

Aus dem Department für Pathobiologie
der Veterinärmedizinischen Universität Wien

Institut für Virologie

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

Retrospektive Untersuchungen von Aborten, Tot- /Frühgeburten und Mumien bei Schweinen auf das Vorhandensein von Genomfragmenten von Porzinem Circovirus 3 und 4

Diplomarbeit

Veterinärmedizinische Universität Wien

Vorgelegt von

Florian Schriebl

Wien, Juli 2023

Betreuerin: Dr.med.vet. Angelika Auer, Institut für Virologie, Veterinärmedizinische Universität Wien

Eigenständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, Florian Schriebl, die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst zu haben und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt zu haben.

Alle sinngemäß und wörtlich übernommenen Textstellen aus fremden Quellen wurden kenntlich gemacht. Der wesentliche Teil der Arbeit wurde selbst durchgeführt und all jene, welche mir geholfen haben, wurden in der Arbeit (Danksagung) erwähnt. Ebenso wurde die Arbeit nicht woanders eingereicht oder veröffentlicht.

Wien, Juli 2023

Danksagung

Hiermit möchte ich mich herzlich bei Dr. Angelika Auer, meiner hervorragenden Betreuerin, bei Prof. Hans Tillmann Rümenapf, der mir die Möglichkeit gegeben hat diese Diplomarbeit zu beginnen, und auch bei Dr. Lukas Schwarz für seinen wertvollen Input in der Planungsphase und sein konstruktives Feedback bei der Präsentation bedanken.

Inhaltsverzeichnis

1	Abstract	1
1.1	Deutsch	1
1.2	Englisch	1
2	Abkürzungsverzeichnis	3
3	Einleitung	4
3.1	Literaturrecherche	4
3.1.1	Zurzeit bekannte Aborterreger bei Schweinen	4
3.1.2	Porzine Circoviren	4
3.1.3	Co-Infektionen mit PCV	9
3.1.4	Cross-species transmission	10
3.2	Fragestellung / Diese Studie	11
3.3	Hypothesen	11
4	Material und Methode	12
4.1	Herstellung der Extraktepools	12
4.2	Standardverdünnungen und Überprüfung des Detektionslimits	12
4.3	PCV3- und PCV4-qPCRs	13
4.4	PCV3- und PCV4-qPCR als Duplex-PCR	14
5	Ergebnisse	15
5.1	Ergebnisse der Standard-Testung und Evaluierung der PCV4-qPCR	15
5.2	Ergebnisse der PCV3-Testung der Extraktepools	16
5.3	Ergebnisse der PCV4-Testung der Extraktepools	18
5.4	Ergebnisse der PCV3- und PCV4-Duplex-qPCR	18
6	Diskussion	23
6.1	Etablierung der PCV4-qPCR	23
6.2	PCV3-qPCR und PCV4-qPCR im Duplex-qPCR	23
6.3	PCV3	24

6.4	PCV4.....	25
7	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....	27
8	Literaturverzeichnis.....	28

1 Abstract

1.1 Deutsch

In dieser Diplomarbeit wurde die Nachweishäufigkeit von Porzinem Circovirus 3 und Porzinem Circovirus 4 in Abortmaterial österreichischer Ferkelproduktionsbetriebe untersucht. Diese neuartigen Circoviren werden mit verschiedenen klinischen Symptomen wie das Porzine Dermatitis und Nephropathie Syndrom, Aborten, Totgeburten und Atemwegserkrankungen in Verbindung gebracht. Im Rahmen dieser Studie wurden 97 Betriebe (296 Abortproben) aus verschiedenen Regionen Österreichs mittels quantitativer Polymerase-Kettenreaktion auf das Vorhandensein spezifischer Nukleinsäuren von Porzinem Circovirus 3 und 4 untersucht. Zu diesem Zweck wurde ergänzend zu der bereits am Institut für Virologie etablierten quantifizierende Polymerase-Kettenreaktion für das Porzine Circovirus 3 eine quantifizierende Polymerase-Kettenreaktion zum Nachweis von Porzinem Circovirus 4 spezifischer Nukleinsäuren etabliert. In Proben aus fünf von 97 Schweinebeständen (5,15 %) konnte Porzines Circovirus 3 nachgewiesen werden, das Porzine Circovirus 4 aber in keiner der Proben nachgewiesen werden konnte. Dies deutet darauf hin, dass das Porzine Circovirus 3, im Gegensatz zum Porzinen Circovirus 4, in Österreich zirkuliert und ein Zusammenhang mit dem Abortgeschehen nicht ausgeschlossen werden kann. Die Studie schloss eine diagnostische Lücke bezüglich des Nachweises dieser beiden Erreger und lieferte eine wichtige Basis für weiterführende Untersuchungen.

1.2 Englisch

In this study the detection frequency of porcine circovirus 3 and porcine circovirus 4 in abortion material from Austrian piglet production farms was investigated. These novel circoviruses are associated with various clinical symptoms such as porcine dermatitis nephropathy syndrome, abortions, stillbirths and respiratory diseases. In this study, 97 farms (296 abortion samples) from different regions of Austria were analysed for the presence of specific nucleic acids of porcine circovirus 3 and 4 by quantitative polymerase chain reaction. In addition to the quantifying polymerase chain reaction for porcine circovirus 3 already established at the Institute of Virology, a quantifying polymerase chain reaction was established for the detection of porcine circovirus 4 specific nucleic acids. Samples of five out of 97 pig herds (5.15 %) tested positive for porcine circovirus 3, but porcine circovirus 4 could not be detected in any of the samples. This indicates that porcine circovirus 3, in contrast to porcine circovirus 4, is circulating in Austria and a connection with abortion cannot be excluded. The study closed a

diagnostic gap regarding the detection of these two pathogens and provided an important basis for further investigations.

2 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
APPV	Atypisches Porzines Pestivirus
Cap	Kapsidprotein
EMCV	Encephalomyocarditis Virus
FFPE	Formalin-fixiert Paraffin-eingebettet
GE	Genomäquivalente
NEB	New England Biolabs
NTC	No Template Control
ORFs	Open Reading Frames
PCV	Porzines Circovirus
PCVD	Porzines Circovirus-Assoziierte Krankheiten
PCV2-SD	Porzines Circovirus 2 - Systemic Disease
PCV2-RD	Porzines Circovirus 2 - Reproductive Disease
PDNS	Porzines Dermatitis und Nephropathie Syndrom
PK-15	Pig Kidney-15 (Zelllinie)
PMWS	Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome
PPV	Porzines Parvovirus
PRRS	Porzines Reproduktives und Respiratorisches Syndrom
PRRSV	Porzines Reproduktives und Respiratorisches Syndrom Virus
PTV	Porzines Teschovirus
Rep	Replikaseprotein
Tab.	Tabelle
Upm	Umdrehungen pro Minute

3 Einleitung

3.1 Literaturrecherche

3.1.1 Zurzeit bekannte Aborterreger bei Schweinen

Aborte, Tot- und Frühgeburten sind bis heute ein großes wirtschaftliches Problem in der Ferkelproduktion. Hauptfokus liegt dabei auf dem Nachweis von Porzinem Reproductivem und Respiratorischem Syndrom Virus (PRRSV), Porzinem Circovirus 2 (PCV2) und bei Auftreten von Mumien auf Porzinem Parvovirus 1 (PPV1), dennoch bleiben viele Testergebnisse negativ und die Ätiologie ungeklärt (1). Eine in einem dicht besiedelten Zuchtgebiet in Norditalien durchgeführte Studie ergab, dass viele Fortpflanzungsstörungen bei Schweinen sowohl mit Umweltfaktoren als auch mit Infektionserregern in Zusammenhang stehen. In der Studie wurden 1625 abortierte Föten aus 140 Betrieben über einen Zeitraum von drei Jahren untersucht. Dabei wurde in 323 von 549 Fällen (58,8 %) ein infektiöser Erreger gefunden. Dazu gehörten virale Erreger wie PCV2, PRRSV, PPV1, das Virus der Aujeszky'schen Krankheit und das Encephalomyocarditis-Virus (EMCV), sowie Bakterien wie *Escherichia coli*, *Streptococcus* sp., *Staphylococcus* sp., *Pasteurella* sp., *Shigella* sp. und *Yersinia* sp. (2). Außerdem wurde in einer in Ungarn durchgeführten Studie der Nachweis von Porzinem Circovirus 3 (PCV3) in einem Schweinebetrieb mit Reproduktionsstörungen publiziert (3). Das Porzine Circovirus 4 (PCV4) wurde erstmals im Jahr 2019 in der Provinz Hunan in China in klinischen Proben von Schweinen mit Atemwegssymptomen, Darmsymptomen und Porzinem Dermatitis und Nephropathie Syndrom (PDNS) nachgewiesen (4). Es wurde das Vorhandensein mehrerer Erreger in unterschiedlichen Anteilen beobachtet, eine Co-infektion mit mehreren Erregern für häufig befunden (2,5). Das Verständnis der häufigsten und vorherrschenden Ursachen für Aborte bei Schweinen kann helfen, die Tiergesundheit zu überwachen und Schweinebetriebe optimal zu managen (2).

3.1.2 Porzine Circoviren

Porzine Circoviren (PCV) sind 16–24 Nanometer kleine, unbehüllte, einzelsträngige zirkuläre DNA-Viren, die zur Gattung der Circoviren innerhalb der Familie der Circoviridae gehören (6–9). Das PCV-Genom kodiert zwei Strukturproteine sowie für mehrere Nicht-Strukturproteine. Neben mehreren kleineren Leserahmen gibt es zwei open reading frames (ORFs), nämlich ORF1 und ORF2, welche für das Replikaseprotein (Rep) bzw. für das Kapsidprotein (Cap) kodieren (10,11). Bei Schweinen wurden bisher vier PCV-Spezies identifiziert, darunter das Porzine Circovirus 1 (PCV1), PCV2, PCV3 und PCV4 (4,12–15).

3.1.2.1 Porzines Circovirus 1

Das Porzine Circovirus 1 wurde zunächst als Kontaminante in PK-15 Zellkulturen identifiziert (16). Das Virus ist nicht krankheitserregend und kommt sowohl bei Wild- als auch bei Hausschweinen vor. Auch nach experimenteller Infektion von Schweinen sind keine Krankheitssymptome ausgebildet worden (14,17). Aufgrund seiner nicht vorhandenen Pathogenität ist kein kommerzieller Impfstoff erhältlich.

3.1.2.2 Porzines Circovirus 2

Das Porzine Circovirus 2 wurde als ubiquitärer Erreger erkannt, der mit PCV-assoziierten Krankheiten in Verbindung gebracht wird: „porcine circovirus disease“ (PCVD). PCVD ist eine Bezeichnung für eine Gruppe von Krankheiten, die durch PCV2 verursacht werden, darunter PCV2-Systemic Disease, PDNS und PCV2-assoziiertes Reproduktionsversagen (18–21). Das Porzine Circovirus 2 ist nach wie vor einer der wichtigsten Krankheitserreger, die eine Bedrohung für die globale Schweineindustrie darstellen (21,22). PCV2 ist das am besten untersuchte PCV, die Impfung dagegen wird in der Schweineindustrie in großem Umfang eingesetzt, um PCV-assoziierte Krankheiten zu bekämpfen. Kommerzielle Impfstoffe mit PCV2a-Antigen haben sich als kreuzprotektiv gegen andere Genotypen wie PCV2b und PCV2d erwiesen (5). Jüngste Studien deuten jedoch darauf hin, dass PCV2-Impfstoffe aufgrund der antigenen Heterogenität dieser Viren wahrscheinlich zu keinem Kreuzschutz gegen PCV3 führen (23).

Die Impfung von Ferkeln beim Absetzen und die Impfung von Sauen alle sechs Monate sind zwei Protokolle, die für die Immunisierung von Schweinen gegen PCV2 angewendet werden. Durch die wiederholte Impfung trächtiger Sauen wird ein Schutz gegen die Infektion der Fortpflanzungsorgane aufgebaut, der die Übertragung des Virus auf die Ferkel verhindern kann. In vielen Ländern, darunter auch Kolumbien, hat die Impfung gegen PCV2 zu einem Rückgang der Prävalenz geführt (24). Ebenfalls gibt es zur Vorbeugung Management-Pläne wie z.B. den 20-Punkte Plan von Madec. Dies ist eine Reihe von Maßnahmen zur Bekämpfung von PCV2-Infektionen in Schweinebetrieben. Der Plan wurde von F. Madec und Kollegen entwickelt und basiert auf den Grundsätzen der Stressminimierung, der Verringerung des Kontakts zwischen Schweinen, der Aufrechterhaltung einer guten Hygiene und der Bereitstellung einer guten Ernährung. Der 20-Punkte-Plan umfasst Maßnahmen wie die Begrenzung des Kontakts zu anderen Schweinen, die Einrichtung fester Abtrennungen zwischen den Boxen, die Anwendung des "all in, all out"-Systems in den Betrieben, die

Quarantäne neu erworbener Schweine und die Unterdrückung bestimmter Krankheiten wie die Porzine Parvovirose, PRRS, enzootische Pneumonie und Schweinegrippe, die den Schweregrad von PCV2-induzierten Läsionen erhöhen. Der Plan zielt darauf ab, die Ausbreitung von PCV2-Infektionen zu verhindern und die Auswirkungen der Krankheit auf die Gesundheit und Produktivität der Schweine zu minimieren (25,26).

Die Diagnose von PCVD basiert auf dem Nachweis von PCV2 in Gewebe- oder Serumproben sowie auf dem Vorhandensein kompatibler klinischer Symptome und histopathologischer Läsionen (27,28). Die sogenannte „diagnostische Trias“ für PCV2-reproductive disease (PCV2-RD) umfasst unter anderem ein Reproduktionsversagen in der späten Trächtigkeit, das Vorhandensein einer fibrösen bis nekrotisierenden Myokarditis bei Föten und eine moderate bis hohe Viruslast im fetalen Herzen. Ein Schwellenwert von 10^9 Genomäquivalente (GE)/g fetalem Herzgewebe wird als Indikator für eine PCV2-RD-Diagnose vorgeschlagen (29).

3.1.2.3 Porzines Circovirus 3

Das Porzine Circovirus 3 wurde erstmals 2015 in den Vereinigten Staaten bei gesunden so wie bei kranken Schweinen und Wildschweinen identifiziert, die an PDNS, Fortpflanzungsstörungen, Myokarditis und multisystemischen Entzündungen litten (7,30,31). Nach metagenomischer Sequenzierung wurde es 2016 als neue PCV-Spezies vorgeschlagen (30). Studien beschrieben jeweils PCV3-assoziierte Erkrankungen bei Schweinen in den USA und Thailand, die unter verschiedenen klinischen Symptomen litten (32,33). In Österreich erfolgten die ersten Nachweise von PCV3 in Hausschweinen 2018 und in Wildschweinen 2019 (34,35). Während die Rolle von PCV3 noch umstritten ist und seine potenziellen Auswirkungen auf die Gesundheit von Schweinen noch nicht vollständig geklärt sind, wurde es mit einer Reihe von klinischen und pathologischen Erscheinungen wie Fortpflanzungsstörungen, Atemwegserkrankungen, Durchfall und Störungen des zentralen Nervensystems in Verbindung gebracht (32,33,36). Experimentelle Infektionsstudien haben unterschiedliche Ergebnisse in Bezug auf den Schweregrad der Erkrankung, klinische Anzeichen und pathologische Veränderungen gezeigt, während bei einigen Studien eine klinische Erkrankung beobachtet werden konnte, haben andere nur eine subklinische Infektion gezeigt (37–40). Eine genaue Quantifizierung der Viruslast in klinischem Material ist wichtig für die Untersuchung und Diagnose der Infektion (41). Das Porzine Circovirus 3 wurde weltweit mit verschiedenen klinischen und pathologischen Erscheinungsbildern assoziiert, und obwohl erst kürzlich entdeckt, wurde PCV3-DNA in retrospektiven Studien nachgewiesen, was darauf hindeutet, dass das Virus wahrscheinlich bereits Jahrzehnte vor den ersten Berichten in

Schweinepopulationen weltweit zirkulierte. Seine Pathogenität bleibt jedoch noch unklar (7,12,23,31,32,42). Die Prävalenz von PCV3 variiert sehr stark zwischen den einzelnen Regionen und die früheste Entdeckung reicht weit zurück. So wurde in einer Untersuchung über die molekulare Diagnose und eine retrospektive Analyse von PCV3 in gefrorenem Gewebe und Formalin-fixiertem Paraffin-eingebetteten Schweinegewebe (FFPE) berichtet. Das Gewebe wurde im Zeitraum von 1967 bis 2018 im Südosten Brasiliens (Bundesstaaten Espírito Santo und Rio de Janeiro) gesammelt. Von insgesamt 178 Proben wurden 26 (14,6 %) positiv auf PCV3 getestet. Dabei waren 14 von 35 (40 %) gefrorene Gewebeproben und zwölf von 143 (8,4 %) FFPE-Gewebeproben betroffen. Die Anwesenheit von PCV3 wurde in verschiedenen Zeiträumen, nämlich den 1960er, 1970er, 2000er und 2010er Jahren nachgewiesen. Dabei konnten die Typen PCV3a und PCV3b identifiziert werden. Eine interessante Feststellung war, dass 40 % der symptomfreien Schweine, die als geeignet für den Schlachtbetrieb galten, positiv auf PCV3 getestet wurden. Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass PCV3-DNA bereits 51 Jahre vor den ersten offiziellen Berichten nachgewiesen wurde und dass die älteste sequenzierte Teilkapsidprobe aus dem Jahr 1967 stammt (31). Gemäß einer Studie, die in Kolumbien durchgeführt wurde, zeigte sich eine signifikant niedrigere Prävalenz von PCV3 von 1,19 % in Kotpoolproben in zwei Provinzen während des Zeitraums 2015–2016. Im Gegensatz dazu wurde während des Zeitraums 2018–2019 eine deutlich höhere Prävalenz von PCV3 festgestellt, und zwar 43,5 % in Serumpools und 52,6 % in Fortpflanzungsgeweben. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass sich PCV3 schnell in Regionen mit dichter Schweineproduktion ausbreiten kann (43). In einer Studie in Jianhxi 2020 wurde eine höhere Nachweishäufigkeit von PCV3 bei durchfallerkrankten Saugferkeln (27,3 %) und abgesetzten Ferkeln (14,3 %) im Vergleich zu nicht-durchfallerkrankten Ferkeln festgestellt (6,67 % bei Saugferkeln und 4,76 % bei abgesetzten Ferkeln) (37). In einer polnischen Studie untersuchte man die Verbreitung von PCV3 in 21 polnischen Schweinebetrieben. Dazu wurden Serum-, Kot- und Speichelproben mittels quantitativer Real-Time-PCR analysiert. Insgesamt wurden 1451 Serum- und Kotproben sowie 327 Speichelproben untersucht. Die Ergebnisse zeigten, dass PCV3 häufiger in Speichel (37,3 % positive Proben) nachgewiesen wurde als in Serum (9,7 % positive Proben) oder Kot (15,0 % positive Proben). Bei vier Betrieben mit Reproduktionsstörungen wurden auch fetale Materialien untersucht, wobei PCV3 in 36,0 % der Föten oder totgeborenen Ferkel (9/25) nachgewiesen wurde. Die Studie zeigte, dass die Verbreitungsmuster von PCV3 variieren können und eine angeborene oder frühzeitige Infektion nicht ungewöhnlich ist. In einer ungarischen Studie wurde festgestellt, dass die Prävalenz von PCV3-DNA im Thymusgewebe

mit 89 % am höchsten ist, gefolgt von Lymphknoten mit 60 %, Plazenta mit 50,9 %, Milz mit 21,8 %, Niere mit 7,2 % und Leber mit 5,4 % (3). In einer Untersuchung von 53 deutschen Betrieben unterschiedlicher Lage und Größe wurde das Auftreten von PCV3 bei Mastschweinen untersucht. In 75 % (40/53) der Betriebe konnte PCV3-DNA in mindestens einem Serumpool nachgewiesen werden (44). Derzeit ist kein kommerzieller Impfstoff gegen PCV3 verfügbar, und die Pathogenese und klinische Bedeutung von PCV3 werden noch untersucht (12). Die Entwicklung eines Impfstoffs gegen PCV3 wird jedoch in Erwägung gezogen und mehrere Studien haben über die Bildung von PCV3-spezifischen Antikörpern bei Mäusen und Schweinen berichtet (4,7). Der Nachweis des Virus basiert derzeit auf molekularen Techniken wie konventioneller PCR und qPCR und seine Charakterisierung durch Sanger-Sequenzierung oder next generation sequencing (45).

3.1.2.4 Porzines Circovirus 4

Das Porzine Circovirus 4 ist erst ein kürzlich beschriebenes Virus, das in Schweinebeständen in mehreren Provinzen in China und Südkorea nachgewiesen wurde (4). Das Virus spielt im chinesischen Raum bereits seit längerem eine größere Rolle. So wurde in einer retrospektiven Analyse in Guangxi von 2015 bis 2019 eine Positivrate von 9,1 % für PCV4 festgestellt (46). Bei einem PCR-Screening zufällig ausgewählter Feldproben in der chinesischen Provinz Hunan wurde eine Gesamtprävalenz von 12,8 % für PCV4 festgestellt. Die höchsten Positivraten wurden bei Nasenabstrichen (28,5 %, 6/21) und Serumproben (13,4 %, 11/82) beobachtet (4). Gemäß einer Studie von Nguyen et al. wurde im Zeitraum von 2019 bis 2020 in sechs Provinzen Koreas eine Prävalenzrate von 3,28 % für PCV4 nachgewiesen (47). In einer serologischen Untersuchung von 1790 Serumproben, die zwischen 2008 und 2020 in 17 Provinzen Chinas von Schweinen entnommen und mittels eines indirekten anti-PCV4-IgG-ELISA getestet wurden, wurde eine Gesamtprävalenz von 43,97 % für PCV4 festgestellt. Der ELISA basierte auf dem Replikase-Protein und zeigte keine Kreuzreaktivität mit PCV1, PCV2 und PCV3. PCV4-Rep-Antikörper wurden in Serumproben aus 16 von 17 Provinzen in China nachgewiesen. Die höchste Prävalenz von 67,8 % wurde bei Sauen beobachtet, gefolgt von Mast- und Saugferkeln mit positiven Raten von 35,0 % bzw. 14,6 %. Die niedrigste Rate von 12,6 % wurde bei Jungschweinen festgestellt. Es wurde auch festgestellt, dass die früheste positive Probe aus dem Jahr 2008 stammt. Diese Studie liefert wichtige Erkenntnisse über die Seroprävalenz von PCV4 in den Schweinebeständen Chinas seit der Entdeckung des Virus (48). In einer weiteren Studie wurde ein indirekter ELISA auf der Grundlage des Kapsidproteins entwickelt, um PCV4-Antikörper in Schweineseren nachzuweisen. Nach der Validierung der

Spezifität und Sensitivität wurde der ELISA in einer retrospektiven serologischen Untersuchung von Schweineseren aus der chinesischen Provinz Jiangsu eingesetzt. Es wurde festgestellt, dass 3,44 % der analysierten Proben, die zwischen 2018 und 2021 gesammelt wurden, positiv auf PCV4-Antikörper getestet wurden. Diese Ergebnisse liefern wichtige Erkenntnisse über die Prävalenz von PCV4-Antikörpern in diesen Regionen und tragen zur weiteren Erforschung des Virus bei (49). Niu et al. identifizierten PCV4 als pathogen für Ferkel (50). Eine Studie fand einen geringen Anteil an PCV4-DNA in klinischen Proben von Hunden mit Atemwegs- und Darmerkrankungen aus Südwestchina. Die Ergebnisse zeigten einen geringen Prozentsatz an PCV4-DNA (1,14 %, 3/264), was darauf hindeutet, dass PCV4 bei Hunden im Südwesten Chinas nachgewiesen werden konnte, dies ist der erste Nachweis von PCV4 bei Hunden weltweit. Der Zusammenhang zwischen dem PCV4-Status und klinischen Symptomen bei Hunden sollte weiter untersucht werden (51). Eine weitere Studie hat das vollständige Genom eines PCV4-Stammes aus einem Hund sequenziert und analysiert und wies eine hohe Identität (97,9–99,0 %) mit anderen PCV4-Stämmen auf, die von Schweinen, Milchkühen, Marderhunden und Füchsen stammen (52). Über das Vorkommen von PCV4 in Europa gibt es nur wenige Informationen. Laut einer im Jahr 2020 veröffentlichten Studie wurde PCV4 in Italien und Spanien nicht nachgewiesen (53). Die begrenzte geografische Verbreitung von PCV4 und seine mögliche Beschränkung auf China legen jedoch nahe, dass weitere Untersuchungen erforderlich sind, um sein Vorkommen in Europa zu bestätigen (53). Da es sich bei PCV4 um ein neu auftretendes Virus handelt, gibt es derzeit keinen Impfstoff dagegen. Weitere Forschung ist erforderlich, um die Pathogenität und Rolle von PCV4 zu verstehen, um die potenzielle Gefährdung der Schweineindustrie zu bestätigen und bei Bedarf wirksame Impfstoffe dagegen zu entwickeln (4,53,54).

3.1.3 Co-Infektionen mit PCV

Es gibt Berichte über Co-Infektionen mit verschiedenen Arten von PCV, einschließlich PCV2 und PCV3. In einer Studie in China wurde festgestellt, dass PCV2 und PCV3 häufig gemeinsam vorkommen. Die Raten der Co-Infektionen mit PCV2 + PCV3, PCV2 + PCV4, PCV3 + PCV4 und PCV2 + PCV3 + PCV4 lagen bei 47,2 %, 7,41 %, 7,4 % bzw. 5,6 %. Die Studie ergab, dass Co-Infektionen mit PCV2, PCV3 und PCV4 häufig im Lungengewebe von Ferkeln nachgewiesen wurden. Die Auswirkungen von Co-Infektionen auf bestimmte klinische Erscheinungsformen und Schweineproduktionssysteme sind jedoch noch nicht ausreichend erforscht und bedürfen weiterer Untersuchungen (55). Insgesamt unterstreicht das Potenzial für Co-Infektionen zwischen verschiedenen PCV-Typen die Bedeutung einer kontinuierlichen

Überwachung und Kontrolle dieser Viren in Schweinepopulationen. Co-Infektionen von PCV2 mit anderen Erregern sind von großer Bedeutung und eine Infektion mit anderen Erregern ist in Gegenwart von PCV2 wahrscheinlicher. Co-Infektionen mit dem Porzinen Parvovirus, PRRSV oder *Mycoplasma hyopneumoniae* können nachweislich die PCV2-Replikation hochregulieren, indem sie den Schweregrad der mit PCV2 assoziierten Läsionen und klinischen Symptome erhöhen (56). Co-Infektionen mit verschiedenen PCVs erhöhten die Wahrscheinlichkeit des Auftretens neuer PCVs (57).

3.1.4 Cross-species transmission

Die artenübergreifende Übertragung von PCV wurde in verschiedenen Studien dokumentiert. Porzine Circoviren wurden bei Rindern, Füchsen, Ratten, Hunden, Wiederkäuern, Nagetieren und Hunden nachgewiesen, was darauf hinweist, dass PCV (PCV1–PCV3) ein breites Wirtsspektrum haben. Das Vorhandensein von PCV1-Antikörpern bei Rindern wurde erstmals 1995 in Deutschland gemeldet, was auf das Potenzial einer artübergreifenden Übertragung von PCV1 hinweist (58–61). PCV1 wurde in menschlichen Proben, einschließlich Serum, Verdauungstrakt- und Atemwegsproben, nachgewiesen, was die Möglichkeit einer Infektion des Menschen nahelegt (62–64). Die Fähigkeit von PCV1, menschliche Zellen zu infizieren, wurde auch *in vitro* nachgewiesen (65). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass PCV1 das Potenzial für eine artenübergreifende Übertragung hat und ein Risiko für die Gesundheit von Menschen und Tieren darstellen kann. In einem Bericht wurde PCV2 bei sechs Nerzen nachgewiesen, die in China an Durchfall starben (66). PCV2 kann auch bei anderen Spezies als Schweinen tödliche Krankheiten verursachen, was auf das Potenzial einer zoonotischen Übertragung hinweist (67). Eine Studie berichtete über den Nachweis von PCV2-DNA in menschlichen Serumproben, was darauf hindeutet, dass PCV2 Menschen infizieren kann. Die klinische Bedeutung einer PCV2-Infektion beim Menschen bleibt jedoch unklar (67). PCV3 ist evolutionär am engsten mit dem Caninen Circovirus verwandt, und PCV3-DNA wurde bei Haussäugetieren wie Wiederkäuern, Nagetieren und Hunden nachgewiesen (21,68,69). PCV4 wurde bisher nur bei vier Spezies (Schwein, Marderhund, Fuchs und Hund) nachgewiesen (51). Aus einer phylogenetischen Analyse ging hervor, dass PCV4 näher mit dem Mink Circovirus verwandt ist als mit PCV1-3, was auf eine evolutionäre Abstammung von PCV4 aus dem Mink Circovirus schließen lässt. Dies legt nahe, dass eine Übertragung von Circoviren zwischen verschiedenen Arten, einschließlich PCV3 und PCV4, stattfinden kann und zur genetischen Diversität und Entwicklung dieser Viren beiträgt (57). Darüber hinaus stellt die

artenübergreifende Übertragung von PCV möglicherweise eine ernsthafte Bedrohung für die globale Schweineindustrie und andere Tierindustrien dar (70).

3.2 Fragestellung / Diese Studie

Da durch kürzlich durchgeführte Studien im chinesischen Raum eine Verbindung von ähnlichen Krankheitsgeschehen mit PCV3 und PCV4 entdeckt wurde und diese Krankheitserreger dadurch sehr stark an Bedeutung gewinnen (4,30,37,39,42,50,54,55,57,71–74), wurden im Rahmen dieser Studie österreichische Schweinebestände mit Abortsymptomatik, auf das Vorhandensein von PCV3- und PCV4-spezifischer Nukleinsäuren überprüft. Damit soll die schlechte Datenlage in Österreich in Bezug auf diese beiden Viren verbessert werden, um deren Rolle als potenzielle Aborterreger einschätzen zu können. In Zusammenhang mit dieser Fragestellung war es ebenfalls Ziel dieser Arbeit, eine quantifizierende qPCR zum Nachweis PCV4-spezifischer Nukleinsäuren zu etablieren.

3.3 Hypothesen

1. Abortierte, tot- oder frühgeborene Ferkel werden in Österreich auf PCV3 nur sporadisch und auf PCV4 gar nicht untersucht. Die Diagnostik von abortierten, mumifizierten, tot- oder frühgeborenen Feten sollte um diese viralen Erreger routinediagnostisch erweitert werden, um eine diagnostische Lücke in der Abort-, Mumien-, Totgeburten- und Frühgeburtsdiagnostik beim Schwein zu schließen.
2. Die Erreger sind selten bzw. nicht nachweisbar und haben keine aktuelle Relevanz in österreichischen Ferkelproduktionsbetrieben.

4 Material und Methode

Für diese Studie wurden Nukleinsäureextrakte, die bei -80 °C gelagert wurden und mit einem Abortvorbericht versehen waren, mittels qPCR auf das Vorhandensein von PCV3 und PCV4 Genomfragmenten getestet. Die Extrakte stammten aus den Jahren 2021 und 2022 und umfassten insgesamt 296 Proben, die betriebsweise zu 97 Poolproben zusammengefasst wurden. Diese Proben wurden bereits teilweise routinemäßig und vorberichtsabhängig auf PRRSV, PCV2, PPV, Atypisches Porzines Pestivirus (APPV), Porzines Teschovirus (PTV) und Encephalomyocarditis-Virus (EMCV) getestet (Tab.1). Wenn eine Poolprobe positiv war, wurden die einzelnen Proben aus dem Pool nachgetestet, um die Viruslast zu bestimmen.

Tab.1: Probenanzahl der getesteten (pos./neg.) und ungetesteten Aborterreger, (n=296)

Erreger	PRRSV	PCV2	PPV	APPV	PTV	EMCV
Positiv getestet	15	29	0	1	0	0
Negativ getestet	122	104	31	1	3	2
Nicht getestet	159	163	265	294	293	294

4.1 Herstellung der Extraktepools

Insgesamt 296 bei -80 °C gelagerte Nukleinsäureextrakte wurden aufgetaut und betriebsweise je 10 µl in 1,5 ml Eppendorf Tubes gepoolt. Zehn Proben, für die keine Extrakte mehr verfügbar waren, wurden unter Verwendung der ursprünglichen Originalprobe, die als Rückstellprobe bei -80 °C gelagert wurde, erneut extrahiert. Dafür wurden zehn Milligramm der ursprünglichen Probe mit 1 ml sterilem PBS gemischt und unter Verwendung von drei Stahlkugeln in einem Tissue-Lyser (Qiagen) homogenisiert. Nach dem Zentrifugieren (13000 Upm, 1 min) wurden 140 µl des Organlysates unter Verwendung des QIAamp Viral RNA Mini QIAcube Kit in einem QIAcube (Qiagen) extrahiert.

4.2 Standardverdünnungen und Überprüfung des Detektionslimits

Um die quantitative PCR durchzuführen, mussten qPCR-Standards für PCV3 und PCV4 überprüft werden. Dies sind doppelsträngige DNA-Moleküle, die jene DNA-Sequenzen enthalten, welche mittels PCR amplifiziert werden können. Für PCV3 war hier bereits ein entsprechendes Plasmid (Plasmid 1979) vorhanden und das Detektionslimit der PCV3-qPCR mit 10 GE/µl Extrakt bestimmt worden (35). Der PCV4 Standard wurde in Form eines 200 bp langen, doppelsträngigen DNA-Fragmentes bei der Firma Eurofins synthetisiert (Abb.1).

```

GTCAAATTCTCTGAATTGCACATACAGAGTAAATCTCACTGTCCACACCTGCACAAAGTTAGAATTTTGTAT
ACTGTATTGGAGGCCATGATGGACTAGGTCCTGGTCCGCCATGCTGATCCACCATTGGTTTCTTTTGGTGT
TAGGCTGGAAGTGGAGGGTGTGGGTTTCCCCAGAGGGGTCCTGGGGTTTTGGAGTGA

```

Abb.1: Nukleotidsequenz des PCV-4 DNA-Fragments und Positivkontrolle.

Für die Erstellung der Standard-Verdünnungsreihen war die Konzentration der Stocklösung bereits von der Herstellerfirma angegeben und wurde mithilfe des Promega-Quantus™-Fluorometers erfolgreich überprüft. Danach wurde mithilfe eines online Rechners (<http://scienceprimer.com/copy-number-calculator-for-realtime-pcr>) unter Eingabe von DNA-Menge in Nanogramm und Nukleotidanzahl der enthaltenen Sequenz die Anzahl der enthaltenen Kopien der Zielsequenzen in GE/μl berechnet. Auf Basis dieser Information wurden nun Verdünnungen hergestellt, die jeweils 10¹ GE/μl bis 10¹¹ GE/μl enthielten. In weiterer Folge wurde die PCV4 Verdünnungsreihe im Dreifachansatz getestet und neu beurteilt.

4.3 PCV3- und PCV4-qPCRs

Für den Nachweis von PCV3- und PCV4-spezifischer Nukleinsäuren wurden publizierte Primer- und Sondensequenzen herangezogen (7,75) (Tab.2) und unter Verwendung des Luna Universal Probe qPCR Mix (NEB) Mastermixe hergestellt (Tab.3).

Tab.2: Verwendete Forward/Reverse-Primer und Sonden der PCV3 und PCV4 qPCR

Primer-F(qPCV3-Palinski-F)	5'-AGT GCT CCC CAT TGA ACG-3'
Primer-R(qPCV3-Palinski-R)	5'-ACA CAG CCG TTA CTT CAC-3'
PCV3-Sonde	ATTO647N-5'-ACC CCA TGG CTC AAC ACA TAT GAC C-3'-BBQ650
Primer-F(qPCV4-Zou-F)	5'-GTC CAC ACC TGC ACA AAG TT-3'
Primer-R(qPCV4-Zou-R)	5'-CCT CCA CTT CCA GCC TAA CA -3'
PCV4-Sonde	FAM-5'-AGG TCC TGG TCC GCC ATG CT-3'-BHQ1

Das Temperaturschema bestand aus einem initialen Denaturierungsschritt bei 95 °C für 1 Minute, gefolgt von 45 Zyklen mit jeweils 15 Sekunden bei 95 °C und 30 Sekunden bei 60 °C.

Tab.3: Tabelle der Mischungsverhältnisse für die PCV3- und PCV4-Mastermixe.

Komponente	PCV3 and PCV4 Mastermix
Luna Universal Probe qPCR Mix	7,37 µl
RNase-freies Wasser	6,19 µl
Primermischung vorwärts + rückwärts (20 µM)	0,29 µl
Sonde (20 µM)	0,15 µl
Gesamtvolumen	14 µl

Die Prävalenz von PCV3 und PCV4 in Ferkelproduktionsbetrieben mit Abortproblematik wurde mittels qPCR unter Verwendung eines Rotor-Gene-Geräts (Qiagen) durchgeführt. Es wurden alle Poolproben auf PCV3 und PCV4 Genomfragmente getestet. Die Messungen des Signals der PCV3-Sonde (ATTO647N als Fluorophor) erfolgte im roten Detektionskanal, die Messungen des Signals der PCV4-Sonde (FAM als Fluorophor) im grünen Detektionskanal. Die Poolproben wurden bei positivem Ergebnis zusammen mit den zugehörigen Einzelproben erneut im Doppelansatz getestet, um die Reproduzierbarkeit zu überprüfen. Eine Probe galt als positiv, wenn sie bei der Wiederholung ebenfalls positiv war. Um von GE/µl Extrakt auf GE/g Probe umzurechnen, wurden die vom Rotor-Gene ermittelten Werte mit dem Faktor 4285 multipliziert. Dadurch werden Konzentrations- und Verdünnungsschritte, die im Rahmen der Probenaufbereitung und Nukleinsäureextraktion durchgeführt wurden, miteinberechnet. Proben mit einer Konzentration unter 10^5 GE/g wurden als negativ beurteilt.

Mit jedem qPCR-Ansatz wurden drei Verdünnungen der jeweiligen Standardreihe (PCV3/4 10^5 – 10^7) sowie zwei „no template controls“ (NTC) mitgeführt. Nur wenn in den NTCs keine spezifischen Nukleinsäuren nachweisbar waren, und die Standards erwartungsgemäße Kurven erzeugten, galt der Ansatz als valide. Zudem wurden alle Proben bereits im Rahmen der diagnostischen Erstuntersuchungen mittels Beta-Actin-Real-Time-qPCR auf Hemmstoffe untersucht.

4.4 PCV3- und PCV4-qPCR als Duplex-PCR

Um die Spezifität und Sensitivität der einzelnen qPCRs für PCV3 und PCV4 in einer gemeinsamen qPCR zu überprüfen, wurden diese in einem Duplex-qPCR-Experiment kombiniert. Dazu wurde ein spezifischer Mastermix hergestellt, der die Primer und Sonden für den Nachweis beider Virusgenome enthielt. Dieser Mastermix wurde dann mit den Verdünnungsreihen der PCV3- und PCV4-Standards in einem gemeinsamen qPCR-Ansatz eingesetzt.

5 Ergebnisse

5.1 Ergebnisse der Standard-Testung und Evaluierung der PCV4-qPCR

In der Testung der PCV4-Standardreihe konnte ein erwartungsgemäßes Kurvenbild erzeugt werden. Kurven und Quantifizierungsdaten sind in Tab.4, Abb.2 und Abb.3 dargestellt. Die PCV4-Standardverdünnung, welche 10 GE/µl Extrakt enthielt, konnte in allen drei Replikaten nachgewiesen werden. Das Detektionslimit wurde daher mit 10 GE/µl Extrakt bestimmt.

Tab.4: Angaben zur Quantifizierung der PCV4 Verdünnungsreihe.

Threshold	0,1978
Left Threshold	1,000
Standard Curve Imported	No
Standard Curve (1)	$\text{conc} = 10^{(-0,289 \cdot \text{CT} + 11,868)}$
Standard Curve (2)	$\text{CT} = -3,456 \cdot \log(\text{conc}) + 41,012$
Reaction efficiency (*)	$(* = 10^{(-1/m)} - 1) 0,9471$
M	-3,45556
B	41,01189
R Value	0,99908
R^2 Value	0,99816
Start normalising from cycle	1
Noise Slope Correction	Yes
No Template Control Threshold	% 0
Reaction Efficiency Threshold	Disabled
Normalisation Method	Dynamic Tube Normalisation
Digital Filter	Light

Quantitation data for Cycling A.Green

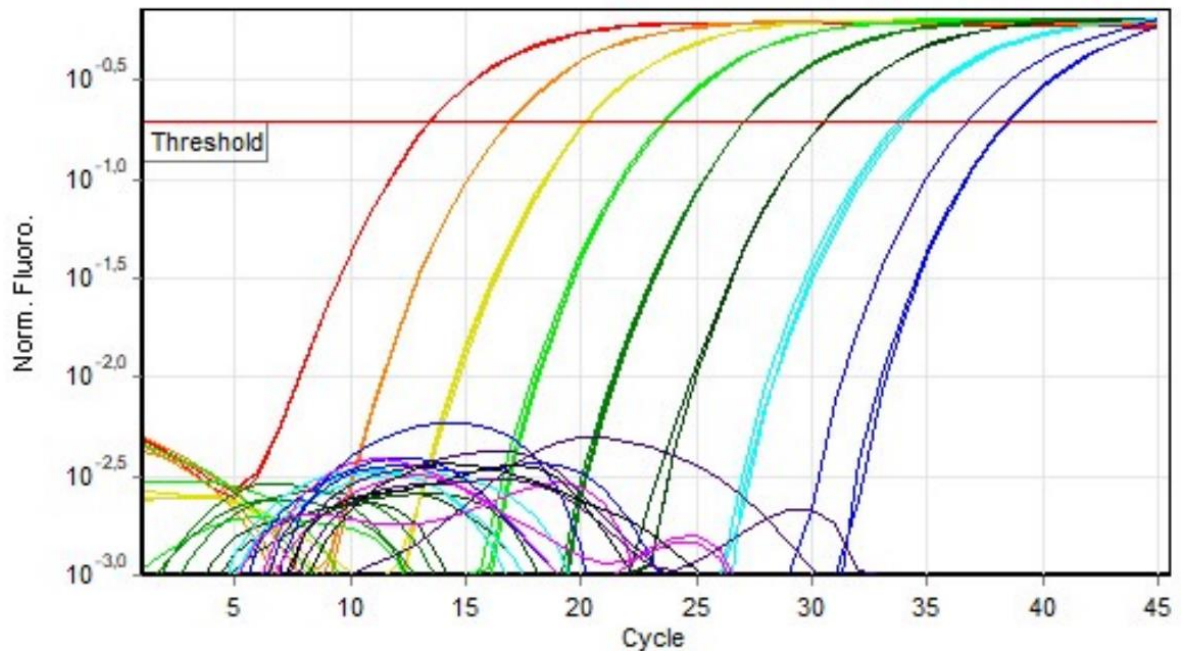


Abb.2: qPCR-Kurven der PCV4-Verdünnungsreihe gemessen im grünen Kanal von 10^8 GE/ μ l (rot) bis 10 GE/ μ l (dunkelblau).

Standard Curve

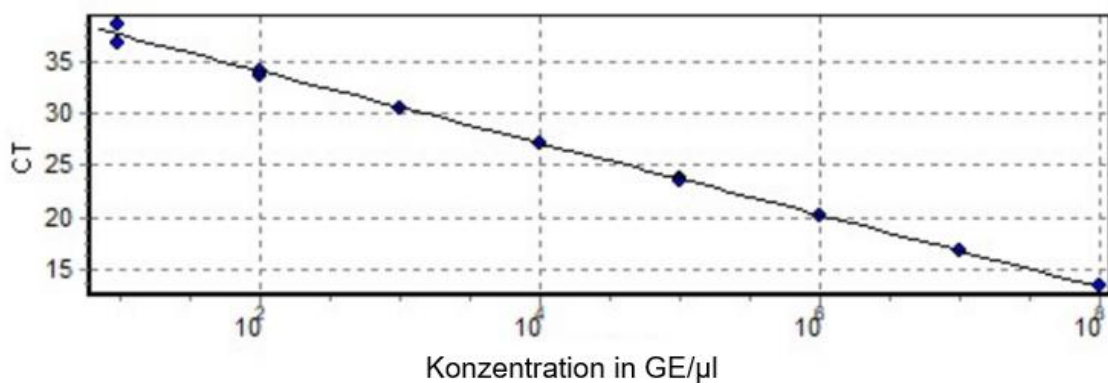


Abb.3: Standardkurve der PCV4-Verdünnungsreihe.

5.2 Ergebnisse der PCV3-Testung der Extraktepools

Von 97 bestandsweise gepoolten Abortprobe-Extrakten konnten in fünf Pools (5,15 %) PCV3-spezifische Nukleinsäuren nachgewiesen werden. Nach dem Öffnen positiver Pools konnten elf von 296 Einzelproben als positiv bewertet werden (3,72 %) (Siehe Abb.4 und Abb.5). Zwei

dieser Proben konnten zuvor bereits auf andere Erreger positiv getestet werden, davon 197/22 positiv auf PCV2 und 2891/21 positiv auf PRRSV. Die genauen Konzentrationen sind in Tab.5 dargestellt.

Quantitation data for Cycling A.Red

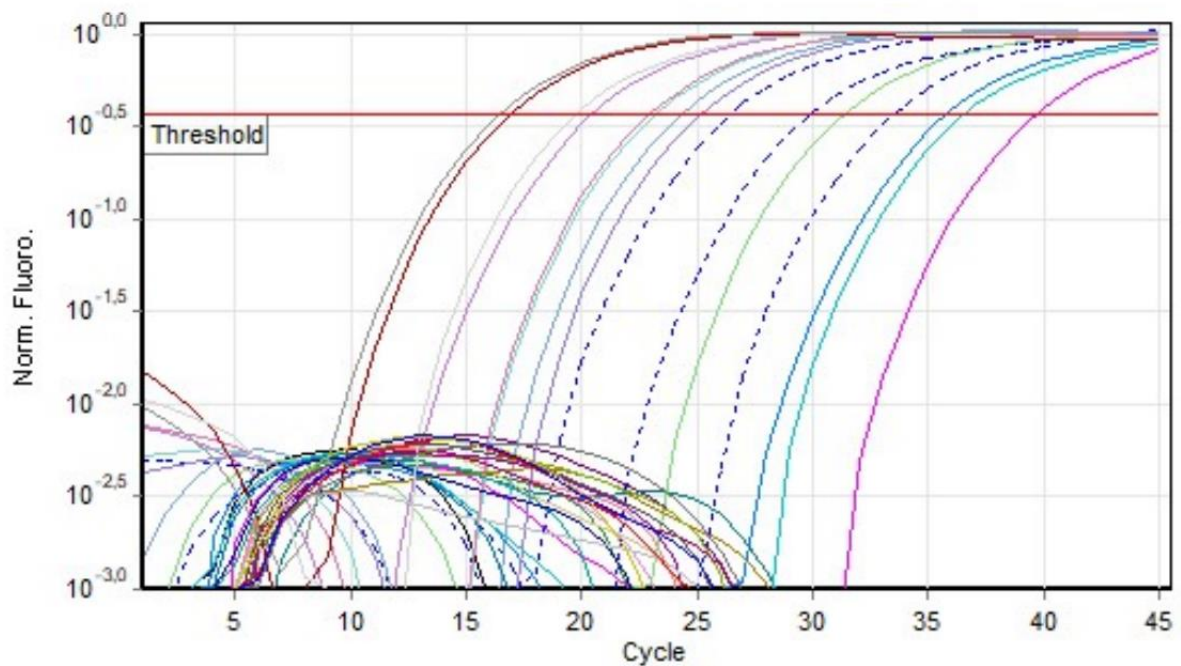


Abb.4: Messung der Einzelproben für PCV3 im Roten Kanal. Die Standardverdünnungen mit 10^5 GE/ μ l, 10^6 GE/ μ l und 10^7 GE/ μ l sind in blauen strichlierten Linien dargestellt; Die Probe 2852/21 (rosa) liegt unter dem Cut-off-Wert von 10^5 GE/g.

Standard Curve

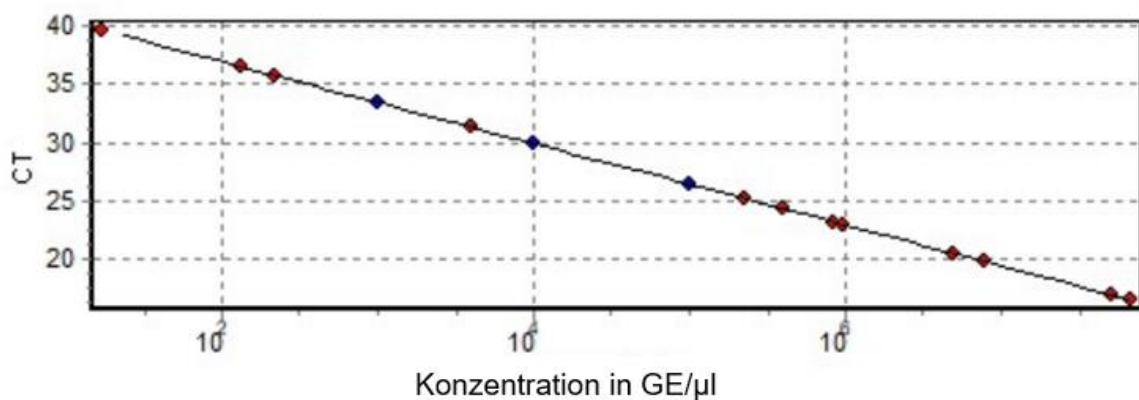


Abb.5: Standardkurve der Messung der Einzelproben für PCV3.

Tab.5: Liste der PCV3-positiv getesteten Proben mit Kopienzahl (in GE/g) und Probenart.

Bestand Nr.	Probe Nr.	Probenart	Kopien PCV3	Tests und Kopien anderer Erreger
SEP 107/21	482/21	PPV-Pool	$9,43 \cdot 10^5$	PPV-negativ
SEP 440/21	2854/21	PPV-Pool	$5,66 \cdot 10^5$	PPV- und PTV-negativ
SEP 440/21	2891/21	PRRSV-Pool, Thymus-Pool	$1,72 \cdot 10^7$	$2,26 \cdot 10^7$ (PRRSV)
SEP 25/22	195/22	PRRSV-Pool, Thymus-Pool	$3,53 \cdot 10^9$	PRRSV-negativ
SEP 25/22	196/22	PRRSV-Pool, Thymus-Pool	$1,69 \cdot 10^9$	PRRSV-negativ
SEP 25/22	197/22	PCV2-Pool, Herzpool	$9,81 \cdot 10^8$	$2,74 \cdot 10^4$ (PCV-2)
SEP 25/22	198/22	PCV2-Pool, Herzpool	$2,11 \cdot 10^{10}$	PCV2-negativ
SEP 54/22	484/22	PRRSV-Pool, Thymus-Pool	$4,13 \cdot 10^9$	PRRSV-negativ
SEP 54/22	485/22	PCV2-Pool, Herzpool	$2,15 \cdot 10^{11}$	PCV2-negativ
SEP 156/22	961/22	PRRSV-Pool, Thymus-Pool	$3,33 \cdot 10^{10}$	PRRSV-negativ
SEP 156/22	963/22	PCV2-Pool, Herzpool	$2,87 \cdot 10^{11}$	PCV2-negativ

5.3 Ergebnisse der PCV4-Testung der Extraktepools

Eine Untersuchung auf das Vorhandensein von PCV-4-spezifischen Nukleinsäuren in österreichischen Ferkelbetrieben mit Abortproblematik ergab keine positiven Ergebnisse.

5.4 Ergebnisse der PCV3- und PCV4-Duplex-qPCR

Im kombinierten Ansatz zum Nachweis von PCV3- und PCV4-DNA in einer qPCR-Reaktion konnten für beide Viren dieselben Nachweisgrenzen wie in der Monoplex-PCR ermittelt werden. Allerdings zeigten die Kurven der im roten Kanal (PCV3) gemessenen Werte Unregelmäßigkeiten, was sich auch in einem R^2 -Wert von 0,81 widerspiegelte (Tab.6, Abb.6, Abb.7). Für PCV4 ergab sich auch im Duplex-Ansatz ein regelmäßiges Kurvenbild (Tab.7, Abb.8, Abb.9).

Tab.6: Angaben zur Quantifizierung der PCV3 Verdünnungsreihe im Duplex.

Threshold	0,0828
Left Threshold	1,000
Standard Curve Imported	No
Standard Curve (1)	$\text{conc} = 10^{(-0,329 \cdot \text{CT} + 13,170)}$
Standard Curve (2)	$\text{CT} = -3,040 \cdot \log(\text{conc}) + 40,044$
Reaction efficiency (*)	$(* = 10^{(-1/m)} - 1)$ 1,13256
M	-3,04042
B	40,04378
R Value	0,90255
R^2 Value	0,81459
Start normalising from cycle	1
Noise Slope Correction	Yes
No Template Control Threshold	% 0
Reaction Efficiency Threshold	Disabled
Normalisation Method	Dynamic Tube Normalisation

Quantitation data for Cycling A.Red

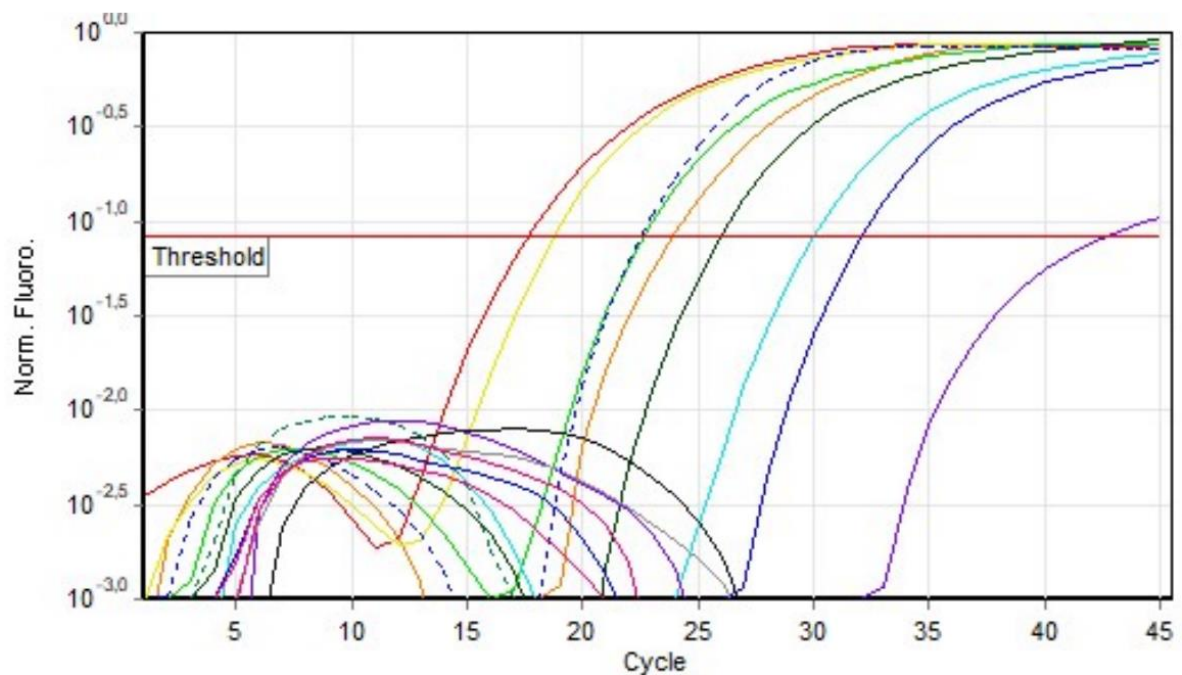


Abb.6: qPCR-Kurven des Duplex-Tests gemessen im roten Kanal (PCV3).

Standard Curve

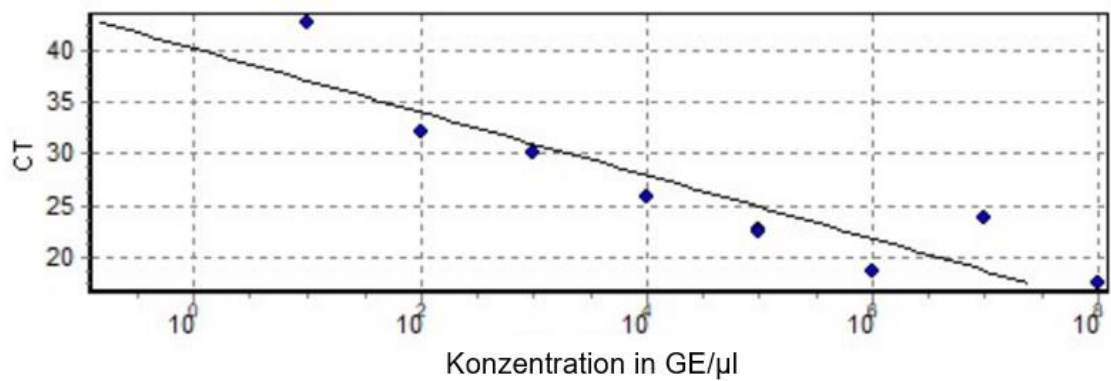


Abb.7: Standardkurve des Duplex-Tests gemessen im roten Kanal (PCV3).

Tab.7: Angaben zur Quantifizierung der PCV4 Verdünnungsreihe im Duplex.

Threshold	0,055
Left Threshold	1,000
Standard Curve Imported	No
Standard Curve (1)	$\text{conc} = 10^{(-0,295 \cdot \text{CT} + 11,096)}$
Standard Curve (2)	$\text{CT} = -3,385 \cdot \log(\text{conc}) + 37,556$
Reaction efficiency (*)	$(* = 10^{(-1/m)} - 1)$ 0,97448
M	-3,38464
B	37,55636
R Value	0,99999
R^2 Value	0,99999
Start normalising from cycle	1
Noise Slope Correction	Yes
No Template Control Threshold	% 0
Reaction Efficiency Threshold	Disabled
Normalisation Method	Dynamic Tube Normalisation

Quantitation data for Cycling A.Green

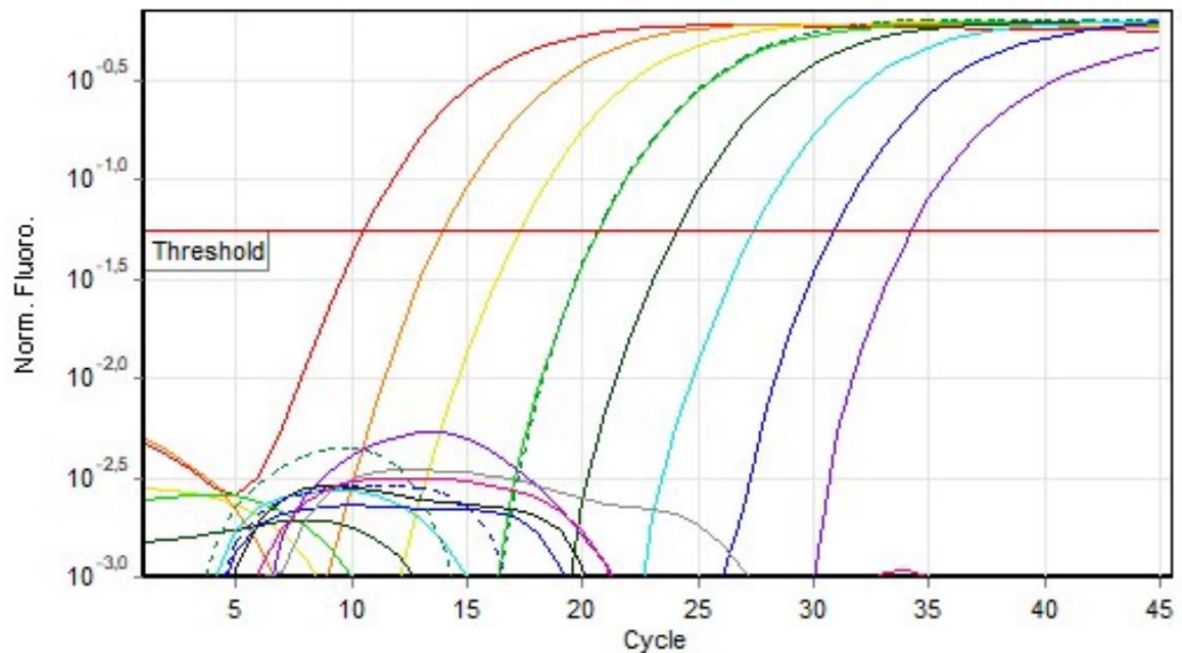


Abb.8: qPCR-Kurven des Duplex-Tests gemessen im grünen Kanal (PCV4).

Standard Curve

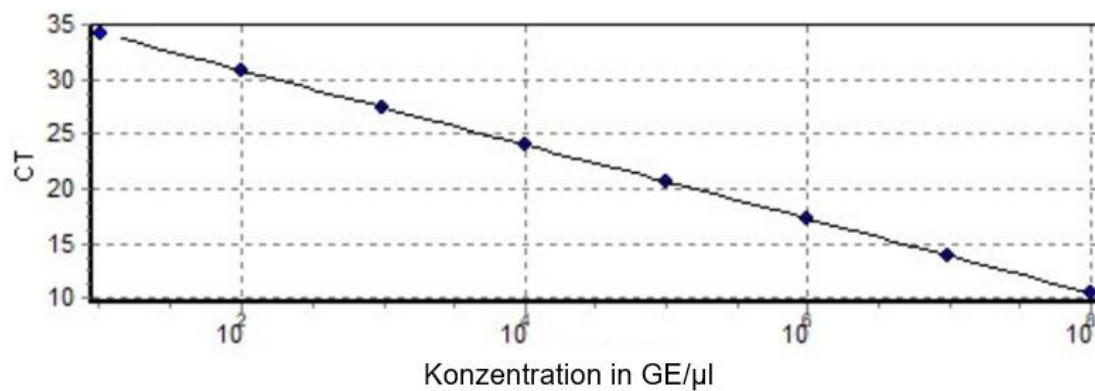


Abb.9: Standardkurve des Duplex-Tests gemessen im grünen Kanal (PCV4).

6 Diskussion

In dieser Studie wurde die Prävalenz des Porzinen Circovirus 3 und 4 in ausgewählten Schweinebetrieben mit Abortproblematik in Österreich untersucht. Porzine Circoviren sind ein wichtiger Krankheitserreger in der Schweinehaltung, die weltweit erhebliche wirtschaftliche Verluste verursachen (21,22). Während PCV2 eines der bedeutsamsten Viren in der Schweineindustrie ist, ist über PCV3 und PCV4 noch wenig bekannt und über ihre Pathogenität wurde noch wenig berichtet.

6.1 Etablierung der PCV4-qPCR

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine qPCR-Methode für den schnellen und sensitiven Nachweis von PCV4 etabliert. Dabei wurden Primer und Sonden von Zou et al. (75) verwendet und ein passendes Standard-DNA-Sequenzstück als Positivkontrolle synthetisiert. Anstelle der Verwendung von Feldproben als Positivkontrolle ist die Synthese kurzer DNA-Abschnitte (ca. 100 Nukleotide) eine praktische Alternative, wenn keine solchen Feldvirusproben zur Verfügung stehen. Die Sensitivität der entwickelten qPCR ist mit Zou et al ähnlich. Es wurde eine sehr gute Sensitivität von 10 Kopien/ μ l erreicht, und der R^2 -Wert von 0,998 deutet auf eine gute Reproduzierbarkeit hin. Es ist allerdings nicht auszuschließen, dass sich das synthetische Gen und das Virusgenom in der PCR unterschiedlich verhalten können, z.B. aufgrund von Sekundärstrukturen.

6.2 PCV3-qPCR und PCV4-qPCR im Duplex-qPCR

Die Duplex-PCR ist eine Form der Multiplex-PCR, bei der zwei verschiedene DNA-Sequenzen gleichzeitig amplifiziert werden. Dieser Ansatz ist besonders nützlich, wenn verschiedene Viren, Bakterien oder genomische Veränderungen als Ursache für eine Vielzahl von Krankheiten in Betracht gezogen werden müssen. Durch den Einsatz einer Duplex-PCR können mehrere Einzel-PCR-Tests eingespart werden, was Zeit und Ressourcen spart. Darüber hinaus kann dies das Risiko von Kontaminationen verringern und die Zuverlässigkeit der Ergebnisse erhöhen. Basierend auf den Ergebnissen der PCV3- und PCV4-Duplex-qPCR kann festgestellt werden, dass dieselben Nachweisgrenzen wie in der Monoplex-PCR erreicht wurden. Es ist jedoch zu beachten, dass bei den Kurven der im roten Kanal gemessenen Werte (PCV3) Unregelmäßigkeiten auftraten, was sich in einem R^2 -Wert von 0,81 widerspiegelte. Der R^2 -Wert ist ein guter Indikator für die Performance einer qPCR und sollte bei $>0,98$ liegen. Es ist wichtig anzumerken, dass es bei Duplex- oder Multiplex-PCRs eine Reihe von Fehlerquellen geben kann, neben trivialen Fehlern aufgrund falscher

Primerkonzentrationen, ungenauen Hybridisierungstemperaturen, fehlerhaften Reaktionskomponenten oder Problemen mit dem Gerät, muss ausgeschlossen werden, dass die Primer und Sondenpaare eine ungünstige Wechselwirkung zeigen. Um solche Probleme zu vermeiden, ist es ratsam, das Protokoll sorgfältig zu überprüfen und sicherzustellen, dass alle Komponenten und ihre Konzentrationen korrekt sind, bevor Versuche wiederholt werden. Insgesamt liefern die Ergebnisse der PCV3- und PCV4-Duplex-qPCR wichtige Erkenntnisse über die Effizienz und Anwendbarkeit dieser Methode zur gleichzeitigen Detektion der beiden Viren. Die identifizierten Unregelmäßigkeiten in den Kurven und der R^2 -Wert könnten auf potenzielle Bereiche für Verbesserungen oder weitere Untersuchungen hinweisen, um die Genauigkeit und Reproduzierbarkeit des Duplex-PCR-Ansatzes weiter zu optimieren. In der Routinediagnostik ist dem Duplex-Nachweis von PCV2 und PCV3, der von Julia Kuczera etabliert worden ist (35), der Vorzug zu geben, da PCV3 scheinbar eine höhere Relevanz besitzt als PCV4.

6.3 PCV3

In dieser Studie wurde eine spezifische Prävalenz von 5,15 % für PCV3 bei einer Viruslast zwischen 10^5 GE/g und $2 \cdot 10^{11}$ GE/g festgestellt. Im Vergleich zu PCV2, bei dem der Schwellenwert einer diagnostizierten Infektion bei 10^9 GE/g liegt, wurde bei vier Proben der Schwellenwert überschritten. In einer Diplomarbeit von Julia Kuczera (2022) wurden in Österreich je 50 PRRSV-positive und PRRSV-negative Feldproben aus den Jahren 2017–2019 auf PCV3 getestet. Bei 13 dieser Proben wurde PCV3 nachgewiesen, konkret bei sechs PRRSV-negativen und sieben PRRSV-positiven Proben (35). Wenn man die Zahlen der PRRSV-Proben mit den in dieser Studie durchgeführten Untersuchungen vergleicht, fällt auf, dass PCV3 weniger häufig im Zusammenhang mit Aborten auftritt. Es lässt sich nicht vollständig ausschließen, dass ein Zusammenhang zwischen Aborten und PCV3 besteht, aber es gibt eine starke Tendenz, dass PCV3 kein klassischer Aborterreger ist. Wenn man weitere internationale Studien betrachtet, wird die Hypothese dieser Tendenz in Frage gestellt. Eine Studie von Saporiti et al. aus Spanien im Jahr 2021 wies das Auftreten von PCV3 bei Föten und Totgeburten in 18 von 53 Proben (33,9 %) nach (36). Eine Studie von Molossi et al. aus dem Jahr 2022 in Brasilien ergab, dass in sechs von elf Proben (54,54 %) PCV3 nachgewiesen wurde und eine Verbindung des Virus mit Spätaborten, Totgeburten und mumifizierten Ferkeln hergestellt wurde (76). Im selben Jahr führte Yang et al. in den USA eine Studie bei Schweinen aller Altersgruppen und klinischen Zuständen durch und erreichte eine PCV3-Nachweisrate von 27 %. Reduziert auf die Untersuchung von 283 Föten betrug die Nachweisrate 22,48 %

(77). Alle drei Studien (36,76,77) wiesen eine deutlich höhere Prävalenz als die zuvor erwähnte Studie von Julia Kuczera und dieser Studie auf. Die Gründe dafür sind schwer zu identifizieren, deuten jedoch am ehesten auf regionale Unterschiede hin. Aufgrund des begrenzten Datenmaterials (Anzahl der Studien, Anzahl der Proben) ist eine verlässliche Vergleichbarkeit der vermuteten Tendenz derzeit nicht möglich. Ein gemeinsamer Aspekt, der in mehreren Studien (35,36,77) sowie in dieser Studie erkennbar ist, sind Co-Infektionen mit anderen Viren. Obwohl dies nicht sehr häufig auftritt (6,8 % der positiven Proben bei Yang et al. 2022, 3,7 % der positiven Proben bei Saporiti et al. 2021, 12 % der positiven Proben bei Julia Kuczera 2018), kann es aufgrund der durchgehenden Präsenz nicht als Ausnahme oder Einzelfall angesehen werden. Unter Berücksichtigung der Ergebnisse einer Studie von Auer et al. aus dem Jahr 2022, bei der 95 Wildschweinproben aus einem privaten Wildbestand in Österreich auf PCV3 und 25 % davon positiv getestet wurden (34), liegt die Vermutung nahe, dass PCV3 im Vergleich zu heimischen Schweinebetrieben eher selten auftritt, aber in der Wildschweinpopulation vermehrt vorhanden ist. Es ist möglich, dass dieser Wildbestand eine höhere Prävalenz von PCV3 aufweist als andere Wildschweine in Österreich. Um dies zu bestätigen, wären weitere Studien mit größeren und repräsentativeren Stichproben von Wildschweinen aus verschiedenen Regionen notwendig. Eine gezielte Kontrolle von PCV3 in Schweinebetrieben erscheint nicht sinnvoll, da die Prävalenz ohnehin sehr niedrig ist. Obwohl PCV3 bei einigen Infektionen eine hohe Virenlast verursacht, was auf einen potenziellen Problemverursacher hinweist, ist die Gefahr wahrscheinlich gering. Die Studie von Deim et. al zeigt, dass der Erreger vermehrt in Thymusgewebe und Lymphknoten nachgewiesen wird, was auf eine potenzielle Immunsuppression hindeutet. Dies begünstigt die Ausbreitung und Wirkung von Begleitkrankheiten, die die klinische Symptomatik negativ beeinflussen kann (3). Die Behandlung von Viruserkrankungen ist generell schwierig und basiert hauptsächlich auf Prävention (Impfung und Management). Dies gilt auch für PCV3-Infektionen. Es gibt bereits bewährte Managementmaßnahmen wie den 20-Punkte-Plan von Madec, der nicht nur PCV3, sondern auch andere Infektionen vorbeugen kann (26). Die Entwicklung eines Impfstoffs gegen PCV3 ist nicht zu erwarten, da die Bedeutung als Pathogen zu gering ist.

6.4 PCV4

In dieser Studie konnten keine spezifischen Genomfragmente von PCV4 in österreichischen Ferkelproduktionsbetrieben nachweisen werden. Ähnliche Ergebnisse wurden auch in einer Studie aus Italien und Spanien im Jahr 2020 erzielt, bei der ebenfalls keine Genomfragmente von PCV4 gefunden wurden (53). Im Gegensatz dazu zeigen Studien aus Asien in einigen

Provinzen eine spezifische Belastung mit PCV4, die mit klinischen Manifestationen in Verbindung steht (4,46,47). In einer Studie von Ge et al. wurde eine Gesamtseroprävalenz aus 17 Provinzen Chinas von 43,97% entdeckt. Auch wurde festgestellt, dass die früheste positive Probe aus dem Jahr 2008 stammt, was darauf hinweist, dass das Virus bereits seit langem im Umlauf ist (Ge et al., 2021). Es wird vermutet, dass das Porzine Circovirus 4, als ein neuartiges Virus mit genetischen Unterschieden zu anderen PCV-Typen und der Fähigkeit, verschiedene Tierarten zu infizieren, bisher nicht im österreichischen Raum verbreitet ist oder noch nicht eingeschleppt wurde. Es besteht aber die Möglichkeit, dass sich die Feldstämme von PCV4 in Österreich von der bestellten positiven Probe unterscheiden und aufgrund kleiner Unterschiede im Genom nicht nachgewiesen werden konnten oder nur in sehr geringer Dichte vorkommen. Um eine potenzielle Einschleppung und Ausbreitung von PCV4 frühzeitig zu erkennen, wäre es ratsam, ein jährliches Monitoring durchzuführen. Hierbei könnten erlegte Wildschweine eine wichtige Rolle spielen, und es wäre sinnvoll, Probenmaterial von ihnen obligatorisch einzusenden und zusätzlich auf das Vorhandensein von PCV4 zu testen. Da Wildschweine häufigen Kontakt zu anderen Tierarten haben und somit ein erhöhtes Infektionsrisiko besteht, könnten sie als potenzielle Reservoirs oder Überträger dienen und das Virus auf Hausschweine übertragen. Durch geeignete Überwachungsmaßnahmen und eine frühzeitige Erkennung könnten geeignete Schutzmaßnahmen ergriffen werden, um die Einschleppung und Ausbreitung von PCV4 in Hausschweinebeständen zu minimieren.

7 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abb.1: Nukleotidsequenz des PCV-4 DNA-Fragments und Positivkontrolle.	13
Abb.2: qPCR-Kurven der PCV4-Verdünnungsreihe gemessen im grünen Kanal von 10^8 GE/ μ l (rot) bis 10 GE/ μ l (dunkelblau).	16
Abb.3: Standardkurve der PCV4-Verdünnungsreihe.	16
Abb.4: Messung der Einzelproben für PCV3 im Roten Kanal. Die Standardverdünnungen mit 10^5 GE/ μ l, 10^6 GE/ μ l und 10^7 GE/ μ l sind in blauen strichlierten Linien dargestellt; Die Probe 2852/21 (rosa) liegt unter dem Cut-off-Wert von 10^5 GE/g.	17
Abb.5: Standardkurve der Messung der Einzelproben für PCV3.	17
Abb.6: qPCR-Kurven des Duplex-Tests gemessen im roten Kanal (PCV3).	20
Abb.7: Standardkurve des Duplex-Tests gemessen im roten Kanal (PCV3).	20
Abb.8: qPCR-Kurven des Duplex-Tests gemessen im grünen Kanal (PCV4).	22
Abb.9: Standardkurve des Duplex-Tests gemessen im grünen Kanal (PCV4).	22
Tab.1: Probenanzahl der getesteten (pos./neg.) und ungetesteten Aborterreger, (n=296) ...	12
Tab.2: Verwendete Forward/Reverse-Primer und Sonden der PCV3 und PCV4 qPCR	13
Tab.3: Tabelle der Mischungsverhältnisse für die PCV3- und PCV4-Masternixe.....	14
Tab.4: Angaben zur Quantifizierung der PCV4 Verdünnungsreihe.....	15
Tab.5: Liste der PCV3-positiv getesteten Proben mit Kopienzahl (in GE/g) und Probenart. .	18
Tab.6: Angaben zur Quantifizierung der PCV3 Verdünnungsreihe im Duplex.	19
Tab.7: Angaben zur Quantifizierung der PCV4 Verdünnungsreihe im Duplex.	21

8 Literaturverzeichnis

1. Gary C. Althouse, Johannes Kauffold, Stephanie Rossow. Diseases of the Reproductive System. In: Diseases of Swine. 11. Aufl. John Wiley & Sons Incorporated; 2019. S. 373–92.
2. Salogni C, Lazzaro M, Giacomini E, Giovannini S, Zanoni M, Giuliani M, u. a. Infectious agents identified in aborted swine fetuses in a high-density breeding area: a three-year study. *J Vet Diagn Invest.* 2016;28(5):550–4.
3. Deim Z, Dencső L, Erdélyi I, Valappil SK, Varga C, Pósa A, u. a. Porcine circovirus type 3 detection in a Hungarian pig farm experiencing reproductive failures. *Veterinary Record.* 2019;185(3):84.
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.* 2020;67(3):1057–61.
5. Franzo G, Legnardi M, Hjulsgaard 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.* 2018;65(3):602–6.
6. Tischer I, Gelderblom H, Vettermann W, Koch MA. A very small porcine virus with circular single-stranded DNA. *Nature.* 1982;295:64–6.
7. 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.* 2017;91(1).
8. Rosario K, Breitbart M, Harrach B, Segalés J, Delwart E, Biagini P, u. a. Revisiting the taxonomy of the family Circoviridae: establishment of the genus Cyclovirus and removal of the genus Gyrovirus. *Arch Virol.* 2017;162(5):1447–63.
9. Breitbart M, Delwart E, Rosario K, Segalés J, Varsani A. ICTV Virus Taxonomy Profile: Circoviridae. *J Gen Virol.* 2017;98:1997–8.
10. Finsterbusch T, Mankertz A. Porcine circoviruses--Small but powerful. *Virus Res.* 2009;143(2):177–83.

11. Finsterbusch T, Steinfeldt T, Caliskan R, Mankertz A. Analysis of the subcellular localization of the proteins Rep, Rep' and Cap of porcine circovirus type 1. *Virology*. 2005;343:36–46.
12. Saporiti V, Martorell S, Cruz TF, Klaumann F, Correa-Fiz F, Balasch M, u. a. Frequency of Detection and Phylogenetic Analysis of Porcine circovirus 3 (PCV-3) in Healthy Primiparous and Multiparous Sows and Their Mummified Fetuses and Stillborn. *Pathogens*. 2020;9(7).
13. Hamel AL, Lin LL, Nayar GPS. Nucleotide Sequence of Porcine Circovirus Associated with Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome in Pigs. *J Virol*. 1998;72(6):5262–7.
14. Tischer I, Miels W, Wolff D, Vagt M, Griem W. Studies on epidemiology and pathogenicity of porcine circovirus. *Arch Virol*. 1986;91(3–4):271–6.
15. Zhai SL, Chen SN, Xu ZH, Tang MH, Wang FG, Li XJ, u. a. Porcine circovirus type 2 in China: An update on and insights to its prevalence and control. *Virol J*. 2014;11:88.
16. Tischer I, Rasch R, Tochtermann G. Characterization of papovavirus and picornavirus-like particles in permanent pig kidney cell lines. *Zentralbl Bakteriol*. 1974;226(2):153–67.
17. Allan GM, McNeilly F, Cassidy JP, Reilly GAC, Adair B, Ellis WA, u. a. Pathogenesis of porcine circovirus; experimental infections of colostrum deprived piglets and examination of pig foetal material. *Vet Microbiol*. 1995;44(1):49–64.
18. Chae C. Postweaning multisystemic wasting syndrome: a review of aetiology, diagnosis and pathology. *Veterinary Journal*. 2004;168(1):41–9.
19. Chae C. A review of porcine circovirus 2-associated syndromes and diseases. *Veterinary Journal*. 2005;169(3):326–36.
20. 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. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 1999;11:530–2.
21. Segalés J. Porcine circovirus type 2 (PCV2) infections: Clinical signs, pathology and laboratory diagnosis. *Virus Res*. 2012;164(1–2):10–9.

22. Gillespie J, Opriessnig T, Meng XJ, Pelzer K, Buechner-Maxwell V. Porcine Circovirus Type 2 and Porcine Circovirus-Associated Disease. *J Vet Intern Med*. 2009;23(6):1151–63.
23. Klaumann F, Correa-Fiz F, Franzo G, Sibila M, Núñez JI, Segalés J. Current knowledge on Porcine circovirus 3 (PCV-3): A novel virus with a yet unknown impact on the swine industry. *Front Vet Sci*. 2018;5:315.
24. Vargas-Bermudez DS, Díaz A, Mogollón JD, Jaime J. Longitudinal comparison of the humoral immune response and viral load of Porcine Circovirus Type 2 in pigs with different vaccination schemes under field conditions. *F1000Res*. 2018;
25. Bojkovski J, Kureljusic B, Prodanov-Radulovic J, Aniță D, Luanda O, Aniță A, u. a. The role of viral infections in the development of respiratory disease in swine. *Scientific Papers Journal*. 2023;65(4).
26. Madec F, EVENO É, MORVAN P, HAMON L, MORVAN H, ALBINA E, u. a. La Maladie de l'Amaigrissement du Porcelet (MAP) en France. *Journées Rech Porcine en France*. 1999;31:347–54.
27. 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*. 1999;120(1):59–78.
28. Grau-Roma L, Stockmarr A, Kristensen CS, Enøe C, López-Soria S, Nofrarías M, u. a. Infectious risk factors for individual postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) development in pigs from affected farms in Spain and Denmark. *Res Vet Sci*. 2012;93(3):1231–40.
29. 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*. 2021;272.
30. Phan TG, Giannitti F, Rossow S, Marthaler D, Knutson T, Li L, u. a. Detection of a novel circovirus PCV3 in pigs with cardiac and multi-systemic inflammation. *Virology*. 2016;13(1):184.

31. Rodrigues ILF, Cruz ACM, Souza AE, Knackfuss FB, Costa CHC, Silveira RL, u. a. Retrospective study of porcine circovirus 3 (PCV3) in swine tissue from Brazil (1967–2018). *Brazilian Journal of Microbiology*. 2020;51:1391–7.
32. 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;8:684–98.
33. Kedkovid R, Woonwong Y, Arunorat J, Sirisereewan C, Sangpratum N, Kesdangsakonwut S, u. a. Porcine circovirus type 3 (PCV3) shedding in sow colostrum. *Vet Microbiol.* 2018;220:12–7.
34. Auer A, Schweitzer L, Kübber-Heiss A, Posautz A, Dimmel K, Seitz K, u. a. Porcine Circoviruses and Herpesviruses Are Prevalent in an Austrian Game Population. *Pathogens*. 2022;11(3):305.
35. Kuczera Julia. Etablierung einer PCV2- und PCV3-Duplex-qPCR und Prävalenz von PCV3 in Österreich [Diplomarbeit]. University of Veterinary Medicine Vienna; 2022.
36. Saporiti V, Valls L, Maldonado J, Perez M, Correa-Fiz F, Segalés J, u. a. Porcine Circovirus 3 Detection in Aborted Fetuses and Stillborn Piglets from Swine Reproductive Failure Cases. *Viruses*. 2021;13(2):264.
37. Zhang F, Yuan W, Li Z, Zhang Y, Zeng X, Zhao M, u. a. Porcine Circovirus Type 3 in Pig Farms Experiencing Diarrhea in Jiangxi, China: Prevalence, Genome Sequence and Pathogenicity. *Animals*. 2020;10(12):2324.
38. Mora-Díaz J, Piñeyro P, Shen H, Schwartz K, Vannucci F, Li G, u. a. Isolation of PCV3 from Perinatal and Reproductive Cases of PCV3-Associated Disease and In Vivo Characterization of PCV3 Replication in CD/CD Growing Pigs. *Viruses*. 2020;12(2):219.
39. 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.* 2019;93(4).
40. Temeeyasen G, Lierman S, Arruda BL, Main R, Vannucci F, Gimenez-Lirola LG, u. a. Pathogenicity and immune response against porcine circovirus type 3 infection in caesarean-derived, colostrum-deprived pigs. *Journal of General Virology*. 2021;102(1).

41. Woźniak A, Miłek D, Stadejek T. Wide Range of the Prevalence and Viral Loads of Porcine Circovirus Type 3 (PCV3) in Different Clinical Materials from 21 Polish Pig Farms. *Pathogens*. 2020;9(5):411.
42. Kwon T, Yoo SJ, Park CK, Lyoo YS. Prevalence of novel porcine circovirus 3 in Korean pig populations. *Vet Microbiol*. 2017;207:178–80.
43. Vargas-Bermudez DS, Mogollón JD, Jaime J. The Prevalence and Genetic Diversity of PCV3 and PCV2 in Colombia and PCV4 Survey during 2015-2016 and 2018-2019. *Pathogens*. 2022;11(6):633.
44. Fux R, Söckler C, Link EK, Renken C, Krejci R, Sutter G, u. a. Full genome characterization of porcine circovirus type 3 isolates reveals the existence of two distinct groups of virus strains. *Virol J*. 2018;15(1).
45. Faustini G, Drigo M, Menandro ML, Pasotto D, Giovanni F. Phylodynamic analysis of current Porcine circovirus 4 sequences: Does the porcine circoviruses evolutionary history repeat itself? *Transbound Emerg Dis*. 2022;69(5):3363–9.
46. Sun W, Du Q, Han Z, Bi J, Lan T, Wang W, u. a. Detection and genetic characterization of porcine circovirus 4 (PCV4) in Guangxi, China. *Gene*. 2021;773.
47. Nguyen VG, Do HQ, Huynh TM Le, Park YH, Park BK, Chung HC. Molecular-based detection, genetic characterization and phylogenetic analysis of porcine circovirus 4 from Korean domestic swine farms. *Transbound Emerg Dis*. 2022;69(2):538–48.
48. Ge M, Hu WQ, Ning KM, Li SY, Xiao CT. The seroprevalence of the newly identified porcine circovirus type 4 in China investigated by an enzymed-linked immunosorbent assay. *Transbound Emerg Dis*. 2021;68(6):2910–4.
49. Lian Z, Liu J, Liu P, Zhu Z, Yao X, Yuan L, u. a. Development and application of an indirect ELISA for the detection of antibody to porcine circovirus 4 in pigs. *Transbound Emerg Dis*. 2021;68(6):2975–9.
50. Niu G, Zhang X, Ji W, Chen S, Li X, Yang L, u. a. Porcine circovirus 4 rescued from an infectious clone is replicable and pathogenic in vivo. *Transbound Emerg Dis*. 2022;69(5):1632–41.

51. Zhang LH, Wang TX, Fu PF, Zhao YY, Li HX, Wang DM, u. a. First Molecular Detection and Genetic Analysis of a Novel Porcine Circovirus (Porcine Circovirus 4) in Dogs in the World. Sinclair A, Herausgeber. *Microbiol Spectr.* 2023;11(2).
52. Xu T, Chen L, Huang BZ, Zhu L, Sun XG, Lai SY, u. a. The first dog-origin porcine circovirus type 4 complete genomic sequence have high homology with that of pig-derived strains. *Front Microbiol.* 2023;14.
53. Franzo G, Ruiz A, Grassi L, Sibila M, Drigo M, Segalés J. Lack of porcine circovirus 4 genome detection in pig samples from Italy and Spain. *Pathogens.* 2020;9(6).
54. Xu T, You D, Wu F, Zhu L, Sun XG, Lai SY, u. a. First molecular detection and genetic analysis of porcine circovirus 4 in the Southwest of China during 2021–2022. *Front Microbiol.* 2022;13.
55. Yue W, Li Y, Zhang X, He J, Ma H. Prevalence of Porcine Circoviruses in Slaughterhouses in Central Shanxi Province, China. *Front Vet Sci.* 2022;9.
56. Opriessnig T, Halbur PG. Concurrent infections are important for expression of porcine circovirus associated disease. *Virus Res.* 2012;164(1–2):20–32.
57. Wang Y, Yan S, Ji Y, Yang Y, Rui P, Ma Z, u. a. First Identification and Phylogenetic Analysis of Porcine Circovirus Type 4 in Fur Animals in Hebei, China. *Animals.* 2022;12(23):3325.
58. Tischer I, Bode L, Apodaca J, Timm H, Peters D, Rasch R, u. a. Presence of antibodies reacting with porcine circovirus in sera of humans, mice, and cattle. *Arch Virol.* 1995;140:1427–39.
59. Kiupel M, Stevenson GW, Choi J, Latimer KS, Kanitz CL, Mittal SK. Viral Replication and Lesions in BALB/c Mice Experimentally Inoculated with Porcine Circovirus Isolated from a Pig with Postweaning Multisystemic Wasting Disease. *Vet Pathol.* 2001;38:74–82.
60. Herbst W, Willems H. Detection of virus particles resembling circovirus and porcine circovirus 2a (PCV2a) sequences in feces of dogs. *Res Vet Sci.* 2017;115:51–3.
61. Song T, Zhang S, Hao J, Xin S, Hui W, Tang M, u. a. First detection and genetic analysis of fox-origin porcine circovirus type 2. *Transbound Emerg Dis.* 2019;66(1):1–6.

62. Bernstein CN, Nayar G, Hamel A, Blanchard JF. Study of Animal-Borne Infections in the Mucosas of Patients with Inflammatory Bowel Disease and Population-Based Controls. *J Clin Microbiol.* 2003;41(11):4986–90.
63. Li L, Kapoor A, Slikas B, Bamidele OS, Wang C, Shaukat S, u. a. Multiple Diverse Circoviruses Infect Farm Animals and Are Commonly Found in Human and Chimpanzee Feces. *J Virol.* 2010;84(4):1674–82.
64. Borkenhagen LK, Mallinson KA, Tsao RW, Ha SJ, Lim WH, Toh TH, u. a. Surveillance for respiratory and diarrheal pathogens at the human-pig interface in Sarawak, Malaysia. *PLoS One.* 1. Juli 2018;13(7).
65. Hattermann K, Roedner C, Schmitt C, Finsterbusch T, Steinfeldt T, Mankertz A. Infection studies on human cell lines with porcine circovirus type 1 and porcine circovirus type 2. *Xenotransplantation.* 2004;11(3):284–94.
66. Wang GS, Sun N, Tian FL, Wen YJ, Xu C, Li J, u. a. Genetic analysis of porcine circovirus type 2 from dead minks. *Journal of General Virology.* 2016;97(9):2316–22.
67. Opriessnig T, Giménez-Lirola LG, Halbur PG. Polymicrobial respiratory disease in pigs. *Anim Health Res Rev.* 2011;12(2):133–48.
68. Li L, McGraw S, Zhu K, Leutenegger CM, Marks SL, Kubiski S, u. a. Circovirus in Tissues of Dogs with Vasculitis and Hemorrhage. *Emerg Infect Dis.* 2013;19(4):534–41.
69. Decaro N, Martella V, Desario C, Lanave G, Circella E, Cavalli A, u. a. Genomic Characterization of a Circovirus Associated with Fatal Hemorrhagic Enteritis in Dog, Italy. *PLoS One.* 2014;9(8).
70. Turlewicz-Podbielska H, Augustyniak A, Pomorska-Mól M. Novel Porcine Circoviruses in View of Lessons Learned from Porcine Circovirus Type 2-Epidemiology and Threat to Pigs and Other Species. *Viruses.* 2022;14(2):261.
71. Hu X, Chen Z, Song D, Li Y, Ding Z, Wu X, u. a. Frequency detection of porcine circovirus-like viruses in pigs with porcine respiratory disease. *Vet Microbiol.* 2022;275.
72. Li X, Chen S, Niu G, Zhang X, Ji W, Ren Y, u. a. Porcine Circovirus Type 4 Strains Circulating in China Are Relatively Stable and Have Higher Homology with Mink Circovirus than Other Porcine Circovirus Types. *Int J Mol Sci.* 2022;23(6):3288.

73. Wang D, Mai J, Yang Y, Xiao CT, Wang N. Current knowledge on epidemiology and evolution of novel porcine circovirus 4. *Vet Res.* 2022;53(1):38.
74. Wu M, Chen Y, Lang W, Qin X, Ruan L, Su M, u. a. Genetic Variation Analysis of Porcine Circovirus Type 4 in South China in 2019 to 2021. *Viruses.* 2022;14(8):1736.
75. Zou J, Liu H, Chen J, Zhang J, Li X, Long Y, u. a. Development of a TaqMan-Probe-Based Multiplex Real-Time PCR for the Simultaneous Detection of Porcine Circovirus 2, 3, and 4 in East China from 2020 to 2022. *Vet Sci.* 2022;10(1):29.
76. Molossi FA, de Cecco BS, de Almeida BA, Henker LC, da Silva MS, Mósena ACS, u. a. PCV3-associated reproductive failure in pig herds in Brazil. *Trop Anim Health Prod.* 2022;54(5):293.
77. Yang Z, Marthaler DG, Rovira A. Frequency of porcine circovirus 3 detection and histologic lesions in clinical samples from swine in the United States. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation.* 2022;34(4):602–11.