

Aus dem Department für Pathobiologie
der Veterinärmedizinischen Universität Wien

Institut für Virologie
(Leitung: Univ. Prof. Dr. med. vet. Till Rümenapf)

Etablierung einer PCV2- und PCV3-Duplex-qPCR und Prävalenz von PCV3 in Österreich

Diplomarbeit

Veterinärmedizinische Universität Wien

vorgelegt von

Julia Kuczera

Wien, im September 2022

Betreuung:

Dr. med. vet. Angelika Auer

und

Univ. Prof. Dr. med. vet. Till Rümenapf

Institut für Virologie

Department für Pathobiologie

Veterinärmedizinische Universität Wien

Gutachter:

Dr. med. vet. Lukas Schwarz

Universitätsklinik für Schweine

Department/Universitätsklinik für Nutztiere und öffentliches

Gesundheitswesen in der Veterinärmedizin

Veterinärmedizinische Universität Wien

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1.	<i>Geschichte</i>	<i>1</i>
1.2.	<i>Das Virus</i>	<i>1</i>
1.3.	<i>Epidemiologie.....</i>	<i>2</i>
1.4.	<i>Klinik und Befunde</i>	<i>3</i>
1.4.1.	<i>PCV2-subklinische Infektion</i>	<i>3</i>
1.4.2.	<i>PCV2-assoziierte systemische Erkrankung</i>	<i>4</i>
1.4.3.	<i>PCV2-assoziierte respiratorische Erkrankung</i>	<i>4</i>
1.4.4.	<i>PCV2-assoziierte Enteritis</i>	<i>5</i>
1.4.5.	<i>PCV2-assoziierte Reproduktionsstörungen.....</i>	<i>5</i>
1.4.6.	<i>Porzines Dermatitis und Nephropathie Syndrom (PDNS).....</i>	<i>5</i>
1.4.7.	<i>PCV2-assoziierte neurologische Erkrankung</i>	<i>6</i>
1.4.8.	<i>Pathogenese</i>	<i>6</i>
1.5.	<i>Auftreten neuer genetischer Variationen – PCV3 und PCV4</i>	<i>6</i>
1.6.	<i>Prophylaxe</i>	<i>7</i>
1.7.	<i>Diagnostik</i>	<i>8</i>
1.7.1.	<i>In situ-Hybridisierung.....</i>	<i>8</i>
1.7.2.	<i>Immunhistochemie.....</i>	<i>9</i>
1.7.3.	<i>ELISA</i>	Fehler! Textmarke nicht definiert.
1.7.4.	<i>PCR und qPCR.....</i>	<i>10</i>
2.	Ziel der Arbeit	13
3.	Material und Methoden	14
3.1.	<i>Validierung der Sonden in der PCV2-Monoplex-qPCR</i>	<i>15</i>
3.2.	<i>Validierung des Standards und der Sonden in der PCV3-Monoplex-qPCR.....</i>	<i>16</i>
3.3.	<i>Validierung der neuen PCV2 und PCV3-Duplex-qPCR.....</i>	<i>16</i>
3.4.	<i>Duplex-qPCR in der Standarddiagnostik.....</i>	<i>16</i>
3.4.1.	<i>Retrospektive Studie</i>	<i>17</i>
3.4.2.	<i>Ferkelorgane aus einem PCV3-Fall</i>	<i>19</i>
4.	Ergebnisse	21
4.1.	<i>Validierung der PCV2-Monoplex-qPCR.....</i>	<i>21</i>
4.2.	<i>Validierung der Sonden und des Standards in der PCV3-Monoplex-qPCR.....</i>	<i>23</i>
4.3.	<i>Validierung der neuen PCV2 und PCV3 Duplex-qPCR</i>	<i>25</i>
4.4.	<i>PCV2 und PCV3-Duplex-qPCR in der Standarddiagnostik</i>	<i>30</i>

4.4.1. Retrospektive Studie	30
4.4.2. Ferkelorgane aus einem PCV3-Fall	33
5. Diskussion	39
6. Zusammenfassung	42
7. Abstract	43
8. Literaturverzeichnis.....	44

1. Einleitung

1.1. Geschichte

Das porcine Circovirus konnte 1974 zum ersten Mal in porcinen Nierenzelllinien isoliert werden. Dieses als Porzines Circovirus 1 (PCV1) bezeichnete Virus galt lange Zeit als apathogen. 1997 wurde ein abweichender Stamm, das Porzine Circovirus 2 (PCV2), aus Schweinen isoliert, welche an der sogenannten wasting disease litten (1). Das PCV2 ist das Hauptpathogen der Porzinen Circovirus-Erkrankungen. Die weltweit hohen Ausfälle in der Schweineproduktion verdeutlichen die Relevanz dieses Virus in der Tiermedizin. Sie präsentieren sich klinisch in verschiedenen Organsystemen. Das Virus führt zu einer starken Einschränkung der Funktion des lymphatischen Systems und löst dadurch eine Verminderung der Immunkompetenz aus. Als Folge daraus spielen in der PCV-Problematik Koinfektionen (z.B. mit dem Porzinen Respiratorischen und Reproduktiven Syndrom Virus (PRRSV) oder *Mycoplasma hyopneumoniae*) eine sehr wichtige Rolle. Die PCV2-assoziierten Erkrankungen können sich in verschiedenen Organsystemen manifestieren und so verschiedene Symptomkomplexe aufweisen. Heute werden die verschiedenen Krankheitsbilder unterteilt in: PCV2-subklinische Erkrankung, PCV2-systemische Erkrankung (Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome), PCV2-assoziierte respiratorische Erkrankung, PCV2-assoziierte Enteritis, PCV2-assoziierte Reproduktionsstörung, Porzines-Dermatitis-und-Nephropathie-Syndrom und PCV2-assoziierte neurologische Erkrankung (2).

Als neue Variationen wurden 2016 in den USA das Porzine Circovirus 3 (PCV3) bei Schweinen mit PDNS und Reproduktionsstörungen (3) und 2019 in China das Porzine Circovirus 4 (PCV4) bei Schweinen mit unterschiedlichen Gesundheitszuständen entdeckt (4).

1.2. Das Virus

Das porcine Circovirus gehört zur Familie der Circoviridae und hier zur Gattung der Circoviren. Bei den Circoviridae handelt es sich um unbehüllte, einzelsträngige DNA-Viren. Virionen zeigen eine icosahedrale Symmetrie mit 60 Untereinheiten, die sich aus 12 pentameren morphologischen Elementen zusammensetzen. Die Größe beträgt im Durchmesser nur 15-25 nm. Das Genom dieses Virus stellt sich als einzelnes ringförmiges DNA-Molekül dar, welches

aus 1,7-2,5 kb besteht. Die Replikation findet nach der „Rolling Circle“-Methode als doppelsträngige DNA im Zellkern statt (5).

Figur a der Abbildung 1 zeigt eine Rekonstruktion eines PCV2 Virions im Kryo-Elektronenmikroskop. In Figur b ist eine Aufnahme des PCV2 in einem negativkontrastierten Transmissionselektronenmikroskop zu sehen.

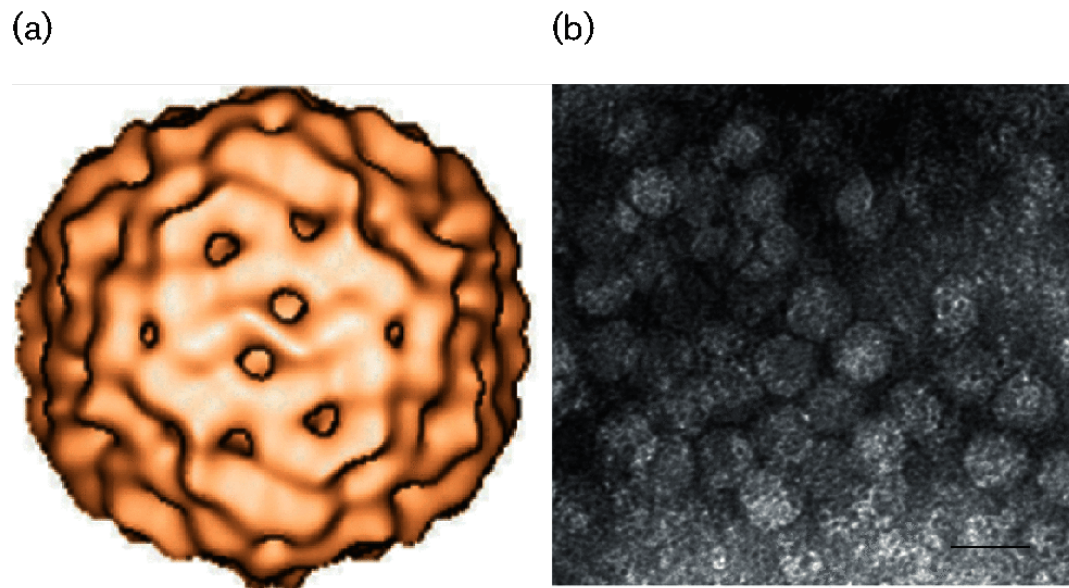


Abbildung 1: a) Rekonstruktion eines PCV2 Virions nach Kryo-Elektronenmikroskopie. b) Negativkontrastierte Transmissionselektronenmikroskopieaufnahme (Maßstab 20nm) (5)

Anhand von Sequenzierungen von Virusisolaten können verschiedene Genotypen differenziert werden, die sich in ihrer Nukleinsäuresequenz unterscheiden und zeigen, dass sich das Virus entwickelt. Von PCV2 sind derzeit acht verschiedene Genotypen (PCV2a, PCV2b, PCV2c, PCV2d, PCV2e, PCV2f, PCV2g und PCV2h) bekannt, von denen aber nur drei (PCV2a, PCV2b und PCV2d) weltweit verbreitet sind. Die anderen Genotypen treten sporadisch auf. Ihre klinische Relevanz ist unbekannt (6). Von PCV3 sind derzeit 3 verschiedene Genotypen bekannt (PCV3a, PCV3b und PCV3c) (7).

1.3. Epidemiologie

Das Porzine Circovirus 2 ist ein global in Schweinebeständen verbreitetes Virus. Es ist sehr widerstandsfähig in der Umwelt, was die Desinfektion erschwert. Das Virus wird in großen Mengen im Kot ausgeschieden. Die Hauptübertragung erfolgt somit fäkal-oral. Verbreitet wird

das Virus sowohl über infizierte Tiere, als auch über belebte und unbelebte Vektoren wie Insekten, Menschen, Fahrzeuge, Gerätschaften oder kontaminiertes Futter (2). Das Virus kann sowohl im lymphatischen System als auch im Respirations-, im Urogenital- und im Gastrointestinaltrakt nachgewiesen werden. Man geht man davon aus, dass eine Übertragung daher über sämtliche Sekrete und Exkrete erfolgen kann. Aber auch eine transplazentare Übertragung ist möglich (8). Die Morbidität und die Mortalität hängt von der klinischen Erscheinungsform ab. Die PCV2-assoziierte systemische Erkrankung beispielsweise zeigt sich ab der fünften bis siebten Lebenswoche, die Morbidität kann sehr unterschiedlich sein und zwischen 4–60 % liegen. Die Mortalität schwankt zwischen 5–20 % (9).

1.4. Klinik und Befunde

PCV2 ist der klinisch relevanteste Erreger unter den bisher beim Schwein bekannten Circoviren. Eine Erkrankung mit PCV2 verläuft überwiegend chronisch und äußert sich durch verzögertes Wachstum, schlechte Futterverwertung und erhöhte Krankheitsanfälligkeit. Beim akuten Verlauf zeigen die Tiere deutliche und oft schwere klinische Symptome, die mit einer hohen Zahl an Todesfällen einhergehen können. Die Ausprägung der Symptome hängt vom betroffenen Organsystem ab. Pathohistologisch sind im klinisch betroffenen Gewebe immer eine Lymphozytopenie beziehungsweise Lymphozytendepletion (somit der Verlust des lymphatischen Gewebes) und Histiozytose zu finden, die eine Immunsuppression zur Folge haben. (10,11). PCV2 Infektionen können sich in unterschiedlichen Organsystemen manifestieren und so verschiedene Krankheitsbilder präsentieren. Im Folgenden wird auf die wichtigsten Krankheitsbilder genauer eingegangen.

1.4.1. PCV2-subklinische Infektion

Bei einer subklinischen Infektion fehlen klinische Symptome. Verminderte Futterverwertungsraten und damit verbundene geringere Zunahmen beim Tier sind zu beobachten. Dies kann zu hohen wirtschaftlich bedeutsamen Einbußen in der Schweineproduktion führen. Nach der Einführung von Impfstoffen und Impfkonzentrat machten Leistungssteigerungen in Form von höheren Futterverwertungsraten, höheren Zunahmen und geringeren Verlusten die Relevanz der subklinischen Infektion deutlich (12,13).

1.4.2. PCV2-assoziierte systemische Erkrankung

Das Post-Weaning-Multisystemic-Wasting-Syndrom (PMWS) beschreibt ein Kümern nach dem Absetzen der Ferkel durch Erkrankung mehrerer Organsysteme. Die Tiere fallen vor allem durch Abmagern und hochgradig vergrößerte Lymphknoten auf. Häufig treten Augen- und Nasenausfluss, Husten und verschärfte vesikuläre Atemgeräusche auf. Auch ein Ikterus als Hinweis auf einen Leberschaden und gastrointestinale Störungen kann vorkommen. In der Pathologie fallen eine schlecht retrahierte Lunge mit bräunlichen Flecken, weiße Flecken im Bereich der Nierenrinde und eine verfärbte Leber mit leicht rauer Oberfläche auf. Pathohistologisch zeigt sich eine mittel- bis hochgradige Lymphozytendepletion mit granulomatöser Entzündung des Lymphgewebes und gegebenenfalls traubenförmige intrazytoplasmatische Einschlusskörperchen. Des Weiteren ist eine lymphohistiozytäre bis granulomatöse interstitielle Pneumonie und gering- bis hochgradige nekrotisierende Bronchiolitis und Pneumonie erkennbar. Weiter kann es zu interstitieller Nephritis, lymphozytärer Hepatitis, granulomatöser Enteritis und weiteren lymphohistiozytären Entzündungen in anderen Organen kommen (8,14,15).

1.4.3. PCV2-assoziierte respiratorische Erkrankung

Beschränkt sich das Bild auf die unteren Atemwege kommt es in erster Linie zu respiratorischen Symptomen wie Atemnot und Husten. Fieber, Lethargie und Anorexie können darüber hinaus auftreten. Für gewöhnlich ist eine proliferative und nekrotisierende Pneumonie der Auslöser der Symptome. An diesem Krankheitsbild, welches auch als Porcine-Respiratory-Disease-Complex bezeichnet wird, spielen Koinfektionen eine große Rolle. Zumeist sind andere Erreger wie das Porcine Reproductive und Respiratorische Syndrom Virus, Influenza A Virus und *Mycoplasma hyopneumoniae* beteiligt. Pathoanatomisch kann eine schlecht retrahierte Lunge mit bräunlichen Flecken auftreten. Pathohistologisch zeigt sich eine granulomatöse bronchio-interstitielle Pneumonie mit oder ohne Bronchiolitis und bronchiolärer Fibrose. Folge kann eine Nekrose der Pneumozyten Typ I und einer Proliferation der Pneumozyten Typ II sein. Die typischen Läsionen im Lymphgewebe wie sie bei der systemischen Erkrankung vorkommen fehlen dagegen (16–18).

1.4.4. PCV2-assoziierte Enteritis

Das PCV2 gilt als mögliche Ursache für Enteritis beim Ferkel und somit als Durchfallerreger. Kommt es zu einer katarrhalischen Enteritis, sind in der pathologischen Untersuchung in der Regel Ödeme im Mesenterium, eine verdickte Darmschleimhaut und vergrößerte mesenteriale Lymphknoten nachweisbar. Pathohistologisch ergibt sich eine granulomatöse Enteritis. Als auffälligste Läsion zeigen die Peyerschen Platten eine granulomatöse Entzündung mit Lymphozytendepletion, Makrophageninfiltration und mehrkernigen Riesenzellen (11,19).

1.4.5. PCV2-assoziierte Reproduktionsstörungen

Manifestiert sich das PCV2 im Reproduktionssystem kann es einerseits in der Hochträchtigkeit zu Aborten, Totgeburten und mumifizierten sowie ödemisierten Feten kommen, andererseits aber auch zu regelmäßigem Umrauschen bei Zuchtsauen. Die intrauterine Infektion der Föten spielt eine große Rolle. Unter anderem kann infiziertes Sperma hier die Ursache sein. Werden die Feten einer Sektion unterzogen ist eine hypertrophe hyperämische Leber und ein hypertrophiertes fetales Herz mit multifokalen Verfärbungen des Myokards zu finden. Pathohistologisch zeigt sich eine nicht-eitrige bis nekrotisierende oder fibrosierende Myokarditis (20–22).

1.4.6. Porzines Dermatitis und Nephropathie Syndrom (PDNS)

Das Porzine Dermatitis und Nephropathie Syndrom zeichnet sich in der Klinik durch unregelmäßige dunkelrot-violette Papeln und Makulae auf der Haut. Subkutane Blutungen und Ödeme treten besonders an den Hintergliedmaßen und in der Perinealgegend auf und können sich auf den ganzen Körper ausweiten. In der pathologischen Untersuchung zeigen sich vergrößerte Lymphknoten sowie beidseits vergrößerte Nieren mit kortikalen Petechien und Ödembildung am Nierenbecken. Die Pathohistologie beschreibt systemische nekrotisierende Vaskulitis. In den Nieren ergibt sich eine fibrös-nekrotisierende Glomerulitis mit nicht-eitriger interstitieller Nephritis. Überleben die Tiere die akute Phase, entwickelt sich dieses Bild zu einer chronischen Form mit Glomerulosklerose. Im Lymphgewebe kann sich eine gering- bis mittelgradige Lymphozytendepletion mit granulomatöser Entzündung zeigen (23–25). Da das klinische Bild auch der Symptomatik der Schweinepest ähnelt, sollte immer ein Ausschluss dieser Erkrankung durch geeignete Diagnostik vorgenommen werden (10).

1.4.7. PCV2-assoziierte neurologische Erkrankung

Das porcine Circovirus 2 kann mit neurologischen Symptomen, insbesondere dem kongenitalen Tremor in Zusammenhang gebracht werden. Dabei zeigten sich neurovaskuläre Störungen mit akuten Hämorrhagien und Ödemen der zerebellären Meningen und des Parenchyms, die durch nekrotisierende Vaskulitis hervorgerufen wurden und zur Degeneration und Nekrose der grauen und weißen Substanz geführt hat. Pathohistologisch konnten apoptotische endotheliale Zellen und virale DNA nachgewiesen werden (26,27).

1.4.8. Pathogenese

Hat das Virus ein Individuum befallen, persistiert es im lymphatischen System, besiedelt hier vor allem Makrophagen und Lymphozyten und bleibt vom Immunsystem in der Regel unentdeckt. Der Ausbruch einer PCV2 assoziierten Erkrankung kann mit einem Auslöser wie einer Sekundärinfektion, beispielsweise dem Porzinen Reproduktiven und Respiratorischen Syndrom Virus, Influenza A Virus, *Mycoplasma hyopneumoniae* oder *Actinobacillus pleuropneumoniae* einhergehen. Anderen Ursachen wie Stress, wachsender Infektionsdruck oder mangelnde Bestandshygiene können ebenfalls Auslöser sein. Findet aufgrund einer Infektion die Replikation der Immunzellen statt, führt dies gleichzeitig zur Vermehrung des Virus. Dieses repliziert sich innerhalb der Lymphozyten und führt letztendlich zur Zelllyse und folglich zur Virusfreisetzung. Durch die Zerstörung der Lymphozyten werden Zytokinen freigesetzt, die eine Makrophageneinwanderung und -vermehrung in das Gewebe stimulieren. Als Resultat dieser hochgradigen Histiozytose kann es zu einem Funktionsverlust der betroffenen Organe kommen. Das zerstörte lymphatische System bewirkt eine Immunsuppression und ebnet den Weg für Sekundärerreger (11).

1.5. Auftreten neuer genetischer Variationen – PCV3 und PCV4

Wie in Kapitel 1.1 erwähnt, wurde im Jahr 2016 in den USA in Sauen mit PDNS-ähnlichen Symptomen und Reproduktionsstörungen, die negativ auf PCV2 getestet wurden, erstmals PCV3 entdeckt (3). Eine Sequenzierung zeigte, dass sich dieses Virus vom Porzinen Circovirus 1 und 2 unterscheidet. Anhand der genetischen Analyse stellte sich heraus, dass PCV3 nur zu 31–48 % mit PCV1 und PCV2 homolog ist. Es ist mit dem Caninen Circovirus näher verwandt

als mit den Porzinen Circoviren PCV1 und PCV2. Insgesamt zeigt PCV3 mit allen verwandten Circoviridae nicht mehr als 70 % Übereinstimmung und ist deshalb als neue Spezies anerkannt worden (3,28). Seitdem wurde das neuartige PCV3 in verschiedenen Ländern weltweit nachgewiesen, unter anderem Japan (29), Schweden (28) , Russland (30), Brasilien (31), Spanien und Dänemark (32) und Italien (33). Virus-DNA konnte bisher in fast allen Geweben detektiert werden und macht genau wie das PCV2 sowohl eine horizontale als auch eine vertikale Übertragung möglich (32). Außerdem kann PCV3 wie PCV2 nahezu alle typischen Krankheitsbilder einer porcinen Circovirose hervorrufen, wenn PCV2 selbst durch eine PCR nicht nachweisbar ist (3,34). Besonders hohe Prävalenzen wurden in mumifizierten Föten gefunden, was indiziert, dass PCV3 als Pathogen zu Reproduktionsstörungen und speziell zu mumifizierten Föten führt (3,35). Das Virus konnte bisher sowohl in neugeborenen Ferkeln, in adulten Tieren (36), sowie in gesunden Tieren in Schlachthöfen nachgewiesen werden (37). Auch eruierten Studien, dass PCV3 positive Proben, ähnlich wie PCV2, hohe Koinfektionsraten haben. Die Koinfektionen von PCV3 mit PCV2 können bis zu 70% hoch sein (38). Es werden Koinfektionen von PCV2 mit PRRSV bis zu 85 % (39), PCV3 mit PRRSV bis zu 25 % (7) oder PCV2 und PCV 3 bis 70% (38) beschrieben. Verschiedene Studien fanden heraus, dass das PCV3 andere Tierarten wie Rinder, Mäuse, Zecken, Wildschweine und Rehe infizieren kann. Sogar in Primaten konnte das Virus isoliert werden (40,41). Das PCV3 hat weltweit sehr viel Aufmerksamkeit auf sich gezogen. Seine Prävalenz ist in den Schweinepopulationen global niedrig bis moderat, daher spielt es in der Forschung eine große Rolle. Dennoch wurde seine Rolle als ein pathogenes Virus lange kontrovers diskutiert (42). In einer Studie wurden vier und acht Wochen alte spezifisch-pathogenfreie (SPF) Ferkel intranasal mit PCV3 infiziert um die klinischen Symptome zu evaluieren. Diese traten ab Tag 8 post infectionem auf und begannen mit Anorexie, Husten, Niesen und Durchfall. Dazu kamen später erhöhte Atemfrequenzen, Lethargie, Hautveränderungen wie multifokale Papeln und oberflächliche Dermatitis. Einige Ferkel verstarben. In der Pathologie zeigten sich Pneumonien, hyperplastische Lymphknoten, Hepatitis, Nephritis und Splenitis und weiters typische histopathologische Läsionen, wie sie auch PCV2 verursacht. Damit ist die Pathogenität des Virus bestätigt (43).

1.6. Prophylaxe

Zur Immunprophylaxe kann eine Impfung neben konsequenter Bestandshygiene den Infektionsdruck senken, zu einer Vermeidung von Ausbrüchen beitragen und die Dauer der Virämie herabsetzen. Außerdem kann die Ausprägung der Symptome und deren Folgen

vermindert werden. Die Entwicklung anderer multifaktorieller Erkrankungen, an denen das Virus mitbeteiligt ist, kann reduziert werden (11). Der Effekt von Impfungen zeigt sich in einer Erhöhung der Leistungsfähigkeit wie verbesserte Tageszunahmen, geringere Verluste, verbesserter Futterverwertung und reduziertem Antibiotikaeinsatz. So ist auch in Herden mit subklinischen Infektionen der Erfolg der Impfung messbar (12,44).

Gegen PCV2-assoziierte Krankheitskomplexe stehen verschiedene inaktivierte Impfstoffe zur Verfügung. Neben der Optimierung von Management und Hygiene sollte die Zulassung der jeweiligen Impfstoffe beachtet werden. Die Vakzinierung der Jung- und Muttersauen erfolgt reproduktionsorientiert. Dies sollte zum Schutz vor der Reproduktionsstörung vor der Belegung beziehungsweise zum Schutz der Ferkel über passive Immunität 2-4 Wochen vor der Geburt stattfinden. Impfungen der Ferkel zum Schutz vor der systemischen Erkrankung sollten in der Sägezeit, mindestens aber drei Wochen vor der mutmaßlichen Infektion, durchgeführt werden. Um den Impferfolg zu sichern, darf der maternale Schutz der Ferkel nicht mehr vorhanden sein (10,45).

1.7. Diagnostik

Für die Diagnostik stehen unterschiedliche Möglichkeiten zur Verfügung. Als Goldstandard gelten *in situ*-Hybridisierung und Immunhistochemie. Der Nachteil dieser Verfahren ist, dass sie nicht jedes Labor anbietet. Zudem sind diese mit hohem Aufwand und erhöhten Kosten verbunden. Die betroffenen Tiere müssen für diese Diagnostik getötet werden. Sowohl die klassische PCR als auch die serologische Untersuchung auf Antikörper mit oder ohne Schnelltests und ELISA (Enzymelinked Immunosorbent Assay) werden aufgrund der Virusverbreitung beziehungsweise des ubiquitären Vorkommens nicht als sinnvoll erachtet (11,42). Heute wird in der Praxis hauptsächlich der molekularbiologische Nachweis mittels qPCR genutzt (46).

Im Folgenden wird auf die unterschiedlichen diagnostischen Möglichkeiten genauer eingegangen:

1.7.1. *In situ*-Hybridisierung

Die *in Situ*-Hybridisierung (ISH) ist ein Verfahren um DNA oder RNA Sequenzen sowie Replikationsprodukte in Zellen oder Gewebe zu detektieren. Diese Methode basiert auf der

komplementären Bindung von spezifischen Nukleotid-Sonden an die gesuchten Zielsequenzen. Die Sonden sind zur Sichtbarmachung häufig fluoreszenzmarkiert (47).

1.7.2. Immunhistochemie

Die Immunhistochemie (IHC) wird an Gewebe durchgeführt, welches in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet wurde. Es werden mono- und polyklonale Antikörper genutzt, um virale Proteine im Gewebe nachzuweisen. Für diese Methode werden verschiedene Marker eingesetzt, die an Antikörper-Antigen-Komplexe binden und so ein positives Signal emittieren (48). Bei diesen Markern kann es sich um fluoreszierende Moleküle handeln oder um Enzyme, wie die Meerrettichperoxidase oder alkalische Phosphatase, die nach einer Inkubation mit einem chromogenen Substrat, wie Diaminobenzidin, ein gefärbtes Produkt erzeugen (49).

In einem Vergleich der beiden Methoden ISH und IHC, wurde festgestellt, dass mittels IHC mehr positive Zellen nachweisbar sind als mit ISH. Diese Methode ist demnach sensitiver (50). Als diagnostische Trias sind das entsprechende klinische Bild, pathohistologische Läsionen in betroffenem Gewebe und der positive Erregernachweis in diesem entscheidend. In neueren Studien wurde allerdings herausgefunden, dass die pathohistologischen Läsionen vor allem bei der PCV2-assoziierten Reproduktionsstörung oftmals fehlen und das Virus dennoch mittels qPCR und Immunhistochemie nachgewiesen werden kann (46).

1.7.3. Enzymelinked Immunosorbent Assay

Der Enzymelinked Immunosorbent Assay (ELISA) ist ein spezieller Immunoassay, bei dem mit spezifischen Antikörpern oder anderen Liganden die Anwesenheit von Zielmolekülen detektiert werden soll. Diese Methode ist konzipiert für flüssige Probenmaterialien wie Blut oder Harn. Wenn das gesuchte Antigen oder Molekül vorhanden ist, bindet es an immobilisierte Antikörper auf dem Test. Nachdem das Probenmaterial in einem Waschschrift entfernt wird und nur die gebundenen Moleküle zurückbleiben, wird ein Substrat hinzugefügt. Dieses Substrat sorgt im positiven Fall für einen Farbumschlag, in dem es wiederum an den Antikörper-Antigen-Komplex bindet. Die Farbintensität korreliert dabei mit der Quantität der Zielmoleküle (48).

In der PCV2-Diagnostik wird der ELISA wie bereits in Abschnitt 1.7 erwähnt, aufgrund der Virusverbreitung nicht zur Diagnosestellung verwendet. In der Routinediagnostik kann der indirekte Erregernachweis, also der Nachweis von Antikörpern, zum Herdensing genutzt

werden. Zum einen ist die serologische Evaluierung von Impferfolgen möglich, zum anderen können IgM- und IgG-Werte separat erfasst und quantitativ unterschieden werden. Damit sind Rückschlüsse auf das Infektionsgeschehen beziehungsweise den Infektionszeitpunkt möglich. In der frühen Infektionsphase, etwa bis Tag 21 post infectionem, liegt der IgM-Wert über dem IgG-Wert. Unterschreitet der IgM-Wert den IgG-Wert, ist die Probe nach Tag 20 entnommen worden. Ab etwa zwei Monaten nach dem Infektionszeitpunkt ist kein IgM mehr nachweisbar (10).

1.7.4. PCR und qPCR

Die Polymerase-Chain-Reaction (PCR) oder Polymerase-Kettenreaktion ist ein diagnostisches Verfahren, mit dem Nukleinsäuresequenzen amplifiziert, also vervielfältigt werden können. Im Wesentlichen funktioniert dieses *in vitro* Verfahren wie die Replikation der DNA *in vivo* in der Zelle: das Ergebnis eines Zyklus ist eine Verdoppelung der Anzahl an Ursprungssequenzen. Mithilfe der PCR kann ein Vielfaches an Kopien in kürzester Zeit erzeugt werden. Der größte Vorteil dieses Verfahrens liegt in der Erkennung und Vervielfachung spezifischer Zielsequenzen. Die amplifizierte Sequenz kann dann für die weitere Diagnostik genutzt werden. Amplifizierungszyklen sind unterteilt in verschiedene Schritte, die sich in Dauer und Temperatur unterscheiden. Der erste Schritt ist die sogenannte Denaturierung, bei der die doppelsträngige DNA in zwei einzelne DNA-Stränge getrennt wird. Dies geschieht bei 94°C bis 96°C für einige Sekunden bis Minuten - je nach Protokoll. Der zweite und kritischste Schritt ist das „Annealing“. Hier sollen die Primer an die Zielsequenzen binden. Sie bestimmen welcher Teil tatsächlich amplifiziert wird. Die Temperatur dieses Vorgangs schwankt zwischen 50°C und 70°C und hängt von verschiedenen Faktoren ab. Im dritten und letzten Schritt erfolgt die DNA-Synthese. Das Enzym Polymerase synthetisiert nun eine Kopie der Zielsequenz durch Hinzufügen von Nukleotiden an die angedockten Primer. Dieser Vorgang findet bei der Optimaltemperatur der Enzyme statt und liegt meist zwischen 68°C und 72°C. Mit dem erneuten Anstieg auf die Denaturierungstemperatur beginnt der nächste Zyklus. Auf diese Art werden Millionen von Kopien der ursprünglichen DNA-Sequenz erzeugt. Diese PCR Produkte können für die weitere Diagnostik genutzt beziehungsweise analysiert werden. Hier kommt beispielsweise die Gelelektrophorese zum Einsatz. Mit diesem Verfahren können Nukleinsäurestränge nach ihrer Größe getrennt werden, um mit DNA-Strängen bekannter Größe verglichen zu werden. Alle nötigen Komponenten für die PCR werden in möglichst

optimalen Konzentrationen kombiniert. Dazu gehören die Zielsequenz, die passenden Primer mit dazugehörigen Sonden, Nukleotide, Polymerase-Enzyme und Pufferkomponente.

Die Primer sind die kritischen Komponenten der Reaktion, da sie die Spezifität der PCR festlegen. Es handelt sich um einzelsträngige DNA-Fragmente, die komplementär zur gesuchten Zielsequenz sind und zwischen 20 und 30 Basen aufweisen. Es gibt immer einen Forward- und einen Reverse-Primer. Die Nomenklatur des Enzymes Polymerase, welches dafür zuständig ist, dass aus den einzelnen Nukleotiden wieder ein vollständiger Strang entsteht, leitet sich von dem Bakterium ab, aus dem es stammt. Die Taq-Polymerase, die heute hauptsächlich genutzt wird, kommt aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus*. Seine Aktivität bleibt auch bei den nötigen Temperaturschwankungen erhalten.

Die klassische PCR gibt an, ob die gesuchte Zielsequenz präsent ist oder nicht und liefert als Ergebnis millionenfach Kopien der gesuchten Sequenzen. Um die tatsächliche quantitative Menge der gefundenen Sequenzen zu eruieren wird heute die Realtime- oder quantitative PCR (qPCR) verwendet. Bei dieser Methode wird die Bildung der PCR-Produkte mit Hilfe von Fluoreszenzsignalen in Echtzeit gemessen. Es werden zwei qPCR differenziert: die farbstoffbasierte qPCR und die sondenbasierte qPCR. Bei der farbstoffbasierten qPCR wird ein fluoreszenter Farbstoff eingesetzt, der sequenzunspezifisch doppelsträngige DNA (dsDNA) bindet. Bei der sondenbasierten qPCR kommt eine sequenzspezifische fluorophormarkierte Sonde zum Einsatz. Die häufig genutzten sogenannten Hydrolysesonden besitzen an ihrem 5'-Ende einen Reporter und an ihrem 3'-Ende einen Quencher; sie sind komplementär zur Zielsequenz. Der Quencher verhindert durch einen Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET) die Emission des Fluorophors. Während der PCR-Zyklen wird die Sonde durch die Taq-DNA-Polymerase hydrolysiert, wodurch Reporter und Quencher räumlich getrennt werden. Diese räumliche Trennung führt schließlich zu einer Erhöhung der Fluoreszenz. Die Intensität der gemessenen Fluoreszenz ist somit proportional zur Menge der produzierten Kopien. Der Zyklus, bei dem das Fluoreszenzsignal einen bestimmten Schwellenwert überschreitet, wird als Ct-Wert (cycle-threshold-Wert) bezeichnet. Damit die quantitative Menge der DNA aus unbekannten Proben ermittelt werden kann, wird ein sogenannter Standard verwendet. Mithilfe einer Standardverdünnungsreihe mit bekannten Mengen an Genomäquivalenten kann eine Standardkurve erstellt werden, anhand dieser die DNA-Menge einer unbekannten Probe quantifiziert wird. Da die Verdünnung über mehrere Zehnerpotenzen erfolgen muss, ist die Verwendung reiner Spezies-Nukleinsäure sowie präzises Pipettieren erforderlich.

In der so genannten Multiplex-qPCR können mehr als ein Primerpaar mit dazugehörigen und verschieden gelabelten Sonden hinzugefügt werden, so sind es bei der Duplex-PCR beispielsweise zwei Primerpaare. Dadurch können mit einer PCR verschiedene Zielsequenzen erkannt und vervielfältigt werden. Wichtig ist hierbei, dass die Bestandteile wie Primer und Sonden nicht miteinander interagieren und die beteiligten Enzyme dieselben Temperaturoptima aufweisen (48).

Der molekularbiologische Nachweis mittels qPCR wird heute in der PCV-Diagnostik oft genutzt. Sie gilt als Methode der Wahl da sie im Gegensatz zur Immunhistochemie kostengünstig ist und die Diagnostik aus Blutproben oder Tupferproben von lebenden Schweinen ermöglicht. Dies ist relevant, wenn es beispielsweise um Zuchtsauen geht. Dennoch werden nach wie vor hauptsächlich Lymphknoten und andere Organe verwendet. Verschiedene Studien schlagen unterschiedliche Schwellenwerte zur Diagnostik von PCV2-assoziierten Erkrankungen vor, diese können jedoch nicht standardisiert werden (51). So schwanken die Angaben für Serum zwischen $10^{4,7}$ Kopien/ml Serum (52) und $10^{7,4}$ Kopien/ml Serum (53) und für lymphoide und andere Organe zwischen $10^{6,8}$ und $10^{8,4}$ Kopien/g Gewebe (52). Aufgrund der kurzen Virämie (54) und der diagnostischen Trias aus klinischer Symptomatik in unterschiedlichen Organsystemen, typischen histopathologischen Läsionen in betroffenen Organen und dem direkten Antigen-Nachweis in diesem Gewebe wird die Verwendung von Organproben für die PCR bevorzugt (51,54).

2. Ziel der Arbeit

In dieser Arbeit sollen Mono- und Duplex-qPCR anhand von Plasmidstandards verglichen werden, um dann eine PCV2 und PCV3 Duplex-qPCR zu etablieren. Diese wurde genutzt, um retrospektiv die Prävalenz von PCV3 in Österreich einschätzen zu können. Dafür wurden 50 PRRSV positive und 50 PRRSV negative Feldproben aus verschiedenen Bundesländern aus den Jahren 2017-2019 untersucht. Mit Hilfe von Ferkelorganproben aus einem PCV3-positiven Betrieb von 2019 soll herausgefunden werden, in welchem Organ die meisten PCV3 Viruskopien zu finden sind, um geeignetes Probenmaterial zu verifizieren.

Hypothese: PCV3 ist in Österreich prävalent. Zwischen PRRSV positiven und PRRSV negativen Feldproben gibt es im Hinblick auf das Vorhandensein PCV2- beziehungsweise PCV3-spezifischer Nukleinsäuren keinen signifikanten Unterschied.

3. Material und Methoden

3.1. Materialien und qPCR-Protokoll

Zunächst wurde eine bereits am Institut für Virologie etablierte qPCR zum Nachweis PCV2-spezifischer Nukleinsäuren erneut validiert und auf ihre Nachweisgrenze hin überprüft. Daneben wurde eine neue PCV3-qPCR mithilfe eines neuen Standards validiert und ebenfalls auf ihre Nachweisgrenze hin überprüft. Diese wurden mit PCV2/PCV3-Duplex-qPCR-Ansätzen verglichen. Mithilfe der Ergebnisse wurden Standardkurven erstellt, anhand welcher die Quantifizierung unbekannter Proben erfolgen soll. Im Anschluss wurden Feldproben mithilfe dieser Duplex-qPCR untersucht.

Für die Etablierung einer Duplex-qPCR ist es wichtig, dass sich die Fluoreszenzsonden in ihrem Emissionsspektrum möglichst unterscheiden, sodass der Thermocycler sie voneinander differenzieren kann. Aus diesem Grund wurde für die PCV2-Sonde der Farbstoff FAM mit einem Spektrum von 494-518 nm verwendet und für die PCV3-Sonde der Farbstoff Cy5 mit einem Spektrum von 643-667 nm.

Primer und Sondensequenzen PCV2 (55)

PCV2-Forward-Primer (PCV2-F): 5'-GAGTCTGGTGACCGTTGCA-3'

PCV2-Reverse-Primer (PCV2-R): 5'-YCCCGCTCACTTTCAAAAGTTC-3'

PCV2-Sonde (PVC2-Sonde): FAM-5'-CCCTGTAACGTTTGTTCAGAAATTTCCGCG-3'-BHQ1

Amplifikatlänge: 85 Basenpaare

Primer und Sondensequenzen PCV3 (3)

PCV3-Forward-Primer (qPCV3-Palinski-F): 5'-AGTGCTCCCCATTGAACG-3'

PCV3-Reverse-Primer (qPCV3-Palinski-R): 5'-ACACAGCCGTTACTTCAC-3'

PCV3-Sonde: (PCV3-Sonde-Cy5) Cy5-5'-ACCCCATGGCTCAACACATATGACC-3'-BHQ2

Amplifikatlänge: 112 Basenpaare

Als Thermocycler wurde der Rotor-Gene Q MDx 5-plex HRM (CA) (QIAGEN® GmbH, Deutschland) mit der Softwareversion 2.1.0.9 verwendet und als Mastermix der LUNA Universal Probe qPCR Master Mix (New England BioLabs® GmbH, Deutschland).

Mastermixe wurden nach dem Protokoll aus Tabelle 1 hergestellt. Das Temperaturschema der qPCR kann Tabelle 2 entnommen werden.

Tabelle 1: Mastermix Protokoll (Angaben in µl), *tatsächliche Anzahl an Mastermixen, die hergestellt werden um einen Puffer zu gewährleisten

Anzahl der benötigten Mastermixe*	1x	8x	16x	24x	32x	40x
		(8,5x)	(17x)	(25x)	(33x)	(42x)
Luna Universal Probe qPCR Master Mix	10	85	170	250	330	420
RNAse freies H ₂ O	9,4	79,9	159,8	235	310,2	394,8
Primergemisch (F+R je 40µM)	0,4	3,4	6,8	10	13,2	16,8
Sonde (20 pmol/µl)	0,2	1,7	3,4	5	6,6	8,4
Gesamtvolumen	20	170	340	500	660	840
Zugabe Template	1					

Tabelle 2: qPCR-Temperaturschema

Aktivierung Taq	95°C	1 min	45x
Denaturierung	95°C	15 sec	
Annealing	60°C	30 sec	

3.2. Validierung der Sonden in der PCV2-Monoplex-qPCR

Für die Validierung der PCV2-Monoplex-qPCR wurden zunächst der Standard und die Sonden auf ihre Funktion hin untersucht. Dafür wurde der PCV2-Plasmid-Standard PKS 72 aus der Diagnostik des Institutes für Virologie der Veterinärmedizinischen Universität Wien verwendet und eine Verdünnungsreihe bis 10⁻⁸ angesetzt. Die Verdünnungen 10⁻² bis 10⁻⁸ wurden

verwendet und die PCR nach Protokoll in dieser Arbeit (siehe Kapitel 3.1) im Doppelansatz angesetzt. „No template control“ (NTC) und negative Extraktionskontrollen wurden mituntersucht, um Kreuzkontaminationen auszuschließen. Die Messungen wurden im Doppelansatz durchgeführt und fanden im grünen Kanal statt. Das unverdünnte Plasmid enthält $3,77 \times 10^{10}$ Genomäquivalente/ μl .

3.3. Validierung des Standards und der Sonden in der PCV3-Monoplex-qPCR

Für die Validierung der PCV3-Monoplex-qPCR wurden ebenfalls die Sonden und der Standard auf ihre Funktion überprüft. Dafür nutzten wir den PCV3-Plasmid-Standard p1979 und setzten von diesem eine Verdünnungsreihe bis 10^{-11} an. In der Diagnostik des Institutes für Virologie der Veterinärmedizinischen Universität Wien ist der Standard bisher nicht verwendet worden. Aus diesem Grund war zunächst eine Validierung erforderlich. Daher wurde der qPCR eine bekannte PCV3-Positiv-Probe hinzugefügt. Zusätzlich sollte herausgefunden werden, bis zu welcher Verdünnung die Genomäquivalente nachweisbar sind. Daher wurden die Verdünnungen 10^{-5} bis 10^{-11} verwendet und die PCR nach Protokoll in dieser Arbeit im Doppelansatz durchgeführt. Auch hier wurden NTC und negative Extraktionskontrollen mituntersucht, um Kreuzkontaminationen auszuschließen. Die Messungen wurden im Doppelansatz durchgeführt und fanden im roten Kanal statt. Das unverdünnte Plasmid enthält 10^{10} Genomäquivalente/ μl .

3.4. Validierung der neuen PCV2 und PCV3-Duplex-qPCR

Um eine Duplex-PCR zu etablieren wurde eine Verdünnungsreihe angesetzt, die sowohl den PCV2-, als auch den PCV3-Standard zu gleichen Teilen enthielt. Im Ansatz wurden die Verdünnungen 10^{-4} bis 10^{-9} und jeweils eine Verdünnung 10^{-4} von beiden Standards zur Kontrolle genutzt, um die Spezifität sicher zu stellen. Sie sollten später in nur einem Kanal detektiert werden können. Die Messungen fanden im grünen und im roten Kanal im Doppelansatz statt.

3.5. Die PCV2-/PCV3-Duplex-qPCR in der Standarddiagnostik

Um die Zuverlässigkeit der neuen Duplex-qPCR zu überprüfen, wurde sie mit bereits getesteten Proben aus der Standarddiagnostik erneut durchgeführt. Anhand dieser Untersuchung soll die

PCV3-Prävalenz eingeschätzt und geeignetes Probenmaterial verifiziert werden. Das PRRSV-Feldprobenmaterial aus den Jahren 2017-2019 wurde aus dem Archiv des Instituts für Virologie der Veterinärmedizinischen Universität Wien zur Verfügung gestellt. Zusätzlich wurde Probenmaterial von Ferkeln aus einem PCV3-positiven Betrieb von der Universitätsklinik für Schweine bereitgestellt.

3.5.1. Retrospektive Studie

Für eine retrospektive PCV3-Untersuchung wurden Nukleinsäureextrakte von PRRSV-Pool-Proben aus den Jahren 2017 – 2019 aus dem Archiv verwendet, welche bei -80 °C aufbewahrt wurden (Tabelle 3). Ein PRRSV-Pool bestand aus Lunge, Tracheobronchial-Lymphknoten und Tonsillen. Es wurden jeweils 50 PRRSV-positive und 50 PRRSV-negative Proben ausgewählt, um gleiche Voraussetzungen zu gewährleisten und später die Koinfektionsraten zu verifizieren. Die Proben stammen aus den Bundesländern Oberösterreich, Niederösterreich, Steiermark und Kärnten. Alle Extrakte wurden mit jeweils drei PCV2/PCV3-Standard-Verdünnungen in der PCV2/PCV3-Duplex-qPCR angesetzt und nach Protokoll in dieser Arbeit durchgeführt. Eine NTC und negative Extraktionskontrollen wurden mituntersucht, um Kreuzkontaminationen auszuschließen. Alle Proben, die im ersten Lauf grenzwertig positiv waren, wurden ein zweites Mal getestet.

Tabelle 3: PRRSV-Pool-Proben aus den Jahren 2017 – 2019

Proben ID	PRRSV	Herkunft	Proben ID	PRRSV	Herkunft
1041/17	pos	Oberösterreich	1497/17	neg	Oberösterreich
1042/17	pos	Oberösterreich	1555/17	neg	Niederösterreich
1043/17	pos	Oberösterreich	1557/17	neg	Niederösterreich
1321/17	pos	Niederösterreich	1561/17	neg	Niederösterreich
1442/17	pos	Niederösterreich	1563/17	neg	Niederösterreich
1540/17	pos	Niederösterreich	1567/17	neg	Niederösterreich
1542/17	pos	Niederösterreich	1569/17	neg	Niederösterreich
1545/17	pos	Niederösterreich	1680/17	neg	Steiermark
1547/17	pos	Niederösterreich	1711/17	neg	Steiermark
1703/17	pos	Oberösterreich	1716/17	neg	Oberösterreich
1858/17	pos	Steiermark	1861/17	neg	Oberösterreich
1859/17	pos	Steiermark	1976/17	neg	Oberösterreich

1964/17	pos	Oberösterreich	2026/17	neg	Oberösterreich
1965/17	pos	Oberösterreich	009/18	neg	Oberösterreich
92/18	pos	Oberösterreich	34/18	neg	Oberösterreich
95/18	pos	Oberösterreich	194/18	neg	Oberösterreich
98/18	pos	Oberösterreich	334/18	neg	Steiermark
133/18	pos	Oberösterreich	352/18	neg	Oberösterreich
135/18	pos	Oberösterreich	627/18	neg	Oberösterreich
137/18	pos	Oberösterreich	647/18	neg	Steiermark
157/18	pos	Oberösterreich	649/18	neg	Oberösterreich
192/18	pos	Steiermark	891/18	neg	Steiermark
196/18	pos	Oberösterreich	964/18	neg	Oberösterreich
340/18	pos	Steiermark	987/18	neg	Oberösterreich
354/18	pos	Steiermark	1140/18	neg	Steiermark
638/18	pos	Oberösterreich	1439/18	neg	Oberösterreich
641/18	pos	Oberösterreich	1531/18	neg	Oberösterreich
1046/18	pos	Steiermark	1678/18	neg	Oberösterreich
1048/18	pos	Steiermark	1786/18	neg	Niederösterreich
1402/18	pos	Niederösterreich	1840/18	neg	Kärnten
1674/18	pos	Oberösterreich	1842/18	neg	Kärnten
1892/18	pos	Oberösterreich	1846/18	neg	Oberösterreich
2280/18	pos	Oberösterreich	1879/18	neg	Oberösterreich
2282/18	pos	Oberösterreich	2056/18	neg	Steiermark
2284/18	pos	Oberösterreich	2143/18	neg	Oberösterreich
84/19	pos	Steiermark	2168/18	neg	Niederösterreich
86/19	pos	Steiermark	2459/18	neg	Oberösterreich
588/19	pos	Oberösterreich	2475/18	neg	Steiermark
789/19	pos	Kärnten	1136/19	neg	Steiermark
791/19	pos	Kärnten	1227/19	neg	Oberösterreich
1241/19	pos	Steiermark	1237/19	neg	Oberösterreich
1452/19	pos	Oberösterreich	1339/19	neg	Oberösterreich
1462/19	pos	Oberösterreich	1402/19	neg	Steiermark
1472/19	pos	Steiermark	1460/19	neg	Oberösterreich
1514/19	pos	Oberösterreich	1515/19	neg	Oberösterreich

1516/19	pos	Oberösterreich	1599/19	neg	Steiermark
1660/19	pos	Oberösterreich	1614/19	neg	Oberösterreich
1661/19	pos	Oberösterreich	1672/19	neg	Niederösterreich
1662/19	pos	Oberösterreich	1722/19	neg	Oberösterreich
1678/19	pos	Niederösterreich	1738/19	neg	Steiermark

3.5.2. Ferkelorgane aus einem PCV3-Fall

Um Erfahrungen in der PCV3-Diagnostik zu sammeln und Unterschiede in der Viruslast in verschiedenen Organen zu evaluieren, wurden von der Universitätsklinik für Schweine der Veterinärmedizinischen Universität Wien insgesamt 44 Ferkelproben von neun Tieren aus einem PCV3-positiven Betrieb zur Verfügung gestellt. Bei den Proben handelte es sich um Serum und folgende Organproben: Thymus, Parotis, Tonsille, Rückenmark, Lymphknoten, Herz und Kleinhirn (Tab. 4). Der Betrieb besitzt 200 Sauen im Wochenrhythmus und war 2019 auffällig geworden durch das Auftreten von Spreizern und lebensschwachen Ferkeln. Die Tiere wurden mit sehr gutem Lebendgewicht geboren und entwickelten sich dann entweder zu Spreizern oder sie zeigten kein Interesse daran Milch zu saugen. Die Saugferkelverluste lagen in dieser Zeit bei 20 %. Andere klinische Symptome gab es nicht. SLP 27–31/19 waren fünf Saugferkel, die als Spreizer aussortiert wurden und zur Diagnostik bereits negativ auf atypische Pestiviren getestet wurden. SLP 69–71/19 waren vier Saugferkel, die präkolostral und lebensschwach waren.

Mithilfe dieser Proben sollte herausgefunden werden, ob das PCV3-Virus in einem bestimmten Organ persistiert bzw. welche Organe die höchste Viruslast aufweisen. Einige Proben waren bereits extrahiert, die anderen wurden wie folgt bearbeitet: Es wurde jeweils 100mg Organprobe mit 1 ml phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) im TissueLyser II (QIAGEN® GmbH, Deutschland) lysiert. Dieser Vorgang ist notwendig, um die Zellen aufzubrechen und die benötigten Nukleinsäuren freizusetzen. Anschließend wurden die Proben eine Minute bei 13 000 Umdrehungen pro Minute (RPM) zentrifugiert. Für die Extraktion der Nukleinsäuren wurden 140µl vom Überstand der zentrifugierten Proben und das QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN® GmbH, Deutschland) genutzt. Anschließend wurde eine PCV2/PCV3-Duplex-qPCR nach Protokoll aus dieser Arbeit mit den extrahierten Organproben durchgeführt.

Tabelle 4: Ferkelproben aus einem auffälligen Betrieb

Proben ID	Tier ID	Organ
2161/19	SLP 69/19	Serum
2162/19	SLP 69/19	Thymus
2163/19	SLP 69/19	Parotis
2164/19	SLP 69/19	Tonsille
2165/19	SLP 69/19	Rückenmark
2166/19	SLP 70/19	Serum
2167/19	SLP 70/19	Thymus
2168/19	SLP 70/19	Parotis
2169/19	SLP 70/19	Tonsille
2170/19	SLP 70/19	Rückenmark
2171/19	SLP 71/19	Serum
2172/19	SLP 71/19	Thymus
2173/19	SLP 71/19	Parotis
2174/19	SLP 71/19	Tonsille
2175/19	SLP 71/19	Rückenmark
2176/19	SLP 72/19	Serum
2177/19	SLP 72/19	Thymus
2178/19	SLP 72/19	Parotis
2179/19	SLP 72/19	Tonsille
2180/19	SLP 72/19	Rückenmark
2184/19	SLP 27/19	Lymphknoten
2185/19	SLP 27/19	Thymus

Proben ID	Tier ID	Organ
2186/19	SLP 28/19	Lymphknoten
2187/19	SLP 28/19	Thymus
2188/19	SLP 29/19	Lymphknoten
2189/19	SLP 29/19	Thymus
2190/19	SLP 30/19	Lymphknoten
2191/19	SLP 30/19	Thymus
2192/19	SLP 31/19	Lymphknoten
2193/19	SLP 31/19	Thymus
2194/19	SLP 69/19	Herz
2195/19	SLP 70/19	Herz
2196/19	SLP 71/19	Herz
2197/19	SLP 72/19	Herz
457/19	SLP 27/19	Kleinhirn
458/19	SLP 27/19	Serum
459/19	SLP 28/19	Kleinhirn
460/19	SLP 28/19	Serum
461/19	SLP 29/19	Kleinhirn
462/19	SLP 29/19	Serum
463/19	SLP 30/19	Kleinhirn
464/19	SLP 30/19	Serum
465/19	SLP 31/19	Kleinhirn
466/19	SLP 31/19	Serum

4. Ergebnisse

Wie in Abschnitt 3 beschrieben, wurden Standardverdünnungsreihen verwendet, um zum einen die Funktion von PCV2- und PCV3-Standards und -Sonden zu validieren und zum anderen die Nachweisgrenze der qPCRs zu ermitteln. Wie in Abschnitt 1.7.4 erwähnt, konnten die Ct-Werte der Verdünnungen genutzt werden um Standardkurven für die Quantifizierung unbekannter Proben zu erstellen. Als unbekannte Proben wurden anschließend Feldproben mit der neuen PCV2/PCV3-Duplex-qPCR getestet. Die qPCRs wurden alle im Doppelansatz durchgeführt.

4.1. Validierung der PCV2-Monoplex-qPCR

Die Ergebnisse der qPCR zeigten, dass der PCV2-Standard seine Funktion erfüllt und die kalkulierten Konzentrationen der Proben mit den gegebenen Konzentrationen in ihrer dezimalen Größenordnung übereinstimmten (Tab. 5). Alle verwendeten Verdünnungen erreichten den Schwellenwert, die Negativkontrollen überschritten ihn nicht (Abb. 2). Somit konnten die Ct-Werte der Verdünnungen genutzt werden um eine Standardkurve zu erstellen (Abb.3).

Tabelle 5: Quantifizierungsergebnisse der PCV2-Monoplex-qPCR im grünen Kanal (neg = Schwellenwert nicht erreicht, NTC = no template control, GE = Genomequivalente)

Nr.	Farbe	Name	Typ	Ct	Gegebene Konzentration (GE/ul)	Kalkulierte Konzentration (GE/ul)
1		PCV2 10 ⁻²	Standard	13,56	3,77 x 10 ⁸	2,89 x 10 ⁸
2		PCV2 10 ⁻³	Standard	16,45	3,77 x 10 ⁷	4,00 x 10 ⁷
3		PCV2 10 ⁻⁴	Standard	20,03	3,77 x 10 ⁶	3,45 x 10 ⁶
4		PCV2 10 ⁻⁵	Standard	22,82	3,77 x 10 ⁵	5,11 x 10 ⁵
5		PCV2 10 ⁻⁶	Standard	26,81	3,77 x 10 ⁴	3,34 x 10 ⁴
6		PCV2 10 ⁻⁷	Standard	29,91	3,77 x 10 ³	4,01 x 10 ³
7		PCV2 10 ⁻⁸	Standard	33,28	3,77 x 10 ²	4,00 x 10 ²

Nr.	Farbe	Name	Typ	Ct	Gegebene Konzentration (GE/ul)	Kalkulierte Konzentration (GE/ul)
8		NTC	NTC	--	--	neg
9		PCV2 10 ⁻²	Standard	13,04	3,77 x 10 ⁸	4,13 x 10 ⁸
10		PCV2 10 ⁻³	Standard	16,32	3,77 x 10 ⁷	4,38 x 10 ⁷
11		PCV2 10 ⁻⁴	Standard	20,05	3,77 x 10 ⁶	3,40 x 10 ⁶
12		PCV2 10 ⁻⁵	Standard	23,14	3,77 x 10 ⁵	4,10 x 10 ⁵
13		PCV2 10 ⁻⁶	Standard	26,81	3,77 x 10 ⁴	3,35 x 10 ⁴
14		PCV2 10 ⁻⁷	Standard	29,99	3,77 x 10 ³	3,78 x 10 ³
15		PCV2 10 ⁻⁸	Standard	33,54	3,77 x 10 ²	3,34 x 10 ²
16		NTC	NTC	--	--	neg

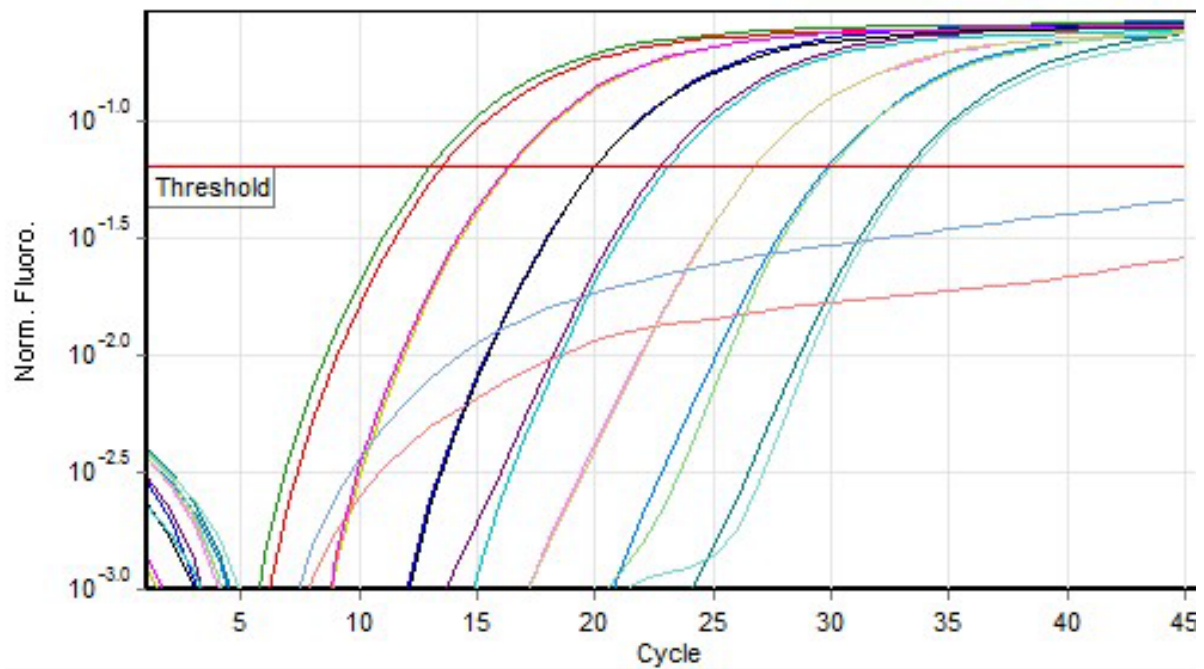


Abbildung 2: Quantifizierungsergebnisse der PCV2-Monoplex-qPCR im grünen Kanal (Kodierung der Farben siehe Tab. 5, threshold = Schwellenwert, x-Achse: cycle = Zyklus, y-Achse: Norm. Fluoro. = ermitteltes Fluoreszenzsignal)

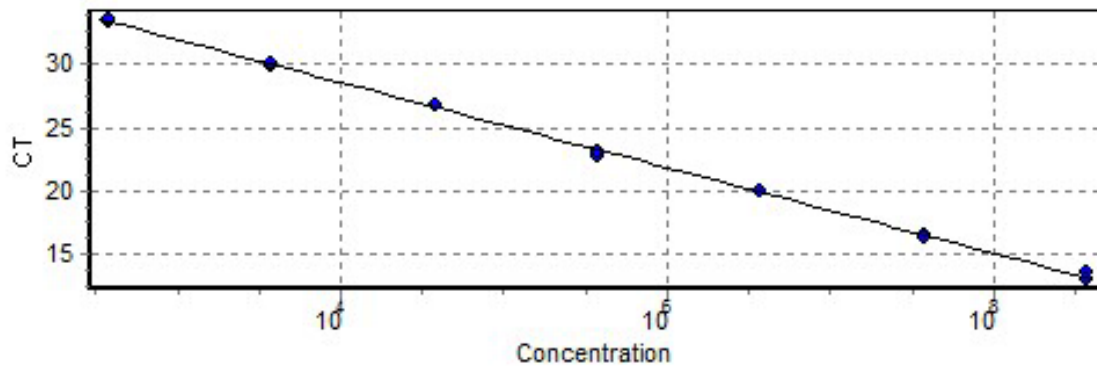


Abbildung 3: Ermittelte PCV2-Standardkurve (x-Achse: concentration = Konzentration in GE/μl, y-Achse: Ct-Wert)

4.2. Validierung der Sonden und des Standards in der PCV3-Monoplex-qPCR

Die Ergebnisse der qPCR zeigten, dass der neue PCV3-Standard seine Funktion erfüllte und die kalkulierten Konzentrationen der Proben mit den gegebenen Konzentrationen in ihrer dezimalen Größenordnung übereinstimmten (Tab. 6). Die verwendeten Verdünnungen bis 10^{-9} erreichten den Schwellenwert. Die Verdünnungen 10^{-10} und 10^{-11} , sowie die Negativkontrollen überschritten den Schwellenwert nicht (Abb. 4). Mithilfe der Ct-Werte der Verdünnungen 10^{-5} bis 10^{-9} konnte eine Standardkurve erstellt werden (Abb.5).

Tabelle 6: Quantifizierungsergebnisse der PCV3-Monoplex-qPCR im roten Kanal (neg = Schwellenwert nicht erreicht, NTC = no template control, GE = Genomequivalente)

Nr	Farbe	Name	Typ	Ct	Gegebene Konzentration (GE/ml)	Kalkulierte Konzentration (GE/ml)
1		PCV3 10^{-5}	Standard	22,48	$1,00 \times 10^5$	$1,01 \times 10^5$
2		PCV3 10^{-6}	Standard	25,82	$1,00 \times 10^4$	$9,89 \times 10^3$
3		PCV3 10^{-7}	Standard	29,04	$1,00 \times 10^3$	$1,04 \times 10^3$

Nr	Farbe	Name	Typ	Ct	Gegebene Konzentration (GE/ml)	Kalkulierte Konzentration (GE/ml)
4		PCV3 10 ⁻⁸	Standard	32,64	1,00 x 10 ²	8,43 x 10 ¹
5		PCV3 10 ⁻⁹	Standard	34,75	1,00 x 10 ¹	1,93 x 10 ¹
6		PCV3 10 ⁻¹⁰	Standard	--	1,00 x 10 ⁰	neg
7		PCV3 10 ⁻¹¹	Standard	--	1,00 x 10 ⁻¹	neg
8		NTC	NTC	--	--	neg
9		PCV3 10 ⁻⁵	Standard	22,43	1,00 x 10 ⁵	1,05 x 10 ⁵
10		PCV3 10 ⁻⁶	Standard	25,58	1,00 x 10 ⁴	1,16 x 10 ⁴
11		PCV3 10 ⁻⁷	Standard	29,25	1,00 x 10 ³	9,01 x 10 ²
12		PCV3 10 ⁻⁸	Standard	32,92	1,00 x 10 ²	6,93 x 10 ¹
13		PCV3 10 ⁻⁹	Standard	36,06	1,00 x 10 ¹	7,74 x 10 ⁰
14		PCV3 10 ⁻¹⁰	Standard	--	1,00 x 10 ⁰	neg
15		PCV3 10 ⁻¹¹	Standard	--	1,00 x 10 ⁻¹	neg
16		NTC	NTC	--	--	neg

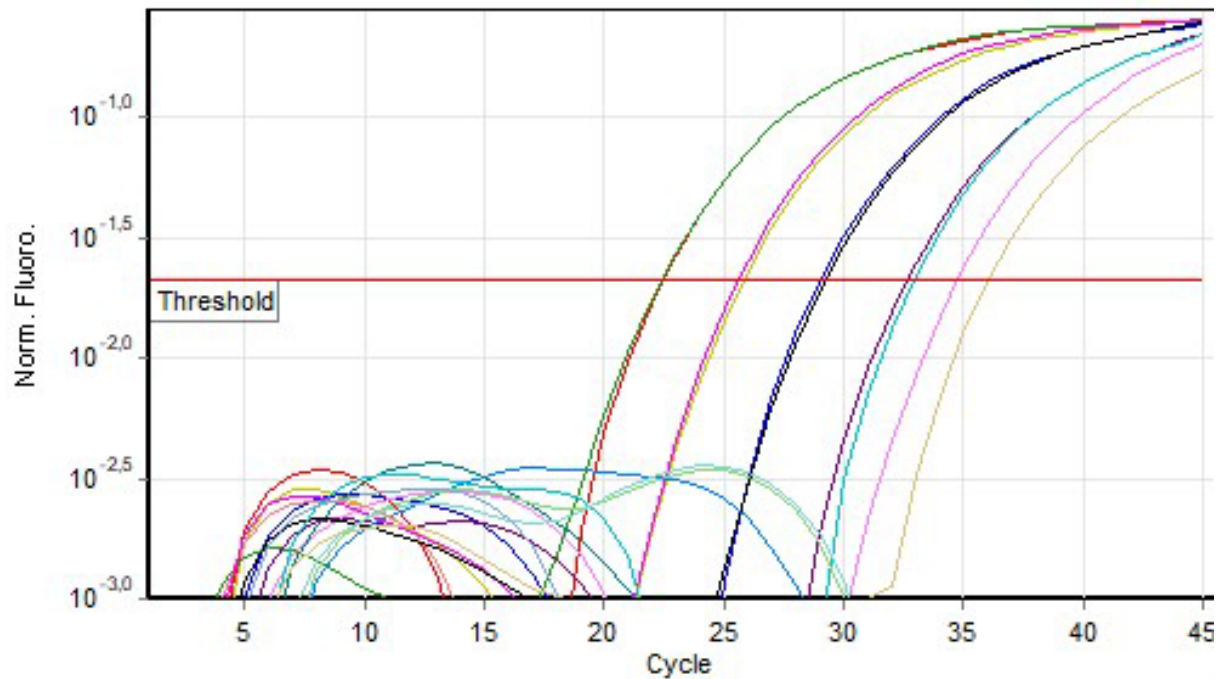


Abbildung 4: Quantifizierungsergebnisse der PCV3-Monoplex-qPCR im roten Kanal (Kodierung der Farben siehe Tab. 6, threshold = Schwellenwert, x-Achse: cycle = Zyklus, y-Achse: Norm. Fluoro. = ermitteltes Fluoreszenzsignal)

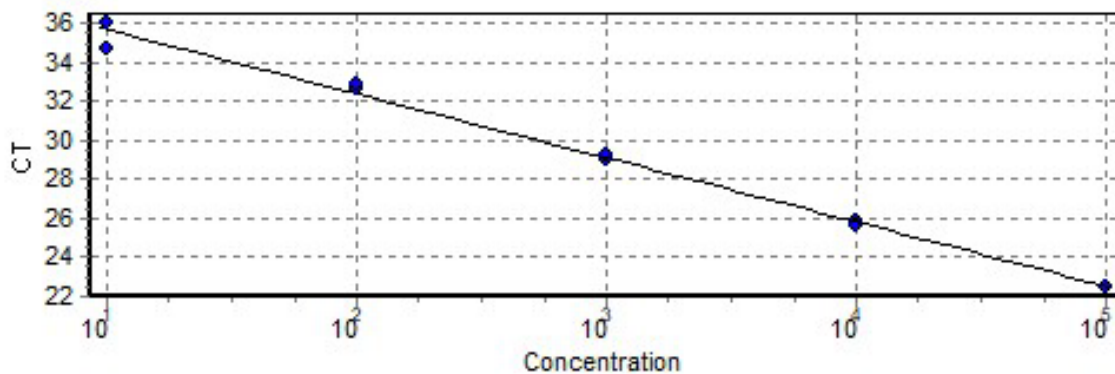


Abbildung 5: Ermittelte PCV3-Standardkurve (x-Achse: concentration = Konzentration in GE/ μ l, y-Achse: Ct-Wert)

4.3. Validierung der neuen PCV2 und PCV3 Duplex-qPCR

Die Ergebnisse der Duplex-qPCR zeigten, dass die Bestandteile der Monoplex-qPCRs in der Duplex-qPCR nicht miteinander interagierten und der Thermocycler die Fluoreszenzsonden voneinander differenzieren konnte. Die kalkulierten Konzentrationen der Proben stimmten auch hier mit den gegebenen Konzentrationen in ihrer dezimalen Größenordnung überein. PCV2 konnte zuverlässig nur im grünen Kanal (Tab. 7, Abb. 6) und PCV3 nur im roten Kanal

nachgewiesen werden (Tab. 8, Abb. 8). Mit den Ct-Werten der verschiedenen Messungen konnten erneut Standardkurven für PCV2 (Abb. 7) und für PCV3 (Abb. 9) für die neue Duplex-qPCR erstellt werden.

Die Nachweisgrenze der PCV2-/PCV3-Duplex-qPCR konnte mit 38 GE/ μ l Extrakt für PCV2 ($\cong 6,5 \times 10^5$ GE/g Gewebe) und mit 10 GE/ μ l Extrakt für PCV3 ($\cong 1,7 \times 10^5$ GE/g Gewebe) angenommen werden.

Tabelle 7: Quantifizierungsergebnisse der PCV2 und PCV3-Duplex-qPCR im grünen Kanal (neg = Schwellenwert nicht erreicht, NTC = no template control, GE = Genomequivalente)

Nr.	Farbe	Name	Typ	Ct	Gegebene Konzentration (GE/ μ l)	Kalkulierte Konzentration (GE/ μ l)
1		PCV2+3 10^{-4}	Standard	19,31	$3,77 \times 10^6$	$3,25 \times 10^6$
2		PCV2+3 10^{-5}	Standard	22,43	$3,77 \times 10^5$	$3,82 \times 10^5$
3		PCV2+3 10^{-6}	Standard	26,12	$3,77 \times 10^4$	$3,07 \times 10^4$
4		PCV2+3 10^{-7}	Standard	29,20	$3,77 \times 10^3$	$3,69 \times 10^3$
5		PCV2+3 10^{-8}	Standard	31,88	$3,77 \times 10^2$	$5,92 \times 10^2$
6		PCV2+3 10^{-9}	Standard	36,61	$3,77 \times 10^1$	$2,30 \times 10^1$
7		PCV3 10^{-4}	Standard	--	--	neg
8		NTC	NTC	--	--	neg
9		PCV2+3 10^{-4}	Standard	19,33	$3,77 \times 10^6$	$3,20 \times 10^6$
10		PCV2+3 10^{-5}	Standard	22,00	$3,77 \times 10^5$	$5,15 \times 10^5$
11		PCV2+3 10^{-6}	Standard	25,47	$3,77 \times 10^4$	$4,78 \times 10^4$
12		PCV2+3 10^{-7}	Standard	29,24	$3,77 \times 10^3$	$3,61 \times 10^3$
13		PCV2+3 10^{-8}	Standard	32,76	$3,77 \times 10^2$	$3,22 \times 10^2$
14		PCV2+3 10^{-9}	Standard	35,57	$3,77 \times 10^1$	$4,70 \times 10^1$

Nr.	Farbe	Name	Typ	Ct	Gegebene Konzentration (GE/ul)	Kalkulierte Konzentration (GE/ul)
15		PCV2 10 ⁻⁴	Standard	17,82	--	9,01 x 10 ⁶
16		NTC	NTC	--	--	neg

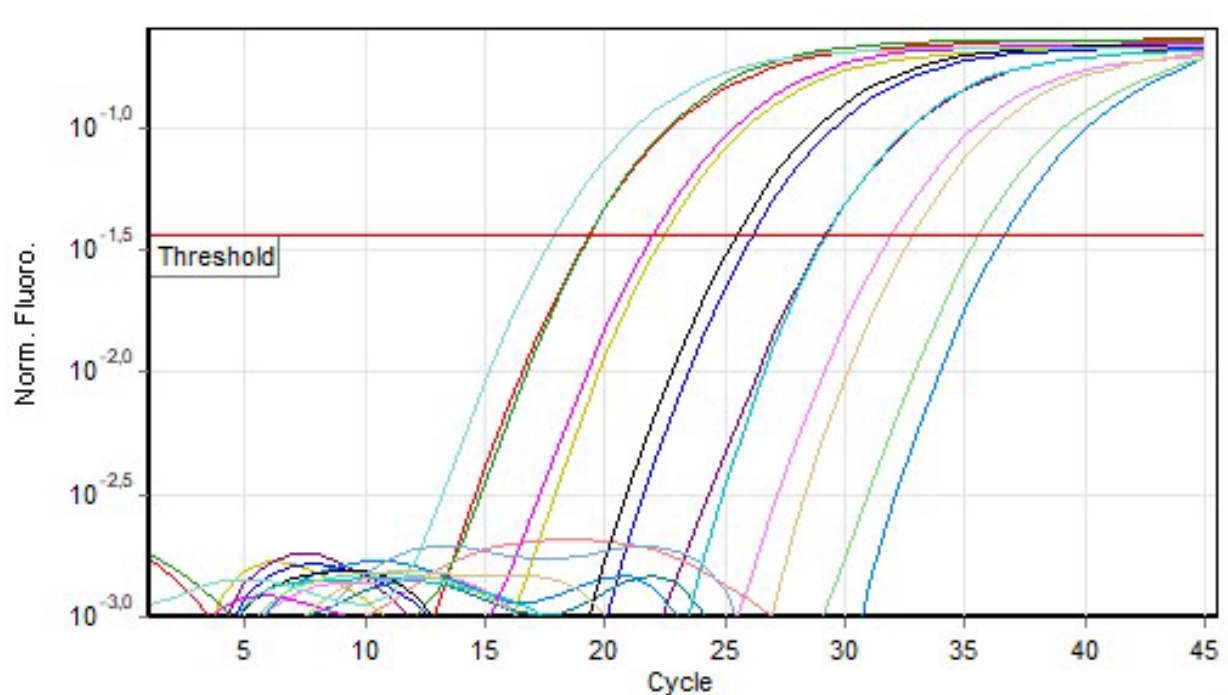


Abbildung 6: Quantifizierungsergebnisse für PCV2 und PCV3 im grünen Kanal (Kodierung der Farben siehe Tab. 7, threshold = Schwellenwert, x-Achse: cycle = Zyklus, y-Achse: Norm. Fluoro. = ermitteltes Fluoreszenzsignal)

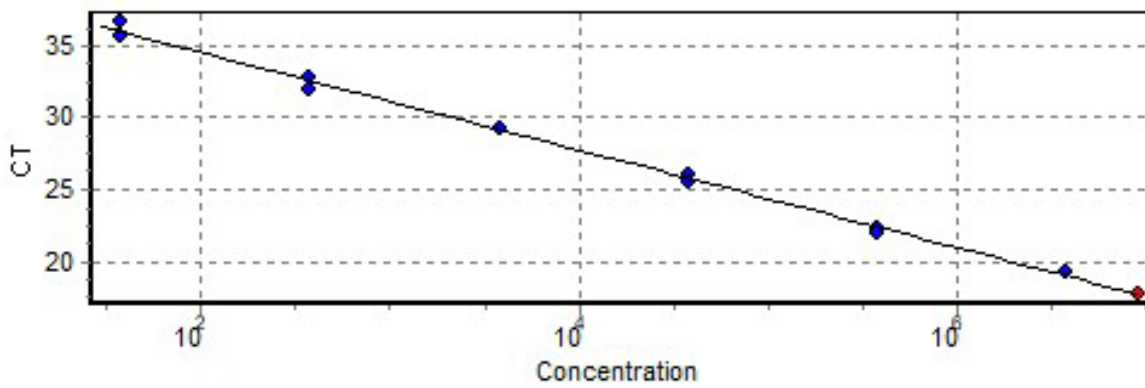


Abbildung 7: Ermittelte PCV2-Standardkurve (x-Achse: concentration = Konzentration in GE/ μ l, y-Achse: Ct-Wert)

Tabelle 8: Quantifizierungsergebnisse der PCV2 und PCV3-Duplex-qPCR im roten Kanal (neg = Schwellenwert nicht erreicht, NTC = no template control, GE = Genomequivalente)

Nr.	Farbe	Name	Typ	Ct	Gegebene Konzentration (GE/ μ l)	Kalkulierte Konzentration (GE/ μ l)
1		PCV2+3 10 ⁻⁴	Standard	20,43	1,00 x 10 ⁶	8,16 x 10 ⁵
2		PCV2+3 10 ⁻⁵	Standard	23,90	1,00 x 10 ⁵	8,73 x 10 ⁴
3		PCV2+3 10 ⁻⁶	Standard	27,58	1,00 x 10 ⁴	8,13 x 10 ³
4		PCV2+3 10 ⁻⁷	Standard	30,72	1,00 x 10 ³	1,07 x 10 ³
5		PCV2+3 10 ⁻⁸	Standard	34,13	1,00 x 10 ²	1,19 x 10 ²
6		PCV2+3 10 ⁻⁹	Standard	37,75	1,00 x 10 ¹	1,14 x 10 ¹
7		PCV3 10 ⁻⁴	Standard	19,32	--	1,67 x 10 ⁶
8		NTC	NTC	--	--	neg
9		PCV2+3 10 ⁻⁴	Standard	19,88	1,00 x 10 ⁶	1,17 x 10 ⁶
10		PCV2+3 10 ⁻⁵	Standard	23,43	1,00 x 10 ⁵	1,18 x 10 ⁵
11		PCV2+3 10 ⁻⁶	Standard	26,76	1,00 x 10 ⁴	1,38 x 10 ⁴
12		PCV2+3 10 ⁻⁷	Standard	31,12	1,00 x 10 ³	8,24 x 10 ²

Nr.	Farbe	Name	Typ	Ct	Gegebene Konzentration (GE/ul)	Kalkulierte Konzentration (GE/ul)
13		PCV2+3 10 ⁻⁸	Standard	34,57	1,00 x 10 ²	8,91 x 10 ¹
14		PCV2+3 10 ⁻⁹	Standard	38,20	1,00 x 10 ¹	8,58 x 10 ⁰
15		PCV2 10 ⁻⁴	Standard	--	--	neg
16		NTC	NTC	--	--	neg

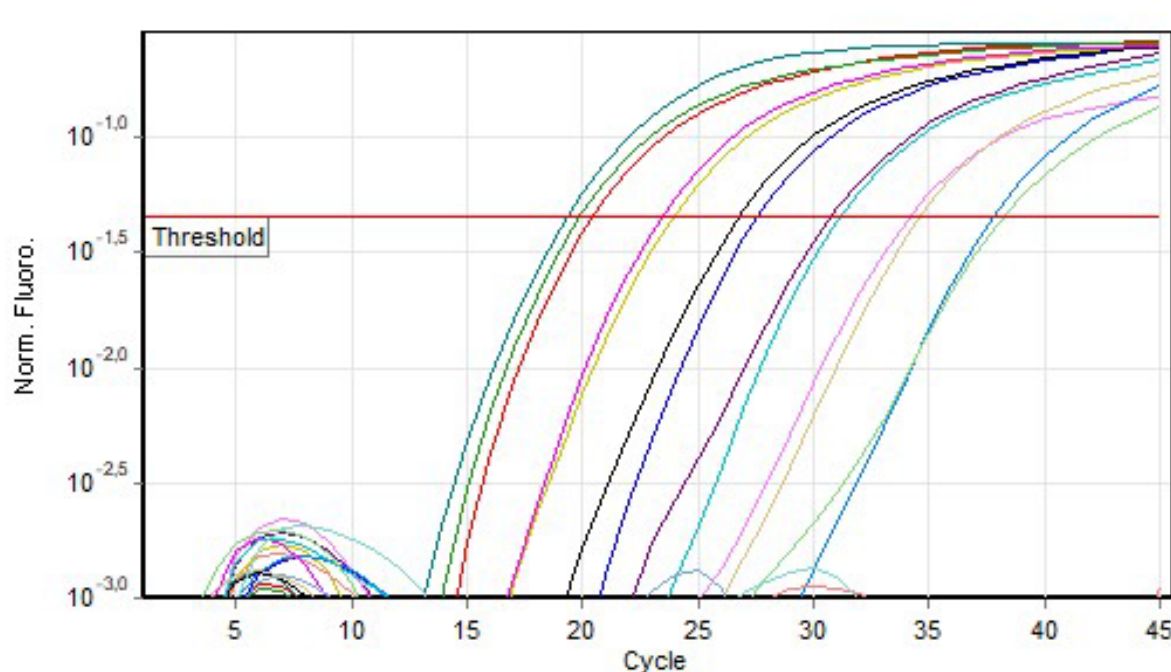


Abbildung 8: Quantifizierungsergebnisse für PCV2 und PCV3 im roten Kanal (Kodierung der Farben siehe Tab. 8, threshold = Schwellenwert, x-Achse: cycle = Zyklus, y-Achse: Norm. Fluoro. = ermitteltes Fluoreszenzsignal)

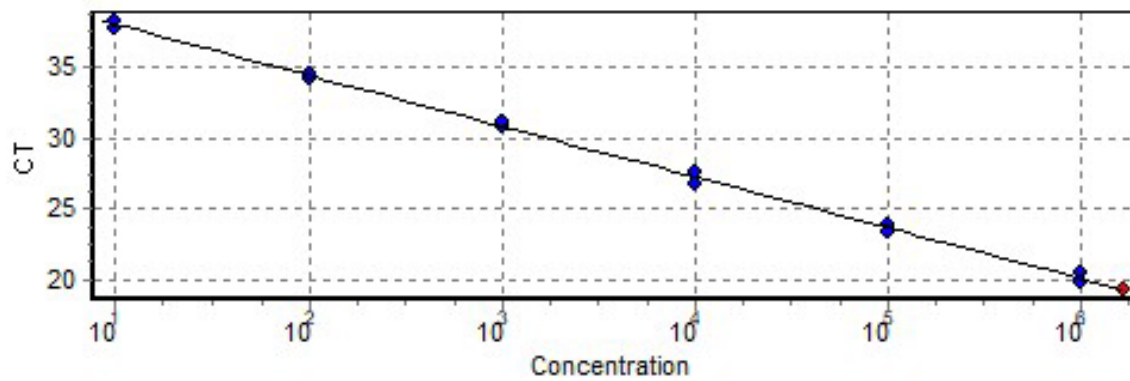


Abbildung 9: Ermittelte PCV3-Standardkurve (x-Achse: concentration = Konzentration in GE/μl, y-Achse: Ct-Wert)

4.4. PCV2 und PCV3-Duplex-qPCR in der Standarddiagnostik

4.4.1. Retrospektive Studie

Die Umrechnung der Ergebnisse von GE/Reaktion in GE/g Gewebe erfolgte mit dem Faktor 4285. Proben, die in der Vergangenheit bereits auf PCV2 getestet wurden, wurden nochmal mit dem Faktor 4 multipliziert um vorausgegangene Verdünnungen aus der PCV2 Diagnostik heraus zu rechnen.

Bei insgesamt 25 von 100 Proben konnte PCV2 oder PCV3 oder beide Viren nachgewiesen werden. Von 50 PRRSV-positiven Proben waren sechs PCV3- und sieben PCV2-positiv. Insgesamt drei dieser Proben waren sowohl PCV2- als auch PCV3-positiv. Von 50 PRRSV-negativen Proben waren sieben PCV3- und neun PCV2-positiv. Nur eine dieser Proben war sowohl PCV2- als auch PCV3-positiv. Aus allen 100 Proben waren somit 13 Proben PCV3-positiv (Tab. 9). Von diesen PCV3-positiven Proben waren vier auch PCV2-positiv (30,77 %) und sechs PRRSV-positiv (46,15 %). Insgesamt gab es zwei Proben, die auf alle drei Erreger positiv getestet wurden (15,38 %) und fünf, die keine Koinfektion aufwiesen (38,46 %) (Tab. 10, Abb. 10). Somit ergibt sich eine Koinfektionsrate von 61,54 %. Von den PCV3-positiven Proben stammten sieben aus Niederösterreich, fünf aus Oberösterreich und eine aus der Steiermark. Die beiden Proben, die auf alle Erreger positiv getestet wurden, stammten aus Niederösterreich.

Tabelle 9: Ergebnisse der PRRSV-Pool-Proben (Angaben in GE/g Gewebe)

Proben ID	PRRSV	PCV2	PCV3	Proben ID	PRRSV	PCV2	PCV3
1041/17	pos	neg	neg	1497/17	neg	neg	neg
1042/17	pos	neg	neg	1555/17	neg	neg	1,80 x 10 ⁷
1043/17	pos	neg	neg	1557/17	neg	1,42 x 10 ⁹	neg
1321/17	pos	neg	neg	1561/17	neg	neg	1,49 x 10 ⁹
1442/17	pos	neg	neg	1563/17	neg	neg	3,46 x 10 ⁸
1540/17	pos	1,26 x 10 ⁶	1,83 x 10 ⁷	1567/17	neg	neg	neg
1542/17	pos	neg	neg	1569/17	neg	6,99 x 10 ⁴	neg
1545/17	pos	2,16 x 10 ⁵	1,19 x 10 ⁸	1680/17	neg	neg	neg
1547/17	pos	8,21 x 10 ¹¹	neg	1711/17	neg	neg	6,94 x 10 ⁷
1703/17	pos	neg	neg	1716/17	neg	neg	neg
1858/17	pos	neg	neg	1861/17	neg	neg	neg
1859/17	pos	neg	neg	1976/17	neg	neg	neg
1964/17	pos	neg	neg	2026/17	neg	neg	neg
1965/17	pos	neg	neg	009/18	neg	3,09 x 10 ¹¹	neg
92/18	pos	1,22 x 10 ³	neg	34/18	neg	neg	neg
95/18	pos	neg	neg	194/18	neg	neg	neg
98/18	pos	neg	neg	334/18	neg	neg	neg
133/18	pos	neg	9,00 x 10 ⁵	352/18	neg	neg	neg
135/18	pos	neg	9,77 x 10 ⁵	627/18	neg	neg	1,99 x 10 ⁴
137/18	pos	neg	neg	647/18	neg	neg	neg
157/18	pos	neg	neg	649/18	neg	neg	neg
192/18	pos	neg	neg	891/18	neg	neg	neg
196/18	pos	neg	neg	964/18	neg	5,10 x 10 ⁵	neg
340/18	pos	neg	neg	987/18	neg	neg	neg
354/18	pos	neg	neg	1140/18	neg	neg	neg
638/18	pos	neg	neg	1439/18	neg	neg	neg
641/18	pos	neg	neg	1531/18	neg	neg	neg
1046/18	pos	neg	neg	1678/18	neg	neg	neg
1048/18	pos	neg	neg	1786/18	neg	neg	neg
1402/18	pos	1,11 x 10 ¹⁰	7,28 x 10 ⁶	1840/18	neg	1,22 x 10 ¹²	neg

1674/18	pos	neg	neg	1842/18	neg	4,71 x 10 ¹¹	neg
1892/18	pos	neg	5,36 x 10 ⁶	1846/18	neg	neg	neg
2280/18	pos	neg	neg	1879/18	neg	neg	neg
2282/18	pos	neg	neg	2056/18	neg	neg	neg
2284/18	pos	neg	neg	2143/18	neg	neg	neg
84/19	pos	neg	neg	2168/18	neg	neg	neg
86/19	pos	neg	neg	2459/18	neg	neg	neg
588/19	pos	neg	neg	2475/18	neg	neg	neg
789/19	pos	neg	neg	1136/19	neg	neg	neg
791/19	pos	neg	neg	1227/19	neg	3,04 x 10 ⁹	neg
1241/19	pos	2,02 x 10 ⁶	neg	1237/19	neg	3,97 x 10 ⁷	neg
1452/19	pos	neg	neg	1339/19	neg	neg	neg
1462/19	pos	neg	neg	1402/19	neg	neg	neg
1472/19	pos	2,22 x 10 ⁷	neg	1460/19	neg	neg	neg
1514/19	pos	neg	neg	1515/19	neg	8,23 x 10 ⁹	1,39 x 10 ⁷
1516/19	pos	neg	neg	1599/19	neg	neg	neg
1660/19	pos	neg	neg	1614/19	neg	neg	neg
1661/19	pos	neg	neg	1672/19	neg	neg	3,40 x 10 ⁶
1662/19	pos	neg	neg	1722/19	neg	neg	neg
1678/19	pos	neg	neg	1738/19	neg	neg	neg

Tabelle 10: PCV3 positive Proben im Zusammenhang mit Koinfektionen

PCV3 pos	PCV2 neg	PCV2 pos	total
PRRSV neg	5 (38,46 %)	2 (15,38 %)	7 (53,85 %)
PRRSV pos	4 (30,77 %)	2 (15,38 %)	6 (46,15 %)
total	9 (69,23 %)	4 (30,77 %)	13 (100 %)

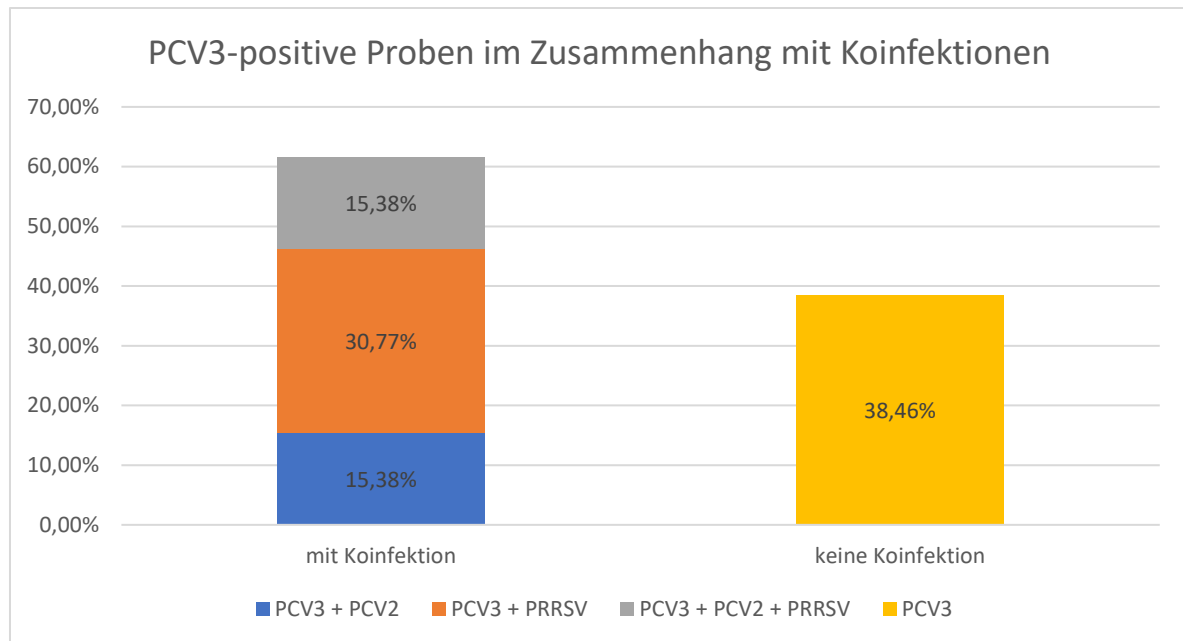


Abbildung 10: Diese Grafik zeigt die Wahrscheinlichkeiten von Koinfektionen der PCV3-positiven Proben: In 8 von 13 PCV3-positiven Proben konnten Koinfektionen mit PCV2 und/oder PRRSV nachgewiesen werden (61,54%), in 5 von 13 PCV3-positive Proben wurden diesen beiden Viren nicht nachgewiesen (38,46 %).

4.4.2. Ferkelorgane aus einem PCV3-Fall

Die Ergebnisse der Untersuchung der Ferkelorgane aus einem PCV3-positiven Betrieb zeigten, dass die PCV3-Viruslast in keinem Organ bedeutend höher war als in den anderen getesteten Organen (Tab. 11, 12, 13). Der höchste Wert aus den unterschiedlichen Probematerialien wurde jeweils durch eine Abweichung (SLP 71/19) bestimmt. Bei dem betroffenen Tier lag der PCV3 Nachweis in allen Proben über $1,20 \times 10^8$ GE/g Gewebe (Tab. 12). Serum als Probenmaterial hatte in acht von neun Tieren ein negatives Ergebnis (Tab. 13).

Tabelle 11: Ergebnisse der Ferkelorgane (Angaben in GE/g Gewebe)

Proben ID	Tier ID	Organ	PCV2	PCV3
2161/19	SLP 69/19	Serum	neg	neg
2162/19	SLP 69/19	Thymus	neg	$5,01 \times 10^5$
2163/19	SLP 69/19	Parotis	neg	$1,84 \times 10^6$
2164/19	SLP 69/19	Tonsille	neg	$4,29 \times 10^5$
2165/19	SLP 69/19	Rückenmark	neg	$6,30 \times 10^5$
2166/19	SLP 70/19	Serum	neg	neg

2167/19	SLP 70/19	Thymus	neg	$2,21 \times 10^5$
2168/19	SLP 70/19	Parotis	neg	$4,71 \times 10^5$
2169/19	SLP 70/19	Tonsille	neg	$7,84 \times 10^5$
2170/19	SLP 70/19	Rückenmark	neg	$1,13 \times 10^6$
2171/19	SLP 71/19	Serum	neg	$1,20 \times 10^8$
2172/19	SLP 71/19	Thymus	neg	$2,46 \times 10^9$
2173/19	SLP 71/19	Parotis	neg	$2,49 \times 10^9$
2174/19	SLP 71/19	Tonsille	neg	$1,06 \times 10^9$
2175/19	SLP 71/19	Rückenmark	neg	$6,56 \times 10^9$
2176/19	SLP 72/19	Serum	neg	neg
2177/19	SLP 72/19	Thymus	neg	$1,79 \times 10^7$
2178/19	SLP 72/19	Parotis	neg	$3,63 \times 10^7$
2179/19	SLP 72/19	Tonsille	neg	$3,70 \times 10^5$
2180/19	SLP 72/19	Rückenmark	neg	$4,46 \times 10^6$
2184/19	SLP 27/19	Lymphknoten	neg	neg
2185/19	SLP 27/19	Thymus	neg	neg
2186/19	SLP 28/19	Lymphknoten	neg	$2,10 \times 10^5$
2187/19	SLP 28/19	Thymus	neg	neg
2188/19	SLP 29/19	Lymphknoten	neg	$6,86 \times 10^4$
2189/19	SLP 29/19	Thymus	neg	$1,95 \times 10^5$
2190/19	SLP 30/19	Lymphknoten	neg	$1,44 \times 10^5$
2191/19	SLP 30/19	Thymus	neg	$7,76 \times 10^4$
2192/19	SLP 31/19	Lymphknoten	neg	$3,40 \times 10^5$
2193/19	SLP 31/19	Thymus	neg	$4,58 \times 10^4$
2194/19	SLP 69/19	Herz	neg	neg
2195/19	SLP 70/19	Herz	neg	neg
2196/19	SLP 71/19	Herz	neg	$3,45 \times 10^{10}$
2197/19	SLP 72/19	Herz	neg	$1,49 \times 10^6$
457/19	SLP 27/19	Kleinhirn	neg	neg
458/19	SLP 27/19	Serum	neg	neg
459/19	SLP 28/19	Kleinhirn	neg	neg
460/19	SLP 28/19	Serum	neg	neg
461/19	SLP 29/19	Kleinhirn	neg	$4,54 \times 10^4$

462/19	SLP 29/19	Serum	neg	neg
463/19	SLP 30/19	Kleinhirn	neg	$1,11 \times 10^5$
464/19	SLP 30/19	Serum	neg	neg
465/19	SLP 31/19	Kleinhirn	neg	neg
466/19	SLP 31/19	Serum	neg	neg

Tabelle 12: Ergebnisse der Ferkelorgane sortiert nach Tier ID (Angaben in GE/g Gewebe)

Proben ID	Tier ID	Material	PCV3
2161/19	SLP 69/19	Serum	neg
2162/19	SLP 69/19	Thymus	$5,01 \times 10^5$
2163/19	SLP 69/19	Parotis	$1,84 \times 10^6$
2164/19	SLP 69/19	Tonsille	$4,29 \times 10^5$
2165/19	SLP 69/19	Rückenmark	$6,30 \times 10^5$
2194/19	SLP 69/19	Herz	neg
2166/19	SLP 70/19	Serum	neg
2167/19	SLP 70/19	Thymus	$2,21 \times 10^5$
2168/19	SLP 70/19	Parotis	$4,71 \times 10^5$
2169/19	SLP 70/19	Tonsille	$7,84 \times 10^5$
2170/19	SLP 70/19	Rückenmark	$1,13 \times 10^6$
2195/19	SLP 70/19	Herz	neg
2171/19	SLP 71/19	Serum	$1,20 \times 10^8$
2172/19	SLP 71/19	Thymus	$2,46 \times 10^9$
2173/19	SLP 71/19	Parotis	$2,49 \times 10^9$
2174/19	SLP 71/19	Tonsille	$1,06 \times 10^9$
2175/19	SLP 71/19	Rückenmark	$6,56 \times 10^9$
2196/19	SLP 71/19	Herz	$3,45 \times 10^{10}$
2176/19	SLP 72/19	Serum	neg
2177/19	SLP 72/19	Thymus	$1,79 \times 10^7$
2178/19	SLP 72/19	Parotis	$3,63 \times 10^7$
2179/19	SLP 72/19	Tonsille	$3,70 \times 10^5$

2180/19	SLP 72/19	Rückenmark	4,46 x 10 ⁶
2197/19	SLP 72/19	Herz	1,49 x 10 ⁶
2184/19	SLP 27/19	Lymphknoten	neg
2185/19	SLP 27/19	Thymus	neg
457/19	SLP 27/19	Kleinhirn	neg
458/19	SLP 27/19	Serum	neg
2186/19	SLP 28/19	Lymphknoten	2,10 x 10 ⁵
2187/19	SLP 28/19	Thymus	neg
459/19	SLP 28/19	Kleinhirn	neg
460/19	SLP 28/19	Serum	neg
2188/19	SLP 29/19	Lymphknoten	6,86 x 10 ⁴
2189/19	SLP 29/19	Thymus	1,95 x 10 ⁵
461/19	SLP 29/19	Kleinhirn	4,54 x 10 ⁴
462/19	SLP 29/19	Serum	neg
2190/19	SLP 30/19	Lymphknoten	1,44 x 10 ⁵
2191/19	SLP 30/19	Thymus	7,76 x 10 ⁴
463/19	SLP 30/19	Kleinhirn	1,11 x 10 ⁵
464/19	SLP 30/19	Serum	neg
2192/19	SLP 31/19	Lymphknoten	3,40 x 10 ⁵
2193/19	SLP 31/19	Thymus	4,58 x 10 ⁴
465/19	SLP 31/19	Kleinhirn	neg
466/19	SLP 31/19	Serum	neg

Tabelle 13: Ergebnisse der Ferkelorgane sortiert nach Probenmaterial (Angaben in GE/g Gewebe)

Proben ID	Tier ID	Material	PCV3
2161/19	SLP 69/19	Serum	neg
2166/19	SLP 70/19	Serum	neg

2171/19	SLP 71/19	Serum	$1,20 \times 10^8$
2176/19	SLP 72/19	Serum	neg
458/19	SLP 27/19	Serum	neg
460/19	SLP 28/19	Serum	neg
462/19	SLP 29/19	Serum	neg
464/19	SLP 30/19	Serum	neg
466/19	SLP 31/19	Serum	neg
2162/19	SLP 69/19	Thymus	$5,01 \times 10^5$
2167/19	SLP 70/19	Thymus	$2,21 \times 10^5$
2172/19	SLP 71/19	Thymus	$2,46 \times 10^9$
2177/19	SLP 72/19	Thymus	$1,79 \times 10^7$
2185/19	SLP 27/19	Thymus	neg
2187/19	SLP 28/19	Thymus	neg
2189/19	SLP 29/19	Thymus	$1,95 \times 10^5$
2191/19	SLP 30/19	Thymus	$7,76 \times 10^4$
2193/19	SLP 31/19	Thymus	$4,58 \times 10^4$
2163/19	SLP 69/19	Parotis	$1,84 \times 10^6$
2168/19	SLP 70/19	Parotis	$4,71 \times 10^5$
2173/19	SLP 71/19	Parotis	$2,49 \times 10^9$
2178/19	SLP 72/19	Parotis	$3,63 \times 10^7$
2164/19	SLP 69/19	Tonsille	$4,29 \times 10^5$
2169/19	SLP 70/19	Tonsille	$7,84 \times 10^5$
2174/19	SLP 71/19	Tonsille	$1,06 \times 10^9$
2179/19	SLP 72/19	Tonsille	$3,70 \times 10^5$
2184/19	SLP 27/19	Lymphknoten	neg
2186/19	SLP 28/19	Lymphknoten	$2,10 \times 10^5$
2188/19	SLP 29/19	Lymphknoten	$6,86 \times 10^4$
2190/19	SLP 30/19	Lymphknoten	$1,44 \times 10^5$
2192/19	SLP 31/19	Lymphknoten	$3,40 \times 10^5$

2165/19	SLP 69/19	Rückenmark	$6,30 \times 10^5$
2170/19	SLP 70/19	Rückenmark	$1,13 \times 10^6$
2175/19	SLP 71/19	Rückenmark	$6,56 \times 10^9$
2180/19	SLP 72/19	Rückenmark	$4,46 \times 10^6$
457/19	SLP 27/19	Kleinhirn	neg
459/19	SLP 28/19	Kleinhirn	neg
461/19	SLP 29/19	Kleinhirn	$4,54 \times 10^4$
463/19	SLP 30/19	Kleinhirn	$1,11 \times 10^5$
465/19	SLP 31/19	Kleinhirn	neg
2194/19	SLP 69/19	Herz	neg
2195/19	SLP 70/19	Herz	neg
2196/19	SLP 71/19	Herz	$3,45 \times 10^{10}$
2197/19	SLP 72/19	Herz	$1,49 \times 10^6$

5. Diskussion

Die Porzine Circovirose stellt eine der relevantesten Infektionskrankheiten in den Schweinebeständen weltweit dar. Die unterschiedlichen Krankheitsbilder führen teilweise zu großen Einbußen und Verlusten (2). Trotz Impfungen kann es immer wieder zu Krankheitsausbrüchen kommen (13). Das Auftreten der neuen Spezies PCV3 zeigt, dass immer wieder neue Viren entdeckt werden, die veterinärmedizinisch und wirtschaftlich relevant sein können (3). Da genau aus diesem Grund diese neuen Viren eine potentielle Gefahr für die Gesundheit der Schweine darstellen, ist es sinnvoll in der Diagnostik eine PCR zu nutzen, die zeitgleich und damit zeit- und kostensparend das Vorhandensein mehrerer Viren überprüft. Für die Etablierung einer Duplex-PCR müssen verschiedene Aspekte beachtet werden. Zum einen dürfen die unterschiedlichen Bestandteile (Primer, Sonden) aus den jeweiligen Protokollen nicht miteinander interagieren. Zum anderen müssen die Temperaturen der einzelnen Phasen beider Protokolle gleich oder aneinander anpassbar sein. Es ist eine technische Voraussetzung, dass sich die Fluoreszenzsonden in ihrem Emissionsspektrum unterscheiden und von dem verwendeten Gerät getrennt voneinander messbar sind (48). In dieser Arbeit stimmen die Temperaturprotokolle schon von vornherein überein und das Emissionsspektrum der Sonden unterscheidet sich. Dies stellt eine sehr gute Voraussetzung für die Zusammenführung dar. Zur Überprüfung der Nachweisgrenzen und Vergleichbarkeit der Ergebnisse der Mono- und Duplex-PCR wurden standardisierte Verdünnungsreihen genutzt und die PCR immer im Doppelansatz durchgeführt. In der PCV2-Monoplex-PCR wurde der Standard bis zu einer Verdünnung von 10^{-8} als positiv erkannt. In der PCV3 Monoplex-PCR wurde der Standard bis zu einer Verdünnung von 10^{-9} als positiv erkannt. In der PCV2 und PCV3 Duplex-PCR wurden dieselben PCV2- und PCV3-Verdünnungsreihen jeweils bis zu einer Verdünnung von 10^{-9} genutzt. Beide wurden ausschließlich in ihrem jeweiligen Kanal in allen angesetzten Verdünnungen als positiv erkannt. Die mitgeführten Negativkontrollen waren stets negativ. Die Nachweisgrenze der PCV2-/PCV3-Duplex-qPCR konnte somit mit 38 GE/ μ l Extrakt für PCV2 ($\cong 6,5 \times 10^5$ GE/g Gewebe) und mit 10 GE/ μ l Extrakt für PCV3 ($\cong 1,7 \times 10^5$ GE/g Gewebe) angenommen werden. Diese Ergebnisse zeigen, dass es zu keinen bedeutenden Nachteilen bei den Nachweisgrenzen durch die Zusammenführung der Protokolle als Duplex-PCR kommt. Daraus lässt sich ableiten, dass sich die Duplex-qPCR für den Einsatz in der Routinediagnostik eignet. Um ihre Tauglichkeit und Zuverlässigkeit noch zusätzlich mit Feldproben zu überprüfen, wurden bereits extrahierte Proben aus der PRRSV-Diagnostik aus den Jahren 2017 bis 2019 verwendet und getestet. Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen die Hypothese und

bestätigen, dass das Porzine Circovirus 3 auch in Österreich prävalent ist. Die Überrepräsentation der Bundesländer Niederösterreich, Oberösterreich und Steiermark lässt sich allerdings darauf zurückführen, dass diese die höchste Dichte an Ställen oder viel mehr die höchste Anzahl an Schweinen besitzen (56) und dementsprechend die Proben fast ausschließlich aus diesen Bundesländern kamen. Darüber hinaus stammten die verwendeten Feldproben von Tieren, die ursprünglich auf PRRSV untersucht wurden. Da das PCV verschiedene Krankheitsbilder hervorruft und nicht nur solche im Zusammenhang mit einer PRRSV-typischen Symptomatik, handelte es sich hierbei nicht um eine repräsentative Stichprobe für die PCV3-Prävalenz. Zur Klärung dieser Fragestellung sind weitere Studien mit randomisierten Proben und einer weit höheren Probenanzahl sinnvoll. Es kann dennoch festgehalten werden, dass die neu etablierte PCV2- und PCV3-Duplex-PCR ausreichend aussagekräftige Ergebnisse hervorbringt und damit in der Diagnostik eingesetzt werden kann.

Die Ergebnisse in Bezug auf das zeitgleiche Vorkommen mit anderen Viren zeigen, dass die Koinfektionsrate von PCV3 mit PCV2 bei circa 30,77 % liegt und die Koinfektionsrate mit PRRSV bei circa 46,15 %. Damit bestätigt diese Arbeit andere Studien, die ebenfalls belegen, dass PCV-Koinfektionen nicht selten vorkommen (57). Es werden Koinfektionen von PCV2 mit PRRSV bis zu 85 % (39), PCV3 mit PRRSV bis zu 25 % (7) oder PCV2 und PCV 3 bis 70% (38) beschrieben. Solche Koinfektionen können theoretisch nur eine Reflektion der weiten Verbreitung von Hauptpathogenen wie PCV2 und PRRSV darstellen, ohne dass ein potentielles Zusammenspiel beziehungsweise Wechselwirken der Erreger dahintersteckt. Allerdings zeigen Studien, dass diese häufig dann detektiert werden, wenn schwere Verläufe zu finden sind. Im Gegensatz dazu zeigen milde Krankheitsverläufe häufig keine Koinfektionen (58). Dieser potentielle Synergismus erfordert ebenfalls weitere Untersuchungen. Es ist außerdem ein weiterer wichtiger Grund für die Etablierung von Duplex- beziehungsweise Multiplex-PCR. Eine funktionierende Duplex- beziehungsweise Multiplex-PCR ist zudem zeit- und kostensparend.

Bei den Ferkelorganen aus dem PCV3-positiven Betrieb zeigte sich, dass die nachweisbaren PCV3-Genomequivalente in jedem beprobten Tier in einem anderen Organ am höchsten waren. Unabhängig davon wie hoch das Ergebnis in den anderen Organen war, fiel der Nachweis im Serum bei fast allen Proben negativ aus. Der Grund dafür liegt in einer kurzen Virämie und dies belegt, dass Serum kein gut geeignetes Probenmaterial für den Nachweis von porzinen Circoviren ist (54). Diese Ergebnisse weisen insgesamt aber darauf hin, dass die Probennahme bei erkrankten Tieren, die klinisch auffällig sind, in den Organsystemen beziehungsweise in

den Organen erfolgen kann und sollte. Bei Totgeburten und mumifizierten oder ödematisierten Föten weisen multifokale Verfärbungen des Myokards beispielsweise auf die PCV-assoziierten Reproduktionsstörungen hin (22). Neben deutlich vergrößerten Lymphknoten kann eine schlecht retrahierte Lunge mit bräunlichen Flecken ein Hinweis auf die PCV2-assoziierte respiratorische Erkrankung sein (18) oder in Zusammenhang mit weißen Flecken in der Nierenrinde und einer verfärbten Leber auf die PCV2-assoziierte systemische Erkrankung (14).

Die Relevanz von PCV3 in der Schweinemedizin wird immer deutlicher. In der Literatur variieren berichtete klinische Anzeichen im Zusammenhang mit einer PCV3-Infektion. Sie umfassen nahezu alle Krankheitsbilder, die in Verbindung mit einer PCV2-Infektion bekannt sind. Bei der Entdeckung in 2016 waren PDNS-Symptome und Reproduktionsstörungen die Hauptsymptomatik. Die abortierten Tiere waren mumifizierte Föten in verschiedenem Alter und haben der Symptomatik der PCV2-assoziierten Reproduktionsstörung entsprochen. In den Organproben dieser Föten wurden hohe PCV3-Titer gefunden (3). Multisystemische Entzündungen und Reproduktionsversagen sind in der Literatur jedoch konsistent und betreffen Probleme im Zusammenhang mit einer PCV3-Infektion. Das Vorhandensein von PCV3-Nukleinsäure durch In-situ-Hybridisierung in klinischen Proben liefert wesentliche Beweise, die die Rolle von PCV3 bei systemischer Entzündung und Reproduktionsversagen unterstützen (34,59). Im Gegensatz zu den Reproduktionsstörungen konnten in Schweinen mit anderen PCV-assoziierten Erkrankungen eher niedrige PCV3-Titer ermittelt werden (58). Eine Studie aus Brasilien fand ebenfalls sehr hohe Prävalenzen in mumifizierten Föten, was indiziert, dass PCV3 als Pathogen zu Reproduktionsstörungen und speziell zu mumifizierten Föten führt und weiter untersucht werden sollte (35). Obwohl der molekulare Nachweis von PCV3 in fötalem Gewebe allein nicht ausreicht, um die virale Rolle in der Pathogenese nachzuweisen, sollte das hohe Vorkommen dieses Virus in mumifizierten Schweineföten weiter untersucht und evaluiert werden. Dahingehend könnte eine Studie zur Pathogenese mit Infektion trächtiger Sauen sinnvoll sein.

6. Zusammenfassung

Das Porzine Circovirus 2, das 1974 das erste Mal isoliert werden konnte, gilt als Haupterreger der Porzinen Circovirose und als eines der relevantesten Viren in der Schweinemedizin. Auch das 2016 neu entdeckte Porzine Circovirus 3 wird verantwortlich gemacht die typischen Krankheitsbilder einer Porzinen Circovirose auslösen zu können, wenn das PCV2 selbst durch eine PCR nicht nachweisbar ist. Aus diesem Grund ist es sinnvoll, Duplex- beziehungsweise Multiplex-qPCR zu etablieren, die zeit- und kostensparend das Vorhandensein mehrerer Viren gleichzeitig überprüfen können. Ziel dieser Arbeit war es, eine solche Duplex-qPCR zum Nachweis PCV2- und PCV3-spezifischer Nukleinsäuren zu etablieren und retrospektiv die Prävalenz von PCV3 in österreichischen Schweinen einzuschätzen. Dazu wurden Sonden und Standards auf ihre Funktion überprüft und die Nachweisgrenze der Monoplex-qPCR mit den Nachweisgrenzen der Duplex-qPCR verglichen. Ergänzend wurden im Anschluss Feldproben getestet, um sowohl Praxistauglichkeit und Zuverlässigkeit, als auch geeignetes Probenmaterial zu verifizieren. Die Untersuchungen haben gezeigt, dass die Duplex-qPCR mit vergleichbaren Nachweisgrenzen die Viren detektieren und voneinander unterscheiden kann. PCV3 ist in Österreich prävalent. Probenmaterialentnahmen sollten aus den Organsystemen erfolgen, die klinisch auffällig sind. Diese können neben deutlich vergrößerten Lymphknoten eine schlecht retrahierte Lunge mit bräunlichen Verfärbungen und eine verfärbte Leber sein oder multifokale Verfärbungen des Myokards bei Totgeburten oder mumifizierten Föten. Einzig Serum scheint aufgrund der kurzen Virämie kein geeignetes Material für die PCR zu sein.

7. Abstract

Porcine circovirus 2 (PCV2), which was isolated for the first time in 1974, is considered as the main pathogenic agent that causes porcine circovirus and is also known as one of the most important viruses in swine medicine. In 2016 the new virus PCV3 was detected, which may cause a characteristic disease pattern primarily known for PCV2, although PCV2 could not be detected. Therefore developing duplex- or multiplex PCRs for detecting different infectious agents simultaneously in one sample is indicated, to save money and time. The aim of this project was to evaluate such a new duplex-PCR to detect PCV2- and PCV3-nucleic acids and to estimate the prevalence of PCV3 in austrian pigs retrospectively. For this reason, probes and standards were verified regarding their function and PCR detection limit were compared. Afterwards field samples were used to verify the reliability and suitability for routine use and to find out which material is the most suitable. It was shown that the duplex qPCR could detect and differentiate the viruses with similar detection limit, compared to the monoplex-qPCR. PCV3 is prevalent in Austria and samples should be taken from organ systems that present with pathologic signs. This could be enlarged lymph nodes, a badly retracted lung, a discolored liver or multifocal discolorations of the myocard in aborted piglets. Serum samples were all negative, except for one. Therefore serum seems not being a matrix for reliably detect PCV3 in infected animals.

8. Literaturverzeichnis

1. Knipe DM, Howley PM, Herausgeber. Fields virology. 6th ed. Philadelphia, PA: Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins Health; 2013. 2 S.
2. Reiner G. Krankes Schwein - kranker Bestand. Stuttgart: Verlag Eugen Ulmer; 2015. 320 S. (UTB Veterinärmedizin).
3. Palinski R, Piñeyro P, Shang P, Yuan F, Guo R, Fang Y, u. a. A Novel Porcine Circovirus Distantly Related to Known Circoviruses Is Associated with Porcine Dermatitis and Nephropathy Syndrome and Reproductive Failure. *J Virol*. 1. Januar 2017;91(1):e01879-16.
4. Zhang HH, Hu WQ, Li JY, Liu TN, Zhou JY, Opriessnig T, u. a. Novel circovirus species identified in farmed pigs designated as Porcine circovirus 4, Hunan province, China. *Transbound Emerg Dis*. Mai 2020;67(3):1057–61.
5. Breitbart M, Delwart E, Rosario K, Segalés J, Varsani A, ICTV Report Consortium YR 2017. ICTV Virus Taxonomy Profile: Circoviridae. *Journal of General Virology*. 1. August 2017;98(8):1997–8.
6. Franzo G, Segalés J. Porcine circovirus 2 (PCV-2) genotype update and proposal of a new genotyping methodology. *PLoS One*. 2018;13(12):e0208585.
7. Fu X, Fang B, Ma J, Liu Y, Bu D, Zhou P, u. a. Insights into the epidemic characteristics and evolutionary history of the novel porcine circovirus type 3 in southern China. *Transbound Emerg Dis*. April 2018;65(2):e296–303.
8. Rosell C, Segalés J, Plana-Durán J, Balasch M, Rodríguez-Arrioja GM, Kennedy S, u. a. Pathological, immunohistochemical, and in-situ hybridization studies of natural cases of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs. *J Comp Pathol*. Januar 1999;120(1):59–78.
9. Segalés J, Domingo M. Postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs. A review. *Vet Q*. September 2002;24(3):109–24.
10. große Beilage E, Wendt M. Diagnostik und Gesundheitsmanagement im Schweinebestand. Stuttgart: Ulmer; 2013. 508 S. (UTB; Bd. 1).
11. Opriessnig T, Meng XJ, Halbur PG. Porcine circovirus type 2 associated disease: update on current terminology, clinical manifestations, pathogenesis, diagnosis, and intervention strategies. *J Vet Diagn Invest*. November 2007;19(6):591–615.
12. Horlen KP, Dritz SS, Nietfeld JC, Henry SC, Hesse RA, Oberst R, u. a. A field evaluation of mortality rate and growth performance in pigs vaccinated against porcine circovirus type 2. *J Am Vet Med Assoc*. 15. März 2008;232(6):906–12.
13. Segalés J, Allan GM, Domingo M. Porcine circovirus diseases. *Anim Health Res Rev*. Dezember 2005;6(2):119–42.
14. Clarke EG. Post-weaning wasting syndrome. In: *Proceedings of the American Association of Swine Practitioners*. 1997. S. 499–501.
15. Harding J. Post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS): Preliminary epidemiology and clinical presentation. In: *Proceedings of the American Association of Swine Practitioners*. 1997. S. 503.
16. Harms P, Halbur P, Sorden S. Three cases of porcine respiratory disease complex associated with porcine circovirus type 2 infection. *J Swine Health Prod*. 1. Januar 2002;10.
17. Kim J, Chung HK, Chae C. Association of porcine circovirus 2 with porcine respiratory disease complex. *Vet J*. November 2003;166(3):251–6.
18. Larochelle R, Sauvageau R, Magar R. Immunohistochemical detection of swine influenza virus and porcine reproductive and respiratory syndrome virus in porcine proliferative and necrotizing pneumonia cases from Québec. *Can Vet J*. August 1994;35(8):513–5.

19. Kim J, Ha Y, Jung K, Choi C, Chae C. Enteritis associated with porcine circovirus 2 in pigs. *Can J Vet Res.* Juli 2004;68(3):218–21.
20. Madson DM, Patterson AR, Ramamoorthy S, Pal N, Meng XJ, Opriessnig T. Reproductive failure experimentally induced in sows via artificial insemination with semen spiked with porcine circovirus type 2. *Vet Pathol.* Juli 2009;46(4):707–16.
21. O'Connor B, Gauvreau H, West K, Bogdan J, Ayroud M, Clark EG, u. a. Multiple porcine circovirus 2-associated abortions and reproductive failure in a multisite swine production unit. *Can Vet J.* Juli 2001;42(7):551–3.
22. West KH, Bystrom JM, Wojnarowicz C, Shantz N, Jacobson M, Allan GM, u. a. Myocarditis and abortion associated with intrauterine infection of sows with porcine circovirus 2. *J Vet Diagn Invest.* November 1999;11(6):530–2.
23. Allan GM, McNeilly E, Kennedy S, Meehan B, Moffett D, Malone F, u. a. PCV-2-associated PDNS in Northern Ireland in 1990. Porcine dermatitis and nephropathy syndrome. *Vet Rec.* 10. Juni 2000;146(24):711–2.
24. Drolet R, Thibault S, D'Allaire S, Thomson J, Done S. Porcine dermatitis and nephropathy syndrome (PDNS): An overview of the disease. *Journal of Swine Health and Production.* 1. November 1999;7.
25. Rosell C, Segalés J, Ramos-Vara JA, Folch JM, Rodríguez-Arrioja GM, Duran CO, u. a. Identification of porcine circovirus in tissues of pigs with porcine dermatitis and nephropathy syndrome. *Vet Rec.* 8. Januar 2000;146(2):40–3.
26. Seeliger FA, Brüggemann ML, Krüger L, Greiser-Wilke I, Verspohl J, Segalés J, u. a. Porcine circovirus type 2-associated cerebellar vasculitis in postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS)-affected pigs. *Vet Pathol.* September 2007;44(5):621–34.
27. Stevenson GW, Kiupel M, Mittal SK, Choi J, Latimer KS, Kanitz CL. Tissue distribution and genetic typing of porcine circoviruses in pigs with naturally occurring congenital tremors. *J Vet Diagn Invest.* Januar 2001;13(1):57–62.
28. Ye X, Berg M, Fossum C, Wallgren P, Blomström AL. Detection and genetic characterisation of porcine circovirus 3 from pigs in Sweden. *Virus Genes.* Juni 2018;54(3):466–9.
29. Hayashi S, Ohshima Y, Furuya Y, Nagao A, Oroku K, Tsutsumi N, u. a. First detection of porcine circovirus type 3 in Japan. *J Vet Med Sci.* 26. September 2018;80(9):1468–72.
30. Yuzhakov AG, Raev SA, Alekseev KP, Grebennikova TV, Verkhovsky OA, Zaberezhny AD, u. a. First detection and full genome sequence of porcine circovirus type 3 in Russia. *Virus Genes.* August 2018;54(4):608–11.
31. Tochetto C, Lima DA, Varela APM, Loiko MR, Paim WP, Scheffer CM, u. a. Full-Genome Sequence of Porcine Circovirus type 3 recovered from serum of sows with stillbirths in Brazil. *Transbound Emerg Dis.* Februar 2018;65(1):5–9.
32. Franzo G, Legnardi M, Hjulsager CK, Klaumann F, Larsen LE, Segales J, u. a. Full-genome sequencing of porcine circovirus 3 field strains from Denmark, Italy and Spain demonstrates a high within-Europe genetic heterogeneity. *Transbound Emerg Dis.* Juni 2018;65(3):602–6.
33. Faccini S, Barbieri I, Gilioli A, Sala G, Gibelli LR, Moreno A, u. a. Detection and genetic characterization of Porcine circovirus type 3 in Italy. *Transbound Emerg Dis.* Dezember 2017;64(6):1661–4.
34. Arruda B, Piñeyro P, Derscheid R, Hause B, Byers E, Dion K, u. a. PCV3-associated disease in the United States swine herd. *Emerg Microbes Infect.* 2019;8(1):684–98.
35. Dal Santo AC, Cezario KC, Bennemann PE, Machado SA, Martins M. Full-genome sequences of porcine circovirus 3 (PCV3) and high prevalence in mummified fetuses from commercial farms in Brazil. *Microb Pathog.* April 2020;141:104027.
36. Wen S, Sun W, Li Z, Zhuang X, Zhao G, Xie C, u. a. The detection of porcine

- circovirus 3 in Guangxi, China. *Transboundary and Emerging Diseases*. 2018;65(1):27–31.
37. Sukmak M, Thanantong N, Poolperm P, Boonsoongnern A, Ratanavanichrojn N, Jirawattanapong P, u. a. The retrospective identification and molecular epidemiology of porcine circovirus type 3 (PCV3) in swine in Thailand from 2006 to 2017. *Transboundary and Emerging Diseases*. 2019;66(1):611–6.
 38. Guo Z, Ruan H, Qiao S, Deng R, Zhang G. Co-infection status of porcine circoviruses (PCV2 and PCV3) and porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) in pigs with watery diarrhea in Henan province, central China. *Microb Pathog*. 6. Februar 2020;142:104047.
 39. Drolet R, Larochelle R, Morin M, Delisle B, Magar R. Detection Rates of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus, Porcine Circovirus Type 2, and Swine Influenza Virus in Porcine Proliferative and Necrotizing Pneumonia. *Vet Pathol*. 1. März 2003;40(2):143–8.
 40. Franzo G, Grassi L, Tucciarone CM, Drigo M, Martini M, Pasotto D, u. a. A wild circulation: High presence of Porcine circovirus 3 in different mammalian wild hosts and ticks. *Transbound Emerg Dis*. Juli 2019;66(4):1548–57.
 41. Ouyang T, Niu G, Liu X, Zhang X, Zhang Y, Ren L. Recent progress on porcine circovirus type 3. *Infect Genet Evol*. September 2019;73:227–33.
 42. Tan CY, Lin CN, Ooi PT. What do we know about porcine circovirus 3 (PCV3) diagnosis so far?: A review. *Transbound Emerg Dis*. November 2021;68(6):2915–35.
 43. Jiang H, Wang D, Wang J, Zhu S, She R, Ren X, u. a. Induction of Porcine Dermatitis and Nephropathy Syndrome in Piglets by Infection with Porcine Circovirus Type 3. *J Virol*. 5. Februar 2019;93(4):e02045-18.
 44. Kixmüller M, Ritzmann M, Eddicks M, Saalmüller A, Elbers K, Fachinger V. Reduction of PMWS-associated clinical signs and co-infections by vaccination against PCV2. *Vaccine*. 25. Juni 2008;26(27–28):3443–51.
 45. StIKo Vet. Leitlinie zur Impfung von Schweinen [Internet]. Friedrich-Löffler-Institut; 2019 Feb [zitiert 19. September 2022]. Verfügbar unter: https://www.openagrar.de/servlets/MCRFileNodeServlet/openagrar_derivate_00020080/Impfleitlinie-Schweine_2019-02-01.pdf
 46. Unterweger C, Brunthaler R, Auer A, Fux R, Weissenbacher-Lang C, Ladinig A. Reconsideration of the diagnostic criteria required for PCV2 reproductive disease. *The Veterinary Journal*. 1. Juni 2021;272:105660.
 47. Jensen E. Technical review: In situ hybridization. *Anat Rec (Hoboken)*. August 2014;297(8):1349–53.
 48. Buckingham L. *Molecular diagnostics: fundamentals, methods, and clinical applications*. Third edition. Philadelphia: F.A. Davis Company; 2019. 1 S.
 49. Magaki S, Hojat SA, Wei B, So A, Yong WH. An Introduction to the Performance of Immunohistochemistry. *Methods Mol Biol*. 2019;1897:289–98.
 50. McNeilly F, Kennedy S, Moffett D, Meehan BM, Foster JC, Clarke EG, u. a. A comparison of in situ hybridization and immunohistochemistry for the detection of a new porcine circovirus in formalin-fixed tissues from pigs with post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *J Virol Methods*. Juli 1999;80(2):123–8.
 51. Segalés J, Sibila M. Revisiting Porcine Circovirus Disease Diagnostic Criteria in the Current Porcine Circovirus 2 Epidemiological Context. *Vet Sci*. 2. März 2022;9(3):110.
 52. Harding JCS, Baker CD, Tumber A, McIntosh KA, Parker SE, Middleton DM, u. a. Porcine circovirus-2 DNA concentration distinguishes wasting from nonwasting pigs and is correlated with lesion distribution, severity, and nucleocapsid staining intensity. *J Vet Diagn Invest*. Mai 2008;20(3):274–82.
 53. Grau-Roma L, Hjulsgaard CK, Sibila M, Kristensen CS, López-Soria S, Enøe C, u. a. Infection, excretion and seroconversion dynamics of porcine circovirus type 2 (PCV2) in pigs from post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) affected farms in Spain and

Denmark. *Vet Microbiol.* 30. März 2009;135(3–4):272–82.

54. Pensaert MB, Sanchez RE, Ladekjær-Mikkelsen AS, Allan GM, Nauwynck HJ. Viremia and effect of fetal infection with porcine viruses with special reference to porcine circovirus 2 infection. *Veterinary Microbiology.* 4. Februar 2004;98(2):175–83.

55. Hoffmann B. AVID-Methodensammlung: AVID-Methode VIR02 [Internet].

Friedrich-Löffler-Institut. 2016 [zitiert 27. März 2022]. Verfügbar unter:

http://avid.dvg.net/fileadmin/Bilder/PDF_AVID_Alt/website/Methoden_ab_2016/AVID-Methode_VIR02_porcines_Circovirus_2_final.pdf

56. Statistik Austria. Viehbestand jährlich [Internet]. 2021 [zitiert 1. Juli 2022]. Verfügbar unter: <https://www.statistik.at/statistiken/land-und-forstwirtschaft/tiere-tierische-erzeugung/viehbestand/viehbestand-jaehrlich>

57. Ouyang T, Zhang X, Liu X, Ren L. Co-Infection of Swine with Porcine Circovirus Type 2 and Other Swine Viruses. *Viruses.* 21. Februar 2019;11(2):185.

58. Zhai SL, Zhou X, Zhang H, Hause BM, Lin T, Liu R, u. a. Comparative epidemiology of porcine circovirus type 3 in pigs with different clinical presentations. *Virol J.* 13. November 2017;14:222.

59. Phan TG, Giannitti F, Rossow S, Marthaler D, Knutson TP, Li L, u. a. Detection of a novel circovirus PCV3 in pigs with cardiac and multi-systemic inflammation. *Virol J.* 11. November 2016;13(1):184.