser Arbeit

Ziel der vorliegenden Diplomarbeit ist die retrospektive molekularepidemiologische Untersuchung von Isolaten des atypischen porzinen Pestivirus (APPV) in österreichischen Schweinebetrieben aus den Jahren 2016 – 2018. Diese Arbeit soll an die im Jahr 2017 veröffentlichte Publikation von Schwarz et. al: „*Congenital infection with atypical porcine pestivirus (APPV) is associated with disease and viral persistence*“ anschließen.

APPV wurde 2015 entdeckt und rasch mit der Myoklonia kongenita - dem umgangssprachlich als ‚Ferkelzittern‘ bezeichneten Krankheitsbild - in ätiologischen Zusammenhang gebracht. Auch in österreichischen Betrieben tritt dieses Syndrom auf und vermindert die Wirtschaftlichkeit der Ferkelproduktion. Vor allem Unterernährung war eines der Hauptprobleme für die österreichischen Ferkelbetriebe, die von Ferkelzittern betroffen waren. Ebenso war ein Anstieg der Gesamtsterblichkeit um etwa 10 % bei neugeborenen Ferkeln auffällig. Nachdem die Ferkel aus österreichischen Schweinebetrieben aus den Jahren 2015 und 2016 von Tierärzten der Klinik für Schweine der Veterinärmedizinischen Universität Wien untersucht worden waren, wurden für die o.g. Publikation Proben entnommen. Zusätzlich wurde mit Proben von nieder – und oberösterreichischen Betrieben eine retrospektive Studie der aufgezeichneten Fälle des Jahres 2013 durchgeführt.

Bei den Untersuchungen stellte sich mittels Reverser – Transkriptase – Polymerase-Kettenreaktion (RT – PCR) heraus, dass ebenso bei Ferkeln aus österreichischen Betrieben, die von Ferkelzittern betroffen waren, das noch wenig erforschte APPV nachweisbar war. Die österreichischen Isolate zeigten dabei eine 90 %ige Übereinstimmung mit Sequenzen von amerikanischen APPV Isolaten und stimmten zu 92 % mit Sequenzen von deutschen APPV Isolaten überein. Außerdem ließ sich daraus schließen, dass das Virus persistierende Infektionen auslösen kann, da sowohl im Speichel, als auch im Samen von bis zu 6 Monate alten Schweinen das Virus mittels quantitativer RT – PCR (qRT-PCR) nachgewiesen werden konnte (Schwarz et al., 2017).

Diese Diplomarbeit befasst sich mit der molekularepidemiologischen Untersuchung von Isolaten des atypischen porzinen Pestivirus aus österreichischen Schweinebetrieben aus den Jahren 2016 – 2018. Dabei soll die folgende Hypothese getestet werden: „Bei den österreichischen APPV Isolaten handelt es sich um eine monophyletische Population.“

1.2 Die Familie *Flaviviridae*

Alle Mitglieder der Familie *Flaviviridae* haben ein einzelsträngiges RNA Genom positiver Polarität mit einer Länge von etwa 9.000 – 13.000 Basen.

Die Familie der *Flaviviridae* lässt sich in vier Gattungen unterteilen. Dazu zählen die Gattungen *Pestivirus*, zu der auch APPV gehört, *Flavivirus*, *Hepacivirus*, sowie *Pegivirus*. In der Human – und Veterinärmedizin sind vor allem Erreger, wie das Gelbfiebervirus, West – Nil Virus oder das Dengue Virus sehr bekannt (Simmonds et al., 2017).

1.3 Allgemeines über die Gattung Pestivirus

Pestiviren sind genetisch variable RNA Viren, die weltweit verbreitet sind und zu hohen wirtschaftlichen Verlusten führen können (Gatto et al., 2019). Zu den Pestiviren gehören unter anderem APPV und CSFV (*Classical swine fever virus*) (Moennig et al., 2003), welche beide in der Schweineindustrie von hoher Bedeutung sind (Tao et al., 2013) und als Rinderpathogen das bedeutende Virus der bovinen Virusdiarrhö (BVDV).

In den letzten Jahren wurden neue Pestiviren in Schweinen entdeckt, die alle als atypische porzine Pestiviren beschrieben wurden. Dazu zählen neben APPV, welches 2015 erstmalig in den USA identifiziert wurde (Hause et al., 2015), das Bungowannah – Virus (Kirkland et al., 2007) und das Linda – Virus (Lamp et al., 2017).

Auch in Ratten und Fledermäusen, sowie in kleinen Tümmern (*Phocoena phocoena*), wurden kürzlich Pestiviren entdeckt (Wu et al., 2012; Firth et al., 2014; Jo et al., 2019). Das erlangt besonders deswegen Bedeutung, da Pestiviren bisher nur mit Klaudentieren assoziiert worden waren (Postel et al., 2017).

Auf Grund der Zunahme der Pestivirusspezies bei Schweinen, wurde eine neue Nomenklatur der Mitglieder der Gattung Pestivirus beschlossen. Bei der neuen Einteilung der Pestiviren wurden sie in die Klassen A – K klassifiziert (B. Smith et. al., 2017).

Tabelle 1 Nomenklatur der Mitglieder der Gattung Pestivirus (B. Smith et. al., 2017)

Klasse	Pestivirus
A	BVDV 1
B	BVDV 2
C	CSFV
D	BDV
E	Pronghorn – Pestivirus
F	Bungowannah – Virus
G	Giraffenpest – Virus
H	Hobi – ähnliches Pestivirus
I	Aydin – ähnliches Pestivirus
J	Rattenpestvirus
K	Atypisches porcine Pestivirus

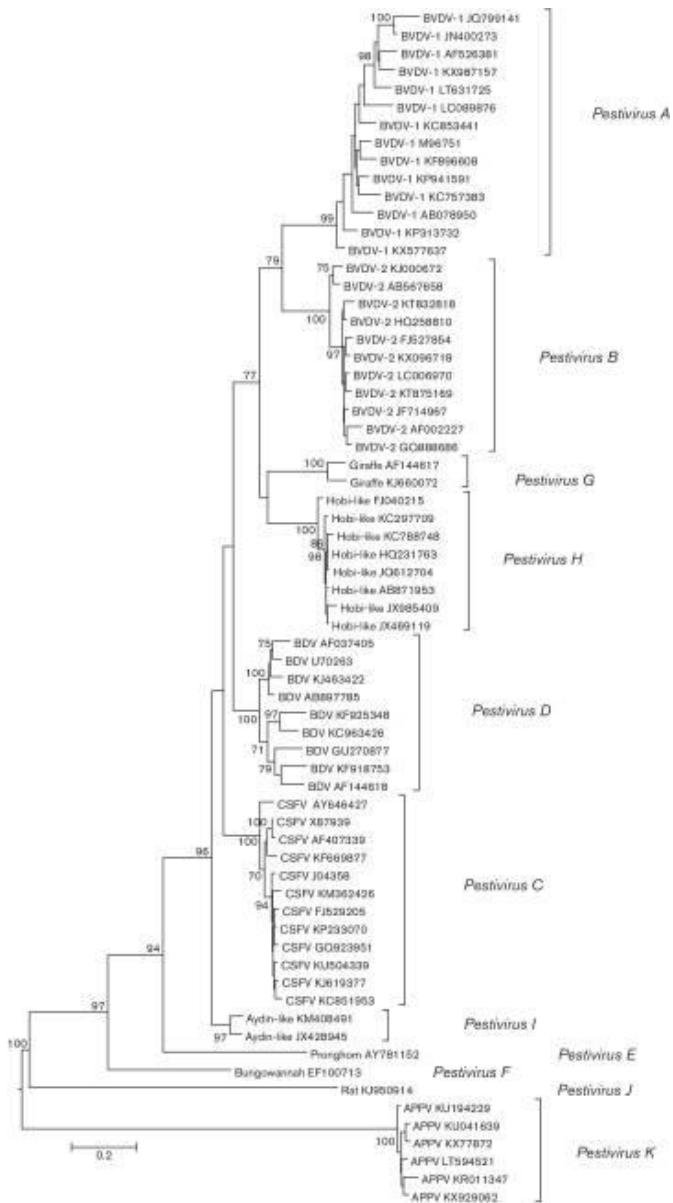


Abbildung 1 Phylogenetischer Baum der Pestiviren entnommen aus dem Paper "Proposed revision to the taxonomy of the genus Pestivirus, family Flaviviridae" (B. Smith et. al., 2017)

Das Virusgenom des APPV hat eine Länge von etwa 11.5 kb und besteht aus einem RNA Einzelstrang positiver Polarität (+ssRNA), der nicht polyadenyliert und nicht gecappt ist. Zum Vergleich umfasst die Standardlänge eines Pestivirus eine Länge von ca. 12,3 kb, im Falle von zytopathogenen BVDV bis hin zu 16,5 kb (Tautz et al., 2015). Alle Pestiviren weisen einen einheitlichen Genomaufbau auf. Im Vergleich zu anderen Viren, die der Familie der *Flaviviridae* angehörig sind, unterscheiden sie sich in zwei Genombereichen, die für die Proteine E^{rns} und Npro kodieren (Postel et al., 2018). APPV unterscheidet sich von anderen Pestiviren durch eine N – terminale Verkürzung des Strukturproteins E2 (Postel et al., 2018).

Das Genom kodiert einen offenen Leserahmen (ORF) und wird an beiden Enden von 5' und 3' untranslatierten Regionen flankiert, die eine wichtige Rolle bei der Translationsinitiation und Replikation spielen. Um Einzelproteine zu erlangen, wird das 3635 – aa – Polyprotein, welches um 250 aa kürzer als das anderer Pestiviren ist, wie in Abbildung 2 ersichtlich, ko – und posttranskriptionell in funktionelle Proteine geschnitten. Diese sind vom N – zum C – Terminus des Polyproteins: Npro, Core, E^{ns}, E1, E2, p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A und NS5B. Sie werden in Struktur – und Nichtstrukturproteine (SP und NSP) unterteilt. Zu den Strukturproteinen gehören Core, E^{ns}, E1, und E2. Die drei Glykoproteine, die in der Virushülle verankert sind, haben die Bezeichnungen E^{ns}, welches nur bei Pestviren zu finden ist (R. Schneider et. al., 1993) und Heterodimere E1 und E2, welche für den Eintritt des Virus in die Zielzellen verantwortlich sind (Pan et al., 2019; (Ronecker et al., 2008). Das Glykoprotein E2 ist hauptverantwortlich für die Produktion von schützenden Antikörpern (Pan et al., 2019).

Die restlichen Proteine gehören der Gruppe der Nichtstrukturproteine an. Das erste NSP Npro besitzt eine Autoprotease – Aktivität, die für die eigene Abspaltung vom folgenden Kapsidprotein wichtig ist (Pan et al., 2019).

Die restlichen Nichtstrukturproteine werden im Anschluss an E2 kodiert. NS2, welches bei anderen Pestiviren eine Cystein Autoprotease Domäne besitzt und für die Spaltung von NS2 und NS3 verantwortlich ist, konnte für APPV noch nicht bestätigt werden (Pan et al., 2019).

Das Nichtstrukturprotein NS3 ist eine Serinprotease, besitzt Helikase- und ATPase-Aktivität und ist für die proteolytische Spaltung der NSPs ab NS4A verantwortlich (Pan et al., 2019).

Das Nichtstrukturprotein NS4A ist als Kofaktor der NS3 – Protease bekannt und wichtig für weitere Reaktionen im Bereich NS4B / NS5A, sowie NS5A / NS5B (Tautz et al., 2015).

Bei NS5B handelt es sich um eine RNA abhängige RNA Polymerase, deren Aufgabe die Replikation des viralen Genoms ist (Pan et al., 2019).

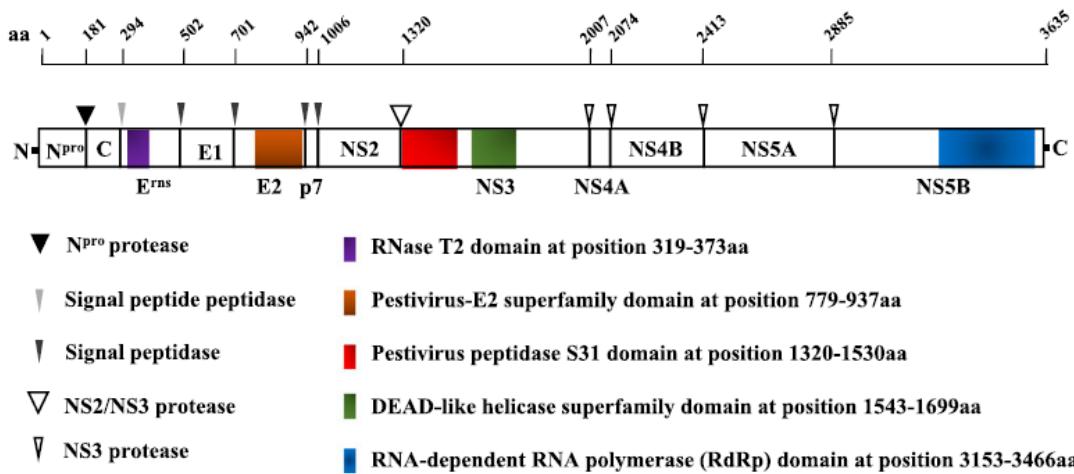


Abbildung 2 Polyprotein von APPV entnommen aus dem Paper „An emerging novel virus: Atypical porcine pestivirus (APPV)“ (Pan et al., 2019) Diese Abbildung zeigt das Polyprotein von APPV. Dabei erkennt man, welcher Aminosäurebereich für die jeweiligen Einzelproteine kodiert und welche Proteasen für die Spaltung des Polyproteins verantwortlich sind. Funktionell wichtige Bereiche sind farblich hinterlegt.

1.4 Myoklonia congenita.

Generell wurde der kongenitale Tremor („Ferkelzittern“, Myoklonia congenita) das erste Mal vor knapp 100 Jahren beschrieben (Kinsley, 1922). Es ist somit ein bekanntes Krankheitsbild und kann verschiedene Ursachen haben. Neben nicht infektiösen Ursachen (z.B. Genetik) sind insbesondere virale Infektionen als Auslöser in Betracht zu ziehen. Das Syndrom wird dabei in fünf Typen (Typ A1-A5) unterteilt. Es wird davon ausgegangen, dass die meisten Fälle heutzutage dem Typ 2 angehören, welcher mit hoher Wahrscheinlichkeit durch eine kongenitale Infektion mit APPV ausgelöst wird.

Bei Typ eins handelt es sich um eine kongenitale Infektion mit CSFV, die alle Rassen betrifft, ein hohes Risiko für die Erkrankung des gesamten Wurfes und ein moderat bis hohes Risiko für den Eintritt des Todes aufweist.

Typ zwei wird mit APPV Infektionen ätiologisch in Verbindung gebracht und kann alle Rassen betreffen. Bei Jungsauen ist das Risiko hoch, dass der gesamte Wurf betroffen ist, bei Sauen allerdings eher gering. Das Risiko für die Mortalität wird hier als niedrig bis moderat eingestuft.

Typ drei bezieht sich auf die genetisch rezessiv geschlechterverbundene Krankheit, die vor allem bei Landrassen vorkommt. Bei Typ drei ist das Risiko für die Erkrankung des gesamten Wurfes gering, dafür die Mortalität hoch.

Typ vier wird auch als genetisch autosomal rezessiver Typ bezeichnet und wird hauptsächlich bei Sattelschweinen beobachtet. Auch hier ist das Risiko für die Erkrankung des ganzen Wurfes niedrig, die Motilität hingegen hoch.

Typ fünf, auch als chemischer Trichlorfon bezeichnet, kann bei allen Schweinerassen in Erscheinung treten. Sowohl das Risiko für die Erkrankung des Wurfes, als auch die Mortalität werden als hoch eingestuft (Gatto et al., 2019).

1.5 Das Krankheitsbild der APPV Infektion

Das mit APPV – assoziierte Zittern lässt sich bei neugeborenen Ferkeln beobachten. Die Wahrscheinlichkeit einen betroffenen Wurf zu haben, ist bei juvenilen Sauen höher als bei älteren Sauen. Nicht alle Würfe eines Schweines sind gleich stark betroffen und zwischen den einzelnen Ferkeln eines Wurfes sind die Symptome unterschiedlich stark ausgeprägt. Beide Geschlechter, sowohl männlich, als auch weiblich, sind vom Auftreten der Symptome gleich stark betroffen. Die Symptome unterscheiden sich je nach Schweregrad und reichen vom isolierten Kopfschütteln, das nur zeitweilig auftritt, bis zu Zittern des gesamten Körpers, welches aus einer myoklonischen Kontraktion resultiert (Gatto et al., 2019; J. Zimmermann 2019. Diseases of swine. Elfte Aufl. Wiley Blackwell Verlag, 622 - 633).

Die Symptome können unterschiedlich lange anhalten, von Wochen bis hin zu Monaten und variieren in ihrer Intensität. In Ruhe oder im Schlaf wurde beobachtet, dass die Intensität der Symptome abnahm, während sie sich in Stresssituationen steigerte. Es wird angenommen, dass der kongenitale Tremor nicht direkt zum Tod führt, sondern dass es durch eine schlechte Kolostrumaufnahme oder eine allgemein eingeschränkte Milchaufnahme zum Verhungern bzw. einer eingeschränkten Entwicklung kommt („Kümmerer“). Doch auch Quetschungen oder andere Verletzungen, die während des Zitterns entstehen, können zum Tod führen (Gatto et al., 2019; de Groot et al., 2016; Schwarz et al., 2017; Arruda et al., 2016).

Bei histologischen Untersuchungen zeigte sich, dass sich die Veränderungen auf das Zentralnervensystem beschränken, welche speziell an der weißen Substanz des Rückenmarks und des Hirnstamms zu beobachten sind (J. Zimmermann 2019. Diseases of swine. Elfte Aufl. Wiley Blackwell Verlag, 622 - 633).

Für den Artikel *“Congenital infection with atypical porcine pestivirus (APPV) is associated with disease and viral persistence”* von Schwarz et al. wurden die Ferkel auch auf pathologische Veränderungen untersucht. Besonders deutlich zeigten sich Veränderungen

der weißen Substanz in Form einer Hypomyelinisierung, welche auch aus anderen Studien ersichtlich sind (Postel et al., 2016). Zusätzlich befanden sich im Bereich der Lunge alveoläre Ödeme und Emphyseme. An den Nieren wurden vereinzelt Petechien gefunden, die sich vor allem im Bereich der Nierenrinde zeigten. Bei der pathologisch – anatomischen Untersuchung wurden keine Veränderungen im Bereich des Gehirns und Rückenmarks entdeckt (Schwarz et al., 2017). Es ist davon auszugehen, dass die Zellen in nervösen und lymphoiden Geweben, sowie die Endothelzellen in anderen Geweben als Zielzellen von APPV angesehen werden können (Liu et al., 2019).

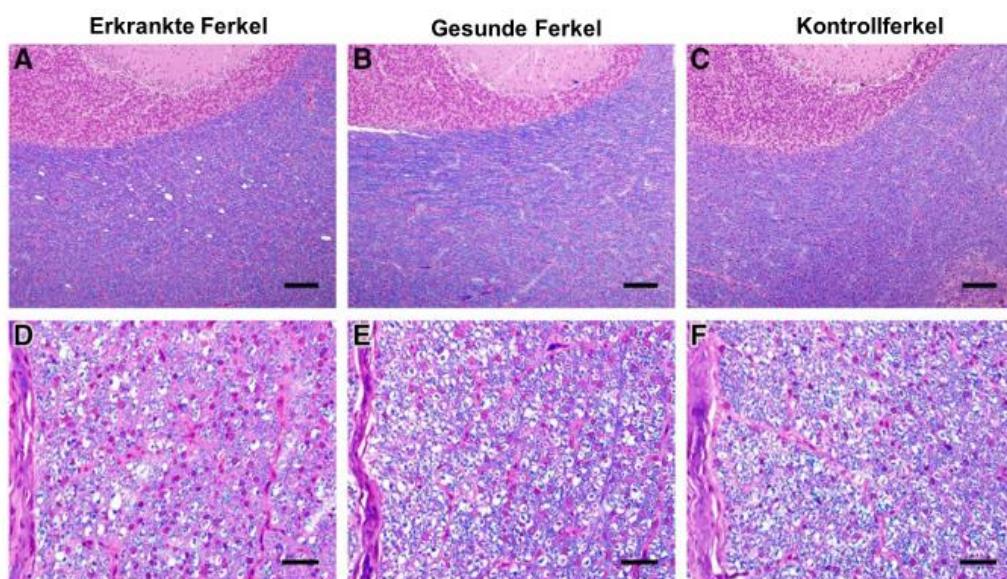


Abbildung 3 Histologische Läsionen von Ferkel mit CT Symptomen im Vergleich zu gesunden Tieren im selben Wurf und zu einem Kontrolltier. Abbildung modifiziert aus Schwarz et al., 2017; der Größenbalken in A-C entspricht 150µm, in D-F 40µm. In Reihe 1 (A-C) wird das Kleinhirn histologisch dargestellt. Dabei erkennt man deutlich, dass bei den Tieren mit neurologischen Symptomen Vakuolen in Bereich der zerebellaren weißen Substanz vorhanden sind. Diese sind weder bei den Wurfgeschwistern, noch bei den Kontrolltieren aufzufinden. In der zweiten Reihe wird die weiße Substanz der Brustwirbelsäule dargestellt. Hier erkennt man eine Hypomyelinisierung bei den betroffenen Tieren, Wurfgeschwister und Tiere der Kontrollgruppe sind auch hier erneut unauffällig.

Da bei Untersuchungen von Serum – und Gewebsproben, sowie Samenproben von klinisch gesunden Haus – und Wildschweinen ebenfalls APPV nachgewiesen werden konnte, wird auf persistierende Infektionen geschlossen. Diese Tiere spielen durch ihre lang anhaltende Ausscheidung eine wichtige Rolle in der Virusverbreitung (Gatto et al., 2019).

Erfolgreiche Behandlungen – oder Präventionsmethoden sind bisher nicht etabliert. Es wurde in China allerdings ein Impfstoff an Mäusen getestet, der auf dem E2 – Protein basiert. Als Ergebnis dieser Studie zeigte sich, dass E2 als wirksame Untereinheit bei der Elimination von APPV erfolgreich sein kann (Zhang et al., 2018).

1.6 Diagnostische Tests zum Nachweis von APPV

Um das Virus nachweisen zu können, wurden verschiedene molekularbiologische und serologische Verfahren entwickelt. Die Nachweismethode der Wahl ist aktuell der Genomnachweis mittels PCR, wobei die Primer an den Nichtstrukturproteinen NS3, NS4B oder NS5B binden. Die Problematik stellt sich hier allerdings in der genetischen Variabilität des Virus dar (Postel et al., 2018). Zum Nachweis von Antikörpern werden verschiedene ELISA Methoden herangezogen. Schwarz et al. arbeiten hierfür bei dem Versuch mit der NS3 Helikase des APPV. Postel et al. exprimierten für die ELISA Untersuchung das E^{rns} Protein des APPV in *Leishmania tarentolae* (Postel et al., 2018).

1.7 Geographische Verbreitung von APPV

Wie erst kürzlich bei einer Studie herausgefunden, geht man weltweit von einer Genomhäufigkeit von ca. 9 % bei klinisch gesunden Hausschweinen aus (Postel et al., 2017). Geographisch kann mittlerweile von einem annähernd weltweiten Auftreten gesprochen werden, denn APPV wurde schon auf vier verschiedenen Kontinenten nachgewiesen. Nachdem APPV erstmalig in den USA beschrieben wurde (Hause et al., 2015), konnte das Virus auch in Kanada, Südamerika (Brasilien) (Mósena et al., 2018) und Europa (Niederlande, Deutschland, Schweden, Österreich, Großbritannien, Schweiz, Serbien, Italien, Ungarn und Spanien) (Beer et al., 2016; de Groot et al., 2016; Postel et al., 2016; Schwarz et al., 2017; Postel et al., 2017) und Asien (China, Süd Korea und Taiwan) (Zhang et al., 2017; Postel et al., 2017) identifiziert werden (Gatto et al., 2019).

Die Untersuchungen von Postel et al. im Jahr 2017 zeigen, dass in der Epidemiologie vor allem gesunde Schweine eine wesentliche Rolle spielen. So wurden in dieser Studie Proben von 1460 klinisch gesunden Schweinen aus Europa (Großbritannien, Deutschland, Serbien, Schweiz) und Asien (China und Taiwan) auf das Vorkommen von APPV – Genomen (PCR) und Antikörpern (indirekter ELISA) untersucht. Mittels ELISA wurde der serologische Status bestimmt und in niedrig bis hoch reaktiv unterteilt. Bei dem Antikörper – ELISA zeigten über 60 % der infizierten Tiere eine mittlere bis hohe Reaktivität. Bei Hausschweinen aus allen Regionen konnten APPV – Genome nachgewiesen werden, 130

der 1460 Tiere bzw. 8,9 % waren genompositiv. Dabei schwankte die Erkennungsrate in den einzelnen Ländern zwischen 2,3 % und 17,5 %. Vor allem in Asien stellte sich heraus, dass das APPV vergleichsweise häufig auftrat, so waren dort 11 der 219 Proben positiv, was 5 % entsprach, aus Taiwan konnten 22 von 200 Proben als positiv identifiziert werden, dies entsprach sogar 11 % (Postel et al., 2017). In 10 % dieser serologisch negativen Tiere konnte mittels PCR das Genom des APPV nachgewiesen werden. Vermutet wird, dass hier der Infektionsstatus, also, ob es sich um eine akute, chronische oder persistierende Infektion handelt, für diese Ergebnisse verantwortlich ist (Postel et al., 2017).

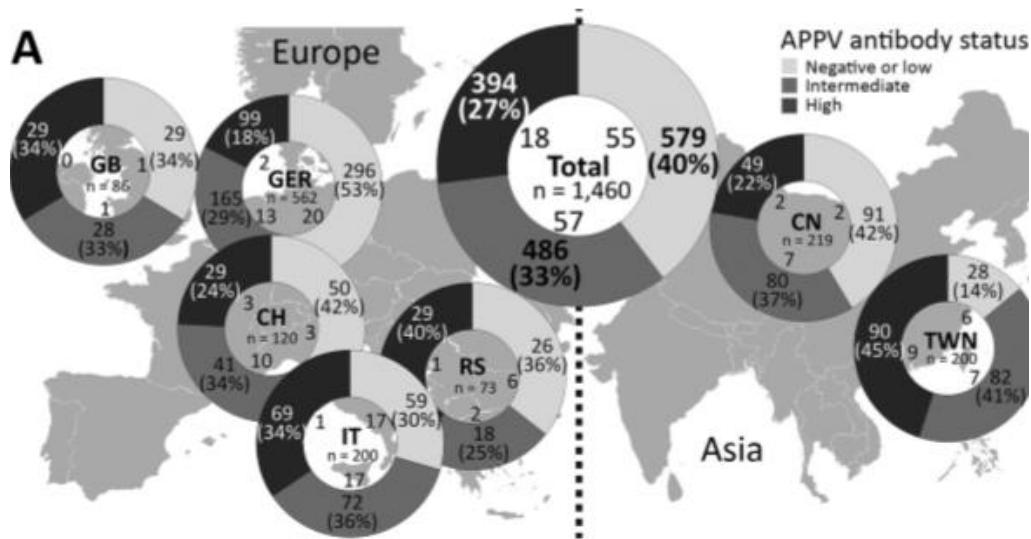


Abbildung 4 Anteil der serologischen und direkten Nachweise von APPV in Schweinen aus Europa und Asien (Postel et al., 2017). Diese Abbildung zeigt im Inneren der Kreise die Gesamtzahl (=n) der untersuchten Schweine und randständig zu den äußerlichen Kreisen die Anzahl der Genom – positiven Fälle in der jeweiligen Region. Das Äußere der Kreise zeigt die Anzahl der serologisch stark positiven (schwarz), mittelmäßig positiven (dunkelgrau) und schwach positiv bis negativen Proben (hellgrau) an.

Innerhalb eines Landes war die genetische Variabilität vereinzelt hoch, so z.B. in Deutschland und in Italien. Generell hatte der geographische Ursprung laut Postel et al jedoch nur einen geringen Einfluss auf die genetischen Unterschiede.

1.8 APPV bei Wildschweinen

Nicht nur bei domestizierten Hausschweinen, sondern auch bei Wildschweinen, wurde bereits APPV detektiert (Colom-Cadena et al., 2018; Cagatay et al., 2018). Allerdings ist ihre Bedeutung in der Virusverbreitung oder in der Übertragung auf Hausschweine noch unbekannt (Gatto et al., 2019).

Cagatay et al. untersuchten das Vorkommen von APPV Genomen und APPV spezifischen Antikörpern von Wildschweinen in Deutschland. Dabei wurden in den Jagdsaisonen 2015/2016 und 2016/2017 insgesamt 456 Serumproben von Wildscheinen aus den nördlichen Gebieten Deutschlands gesammelt. Zusätzlich wurden noch 15 Proben aus Serbien aus dem Jahr 2015 in die Studie miteinbezogen. In 19 % (n=87) der untersuchten Seren konnte APPV mittels RT – PCR nachgewiesen werden. Bei den Untersuchungen zeigten 52 % der Tiere eine mittlere bis hohe ELISA – Reaktivität.

Auch 10 der 15 Tiere aus Serbien zeigten im ELISA eine mittlere bis hohe Reaktivität. Dies lässt eine weite Verbreitung von APPV in den Wildschweinpopulationen Europas vermuten. Es konnte jedoch in keinem der Tiere das APPV – Genom nachgewiesen werden.

Molekularepidemiologisch waren die Wildschweinproben einer Probe aus dem Raum Bayern am ähnlichsten. Die genetische Variabilität von APPV scheint daher bei Hausschweinen aus Ländern in Europa und Asien deutlich höher zu sein, als bei Wildschweinen in Deutschland. Hier ist allerdings zu beachten, dass Wildschweine aus sehr ähnlichen Regionen stammen, Hausschweine haben dagegen geographisch oft unterschiedliche Herkünfte. Es wird vermutet, dass auch die Globalisierung in der Landwirtschaft, wie z.B. internationale Tiertransporte, Tierbewegungen oder auch der Handel mit Sperma, zu einer Begünstigung des Virus unter Hausschweinen führt.

Die Daten zum Vorkommen von APPV bei Wildschweinen legen nahe, dass sie ein wichtiges Virusreservoir für APPV darstellen und es erforderlich ist, ihre epidemiologische Rolle weiter aufzuklären. Ziel wäre es, Bekämpfungs- und Kontrollmaßnahmen, sowie Impfungen zu entwickeln, um eine Weiterausbreitung, die vor allem auch zu wirtschaftlichen Verlusten führt, einzudämmen bzw. zu verhindern (Cagatay et al., 2018).

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Verwendete Proben

Die verwendeten Proben aus verschiedenen österreichischen Betrieben wurden von der Diagnostik des Instituts für Virologie der Veterinärmedizinischen Universität Wien zur Verfügung gestellt und stammen aus dem Zeitraum 2016 – 2018. Dabei handelt es sich um Proben, die bereits während der Routinediagnostik einmal mittels qRT-PCR positiv auf APPV getestet wurden. In den folgenden Tabellen befinden sich die diagnostischen Proben, die seit dem 22.04.2016 an der Veterinärmedizinischen Universität Wien eingegangen sind und für diese Diplomarbeit verwendet wurden. Trotz unterschiedlichster PCR – Protokolle konnte nicht mit allen der 24 Proben ein positives Ergebnis in der konventionellen PCR erzielt werden. Rückführen lässt sich dies wahrscheinlich auf die lange Lagerung des Materials bei -80°C oder auf die initial nur gering vorhandene Viruslast im Material selbst. Für die weitere Arbeit konnten somit nur 20 Proben aus 15 verschiedenen Betrieben verwendet werden.

Tabelle 2 verwendete Proben für die Sequenzierung

Betrieb	Jahr	Bundesland
A	2016	OÖ
B	2016	OÖ
C1	2016	K
C2	2016	K
D	2016	NÖ
E	2016	K
F	2016	OÖ
G1	2017	NÖ
G2	2017	NÖ
G3	2017	NÖ
G4	2018	NÖ
H	2017	NÖ
I	2018	OÖ
J	2016	S

K	2016	OÖ
L1	2017	OÖ
L2	2017	OÖ
M1	2017	K
M2	2017	K
O	2017	NÖ

Tabelle 3 Verwendete Sequenzen der Genbank

Genbank Nummer	Herkunft
KX778731	Österreich
LT594521	Deutschland
KY475592	China
MK728876.1	USA, Nebraska
MF590069.1	USA Minnesota
KX929062.1	Niederlande
NC025677	Norway rat Pestivirus, New York, USA

2.1.2 Verwendetes PCR Gerät

Für die PCR wurde das Gerät SimpliAmp Thermal Cycler der Firma Applied Biosystems verwendet.

2.1.3 Verwendete Primer

Folgende Primer wurden für die PCR und die Sequenzierung verwendet.

Tabelle 4 verwendete Primer

Name	Sequenz	Forward/Reverse
CST 578	GGATTCCAGGAGTACATCA	Reverse Primer
CST 579	GTTATCCAATACCCTGAGGC	Forward Primer

2.1.4 Verwendete Marker

Als DNA – Größenstandard wurde die 1 kb DNA-Ladder der Firma Roth verwendet.

2.1.5 Verwendete Kits

Die virale RNA aus den diagnostischen Proben wurde mit dem Viral RNA Mini Kit der Firma Qiagen extrahiert. Für die PCR Reaktionen wurde entweder das OneTaq OneStep RT – PCR Kit der Firma New England Biolabs (NEB) oder das Phanta Max Kit der Firma Vazyme Biotech Co., Ltd. verwendet. Für die reverse Transkription wurde bei TwoStep Ansätzen der HiScript II 1st Strand cDNA Synthesis Kit der Firma Vazyme Biotech Co., Ltd. verwendet. Für die Agarose Gelelektrophorese wurde mit 0,8 %iger Agarose gearbeitet. Für die direkte Probenaufreinigung aus der PCR – Reaktion wurde das Monarch PCR und DNA Cleanup Kit der Firma NEB und für die Aufreinigung der PCR Reaktion aus dem Gel wurde das Monarch DNA Gel Extraction Kit der Firma NEB verwendet.

2.1.6 Weitere verwendete Programme und Firmen

Für die Berechnung der Annealingtemperatur der PCR wurde der NEB Tm Calculator V 1.12.0 (tmcalculator.neb.com) verwendet.

Zur Sanger - Sequenzierung wurden die Proben mit dem „Mix2Seq Kit“ an Eurofins Genomics versandt.

Für die Auswertung und die Beurteilung der generierten Sequenzen, sowie das Erstellen von Alignments und von phylogenetischen Bäumen, wurde anfangs der CLC Sequenz Viewer 8.0 verwendet. Später wurde mit der CLC Main Workbench 8.1.3 gearbeitet. Im Falle einer nicht eindeutig erkennbaren Nukleinbase wurde der CodonCode Aligner 9.0.1 verwendet. Mit dem Programm Nucleotide BLAST des National Center for Biotechnology Information (NCBI) wurden die Sequenzen mit den Referenzsequenzen in der Genbank verglichen.

2.2 Methoden

2.2.1 Polymerase – Kettenreaktion (PCR), reverse – Transkriptase – PCR (RT – PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion erlaubt es, geringste DNA oder RNA Mengen nahezu beliebig oft zu amplifizieren. Für die PCR braucht man einige grundlegende Komponenten. Dazu gehören synthetische Oligonukleotide (Primer), das Template, eine hitzestabile Polymerase, Desoxyribonucleosidtriphosphate und einen adäquaten Puffer. Für die RT – PCR wird außerdem noch eine reverse Transkriptase benötigt, die RNA in cDNA umschreibt. Generell durchläuft die PCR zyklisch drei Schritte: Denaturierung der Doppelstränge, Anlagerung der Primer und Elongation des DNA Abschnittes.

Es gibt viele verschiedene Anwendungsgebiete der PCR. Sie wird im molekularbiologischen Bereich verwendet, um die Anwesenheit von bestimmten Nukleotidsequenzen nachzuweisen oder um spezifische Sequenzabschnitte für spätere Arbeiten (z.B. Klonierungen oder Sequenzierungen) zu amplifizieren. Vor allem in der medizinischen Diagnostik kommt die PCR häufig zur Anwendung, z.B. um virale oder mikrobielle Gensequenzen nachzuweisen oder zu quantifizieren (Jansohn and Rothhämel, 2012).

2.2.2 PCR Protokolle für diese Diplomarbeit

Beim ersten Versuch wurde mit dem OneTaq OneStep RT – PCR Kit mit folgendem PCR – Protokoll gearbeitet.

Tabelle 5 PCR – Protokoll 1

Material	Menge in μ l
OneTaq One – Step Reaktions Mix	25
OneTaq One – Step Enzyme Mix	2
Genspezifischer Forward Primer 10 μ M (CST 579)	2
Genspezifischer Reverse Primer 10 μ M (CST 578)	2
H2ODD	19 – x
Total RNA	x = 1

Dafür wurden folgende Geräteeinstellungen am Thermocycler verwendet.

Tabelle 6 Einstellung des Thermocyclers

Zyklusschritt	Temperatur in °C	Zeit	Zyklen
Reverse Transkription	48	15 Minuten	1
Initiale Denaturierung	94	1 Minute	1
Denaturierung	94	15 Sekunden	35
Annealing	50	30 Sekunden	35
Extension	68	45 Sekunden	35
Finale Extension	68	5 Minuten	1
Hold	4		1

Da es bei einigen Proben Schwierigkeiten gab, erneut eine positive Bande zu erzeugen (sie wurden bereits zuvor positiv in der Routinediagnostik mittels qRT – PCR getestet), wurden weitere PCR Protokolle ausprobiert. So wurde 1µl der ersten RT – PCR Reaktion (s.o) als Template in einer 2. PCR – Reaktion eingesetzt. Das entsprechende Protokoll ist in Tabelle 7 dargestellt. Die Annealingtemperatur wurde auf 57°C erhöht, da eine Pfu DNA Polymerase zur DNA Amplifikation verwendet wurde.

Tabelle 7 PCR – Protokoll 2

Material	Menge in µl
Template DNA	1
H2ODD	Auf 50
2x Phanta MasterMix	25
Genspezifischer Forward Primer 10µM (CST 579)	2
Genspezifischer Reverse Primer 10µM (CST 578)	2

Da auch mit diesem Protokoll nicht für alle Proben eine analysierbare Bande amplifiziert werden konnte, wurde zur weiteren Optimierung mit einem TwoStep RT – PCR Protokoll

gearbeitet. Dabei umfasste der erste Schritt die reverse Transkription mithilfe des *HiScript II 1st Strand cDNA Synthesis Kits*. Der Ansatz bestand aus 2 µl 10x *RT Mix*, 1 µl 100 µM Primer (CST 578), 1,5 µl Enzym, 4 µl RNA und 11,5 µl Wasser. Dieser Ansatz wurde zunächst für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend noch einmal für 45 Minuten bei 45 °C. Von diesem Ansatz wurden 1 µl im folgenden PCR-Ansatz verwendet:

Tabelle 8 PCR – Protokoll 3

Material	Menge in µl
H2ODD	auf 25
Phanta MasterMix	12,5
cDNA	1
Genspezifischer Forward Primer 10µM (CST 578)	1
Genspezifischer Reverse Primer 10µM (CST 579)	1

Da auch hier erneut nicht alle Ergebnisse zufrieden stellend waren, wurde eine zusätzliche PCR-Amplifikation nach folgendem Protokoll durchgeführt. Hierfür wurde allerdings nur mehr mit den bisher negativ ausgefallen Proben weitergearbeitet.

Tabelle 9 PCR – Protokoll 4

Material	Menge in µl
H2ODD	Auf 50
Phanta	25
PCR Reaktionsmix aus Protokoll 3	2
Genspezifischer Forward Primer 10µM (CST 578)	2
Genspezifischer Reverse Primer 10µM (CST 579)	2

Abschließend wurden sämtliche negative Proben an die Labordiagnostik, welche deren Standard – PCR mit den gleichen Primer (CST 578 und CST 579) durchführte, weitergeleitet. Aus dem Jahr 2016 waren das die Proben mit den Nummern 922, 1907, 1966, 1308 und aus dem Jahr 2018 handelte es sich um die Proben mit den Nummern 1853 und 2375. Allerdings

konnte die Labordiagnostik auch nur bei den Proben aus dem Jahr 2018 ein positives Ergebnis erzeugen.

2.2.3 Agarose – Gelelektrophorese von DNA – Fragmenten

Um die Produkte der PCR detektieren zu können, gibt es verschiedene Techniken, die auf der Markierung der PCR – Produkte oder passenden Hybridisierungssonden basieren. Das erste bekannte System ist die Elektrophorese, bei der mit herkömmlichen Polyacrylamid – und Agarosegelen oder mit der Flüssigkeitspolymer – Kapillarmethode gearbeitet wird. Bei beiden Varianten werden die PCR – Produkte durch elektrische Spannung der Größe nach aufgetrennt (Jansohn & Rothhämel, 2012).

In dieser Arbeit wurden die PCR – Produkte mittels Agarose – Gelelektrophorese nach Anfärben der DNA mit PeqGreen nachgewiesen. Es wurden Agarosegele mit einer Konzentration von 0,8 % verwendet. Dafür wurden 3,2g Agarose in 400 ml Puffer (1x TAE – Puffer, welcher sich aus den Bestandteilen Trisaminomethan, Acetat und Ethylendiamintetraessigsäure zusammensetzt) gemischt und solange gekocht, bis die Agarose komplett aufgelöst wurde. Zusätzlich wurden 16 µl PeqGreen der Firma Biotech hinzugefügt. PeqGreen wurde als Fluoreszinfarbstoff eingesetzt, um die Nukleinsäuren zu detektieren.

Für die Arbeit wurde das Gel zuerst in die entsprechende Form gefüllt und für eine halbe Stunde zum Festwerden belassen. Zu jeder PCR – Reaktion wurden 4 µl des 6 x Loading Puffer der Firma NEB hinzugefügt. In das erste Feld wurden 3 µl eines DNA Markes der Firma Roth pipettiert, in die restlichen Felder wurden 1,5 µl der PCR Proben pipettiert. Beim zweiten Versuch wurde auf 2 µl der PCR Proben erhöht. Die Elektrophoresekammer lief für 30 Minuten bei 100 V. Bei der Elektrophoresekammer nach der zweiten PCR – Amplifikation (Protokoll 2 und 4) wurden 3 µl des 1kb DNA Größenstandards in die erste Tasche pipettiert und in die restlichen Taschen dann je 2 µl DNA und 0,5 µl 6x Loading Puffer.

Der letzte Arbeitsprozess des Versuchs befasste sich mit der Aufreinigung der DNA für die Sequenzierung. Dieser Schritt ist besonders wichtig, um die in der PCR – Reaktion enthaltenen Primer zu entfernen. Dafür wurde das Monarch PCR und DNA Clean up Kit bzw. das Monarch DNA Gel Extraction Kit der Firma NEB verwendet. Die Aufreinigung erfolgte nach Herstellerangabe und die Nukleinsäuren wurden in 17 µl Nuklease – freiem H2Odd eluiert.

2.2.4 Sanger Sequenzierung

Die Proben wurden zur Sequenzierung zur Firma Eurofins geschickt. Hier wurde ebenfalls mit den Primern CST 578 und CST 579 gearbeitet. Dort wurden sie nach dem Prinzip der Sanger Sequenzierung, welche auch als Didesoxymethode nach Sanger bezeichnet wird, sequenziert. Dabei handelt es sich um eine DNA – Sequenzierungsmethode, die hauptsächlich in den Bereichen der Biochemie und Genetik zur Anwendung kommt. Um die Basenabfolge einer DNA bestimmen zu können, müssen 4 verschiedene Lösungen, bestehend aus den 4 Basen Adenin, Cytosin, Thymin und Guanin, sowie eine der Basen in modifizierter Form, vorbereitet werden. Der Einbau der modifizierten Basen während der PCR erfolgt zufällig und so entstehen DNA – Ketten in unterschiedlicher Länge, da die PCR beim Einbau einer modifizierten Base abgebrochen wird. Mittels Gel – Elektrophorese können anschließend die Sequenzen der DNA – Stränge bestimmt werden. Aufgrund der immer gleichen Basenpaarung kann vom komplementär erstellten Basenstrang auf die Basensequenz der zu untersuchenden Ursprungssequenz geschlossen werden.

2.2.5 Vergleich der Sequenzen

Nach dem Eintreffen der Ergebnisse der Firma Eurofins wurden die Gensequenzen zuerst über die NCBI Genbank verglichen. Danach wurden sie mittels der Programme CLC Sequence Viewer 2018 und CLC Main Workbench 8.1.3 weiter analysiert. Aus dem Alignment der mit den CST 578 und CST 579 verwendeten Primer – generierten Sequenzen wurde eine Konsensus – Sequenz erstellt. Allenfalls fehlende Nukleotide wurden mithilfe der Analyse des Elektrosphrogramms im CodonCode Aligner ergänzt. Weiters wurde anschließend ein Alignment aus diesem Consensus und der Austria NS5B Sequenz (Genbank Nummer: KX778731) gebildet und diese miteinander verglichen. Zur weiteren Beurteilung wurden phylogenetische Bäume der vorhandenen Sequenzen mit der *Neighbour joining* – Methode erstellt. Dafür wurden die Sequenzen an die Referenzsequenz NS5B Austria angepasst und wiesen zum Schluss eine Länge von 633 bp auf. Diese Kürzung wurde durchgeführt, da für manche Isolate nicht das komplette 770bp PCR Fragment zufriedenstellend sequenziert werden konnte. Mit Hilfe des Programms Ugene V. 3.3 wurden Basenaustausche der einzelnen Proben im Vergleich mit der NS5B Austria Referenzsequenz analysiert und in einer Tabelle festgehalten. Außerdem wurden Alignments und phylogenetische Bäume mit bereits vorhandenen Sequenzen der Genbank erstellt. In dieser Arbeit wurden Sequenzen, die in

Tabelle 3 angeführt wurden, verwendet. Für die Darstellung der phylogenetischen Bäume wurde eine Bootstrap Analyse mit 1000 Replikaten durchgeführt

3 Ergebnisse

Ziel der vorliegenden Diplomarbeit war es, herauszufinden, ob es sich bei österreichischen APPV – Isolaten aus den Jahren 2016 – 2018 um eine monophyletische Population handelt.

Zu Beginn der Diplomarbeit wurden die positiven APPV Proben aus dem Eingangsbuch des Instituts für Virologie der Veterinärmedizinischen Universität Wien im Zeitraum 2016 bis 2018 herausgesucht und tabellarisch zusammengefasst. Es konnte für 20 der ursprünglichen 24 APPV Proben eine für die Sequenzanalyse geeignete Bande mittels konventioneller RT – PCR amplifiziert werden. Bei den negativen Proben (1308/16, 1907/16, 1966/16, 922/17) ist davon auszugehen, dass sie sich aufgrund der langen Lagerung oder der initial gering vorhandenen Viruslast nicht amplifizieren ließen. Es ist auch nicht auszuschließen, dass manche Proben sich durch die Primer der konventionellen PCR schlicht nicht amplifizieren ließen.

3.1 Ergebnisse der PCR

Zunächst wurde versucht, spezifische APPV – Sequenzen in den Proben mittels dem PCR Protokoll 1 (s. Tabelle 5) zu amplifizieren. Die Ergebnisse dieser PCR werden in der folgenden Abbildung dargestellt.

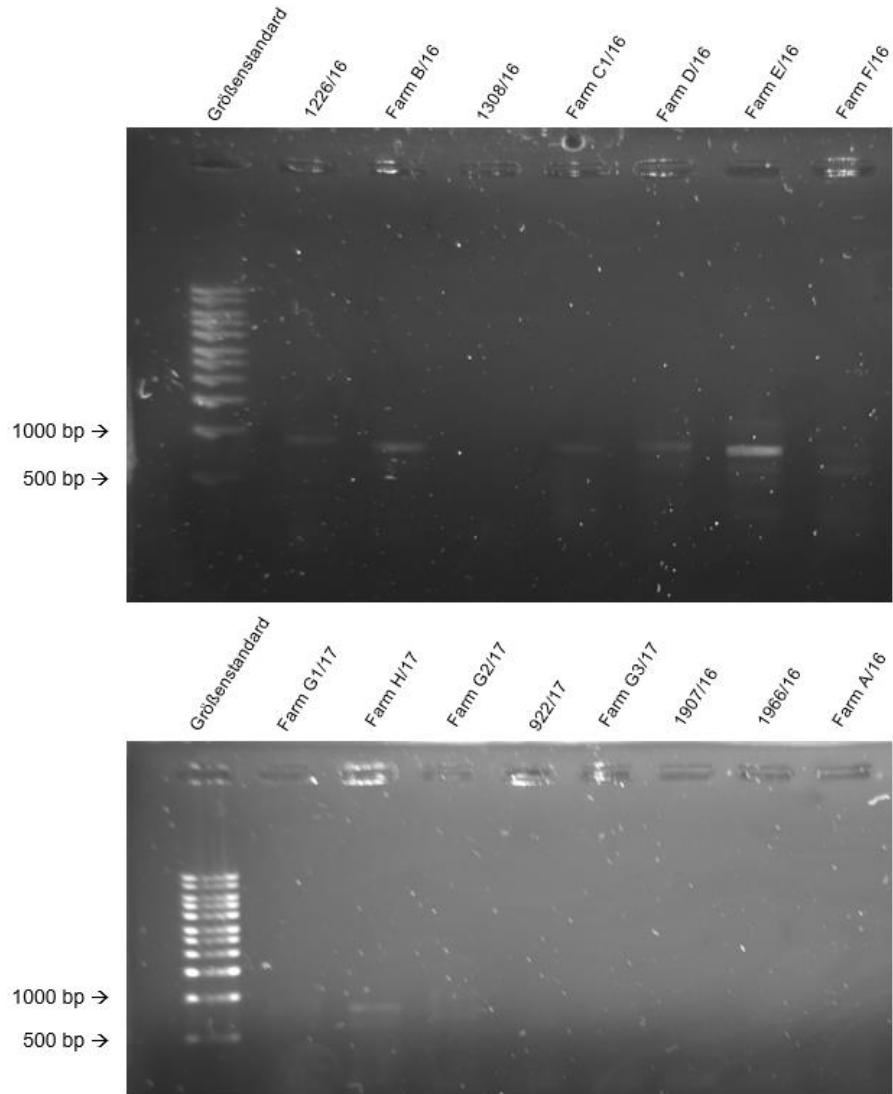


Abbildung 5 Agarose Gel – Elektrophorese Darstellung nach dem 1. PCR Protokoll. Proben, für die eine Sequenz generiert werden konnte, sind mit dem entsprechenden Namen nach Tabelle 2 und dem Isolationsjahr gekennzeichnet. Die restlichen Proben sind mit ihrer diagnostischen Probennummer bezeichnet.

In dieser Abbildung zeigt sich bei dem ersten Gelbild, dass in den Spalten 1226/16, Farm C/16 und Farm D/16 schwache PCR – Banden sichtbar sind. Die Banden mit der

Beschriftung Farm B/16 und Farm E/16 kann man anhand dieser Abbildung deutlich erkennen. Die Proben der Spalten 1308/16 und Farm F/16 fielen hier negativ aus. Sowohl die eindeutig, also auch die wenig eindeutigen Banden, passen mit einer Länge von etwa 770 bp, gut zu dem erwarteten PCR Fragment.

Bei dem zweiten Gelbild der Abbildung 5 lässt sich nur bei Bande Farm H/17 ein schwach positives Ergebnis auf Höhe von ca. 770 bp erahnen. Sämtliche anderen Proben sind in diesem Fall negativ ausgefallen.

Aufgrund des nicht zufriedenstellenden Ergebnisses wurde daher die erste PCR als Template für eine weitere Amplifikation mittels PCR gemäß dem 2. PCR Protokoll, welches in Tabelle 7 gezeigt wird, benutzt, um die Menge der amplifizierten DNA zu erhöhen bzw. überhaupt erst sichtbar zu machen. Auch mit dieser Methode konnten jedoch nicht alle Proben positiv dargestellt werden.

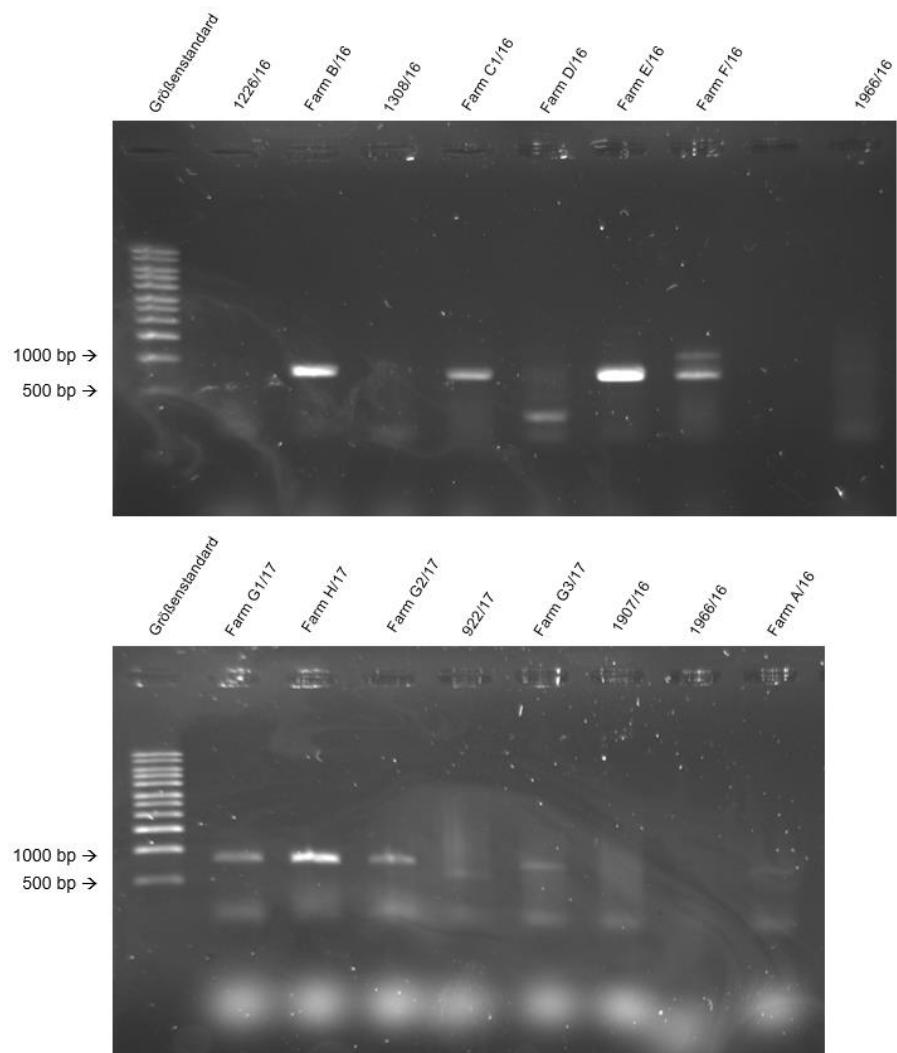


Abbildung 6 Agarose Gel – Elektrophorese Darstellung nach dem 2. PCR Protokoll. Proben, für die eine Sequenz generiert werden konnte, sind mit dem entsprechenden Namen nach Tabelle 2 und dem Isolationsjahr gekennzeichnet. Die restlichen Proben sind mit ihrer diagnostischen Probennummer bezeichnet.

Bei der Abbildung 6 handelt es sich um die Ergebnisse der anschließend durchgeföhrten 2. PCR. Beim ersten Gelbild dieser Abbildung ist eine Bande auf der erwarteten Basenpaarhöhe bei Farm B/16, Farm C/16 und Farm E/16 deutlich erkennbar und zur Sequenzierung verwendbar. Bei den Proben 1226/16, 1308/16 und 1996/16 sind die Banden wieder nicht zufriedenstellend und fielen negativ bzw. extrem schwach positiv aus. Die Bande der Farm D/16 ist deutlich sichtbar, allerdings nicht auf der Höhe der zu erwarteten Basenpaare. Bei der Probe Farm F/16 waren 2 Banden sichtbar, weshalb das Gel noch für weitere 40 Minuten bei 70 V aufgetrennt wurde. Dadurch konnte man im Anschluss eine eindeutige Bande auf der Höhe von ca. 770 bp erkennen.

In dem zweiten Gelbild der Abbildung 6 ist in den Spalten Farm G1/17, Farm H/17, Farm G2/17 und Farm G3/17 eine deutliche Bande auf der entsprechenden Höhe zu erkennen. Die Spalten 922/17, 1907/16, 1966/16 und Farm A/16 zeigen auf diesem Gelbild jedoch erneut keine ausreichend deutliche Bande, um die Proben für die Sequenzierung aufreinigen zu können.

Beim nächsten Versuch wurde nach der reversen Transkription mit dem HiScript II 1st Strand cDNA Synthesis Kit eine PCR gemäß Protokoll 3 durchgeführt. Diese Methode brachte jedoch auch keine zufriedenstellenden Ergebnisse. Da die Gelbilder sich den vorherigen sehr ähneln und keine anderen Proben zusätzlich positiv ausgewertet werden konnten, wird hier auf die Darstellung des Gelbildes verzichtet. Daher wurde in einem weiteren Versuch mit den bisher negativ ausgefallen Proben mit PCR Protokoll 4 eine weitere Amplifikation gestartet.

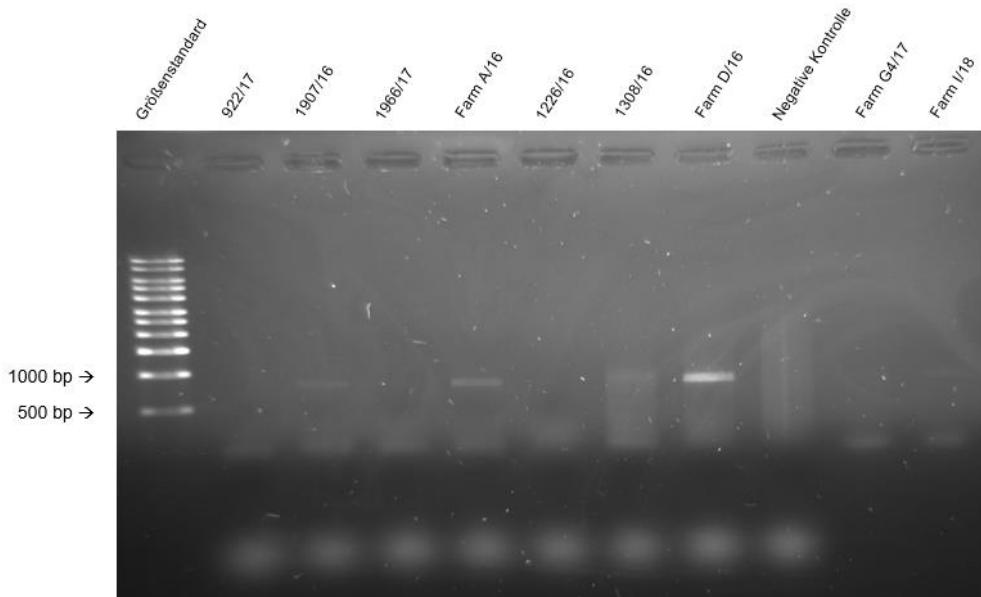


Abbildung 7 Agarose Gel Elektrophorese Darstellung nach dem 4. PCR Protokoll. Proben, für die eine Sequenz generiert werden konnte, sind mit dem entsprechenden Namen nach Tabelle 1 und dem Isolationsjahr gekennzeichnet. Die restlichen Proben sind mit ihrer diagnostischen Probennummer bezeichnet.

Beim Gelbild der Abbildung 7 erkennt man bei Farm A/16 und Farm D/16 eine deutliche Bande, somit konnten diese beiden Proben sequenziert werden. Die Proben, bei denen APPV mit diesen Protokollen nicht erfolgreich nachgewiesen werden konnte, wurden zur weiteren Abklärung an die Labordiagnostik der Virologie der veterinärmedizinischen Universität Wien übergeben. Es konnten dort die zwei Proben aus dem Jahr 2018 (1853 = Farm G/18 und 2375

= Farm I/18) so amplifiziert werden, dass sie für die Sequenzierung verwendet werden konnten.

Die Alignments und phylogenetischen Bäume für diese Arbeit wurden anfangs mit dem CLC Sequence Viewer 8.0 erstellt. Anschließend wurde aufgrund der erweiterten Funktionalität jedoch mit der CLC Main Workbench 8.1.3 weitergearbeitet.

Im ersten Schritt wurden die von der Firma Eurofins erhaltenen Sequenzen in den CLC Viewer eingespielt und aus den Ergebnissen der Sequenzierung mit dem CST 578 eine Konsensus – Sequenz erstellt. Diese Sequenzen wurden sowohl untereinander, als auch mit bereits vorhandenen Sequenzen, die aus der Genbank entnommen wurden, verglichen. Zuerst wurden die erhaltenen Sequenzen mittels der NCBI Nucleotide Blast Website (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) analysiert, um ihre Identität sicherzustellen. Auch ein Vergleich mit den bereits publizierten Sequenzen aus dem Paper „*Congenital infection with atypical porcine pestivirus (APPV) is associated with disease and viral persistence*“ von Schwarz et. al. wurde durchgeführt (GenBank KX77872, KX778726, KX778724, KX778727, KX778728, KX778729, KX778730, KX778731).

3.2 Nukleotididentität

Mittels UGENE wurden sämtliche Sequenzen dieses Versuches, sowie die Sequenzen, die aus der Genbank entnommen wurden, auf ihre Sequenzübereinstimmung untersucht. In der folgenden Tabelle 10 befinden sich somit die Ergebnisse der Nukleotididentität in Bezug auf NS5B Austria KX778731. Alle Sequenzen wiesen für diese Berechnungen eine Länge von 633 bp auf. Diese Länge wurde, wie bereits beschrieben, gewählt, um die Aussagekraft der phylogenetischen Bäume zu verbessern, da nicht alle Sequenzen von Beginn an dieselbe Länge aufwiesen. Nach der Anpassung stellte Farm G3 eine Ausnahme mit einer Länge von nur 375 bp dar.

Tabelle 10 Nukleotididentität

Sequenz	Basenaustausche	Nukleotididentität in %
AT KX778731	0	100
DE LT594521	52	91,7
CN KY475592	54	91,4
USA MK728876.1	54	91,4
USA MF590069.1	66	89,5
KR MF979135	40	93,6
NL KX929062.1	58	90,8
Farm A	39	93,8
Farm B	38	93,9
Farm C1	39	93,8
Farm C2	40	93,6
Farm D	39	93,8
Farm E	40	93,6
Farm F	37	94,1
Farm G1	37	94,1
Farm G2	37	94,1
Farm G3	21	94,4
Farm G4	37	94,1
Farm H	37	94,1
Farm I	64	89,8
Farm J	42	93,3
Farm K	38	93,9
Farm L1	25	96
Farm L2	26	95,8
Farm M1	61	90,3
Farm M2	80	87,3
Wildschwein	32	94,9

3.3 Phylogenie

Mittels der CLC Main Workbench wurden zur graphischen Darstellung der Phylogenie folgender Baum zusammengestellt.

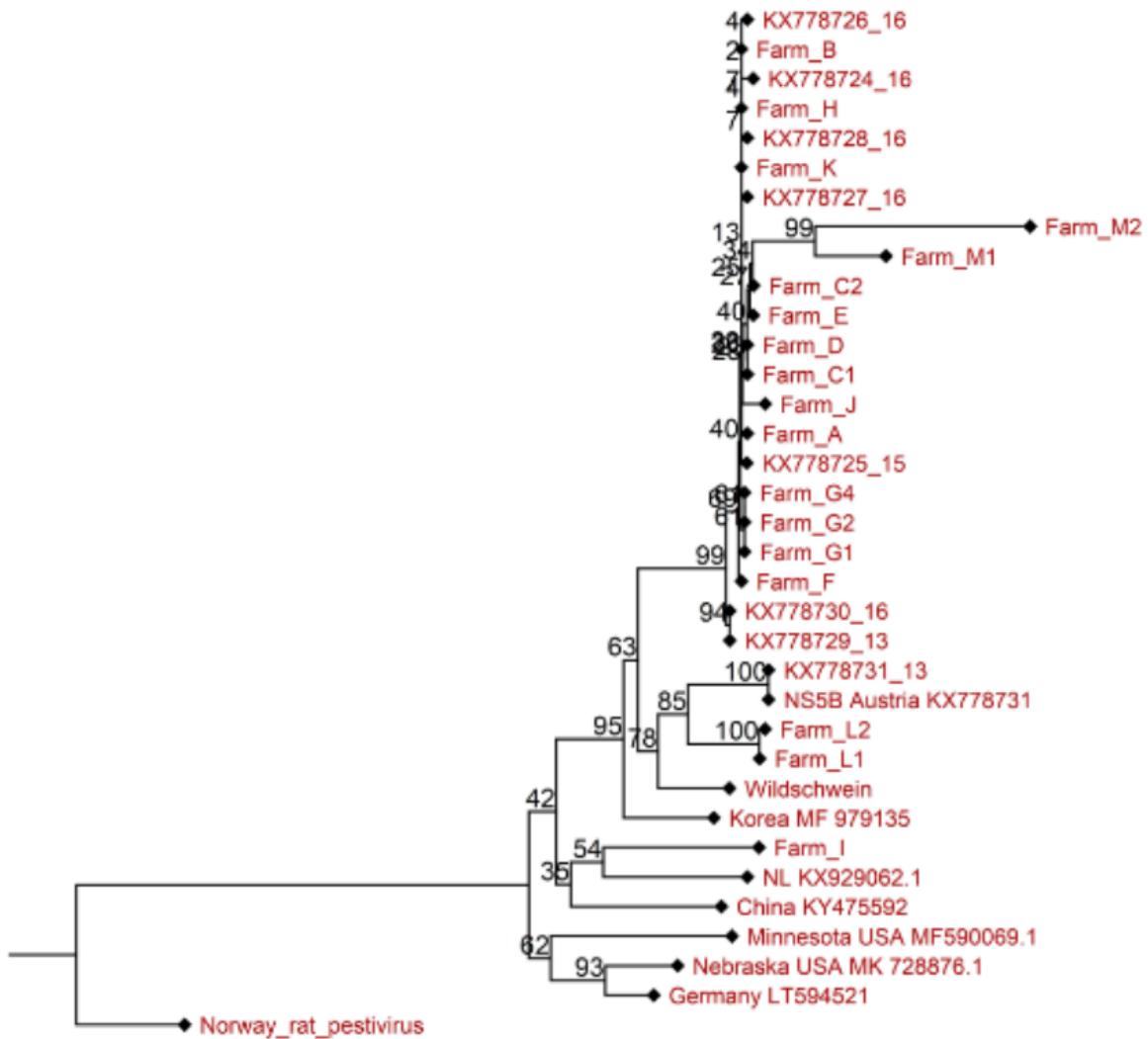


Abbildung 8 Phylogenetische Darstellung der APPV Sequenzen aus Österreich verglichen mit Sequenzen aus Deutschland, Niederlande, Korea, China und USA.

Für diesen Baum wurde ein Phylogramm ausgewählt, dass alle Sequenzen am besten darstellte und so die Übersicht am besten gewährleistet wurde. Da die Sequenz der Farm G3 mit 375 bp deutlich kürzer war, als die anderen Sequenzen, wurde diese Sequenz in diese Darstellung nicht miteinbezogen, um die Phylogenie aufgrund unterschiedlicher Sequenzlängen, nicht zu verfälschen. Als Wurzel wurde zu Darstellungszwecken für diese Abbildung die Sequenz des Rattenpestivirus gewählt. Bei diesem Baum lässt sich erkennen, dass es sich bei APPV in Österreich um ein endemisches Geschehen handelt, da sowohl die Sequenzen dieser Untersuchung, als auch die Sequenzen der Untersuchung von Schwarz et al. nahe bei einander clustern. Verglichen wurden die österreichischen Sequenzen in dieser phylogenetischen Darstellung mit Sequenzen aus Deutschland, Niederlande, Korea, China und USA.

Eine Ausnahme dazu stellen die Farmen L1 und L2 dar sowie ein aus einem Wildschwein stammendes Isolat, welche jedoch immer noch nahe mit der österreichischen Sequenz verwandt ist.

Die größte Abweichung stellt im Diagramm die Farm I dar. Sie ist am nächsten mit der APPV NS5B Sequenz aus den Niederlanden verwandt.

4 Diskussion

In dieser Arbeit wurden Isolate des atypischen porzinen Pestivirus aus österreichischen Schweinebetrieben aus den Jahren 2016 – 2018 auf molekularepidemiologischer Ebene untersucht, um die Hypothese, dass es sich bei den österreichischen Isolaten um eine monophyletische Population handelt, zu verifizieren.

Für diesen Versuch wurden insgesamt 24 Proben aus österreichischen Betrieben, die im Rahmen der Routinediagnostik auf das Institut für Virologie eingeschickt und bereits positiv getestet wurden, ausgewählt. Es gelang allerdings nur bei 20 von 24 RNA Extrakten mittels RT – PCR erneut ein positives Resultat zu erlangen. Eine Probe (Farm G3) konnte zwar sequenziert werden, ihre Sequenz ist allerdings mit nur 375 bp im Vergleich zu der Länge von 633 bp der anderen Proben deutlich kürzer.

Die lange Lagerung bei einer Temperatur von – 80°C oder das wiederholte Frieren und Tauen der Proben könnten einen negativen Einfluss auf die virale RNA in den Proben gehabt haben und zur Degradation der RNA geführt haben. Eventuell war das einer der Gründe, dass initial positiv getestete Proben nicht erneut positiv getestet werden konnten. Ein weiterer Grund könnte außerdem sein, dass die Viruslast in den APPV Proben, wie für Pestiviren nicht unüblich, generell sehr niedrig war und auch als Ursache für die negativen Ergebnisse in Frage kommt. Womöglich wäre es erfolgsversprechender gewesen, wenn anstelle der RNA Extrakte, die RNA erneut aus den Originalproben extrahiert und für die PCR verwendet worden wäre. In den Originalproben befindet sich die virale RNA noch im Viruspartikel in den entsprechenden Geweben und ist daher generell stabiler.

Bisher zeigte sich bei früheren Studien, dass APPV eine hohe genetische Variabilität aufweist, die sich auch innerhalb eines Landes deutlich zeigen kann (Beer et al., 2016). Eventuell könnte das daran liegen, dass in der deutschen Studie NS3 als Vergleichssequenz gewählt wurde. Die regionale genetische Variabilität des APPV, beispielsweise in Deutschland, konnten in dieser Studie nicht bestätigt werden. Auch bei einer Studie aus der Schweiz ergab sich eine große Vielfalt bei der Sequenzierung und der phylogenetischen Analyse (Kaufmann et al., 2019). Eine hohe Ähnlichkeit der APPV Stämme in Europa konnte mittels einer Studie, die in Italien durchgeführt wurde, festgestellt werden (Sozzi et al., 2019).

Die APPV Isolate dieser Diplomarbeit zeigten sich monophyletisch und es handelt sich hierbei um ein endemisches Auftreten in Österreich.

Eine Ausnahme stellt eine Farm dar, deren Isolat am ähnlichsten zu einer APPV – Sequenz aus den Niederlanden ist. Auch beim Vergleich der Nukleotididentität mit der österreichischen NS5B – Sequenz, konnte nur eine Ähnlichkeit von 89 % festgestellt werden. Dies könnte man auf den globalen Handel im Bereich der Tierhaltung zurückführen. Hier spielt vor allem der Tiertransport über Ländergrenzen und der Zukauf von Tieren oder deren Samen aus dem Ausland eine große Rolle (Beer et al., 2016).

Aus einem Betrieb (Farm G) wurden insgesamt vier Proben aus den Jahren 2017 und 2018 in diesen Versuch miteinbezogen. Bei der Beurteilung des Alignments wurden kaum Unterschiede sichtbar und auch im Phylogramm zeigten sie sich deutlich nah beieinander. Somit kann anhand dieser Ergebnisse eine Mutation im Bereich des NS5B Gens, während der letzten zwei Jahre, ausgeschlossen werden.

Mit dieser Diplomarbeit konnte die Hypothese, dass APPV in Österreich monophyletisch ist und es sich um ein endemisches Geschehen handelt, verifiziert werden. Weiters kann durch das endemische Auftreten in Österreich angenommen werden, dass APPV Infektionen in Österreich auf ähnliche Virusstämme zurückzuführen sind. Dies kann sich durch die zunehmenden internationalen Tiertransporte und Zukäufe jedoch stetig verändern, eine zunehmende Genomvariabilität kann somit nicht ausgeschlossen werden und sollte durch laufende Überwachungen mittels weiterer Studien stetig beobachtet werden.

Empfehlenswert wäre es, die folgenden phylogenetischen Untersuchungen an Vollgenomsequenzen durchzuführen, um wirklich die komplette Variabilität der einzelnen Stämme erfassen zu können. Dies war für diese Arbeit allerdings nicht vorgesehen.

5 Zusammenfassung

APPV gilt seit dem Jahre 2017 auch in Österreich als wahrscheinlicher Auslöser der Myoklonia congenita Typ II und weltweit müssen Schweinebetriebe mit den dadurch entstandenen wirtschaftlichen Verlusten kämpfen. Das Vorkommen beschränkt sich nicht nur auf Hausschweine, sondern kann auch bei Wildschweinen beobachtet werden.

Es handelt sich hierbei um ein Pestivirus, welches der Familie der *Flaviviridae* zugeordnet ist. APPV wird oft mit dem umgangssprachlich als ‚Ferkelzittern‘ bezeichneten Krankheitsbild in ätiologischen Zusammenhang gebracht, welches das erste Mal vor 97 Jahren entdeckt wurde. Zu den Hauptsymptomen dieser Krankheit zählt das angeborene Zittern, welches in seiner Intensität in Ruhe abnimmt. Weiters kommt es zu einer schlechten Kolostrumaufnahme, welche sich negativ auf das Immunsystem auswirkt, und zu einer generell eingeschränkten Nahrungsaufnahme. Dieser führt wiederum zu einem schlechten Ernährungszustand der Ferkel. Auch Quetschungen oder andere Verletzungen, die während des Zitterns entstehen, können zum Tod führen. Histologisch lassen sich bei den betroffenen Tieren Veränderungen des Zentralnervensystems, vor allem im Bereich der weißen Substanz des Rückenmarks und des Stammhirns, feststellen.

Für diese Diplomarbeit wurde von 20 bereits positiv getestete APPV – Proben der veterinärmedizinischen Universität Wien zuerst mittel RT – PCR ein Teil der NS5B – kodierenden Region amplifiziert, um diese nach deren Sequenzierung miteinander auf molekularepidemiologischer Ebene zu vergleichen. Dafür wurden zur graphischen Darstellung mittels CLC Main Workbench phylogenetische Bäume erstellt. Die Untersuchung zeigte, dass es sich bei APPV Stämmen aus Österreich primär um eine monophyletische Population handelt. Nur eine Probe aus dem Jahr 2018 war näher mit der Vergleichssequenz aus den Niederlanden, als mit den österreichischen Sequenzen verwandt. Als Ursache wird hier die Globalisierung in der Tierhaltung angenommen.

6 Summary

Since 2017 APPV has been a cause of myoclonia congenita type II and it is a disease of major importance to pigs in Austrian farms. It is also a worldwide disease that leads to economic losses on many pig farms. Not only domestic pigs, but also wild boars can be affected.

APPV is a pestivirus and belongs to the family *Flaviviridae*. The affected pigs are also called “shaking piglets” and this condition was first observed 97 years ago.

The main symptom of APPV is the congenital tremor in newborn piglets, which decreases in intensity at rest. Furthermore, it leads to a poor colostrum uptake, which has a negative effect on the immune system, and a generally restricted food uptake, which leads to a poor nutritional status of the piglets. Squeezing or other injuries that occur during the tremor can also lead to death. Histologically, changes in the central nervous system especially in the white matter of the spinal cord and the brain stem can be observed in the affected animals.

In this diploma thesis 20 APPV positive samples of the Institute of Virology of the University of Veterinary Medicine in Vienna were analyzed. After amplification of parts of the NS5B coding region by PCR the samples were used for further sequence analysis and were compared to each other and to other sequences taken from the Genbank. For graphical representation phylogenetic trees were created.

As a result, it turned out that Austrian APPV strains are, apart from one sample, monophyletic. Only one sample from 2018 was closer to the comparison sequence from the Netherlands probably caused by the globalization in animal husbandry.

7 Literaturverzeichnis

- Arruda, B. L., Arruda, P. H., Magstadt, D. R., Schwartz, K. J., Dohlman, T., Schleining, J. A., Patterson, A. R., Visek, C. A., Victoria, J. G. (2016). Identification of a Divergent Lineage Porcine Pestivirus in Nursing Piglets with Congenital Tremors and Reproduction of Disease following Experimental Inoculation. *PLOS ONE*, 11(2), e0150104.
- B. Smith, D., Meyers, G., Bukh, J., A. Gould, E., Monath, T., Muerhoff, A., Pletnev, A., Rico-Hesse, R., T. Stapleton, J., Simmonds, P., Becher, P. (2017). Proposed revision to the taxonomy of the genus Pestivirus, family Flaviviridae. *Journal of General Virology* 98(8): 2106–2112.
- Beer, M., Wernike, K., Dräger, C., Höper, D., Pohlmann, A., Bergermann, C., Schröder, C., Klinkhammer, S., Blome, S., Hoffmann, B. (2016). High Prevalence of Highly Variable Atypical Porcine Pestiviruses Found in Germany. *Transboundary and Emerging Diseases*, 64(5), 22–26.
- Cagatay, G. N., Antos, A., Meyer, D., Maistrelli, C., Keuling, O., Becher, P., Postel, A. (2018). Frequent infection of wild boar with atypical porcine pestivirus (APPV). *Transboundary and Emerging Diseases*, 65(4), 1087–1093.
- Colom-Cadena, A., Ganges L., Munoz-Gonzales, S., Castillo-Contreras, R., Bohorques, J., Rosell, R., Segales, J., Marco, I., Cabezon, O. (2018). Atypical porcine pestivirus in wild boar (*Sus scrofa*), Spain. *The Veterinary Record*, 183(18), 569
- de Groot, A., Deijs, M., Guelen, L., van Grinsven, L., van Os-Galdos, L., Vogels, W., Derkx, C., Cruijsen, T., Geurts, V., Vrijenhoek, M., Suijskens, J., van Doorn, P., van Leengoed, L., Schrier, C., van der Hoek, L. (2016). Atypical Porcine Pestivirus: A Possible Cause of Congenital Tremor Type A-II in Newborn Piglets. *Viruses*, 8(10), 271

- Firth, C., Bhat, M., Firth, M. A., Williams, S. H., Frye, M. J., Simmonds, P., Conte, J. M., Ng, J., Garcia, J., Bhuva, N. P., Lee, B., Che, X., Quan, P.-L., Lipkin, W. I. (2014). Detection of Zoonotic Pathogens and Characterization of Novel Viruses Carried by Commensal *Rattus norvegicus* in New York City. *MBio*, 5(5), 2150–7511
- Gatto, I. R. H., Sonálio, K., de Oliveira, L. G. (2019). Atypical Porcine Pestivirus (APPV) as a New Species of Pestivirus in Pig Production. *Frontiers in Veterinary Science*, 6, 35
- Hause, B. M., Collin, E. A., Peddireddi, L., Yuan, F., Chen, Z., Hesse, R. A., Gauger, P. C., Clement, T., Fang, Y., Anderson, G. (2015). Discovery of a novel putative atypical porcine pestivirus in pigs in the USA. *Journal of General Virology*, 96(10), 2994–2998.
- Jansohn, M., Rothhämel, S. (2012). Gentechnische Methoden: Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor. fünfte Aufl. Springer-Verlag, 135–145
- Jo, W. K., Cornelius van Elk, Marco van de Bildt, Peter van Run, Monique Petry, Sonja T. Jesse, Klaus Jung, Martin Ludlow, Thijs Kuiken, Albert Osterhaus. (2019). An evolutionary divergent pestivirus lacking the Npro gene systemically infects a whale species. *Emerg Microbes Infect* 8(1): 1383–1392.
- Kaufmann, C., Stalder, H., Sidler, X., Renzullo, S., Gurtner, C., Grahofer, A., Schweizer, M. (2019). Long-Term Circulation of Atypical Porcine Pestivirus (APPV) within Switzerland. *Viruses*, 11(7), 653
- Kinsley, A. (1922). Dancing pigs. *Vet Med* 17, 123.
- Kirkland, P. D., Frost, M. J., Finlaison, D. S., King, K. R., Ridpath, J. F., Gu, X. (2007). Identification of a novel virus in pigs—Bungowannah virus: A possible new species of pestivirus. *Virus Research*, 129(1), 26–34.

Lamp, B., Schwarz, L., Höglér, S., Riedel, C., Sinn, L., Rebel-Bauer, B., Weissenböck, H., Ladinig, A., Rümenapf, T. (2017). Novel Pestivirus Species in Pigs. *Journal of Virology* 87(21), 11872–11883

Liu, J., Li, Z., Ren, X., Li, H., Lu, R., Zhang, Y., Ning, Z. (2019). Viral load and histological distribution of atypical porcine pestivirus in different tissues of naturally infected piglets. *Archives of Virology*, 164(10), 2519–2523

Moennig, V., Floegel-Niesmann, G., Greiser-Wilke, I. (2003). Clinical signs and epidemiology of classical swine fever: A review of new knowledge. *Veterinary Journal*, 165(1), 11–20.

Mósena, A. C. S., Weber, M. N., Cruz, R. A. S. da, Cibulski, S. P., Silva, M. S. da, Puhl, D. E., Hammerschmitt, M. E., Takeuti, K. L., Driemeier, D., Barcellos, D. E. S. N. de, Canal, C. W. (2018). Presence of atypical porcine pestivirus (APPV) in Brazilian pigs. *Transboundary and Emerging Diseases*, 65(1), 22–26.

Pan, S., Mou, C., Chen, Z. (2019). An emerging novel virus: Atypical porcine pestivirus (APPV). *Reviews in Medical Virology*, 29(1), e2018.

Postel, A., Becher, P., Haas, L., Wendt, M. (2018). Das neu entdeckte „atypische porzine Pestivirus“ (APPV): Ein alter Akteur im „Zitterferkelkrankheit“-Komplex? *Tierärztliche Praxis Ausgabe G: Großtiere / Nutztiere*, 46(04), 261–270.

Postel, A., Hansmann, F., Baechlein, C., Fischer, N., Alawi, M., Grundhoff, A., Derking, S., Tenhündfeld, J., Pfankuche, V. M., Herder, V., Baumgärtner, W., Wendt, M., Becher, P. (2016). Presence of atypical porcine pestivirus (APPV) genomes in newborn piglets correlates with congenital tremor. *Scientific Reports*, 6, 27735.

Postel, A., Meyer, D., Cagatay, G. N., Feliziani, F., De Mia, G. M., Fischer, N., Grundhoff, A., Milićević, V., Deng, M.-C., Chang, C.-Y., Qiu, H.-J., Sun, Y., Wendt, M., Becher, P.

- (2017). High Abundance and Genetic Variability of Atypical Porcine Pestivirus in Pigs from Europe and Asia. *Emerging Infectious Diseases*, 23(12), 2104–2107.
- R. Schneider et. al. (1993). Identification of a structural glycoprotein of an RNA virus as a ribonuclease. *Science* 261, 1169–1171
- Ronecker, S., Zimmer, G., Herrler, G., Greiser-Wilke, I., Grummer, B. (2008). Formation of bovine viral diarrhea virus E1-E2 heterodimers is essential for virus entry and depends on charged residues in the transmembrane domains. *Journal of General Virology*, 89(9), 2114–2121.
- Schwarz, L., Riedel, C., Höglér, S., Sinn, L. J., Voglmayr, T., Wöchtl, B., Dinhopl, N., Rebel-Bauder, B., Weissenböck, H., Ladwig, A., Rümenapf, T., Lamp, B. (2017). Congenital infection with atypical porcine pestivirus (APPV) is associated with disease and viral persistence. *Veterinary Research*, 48(1), 1.
- Simmonds, P., Becher, P., Bukh, J., Gould, E. A., Meyers, G., Monath, T., Muerhoff, S., Pletnev, A., Rico-Hesse, R., Smith, D. B., Stapleton, J. T., ICTV Report Consortium. (2017). ICTV Virus Taxonomy Profile: Flaviviridae. *Journal of General Virology*, 98(1), 2–3.
- Sozzi, E., Salogni, C., Lelli, D. (2019). Molecular Survey and Phylogenetic Analysis of Atypical Porcine Pestivirus (APPV) Identified in Swine and Wild Boar from Northern Italy. *Viruses*, 11(12), 1142
- Tao, J., Liao, J., Wang, Y., Zhang, X., Wang, J., Zhu, G. (2013). Bovine viral diarrhea virus (BVDV) infections in pigs. *Veterinary Microbiology*, 165(3–4), 185–189.
- Tautz, N., Tews, B. A., Meyers, G. (2015). The Molecular Biology of Pestiviruses. *Advances in Virus Research*, 93, 47–160.

- Wu, Z., Ren, X., Yang, L., Hu, Y., Yang, J., He, G., Zhang, J., Dong, J., Sun, L., Du, J., Liu, L., Xue, Y., Wang, J., Yang, F., Zhang, S., Jin, Q. (2012). Virome Analysis for Identification of Novel Mammalian Viruses in Bat Species from Chinese Provinces. *Journal of Virology*, 86(20), 10999–11012.
- Zhang, H., Wen, W., Hao, G., Chen, H., Qian, P., Li, X. (2018). A Subunit Vaccine Based on E2 Protein of Atypical Porcine Pestivirus Induces Th2-type Immune Response in Mice. *Viruses*, 10(12), 673
- Zhang, K., Liu, J., Wu, K., Ge, S., Xiao, Y., Shang, Y., Ning, Z. (2017). Identification of atypical porcine pestivirus infection in swine herds in China. *Transboundary and Emerging Diseases*, 64(4), 1020–1023
- Zimmermann, J. (2019). Diseases of swine. Elfte Aufl. Wiley Blackwell Verlag, 622–633.

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Phylogenetischer Baum der Pestiviren entnommen aus dem Paper "Proposed revision to the taxonomy of the genus Pestivirus, family Flaviviridae"	4
Abbildung 2: Polyprotein von APPV entnommen aus dem Paper „An emerging novel virus: Atypical porcine pestivirus (APPV)“ (Pan et al., 2019).....	6
Abbildung 3: Histologische Läsionen von Ferkel mit CT Symptomen im Vergleich zu gesunden Tieren im selben Wurf und zu einem Kontrolltier. Abbildung modifiziert aus Schwarz et al., 2017; der Größenbalken in A-C entspricht 150µm, in D-F 40µm.....	8
Abbildung 4: Anteil der serologischen und direkten Nachweise von APPV in Schweinen aus Europa und Asien (Postel et al., 2017).....	10
Abbildung 5: Agarose Gel – Elektrophorese Darstellung nach dem 1. PCR Protokoll. Proben, für die eine Sequenz generiert werden konnte, sind mit dem entsprechenden Namen nach Tabelle 2 und dem Isolationsjahr gekennzeichnet. Die restlichen Proben sind mit ihrer diagnostischen Probennummer bezeichnet.	22
Abbildung 6: Agarose Gel – Elektrophorese Darstellung nach dem 2. PCR Protokoll. . Proben, für die eine Sequenz generiert werden konnte, sind mit dem entsprechenden Namen nach Tabelle 2 und dem Isolationsjahr gekennzeichnet. Die restlichen Proben sind mit ihrer diagnostischen Probennummer bezeichnet.	24
Abbildung 7: Agarose Gel Elektrophorese Darstellung nach dem 4. PCR Protokoll. Proben, für die eine Sequenz generiert werden konnte, sind mit dem entsprechenden Namen nach Tabelle 1 und dem Isolationsjahr gekennzeichnet. Die restlichen Proben sind mit ihrer diagnostischen Probennummer bezeichnet.	25
Abbildung 8: Phylogenetische Darstellung der APPV Sequenzen aus Österreich verglichen mit Sequenzen aus Deutschland, Niederlande, Korea, China und USA.	28

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Nomenklatur der Mitglieder der Gattung Pestivirus (B. Smith et. al., 2017).....	3
Tabelle 2: verwendete Proben für Sequenzierung	12
Tabelle 3: Verwendete Sequenzen der Genbank.....	13
Tabelle 4: verwendete Primer	13
Tabelle 5: PCR – Protokoll 1	15
Tabelle 6: Einstellung des Thermocyclers.....	16
Tabelle 7: PCR – Protokoll 2.....	16
Tabelle 8: PCR – Protokoll 3.....	17
Tabelle 9: PCR – Protokoll 4	17
Tabelle 10: Nukleotididentität.....	27

