

Aus dem Department für Nutztiere und öffentliches Gesundheitswesen in der Veterinärmedizin
der Veterinärmedizinischen Universität Wien

Universitätsklinik für Schweine

(Leiterin: Univ.-Prof. Dr.med.vet. Andrea Ladinig, Dipl.ECPHM)

**Pathologische und pathohistologische Veränderungen der Lungen PRRSV
infizierter Ferkel mit und ohne vorheriger intranasaler und/oder
intradermaler Applikation neuartiger homologer und heterologer
Inaktivatimpfstoffe**

Diplomarbeit

Veterinärmedizinische Universität Wien

vorgelegt von

[Marina Augustini]

Wien, im [Mai, 2023]

Betreuerin: Univ.-Prof. Dr.med.vet. Andrea Ladinig, Dipl.ECPHM
Universitätsklinik für Schweine
Department für Nutztiere und öffentliches Gesundheitswesen in der
Veterinärmedizin
Veterinärmedizinische Universität Wien

Begutachter: Univ.-Prof. Dr.med.vet. Herbert Weissenböck, Dipl.ECPHM
Institut für Pathologie
Department für Pathobiologie
Veterinärmedizinische Universität Wien

Eigenständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorgelegte Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Alle übernommenen Textstellen aus fremden Quellen wurden kenntlich gemacht.

Ich habe die entscheidenden Arbeiten selbst durchgeführt und alle zuarbeitend Tätigen mit ihrem Beitrag zur Arbeit angeführt.

Die vorliegende Arbeit wurde nicht an anderer Stelle eingereicht oder veröffentlicht.

[Feldkirchen], den [31.05.2023]

[Marina Augustini]

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Das Porzine Reproductive und Respiratorische Syndrom Virus (PRRSV)	2
1.1.1	Ätiologie und Epidemiologie	2
1.1.2	Übertragung.....	3
1.1.3	Pathogenese.....	5
1.1.4	Klinik.....	6
1.1.5	Pathomorphologie	7
1.1.6	Diagnose.....	8
1.1.7	Prophylaxe und Kontrolle	11
1.2	Ziel der Arbeit.....	15
2	Material und Methoden	16
2.1	Versuchsaufbau	16
2.2	Sektion und Probenbeurteilung	19
2.3	Statistik.....	21
3	Ergebnisse	22
3.1	Makroskopische Lungenveränderungen.....	22
3.2	Histologische Lungenveränderungen.....	24
4	Diskussion	27
5	Zusammenfassung	31
6	Summary	32
7	Abkürzungsverzeichnis	33
8	Abbildungsverzeichnis	34
9	Tabellenverzeichnis	35
10	Literaturverzeichnis	36

1 Einleitung

In der Schweineproduktion spielen respiratorische Krankheiten eine immer größere Rolle. Es gibt viele Viren und Bakterien, die eine hohe Affinität zum Respirationstrakt aufweisen. Darunter ist vor allem das Porzine Reproductive und Respiratorische Syndrom Virus (PRRSV) ein bedeutsamer Vertreter (Zimmerman et al. 2019). Das vor über 30 Jahren in Amerika und den Niederlanden entdeckte RNA-Virus (Collins et al. 1992, Wensvoort et al. 1991) ist heute weltweit verbreitet, in den meisten Ländern endemisch (Zimmerman et al. 2019) und führt zu hohen wirtschaftlichen Verlusten in der Schweineindustrie (in den USA bis zu 664 Millionen US Dollar jährlich) (Cho und Dee 2006, Holtkamp et al. 2013). Das Virus befällt bevorzugt porcine Alveolarmakrophagen und Makrophagen von Endometrium und Plazenta und führt unter anderem zu Pneumonien, reduzierten Tageszunahmen, Fruchtbarkeitsstörungen, Aborten und Geburten lebensschwacher Ferkel (Zimmerman et al. 2019).

Da es keine spezifische Therapie gegen die durch das Virus ausgelöste Erkrankung gibt, setzt man auf die Bekämpfung der Ausbreitung des Virus und eine Minderung der klinischen Symptome. Eine dieser Bekämpfungsstrategien ist die Impfung (Nguyen 2013).

1.1 Das Porzine Reproductive und Respiratorische Syndrom Virus (PRRSV)

1.1.1 Ätiologie und Epidemiologie

Das PRRS-Virus gehört der Gattung der *Arteriviren* an, welche aus der Familie der *Arteriviridae* stammen. Gemeinsam mit den Coronaviren gehört PRRSV zur Ordnung der *Nidovirales* (Snijder und Meulenberg 1998, Zimmerman et al. 2019). Die Familie besteht nur aus einem Genus. Deren Vertreter sind das PRRS-Virus, das Equine arteriitis virus (EAV), das Lactate dehydrogenase-elevating virus (LDV) und das simian hemorrhagic fever virus (SHFV). Die wichtigsten tierpathogenen Arteriviren sind das PRRS-Virus und das EAV (Heinritzi et al. 2006, Kuhn et al. 2016). Bei Arteriviren handelt es sich um behüllte, einzelsträngige RNA-Viren. Die Virusfamilie der *Arteriviridae* zeichnet sich vor allem durch ihren strengen Wirtstropismus, persistente Infektionen und die Replikation in Makrophagen aus (Cho und Dee 2006, Snijder und Meulenberg 1998). Das Genom des Virus misst eine Länge von ca. 15 Kilobasen und enthält 11 offene Leserahmen (open reading frames ORFs). Etwa 12 Kilobasen machen die ORFs 1a und 1b aus (etwa 80 % des Genoms) und kodieren für Nicht-Strukturproteine, die vor allem für die Replikase- und Polymerase- Aktivitäten zuständig sind. Die ORFs 2a, 2b, 3, 4, 5a, 5, 6 und 7 kodieren für die viralen Strukturproteine (Dea et al. 2000, Zimmerman et al. 2019). Das PRRS-Virus misst einen Durchmesser von 50-65 nm. Die Tenazität des Virus ist gering, unter Umständen kann das Virus aber über Wochen hinweg infektiös bleiben. Es ist nicht sehr hitzestabil und bevorzugt kalte und feuchte Umgebung (Benfield et al. 1992, Heinritzi et al. 2006). Bei Temperaturen von minus 70 bis minus 20 Grad ist das Virus über Monate bis Jahre überlebensfähig. Zudem hängt die Stabilität auch vom pH-Wert ab. So ist es ab einem pH-Wert von unter 6,5 bzw. über 7,5 nicht sehr stabil (Benfield et al. 1992, Cho und Dee 2006, Zimmerman et al. 2019).

Das Krankheitsbild des Porzinen Reproduktiven und Respiratorischen Syndroms (PRRS) wurde erstmals in den späten 80er Jahren in Nordamerika beschrieben (Collins et al. 1992, Keffaber 1989, Selbitz et al. 2015) und wurde als *swine infertility and respiratory syndrome* (SIRS) (Benfield et al. 1992) bzw. auch als *porcine epidemic abortion and respiratory syndrome* (PEARS) bezeichnet (Terpstra et al. 1991). In Europa tauchte es fast zeitgleich auf. Hier wurde es in den Niederlanden 1991 entdeckt und als Lelystad Virus bezeichnet (Wensvoort et al. 1991). Danach traten weltweit ähnliche Ausbrüche auf (Wills et al. 1997). Obwohl das Virus in Europa und Nordamerika zu ähnlicher Zeit auftrat, unterschieden sich die Isolate in ihrer genomischen Zusammensetzung, wobei sie zu 50 bis 70 Prozent übereinstimmen

(Forsberg et al. 2002). Es werden zwei Spezies des PRRS-Virus unterschieden, PRRSV-1, ehemals europäischer Genotyp 1, und PRRSV-2, ehemals nordamerikanischer Genotyp 2. Innerhalb dieser beiden Spezies gibt es zahlreiche Subtypen (Adams et al. 2015, Cho und Dee 2006, Kuhn et al. 2016, Stadejek et al. 2008). Durch Sequenzierungen von litauischen, weißrussischen und russischen Stämmen wurden vier Subtypen innerhalb von PRRSV-1 definiert (Balka et al. 2013, Stadejek et al. 2008). Im Jahr 2015 wurde in Niederösterreich in einem Ferkelproduktionsbetrieb ein PRRSV- Ausbruch mit schwerwiegender klinischer Symptomatik beschrieben. Die Sauen zeigten Inappetenz, hohes Fieber ($>41\text{ °C}$) und zyanotische Ohren und Schwanzspitzen. Dies führte zu bis zu 90 % Ferkelverlusten im betroffenen Betrieb. Das Virus wurde aus dem Serum von Aufzuchtferkeln mit klinischen Symptomen, mittels Passage auf porzinen Alveolarmakrophagen, isoliert und als PRRSV AUT15-33 bezeichnet. Das Isolat wurde dann teilweise sequenziert (ORF2-7; GenBank-Nummer KU494019) und wies Ähnlichkeiten mit einem kroatischen Isolat auf (Sinn et al. 2016). Kreutzmann et al. (2022) haben vor kurzem die vollständige Genomsequenz publiziert (Kreutzmann et al. 2022). Schließlich breitete sich das Isolat weiter aus, sodass auch andere Regionen betroffen waren (Sinn et al. 2016).

1.1.2 Übertragung

Ausschließlich Haus- und Wildschweine sind empfänglich für PRRSV (Done et al. 2007, Selbitz et al. 2015). Die Übertragung erfolgt direkt und indirekt (Cho und Dee 2006, Heinritzi et al. 2006). Die direkte Übertragung erfolgt vor allem durch Sekretflüssigkeiten, wie Speichel, Nasensekret, Urin, Fäzes und Sperma (Cho und Dee 2006, Wills et al. 1997, Yaeger et al. 1993). Die intrauterine Übertragung findet im letzten Drittel der Trächtigkeit (ab Tag 75-80) statt (Christianson et al. 1993, Kranker et al. 1998, Lager und Mengeling 1995, Mengeling et al. 1995). Indirekt wird das Virus mittels unbelebter und belebter Vektoren übertragen. Zu unbelebten Vektoren gehören unter anderem Kleidung, Nadeln, Transportmittel sowie Wasser und Futter (Cho und Dee 2006, Dee et al. 2004, Otake et al. 2002, Zimmerman et al. 2019). Belebte Vektoren sind zum Beispiel Insekten, Schädlinge oder auch Personen (Arruda et al. 2019, Cho und Dee 2006). Unter den Insekten sind die Hausfliege (*Musca domestica*) und Mosquitos (*Aedes vexans*) als Überträger bekannt (Otake et al. 2003, Pitkin et al. 2009, Pitkin et al. 2009). Die Virusausscheidung kann bis zu sechs Monate anhalten und beginnt kurz nach der Infektion (Selbitz et al. 2015), wobei die Dauer und Menge der Virusausscheidung sowohl

vom Alter und dem Immunstatus des infizierten Tieres, als auch vom jeweiligen Virusstamm abhängig ist (Cho et al. 2006, Klinge et al. 2009).

Das Virus ist weltweit verbreitet und in vielen Ländern endemisch, wobei die Krankheit oft subklinisch verläuft. Die Verbreitung zwischen den Beständen bzw. der Viruseintrag in den Bestand erfolgt vor allem durch Zukauf von infizierten Tieren, die klinisch unauffällig sind, oder auch durch Zukauf von kontaminiertem Samen (Nan et al. 2017, Selbitz et al. 2015). Weiters erfolgt die Verbreitung des Virus bzw. der Virusneueintrag in die Bestände auch durch Aerosole (Arruda et al. 2019). Das Virus persistiert zudem meistens in der Herde. So konnte das Virus beispielsweise noch 100–165 Tage nach der Infektion aus den Tonsillen und lymphatischen Organen isoliert werden (Wills et al. 1997).

Um die Viruszirkulation aufrechtzuerhalten, müssen ständig empfängliche Tiere vorhanden sein (Heinritzi et al. 2006). Besonders Absetzferkel stellen ein empfängliches Reservoir für das Virus dar, nachdem sie sich nach Verlust der maternalen Antikörper im Alter von drei bis sechs Wochen im Zuge des Zusammenlegens unterschiedlicher Gruppen mit dem Virus infizieren können (Done et al. 2007, Selbitz et al. 2015). Ein weiteres Risiko für die Aufrechterhaltung der Viruszirkulation stellen sensible Tiere dar, die noch nie Kontakt mit dem Erreger hatten. Dies sind für einen Bestand vorwiegend die Zukaufstiere. (Done et al. 2007, Nan et al. 2017, Selbitz et al. 2015, Zimmerman et al. 2019).

1.1.3 Pathogenese

Das PRRS-Virus zeigt einen strikten Tropismus zu Zellen, die von Monozyten abstammen. Hier fungieren in erster Linie die porzinen Alveolarmakrophagen als primäre Wirtszellen (Loving et al. 2007, Lunney et al. 2016, van Reeth 1997, Welch und Calvert 2010, Zimmerman et al. 2019). Aber auch andere Zielzellen wurden beschrieben. Studien zeigen, dass das Virus auch in pulmonalen intravaskulären Makrophagen, männlichen Keimzellen, Endothelzellen des Herzens, dendritischen Zellen und in den Peyer-Plaques im Darm zu finden ist (Zimmerman et al. 2019). So findet man das Virus in erster Linie in der Lunge, doch wurde es auch aus Nasenmuscheln, Tonsillen und Lymphknoten isoliert (van Reeth 1997).

Durch Rezeptor- vermittelte Endozytose gelangt das Virus in die Zelle. Hierbei bindet das Virus an die Zellmembran und wird durch eine Clathrin- abhängige Endozytose in die Zelle hineingebracht. Clathrin ist ein Protein, das an der Bildung von Vesikeln beteiligt ist und an bestimmten Bereichen (clathrinbeschichtete Vertiefungen) der Zellmembran zu finden ist. Nach Bindung an Rezeptoren wird ein Vesikel gebildet, das sich in das Innere der Zelle abschnürt und so Virusmaterial in die Zelle bringt (Irannejad et al. 2015, Mettlen et al. 2018). Dies und ein niedriger pH-Wert sind wichtig, damit das Virus replizieren kann (Lunney et al. 2016). Der wichtigste Rezeptor für die Virusaufnahme bzw. -freisetzung in den Makrophagen ist CD163 (Welch und Calvert 2010). Dieser ist vor allem wichtig, um Virusmaterial ins Zytoplasma zu schleusen. Ein weiterer wichtiger Rezeptor ist das Membranprotein Sialoadhesin. Dieses soll vor allem für die Endozytose zuständig sein (Zimmerman et al. 2019). In einer Studie wurde aber gezeigt, dass dieser Rezeptor keine essentielle Rolle spielt (Prather et al. 2013).

Das Virus repliziert anschließend in seinen Zielzellen und führt zu Apoptose der infizierten Zellen, aber auch zum Zelltod benachbarter, nicht infizierter Zellen. Dieses Phänomen wird als *Bystander- Effect* bezeichnet (Lee und Kleiboeker 2007, Sirinarumitr et al. 1998, Sur et al. 1998). Die Ursache für die Apoptose ist noch nicht vollständig geklärt, jedoch geht man davon aus, dass das Gen-Produkt des *Open reading frames 5* (ORF5) p25 dafür verantwortlich ist (Suárez et al. 1996, Zimmerman et al. 2019).

Die infizierten Zellen bilden zusätzlich Zytokine und Chemokine, die das umliegende Gewebe noch weiter schädigen (Balka et al. 2013, Gómez-Laguna et al. 2013).

Kurz nach der primären Virusreplikation (innerhalb von zwölf bis 24 Stunden) kommt es zur Virämie. Je jünger die Tiere zum Zeitpunkt der Infektion sind, desto länger dauert die Virämie an. Außerdem hängt die Dauer der Virämie nicht nur vom Alter der Tiere ab, sondern auch vom Immunstatus der Tiere und vom jeweiligen Virusisolat (Cho et al. 2006, Klinge et al. 2009, van der Linden et al. 2003). Die Virämie hat zur Folge, dass das Virus auch in andere Gewebe, vor allem in lymphatische Organe, gelangt (Selbitz et al. 2015). Gleichzeitig kommt es zur Ausprägung klinischer Symptome. Ein bis zwei Wochen nach der Exposition mit dem PRRS-Virus kommt es zur Bildung von Antikörpern im Blut (Lunney et al. 2016, Selbitz et al. 2015, Yoon et al. 1994). Die ersten beiden Wochen werden als akutes Stadium angesehen, in denen die ersten Antikörpertiter nachgewiesen werden können. Diese frühen Antikörper bieten jedoch noch keinen Schutz gegen das Virus. Die ersten Antikörper, die eine Virus neutralisierende Wirkung zeigen, werden erst ab dem 28 Tag nach Infektion gebildet (Loving et al. 2015). Danach kommt es zum Stadium der Persistenz, in dem sich das Virus deutlich weniger repliziert als im akuten Stadium (van Reeth 1997).

Nach Abklingen der Symptome persistiert das Virus in den lymphatischen Organen, und in akzessorischen Geschlechtsdrüsen. In den Tonsillen und Lymphknoten ist das Virus bis zu 157 Tage, in den akzessorischen Geschlechtsdrüsen bis zu 101 Tage nachweisbar (Christopher-Hennings, Nelson, Hines et al. 1995, Zimmerman et al. 2019).

1.1.4 Klinik

Das PRRS-Virus kann respiratorische oder reproduktive Symptome hervorrufen. Die Symptome können vielfältig sein. Der Schweregrad der klinischen Symptome wird von mehreren Faktoren beeinflusst. So spielen unter anderem das Alter und der Immunstatus der infizierten Tiere, vorangegangene Infektionen bzw. Sekundärinfektionen und das Betriebsmanagement eine wichtige Rolle (Selbitz et al. 2015, Zimmerman et al. 2019). Auch das Virusisolat und dessen Virulenz haben einen Einfluss auf die Ausprägung der klinischen Symptome (Cho und Dee 2006). So kann eine geringe Virulenz zu einem gänzlich subklinischen Verlauf führen. Die Art der Symptome unterscheidet sich, je nachdem welche Altersgruppe betroffen ist. Adulte Sauen und Eber leiden meist an reproduktiven Symptomen. So treten bei Infektion von Sauen erhöhte Umrauschquoten, Aborte, Frühgeburten oder Geburten lebensschwacher Ferkel auf (Cho et al. 2006, Cho und Dee 2006, Done et al. 2007, Zimmerman et al. 2019). Die Ursachen für die Reproduktionsstörungen stellen unter anderem

Plazentaschäden dar. Diese können zur frühzeitigen Plazentaablösung oder zur Unterversorgung der Feten führen (Heinritzi et al. 2006). Eber leiden unter Libidoverlust und Reduktion der Samenqualität (Zimmerman et al. 2019).

Saugferkel zeigen unter anderem Anorexie, Dyspnoe, Gerinnungsstörungen und eine erhöhte Mortalität in den ersten Lebenstagen (bis zu 60 %) (Done et al. 2007, Zimmerman et al. 2019). Die respiratorische Ausprägung betrifft vor allem Aufzucht- und Mastschweine. Die klinischen Symptome in dieser Altersgruppe sind unter anderem Husten, Dyspnoe, Niesen, und Konjunktivitis. Infolgedessen kommt es zu vermehrten Aufkommen von Kümmerern und erhöhten Morbiditäts- und Mortalitätsraten (Done et al. 2007, Selbitz et al. 2015, Zimmerman et al. 2019). Eine Monoinfektion mit dem PRRS-Virus führt meist nur zu einer milden respiratorischen Symptomatik. Durch eine PRRS-Virus Infektion steigt aber die Anfälligkeit für Sekundärinfektionen durch andere Viren (u.a. porcines Circovirus 2 und das Influenzavirus) oder Bakterien (u.a. *Mycoplasma hyopneumonia* und *Bordetella bronchiseptica*) (Zimmerman et al. 2019). Diese Erreger spielen auch differentialdiagnostisch eine große Rolle (Selbitz et al. 2015).

1.1.5 Pathomorphologie

1.1.5.1 Makroskopische Veränderungen

Makroskopisch erkennbare Veränderungen nach einer PRRSV- Infektion sind beispielsweise interstitielle Pneumonien und vergrößerte Tracheobronchiallymphknoten (Halbur et al. 1995, Pol et al. 1991, Rossow et al. 1995, van Reeth 1997). Dies ist aber nicht pathognomonisch für eine PRRSV- Infektion, da auch andere Viren für ähnliche Veränderungen verantwortlich sein können (Done et al. 2007). Außerdem gehen die Veränderungen in der Lunge oft mit sekundären bakteriellen Infektionen einher (Rossow 1998). Die interstitielle Pneumonie stellt sich makroskopisch durch lobuläre oder diffuse Veränderung der Lungenfärbung dar, was zu marmorierten Arealen auf der Lungenoberfläche führt. Die Färbung kann hierbei variieren und von Rot im akuten Stadium bis zu einer sehr hellen Färbung im chronischen Stadium reichen (Sarli et al. 2021). Die Konsistenz der Lunge reicht von verhärtet bis zu fleischig (Halbur et al. 1995, Janke 1995, Sarli et al. 2021, Zimmerman et al. 2019). Zudem kann es zu interstitiellen Ödemen und ödematösen Veränderungen in verschiedenen Organen kommen (van Reeth 1997, Zimmerman et al. 2019).

Die Tracheobronchiallymphknoten können infolge einer PRRSV- Infektion deutlich vergrößert sein (drei- bis viermal so groß wie in gesunden Schweinen). Diese Veränderung ist vor allem zwei bis drei Wochen nach Infektion sichtbar (Halbur et al. 1995, Rossow et al. 1995).

1.1.5.2 Histologische Veränderungen

Histologische Veränderungen, die nach einer PRRSV- Infektion in der Lunge auftreten sind vor allem eine Verdickung der Alveolarsepten durch Infiltration von Makrophagen, Lymphozyten und Plasmazellen und die Hypertrophie und Hyperplasie der Typ 2 Pneumozyten, die durch die Zerstörung der Typ 1 Pneumozyten ausgelöst wird. Im Alveolarlumen kommt es zu einer Ansammlung von nekrotischen Makrophagen, Zelltrümmern sowie seröser Flüssigkeit. (Balka et al. 2013, Sarli et al. 2021, van Reeth 1997). Balka et al. (2013) bewerteten histologisch beispielsweise folgende fünf Läsionen: Hypertrophie und Hyperplasie der Pneumozyten, septale mononukleäre Infiltration, intraalveoläre Ansammlung von nekrotischem Material und die intraalveoläre und perivaskuläre Ansammlung von Entzündungszellen. Nach Rossow et al. sind histologische Lungenläsionen vor allem vom dritten bis zum 21 Tag nach Infektion auffindbar (Rossow et al. 1995). Auch Balka et al. (2013) wiesen zu diesem Zeitpunkt eine erhöhte Ansammlung von nekrotischem Material und intraalveolären Entzündungszellen nach. Nach den 21 Tagen nach Infektion nahmen diese Läsionen stetig ab (Balka et al. 2013). Die schwerwiegendsten Lungenläsionen treten vor allem zwischen dem zehnten und 14. Tag nach der Infektion auf (Rossow et al. 1995). Außerdem kommt es im Zuge einer PRRSV- Infektion zu einem Verlust der Makrophagen. Während der zelluläre Anteil einer bronchoalveolären Lavageflüssigkeit einer nicht infizierten Lunge aus 95 Prozent Makrophagen besteht, findet man bei infizierten Schweinen nur mehr 50 Prozent Makrophagen. Hier besteht die Zellpopulation auch vermehrt aus neutrophilen Granulozyten (35 %) und Lymphozyten (15 %) (Done et al. 2007, van Reeth 1997).

1.1.6 Diagnose

Nachdem das Virus sehr variable klinische Symptome hervorruft, kann anhand derer nur eine Verdachtsdiagnose ausgesprochen werden (Done et al. 2007, Zimmerman et al. 2019). Eine Diagnose kann jedoch nur mittels Virusnachweis oder Nachweis viraler Produkte gestellt werden (Done et al. 2007).

1.1.6.1 Direkter Nachweis

Für die Virusanzucht verwendet man unter anderem Zellkulturen aus porzinen Alveolarmakrophagen (PAMs). Außerdem gibt es weitere definierte Zelllinien wie zum Beispiel CL 2621 und Marc 145 (Benfield et al. 1992, Kim et al. 1993). Die Anzucht auf PAMs erwies sich jedoch als deutlich sensitiver (Bötner 1997, Done et al. 2007, Zimmerman et al. 2019). Die PAMs sollten von Ferkeln, die unter sechs bis acht Wochen alt sind, gewonnen werden und die Makrophagen sollten außerdem vorher auf Virusempfänglichkeit getestet werden. Das Virus wird dann mit Hilfe von spezifischen Antikörpern und zellspezifischen Markern identifiziert (Bötner 1997), wobei man den zytopathischen Effekt des Virus ausnutzt (Done et al. 2007).

Zum Nachweis von PRRSV-Antigenen aus Gewebe benutzt man die Immunhistochemie (IHC). Hier kann man die Immunogold- oder Silberfärbung bzw. Immunoperoxidasefärbung verwenden, wobei die ersten beiden eher unübliche Methoden sind. Die IHC hat zwar eine hohe Spezifität (=100 %), aber eine geringe Sensitivität (67 %) (Halbur et al. 1996). Dieses Verfahren wird jedoch nicht in der Routinediagnostik angewandt, sondern dient eher zu Forschungszwecken (Bötner 1997, Halbur et al. 1994, Magar et al. 1993). Virale Antigene können auch noch durch den *fluorescent antibody test* (FAT) nachgewiesen werden. Dieser ist günstiger und schneller als der IHC, braucht jedoch frische Gewebeproben (Zimmerman et al. 2019). Weiters wurde auch die *in situ* Hybridisierung (ISH) als Nachweißverfahren beschrieben (Sur et al 1996).

PRRSV spezifische RNA wird mit Hilfe verschiedener Reverse Transkriptase (RT)- PCR Methoden identifiziert. Die PCR hat sich in der Routinediagnostik aufgrund ihrer Praktikabilität und hohen Sensitivität und Spezifität als molekularbiologisches Verfahren zum direkten Nachweis von PRRSV durchgesetzt (Christopher-Hennings et al. 1995, Zimmerman et al. 2019). Ein weiterer Vorteil der PCR ergibt sich aber darin, dass man europäische Stämme von amerikanischen unterscheiden kann (Mardassi et al. 1994). Häufig wird eine Sequenzierung der RT-PCR-Ergebnisse durchgeführt, um das Isolat genauer zu definieren. So kann man auch zwischen Feldvirusstamm und Impfvirusstamm unterscheiden. Da ORF5 eine hohe genetische Variabilität aufweist, eignet sich dieser Abschnitt besonders für die Sequenzierung, da man so die Verwandtschaft der verschiedenen Stämme vergleichen kann (Murtaugh et al. 2010,

Pirzadeh et al. 1998). Die PCR-Methode ist jedoch weniger sensitiv als die Zellkultur (Bøtner 1997, Zimmerman et al. 2019).

Als Probenmaterialien für den direkten Erregernachweis eignen sich, abhängig von der betroffenen Altersgruppe, Gewebeproben wie Lunge, Tonsille, Tracheobronchiallymphknoten, Plazenta oder Thymus, Serum, Speichel, bronchoalveoläre Lavageflüssigkeit, Sperma und Hodensaftproben (*Processing fluids*) (Decorte et al. 2015, Kittawornrat et al. 2010, Lopez et al. 2018, Zimmerman et al. 2019).

1.1.6.2 Indirekter Nachweis

Der Nachweis von PRRSV-spezifischen Antikörpern wird hauptsächlich dazu genutzt, um den PRRS-Status einer Herde festzustellen. Die Interpretation des Antikörpernachweises beim Einzeltier ist hingegen nicht zielführend, da dieser für die klinische Diagnose keine Aussage hat. Man kann anhand des Antikörper Nachweises sagen, ob ein Tier schon einmal Kontakt mit dem Virus hatte, aber nicht zwischen Feldvirus oder Impfvirus unterscheiden (Bøtner 1997, Zimmerman et al. 2019). Antikörper können im Serum innerhalb von 14 Tagen nach Infektion nachgewiesen werden, aber frühestens ab dem sechsten Tag. Fünf bis sechs Wochen nach der Infektion erreicht der Antikörpertiter seinen Höhepunkt. Eine Seronegativität wurde oft erst nach sechs Monaten erreicht (Done et al. 2007). Antikörper können auf verschiedene Art nachgewiesen werden. Als erste Methode für den serologischen Nachweis wurde der *Immunoperoxidase-Monolayer-Assay* (IPMA) beschrieben, der vor allem in Europa genutzt worden ist (Wensvoort et al. 1992). Außerdem gibt es noch den indirekten Immunfluoreszenztest (*Indirect Fluorescent Antibody Technique* IFAT). Dieser kam vor allem in den USA zum Einsatz (Yoon et al. 1992). Beide Methoden verwenden PAMs bzw. kontinuierliche Zelllinien (CL 2621 und Marc 145) (Done et al. 2007).

Eine weitere Methode zum Nachweis von Antikörpern ist der *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA), der sehr spezifisch ist und auch eine höhere Sensitivität als der IPMA aufweist. Dadurch und durch seine Praktikabilität hat sich der ELISA in der Routinediagnostik etabliert (Albina et al. 1992, Bøtner 1997, Zimmerman et al. 2019). Die Antikörper können im ELISA ab einer Woche nach Infektion über sechs Monate detektiert werden (Selbitz et al. 2015)

Der Virusneutralisationstest zur Identifizierung PRRSV-neutralisierender Antikörper im Serum wurde ebenfalls beschrieben. Dieser weist jedoch eine niedrige Sensitivität und Spezifität auf (Done et al. 2007, Yoon et al. 1994).

1.1.7 Prophylaxe und Kontrolle

Gegen das Porzine Reproductive und Respiratorische Syndrom ist keine Therapie verfügbar. Eine symptomatische Therapie erfolgt über die Verabreichung von NSAIDs und Antibiotika gegen mögliche Sekundärerreger (Zimmerman et al. 2019). Um eine Viruszirkulation unter Kontrolle zu halten, sind vor allem Biosicherheitsmaßnahmen unabdingbar. Diese sollen den Bestand vor Virusneueintrag schützen (externe Biosicherheit), aber auch die Viruszirkulation im Bestand (interne Biosicherheit) reduzieren (Alarcón et al. 2021).

1.1.7.1 Interne Biosicherheit

Mithilfe interner Biosicherheitsmaßnahmen kann eine bestehende Viruszirkulation im Bestand reduziert werden. So sollten die Altersgruppen strikt voneinander getrennt gehalten werden, kranke Tiere isoliert werden und auch das Umsetzen der Ferkel sollte vermieden werden. Verwendete Nadeln sollten regelmäßig (wurfweise, buchtenweise, etc.) gewechselt werden. Ein wichtiger Punkt ist die Hygiene, weshalb ein striktes Rein/Raus-Verfahren angewendet werden sollte (Pitkin et al. 2009, Zimmerman et al. 2019). Die oben angeführten Maßnahmen sind Teil des McREBEL (Management Changes to Reduce Exposure to Bacteria to Eliminate Losses from PRRS) Systems, mit dessen Hilfe die PRRSV-assoziierten Todesfälle in Saug- und Aufzuchtferkeln aufgrund von sekundären bakteriellen Infektionen minimiert werden können (McCaw 1995).

1.1.7.2 Externe Biosicherheit

Externe Biosicherheitsmaßnahmen sollen einen Betrieb vor einem PRRS-Virusneueintrag schützen. Eine der primären Eintragsquellen in den Bestand sind die Zukaufstiere. Diese sollten vor Eingliederung in die bestehende Herde mindestens sechs bis acht Wochen in Quarantäne gehalten und auf PRRSV getestet werden (Nguyen 2013). Negative Schweine, die in einen PRRSV-positiven Bestand eingegliedert werden, müssen akklimatisiert werden. Dies erfolgt entweder durch Kontakt mit PRRSV-positiven Schweinen oder durch die Impfung (Corzo et al. 2010, Zimmerman et al. 2019). Zudem sollte nur PRRSV-negativer Samen zugekauft werden

(Corzo et al. 2010, Nguyen 2013). Auch der Fahrzeug- und Personenverkehr auf einem Betrieb spielen eine Rolle bei der Einschleppung des Virus. Deswegen sollte eine strikte Trennung von reinen und unreinen Bereichen und eine Kontrolle von Fahrzeug- und Personenverkehr erfolgen. Das Betriebspersonal muss auf Hygienemaßnahmen achten (Rein und Rausduschen, Stiefelwechsel, Handschuhwechsel etc.). Ein weiterer wichtiger Punkt ist die Kontrolle von Insekten am Betrieb, da auch diese Überträger sein können. Luftfiltrationen stehen ebenfalls zur Verfügung, haben aber in Europa in der Praxis kaum Bedeutung. Transportmittel sollten ebenfalls gründlich gesäubert und desinfiziert werden (Nguyen 2013, Pitkin et al. 2009).

1.1.7.3 Vakzine

Eine weitere sehr wichtige Maßnahme zur Reduktion von klinischen Symptomen, pathologischen Läsionen sowie der Virusausscheidung ist die PRRSV-Impfung. Es stehen momentan vermehrungsfähige, attenuierte Lebendimpfstoffe (*modified live virus vaccines*, MLV) und Totimpfstoffe zur Verfügung (Nan et al. 2017).

1.1.7.3.1 Lebendvakzine

MLV-Impfstoffe können entweder attenuierte PRRSV-1 oder PRRSV-2 Stämme (Selbitz et al. 2015) enthalten und lösen optimalerweise Immunität sowohl gegen homologe, als auch gegen heterologe PRRSV-Stämme aus (Charerntantanakul 2012, Nan et al. 2017). Trotzdem besteht nie eine Kreuzprotektivität gegenüber allen Feldstämmen, somit kann es nach Infektion mit heterologen Isolaten trotzdem zu klinischen Symptomen kommen (Charerntantanakul 2012, Nan et al. 2017, Renukaradhya et al. 2015b). Nichtsdestotrotz kann die Impfung schwere Krankheitsverläufe, die Dauer der Virämie und die Dauer und Menge der Virusausscheidung reduzieren (Duerlinger et al. 2022, Murtaugh et al. 2002, Selbitz et al. 2015). Die MLV-Impfstoffe bringen aber auch Nachteile mit sich. So wurde gezeigt, dass Schweine, die mit MLV-Vakzinen geimpft wurden, eine Virämie von bis zu vier Wochen nach der Immunisierung aufweisen können und so das Impfvirus auf naive Tiere übertragen können (Charerntantanakul 2012, Papatsiros et al. 2006). Weiters wurde von Rekombinationen zwischen MLV-Impfstoffen und zirkulierenden Isolaten berichtet (Madsen et al. 1998, Wenhui et al. 2012).

1.1.7.3.2 Totimpfstoffe

Totimpfstoffe replizieren im Gegensatz zu MLV-Vakzinen nicht in geimpften Tieren und können somit nicht von diesen übertragen werden. Jedoch sollte beachtet werden, dass Totimpfstoffe eine unspezifischere Immunantwort im Körper auslösen als MLV-Impfstoffe (Charentantanakul 2012, Kim et al. 2011). Es gibt allerdings Feldversuche, die zeigten, dass die wiederholte Verabreichung inaktiverter Vakzinen in einem PRRS-positiven Betrieb zu einer signifikanten Verbesserung der Reproduktionsleistung und zu einem Anstieg an abgesetzten Ferkeln pro Sau und Jahr geführt hat (Nan et al. 2017, Papatsiros et al. 2006). Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass sowohl MLV-Vakzinen als auch Totimpfstoffe nicht im Stande sind, eine PRRSV- Infektion zu verhindern, aber die klinischen Symptome und die Virusausscheidung reduzieren können, wobei die Effektivität der MLV-Vakzine jene der Totimpfstoffe deutlich übersteigt.

1.1.7.3.3 Impfschemata

Nach einer PRRSV-Impfung dauert es etwa drei bis vier Wochen, bis eine belastbare Immunität besteht. Jungsaugen sollten, bevor sie in die Stammherde eingegliedert werden, zwei Mal im Abstand von drei bis vier Wochen gegen PRRSV geimpft werden. Die Impfung eines Sauenbestandes findet dann entweder terminorientiert, alle drei bis vier Monate, oder produktionsorientiert, zum Beispiel am sechsten Tag *post partum* und am 60. Trächtigkeitstag, statt. Für Ferkel sind in Österreich aktuell nur MLV-Vakzinen zugelassen. Diese werden geimpft, um die Viruszirkulation und die klinischen Symptome in der Aufzucht und Mast zu reduzieren (Heinritzi et al. 2006).

1.1.7.3.4 DNA-, Subunit- und Vektor- PRRSV Vakzinen

Zusätzlich zu den beiden oben genannten, in Österreich zugelassenen, Impfstoffarten gibt es noch weitere Impfstoff-Formulierungen. Diese sind die sogenannten DNA-, Subunit- und Vektor-Impfstoffe (Charentantanakul 2012). Es handelt sich dabei um vollständig inaktivierte Impfstoffe. Bei den Subunit- Impfstoffen wurde versucht mithilfe von Insektenzellen-, die

Strukturproteine von PRRSV aufgewiesen haben, einen wirksamen Schutz zu erzeugen. Zudem kamen auch pflanzenbasierte Subunit-Impfstoffe zum Einsatz. Doch bisherige Subunit-Impfstoffe zeigten nur eine geringe Wirkung und brachten nur einen partiellen Schutz (Plana Duran et al. 1997, Renukaradhya et al. 2015a). Auch vektorassoziierte Vakzine (Adenovirus-Vektoren und Poxvirus-Vektoren) wurden untersucht. Der Adenovirus-Vektor Impfstoff zeigte zwar eine wirksame Immunisierung in Mäusen, jedoch konnte diese in Schweinen nicht nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu kam es bei Verwendung eines Poxvirus-Vektors zu einer verminderten Ausprägung der Virämie und weniger Viruslast in lymphatischen Geweben und der Lunge und geringeren Körpertemperaturen, aber auch hier wurde kein kompletter Schutz erreicht (Gagnon et al. 2003, Shen et al. 2007). Als dritte Alternative zu den herkömmlichen Impfstoffen wurden DNA-Impfstoffe erforscht, welche jedoch auch keinen ausreichenden Schutz gegen PRRSV bieten, jedoch eine vielversprechende Booster-Wirkung nach MLV- Vakzinen zeigen (Renukaradhya et al. 2015a).

In Österreich gibt es im Moment mehrere zugelassene Impfstoffe gegen PRRSV. Darunter ein inaktivierter Impfstoff und mehrere Lebendimpfstoffe gegen PRRSV-1. Informationen zu diesen Impfstoffen sind der jeweiligen Fachinformation der Impfstoffe zu entnehmen. Diese sind im Arzneimittelspezialitätenregister des Bundesamtes für Sicherheit und Gesundheitswesen zu finden (Bundesamt für Sicherheit im Gesundheitswesen Arzneyspezialitätenregister.https://aspreregister.basg.gv.at/aspreregister/faces/aspreregister.jspx;jsessionid=7wllrPrMUQPa_byfHzqdSvfuPciQ6mUUGPBCGeB7lFy_nlbD6kch!-96273023 (Zugriff 18.12.2022).

1.2 Ziel der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, die Wirksamkeit neuartiger homologer und heterologer PRRSV-Inaktivimpfstoffe nach experimenteller Infektion im Ferkelmodell zu untersuchen. Dazu wurden pathologische Veränderungen der Organe, mit besonderem Augenmerk auf die Lunge, von geimpften, mit PRRSV infizierten Ferkeln und nicht geimpften, infizierten Ferkeln makroskopisch und histologisch beurteilt und verglichen.

Die Hypothese war, dass infizierte geimpfte Schweine weniger Lungenläsionen aufweisen als nicht geimpfte Ferkel.

2 Material und Methoden

2.1 Versuchsaufbau

Der gesamte Tierversuch wurde von der Ethik- und Tierschutzkommission, der nationalen Behörde gemäß §§ 26ff. des österreichischen Tierversuchsgesetzes 2012 (TVG 2012) genehmigt (GZ: 2021-0.615.903).

In diesen Tierversuch wurden insgesamt 96 männliche und weibliche Ferkel (Hausschwein, Art: *Sus scrofa domesticus*) eingeschlossen. Durch die Messung PRRSV-spezifischer Antikörper mittels ELISA (IDEXX PRRS X3[®] Ab Test, IDEXX Europe B.V., Hoofddorp, Niederlande) im Serum der Sauen und der Ferkel vor Beginn des Versuchs wurde die PRRSV Freiheit der Tiere bestätigt. Im ersten Schritt wurden diese Ferkel in sechs Gruppen zu je 16 Tieren aufgeteilt. Dabei wurden das Körpergewicht der Ferkel und ihr Herkunftswurf berücksichtigt. Die Tiere wurden an ihrem dritten Lebenstag, dem Studientag -38, am Herkunftsbetrieb geimpft, wobei die Tiere der Gruppen 1 und 2 nicht geimpft wurden. Die Tiere der Gruppe 3 wurden einmalig am dritten Lebenstag mit einem auf dem PRRSV-1 Subtyp 1 Feldvirusisolat „AUT15-33“ basierenden homologen Impfstoff intranasal geimpft. Weitere 16 Ferkel (Gruppe 4) wurden ebenso einmalig am dritten Lebenstag mit dem homologen Impfstoff intradermal geimpft. Die Ferkel der Gruppe 5 wurden mit demselben homologen Impfstoff geimpft. Jedoch wurden diese Tiere nicht nur am dritten Lebenstag intranasal, sondern auch am 17. Lebenstag intradermal geimpft. Die Tiere der Gruppe 6 wurden am dritten Lebenstag mit dem heterologen, auf dem PRRSV-1 Subtyp 3 Feldvirusisolat „Lena“ basierenden Impfstoff geimpft (Tab 1.).

Gruppe (Anzahl der Tiere)	Impfung	Applikation	PRRSV Infektion	Aufstallung
1 (16)	keine	-	Zellkultur-Medium	Stallungen der Universitätsklinik für Schweine
2 (16)	keine	-	PRRSV AUT15-33 5x10 ⁵ TCID ₅₀	Kontumazstall Abteil 1
3 (16)	Auf „AUT15-33“ basierender Impfstoff	Intranasal (3. Lebenstag)	PRRSV AUT15-33 5x10 ⁵ TCID ₅₀	Kontumazstall Abteil 2
4 (16)	Auf „AUT15-33“ basierender Impfstoff	Transdermal (3. Lebenstag)	PRRSV AUT15-33 5x10 ⁵ TCID ₅₀	Kontumazstall Abteil 3
5 (16)	Auf „AUT15-33“ basierender Impfstoff	Intranasal (3. Lebenstag) + transdermal (17. Lebenstag)	PRRSV AUT15-33 5x10 ⁵ TCID ₅₀	Kontumazstall 8 Schweine in Abteil 2 8 Schweine in Abteil 3
6 (16)	Auf „Lena“ basierender Impfstoff	Intranasal (3. Lebenstag)	PRRSV AUT15-33 5x10 ⁵ TCID ₅₀	Kontumazstall Abteil 4

Tab 1. Übersicht über die Gruppen

Als homologer Impfstoff wurde in der vorliegenden Studie ein auf dem PRRSV-1 Subtyp 1 Feldvirusisolat „AUT15-33“ basierender Impfstoff verwendet. Um auch die heterologe Schutzwirkung des neuartigen Inaktivatimpfstoffes zu beurteilen, wurde für eine Gruppe ein auf dem PRRSV-1 Subtyp 3 Isolat „Lena“ basierender Impfstoff eingesetzt. Es wurden außerdem zwei unterschiedliche Applikationsrouten untersucht. Den Ferkeln, die intranasal geimpft wurden, wurden je zwei Milliliter des Impfstoffes in ein Nasenloch appliziert. Hierfür wurden Dosierpistolen (HSW ECO-MATIC®, Henke-Sass, Wolf GmbH, Tuttlingen, Deutschland) mit einem Zerstäuberaufsatz (Henke-Sass, Wolf GmbH, Tuttlingen, Deutschland) verwendet. Die transdermale Impfung von je zwei Millilitern des Impfstoffes pro Tier erfolgte mit einem nadellosen Injektionssystem (Pulse NeedleFree Systems, Inc., Kansas, USA).

Nach dem Absetzen am 26. Lebenstag (Studientag -15) wurden die Ferkel an die Universitätsklinik für Schweine der Veterinärmedizinischen Universität Wien überstellt. Die Tiere der negativen Kontrollgruppe wurden in den Stallungen der Universitätsklinik für Schweine aufgestellt. Die Ferkel, die infiziert wurden, wurden im Kontumazstall der Sicherheitsstufe 2 (BSL- 2) der Veterinärmedizinischen Universität Wien in 4 verschiedenen

Abteilen aufgestellt (Abb. 1), wobei die Tiere der Gruppe 5 aufgeteilt wurden und zusammen mit den Tieren der Gruppen 3 und 4 gehalten wurden (Tab. 1). Jedes Abteil wurde mit ausreichend Futterstellen, Tränken, Gummimatten, Wärmelampen und Beschäftigungsmaterial ausgestattet. Die Fütterung erfolgte mit einem konventionellen Ferkelfutter ad libitum. Die Abteile im Kontumazstall verfügten außerdem über einen getrennten Luftweg. Für ausreichende Hygiene standen eine Personalschleuse und eine Materialschleuse zur Verfügung. Beim Betreten und Verlassen der Ställe musste sich jede Person hinein bzw. hinausduschen und seine Kleidung wechseln (Abb. 1). Bei Auffälligkeiten (Lahmheiten, Verletzungen, Durchfall etc.) wurden die Tiere entsprechend nach Indikation mit Antibiotika (Betamox long acting®, Norbrook Laboratories, Irland), Blauspray und Entzündungshemmer (Metacam® 5 mg/ml, Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH, Deutschland) behandelt.

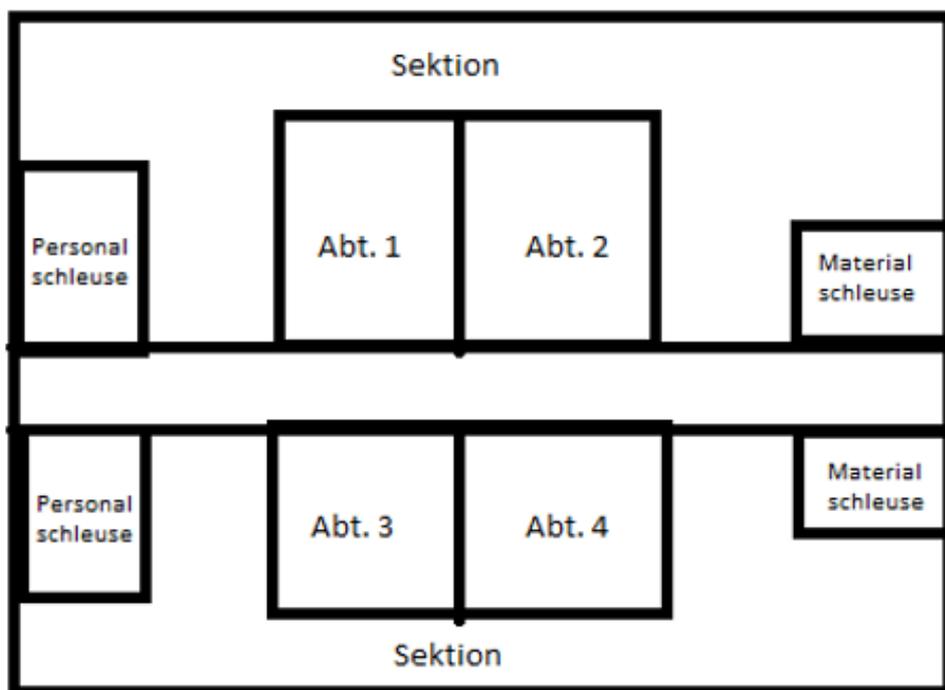


Abb. 1 Kontumazstall

Alle Ferkel, außer die der negativen Kontrollgruppe (Gruppe 1), wurden am 41. Lebenstag (Studientag 0) mit dem PRRSV-Isolat „AUT15-33“ intranasal infiziert. Es wurde eine Infektionsdosis von 5×10^5 TCID₅₀ verwendet. Das verwendete PRRSV-1 Isolat wurde 2015 erstmalig aus einem österreichischen Ferkelproduktionsbetrieb, wo es schwerwiegende klinische Symptome sowohl in Zuchtsauen, als auch in Ferkeln verursachte, isoliert (Sinn et al. 2016). AUT15-33 eignet sich besonders gut für experimentelle Infektionen, da es selbst bei niedrigen Infektionsdosen und unter Versuchsbedingungen klinische Symptome verursachen kann (Duerlinger et al. 2022).

Die erste Hälfte der Tiere jeder Gruppe wurde schließlich an den Studientagen 10 und 11 euthanasiert, die Euthanasie der restlichen Tiere folgte an den Studientagen 27 und 28 (Abb. 2.). Dazu wurden die Tiere mittels intramuskulärer Injektion von Ketaminhydrochlorid (Narketan®, 100mg/ml, Vetoquinol GmbH, Österreich; 10 mg/kg Körpergewicht) und Azaperon (Stresnil®, 40mg/ml, Elanco GmbH, Österreich; 1,3 mg/kg Körpergewicht) in Narkose gelegt und anschließend wurde eine Kombination aus Embutramid, Mebezoniumiodid und Tetracain (T61®, MSD-Tiergesundheit, Deutschland) intrakardial verabreicht.

2.2 Sektion und Probenbeurteilung

Im Zuge der Sektion wurden die Lungen aller Ferkeln untersucht und makroskopisch feststellbare Lungenläsionen wie marmorierte Areale und Bereiche von fester Konsistenz nach Schweregrad, Lage und prozentualem Anteil des betroffenen Lungenlappens beurteilt. Es wurden alle sieben Lungenlappen (linke und rechte Spitzenlappen, Mittellappen und Hauptlappen sowie der akzessorische Lungenlappen) jedes Ferkels makroskopisch beurteilt. Mit dem prozentuellen Anteil der Läsionsausprägung wurde anhand der relativen Gewichtung der verschiedenen Lungenlappen nach Christensen et al. (1999) der Gesamtscore der makroskopischen Läsionen bestimmt (Christensen et al. 1999). Im Anschluss wurden aus dem linken Mittellappen, dem linken Hauptlappen und dem rechten Mittellappen Proben entnommen (2x2 cm) und in 10%iger neutral gepufferter Formaldehydlösung für 24-48 h fixiert, mithilfe von Alkohol und Xylol dehydriert und anschließend in Paraffinwachs eingebettet. Anschließend wurden 3-4 µm dicke Scheiben geschnitten und mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt (HE-Färbung). Danach wurden die gefärbten Schnitte histologisch beurteilt. Neben den Lungenläsionen wurde die Vergrößerung der Tracheobronchiallymphknoten

beurteilt und im Sektionsprotokoll festgehalten. Zudem wurde während der Sektion auf Veränderungen anderer Organe und Körperhöhlen geachtet.

Histologisch wurden Schweregrad und Ausdehnung (Schweregrad: 0: keine Läsion; 1: leicht; 2: mäßig oder 3: schwer; Ausdehnung: 0: nicht vorhanden; 1: fokal; 2: multifokal; 3: diffuse Verteilung der jeweiligen Läsion) folgender Lungenläsionen der drei untersuchten Lungenlappen beurteilt: Hypertrophie und Hyperplasie von Pneumozyten, septale mononukleäre Infiltration, intraalveolärer nekrotischer Debris, intraalveoläre Ansammlung von Entzündungszellen und perivaskuläre Ansammlung von Entzündungszellen. Der histologische Gesamtscore wurde nach Balka et al. (2013) aus der Summe von Schweregrad und Ausdehnung jedes histologisch untersuchten Parameters in den untersuchten Lungenlappen berechnet (maximale Punktezahl von 18 pro Läsion; maximale Punktezahl von 90 pro Schwein) (Balka et al. 2013).

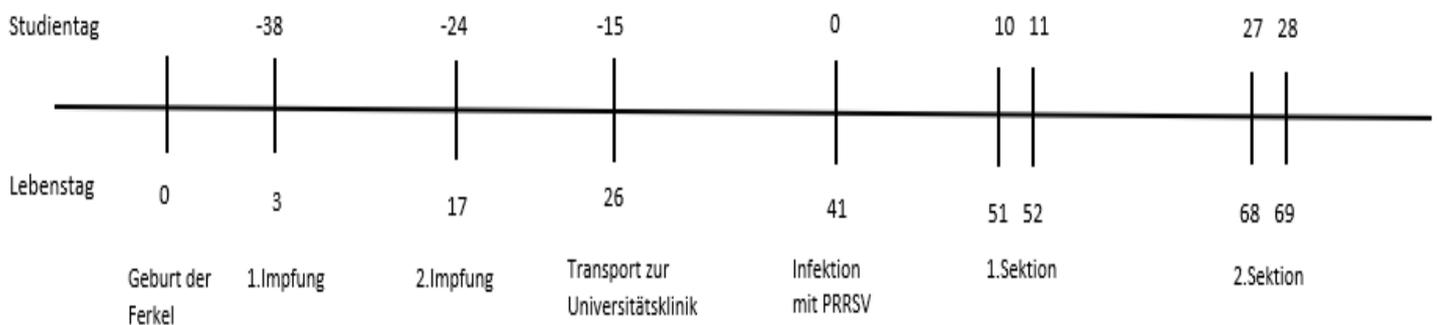


Abb. 2 Zeitstrahl des Experiments

2.3 Statistik

Die statistische Analyse wurde mit IBM SPSS® Statistics (Version 28.0) durchgeführt. Alle Daten wurden mittels Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung getestet. Es wurden die unterschiedlichen Versuchsgruppen hinsichtlich der makroskopischen und histologischen Lungenläsionen miteinander verglichen. Für die Daten ohne Normalverteilung wurden hierzu nichtparametrische Tests (Kruskal-Wallis-Test/Mann-Whitney-U-Test) verwendet. Als signifikanter p-Wert wurde $p < 0.05$ festgelegt.

3 Ergebnisse

Im vorliegenden Versuch wurden insgesamt 96 Schweine sezirt und untersucht. Grundsätzlich konnten in jeder Gruppe makroskopische und histologische Veränderungen der Lungen gefunden werden.

3.1 Makroskopische Lungenveränderungen

Ferkel aus allen infizierten Gruppen zeigten makroskopische Lungenläsionen in Form von marmorierten Arealen und Bereichen von fester Konsistenz (Abb. 4). Da alle in die Studie eingeschlossenen Tiere ursprünglich aus einer konventionellen Schweinehaltung stammen, ist es nicht ungewöhnlich, dass auch einige Tiere der Negativkontrollgruppe Lungenläsionen, wenn auch in viel geringerem Ausmaß als die infizierten Tiere, aufwiesen. Wie erwartet und ähnlich in anderen Studien zu sehen, waren die makroskopischen Lungenläsionen 10 Tage nach der Infektion wesentlich deutlicher als 27 Tage nach der Infektion. Die makroskopischen Lungenläsionen aller infizierten Gruppen (Gruppe 2-6) unterschieden sich am Studientag 10/11 signifikant von denen der negativen Kontrollgruppe ($p < 0,05$) (Gruppe 1). Zwischen den infizierten Gruppen waren keine signifikanten Unterschiede in den Lungenläsionen erkennbar. Am Studientag 27/28 unterschieden sich nur noch die Gruppen 4 und 5 zur Gruppe 1 signifikant (Abb.3)

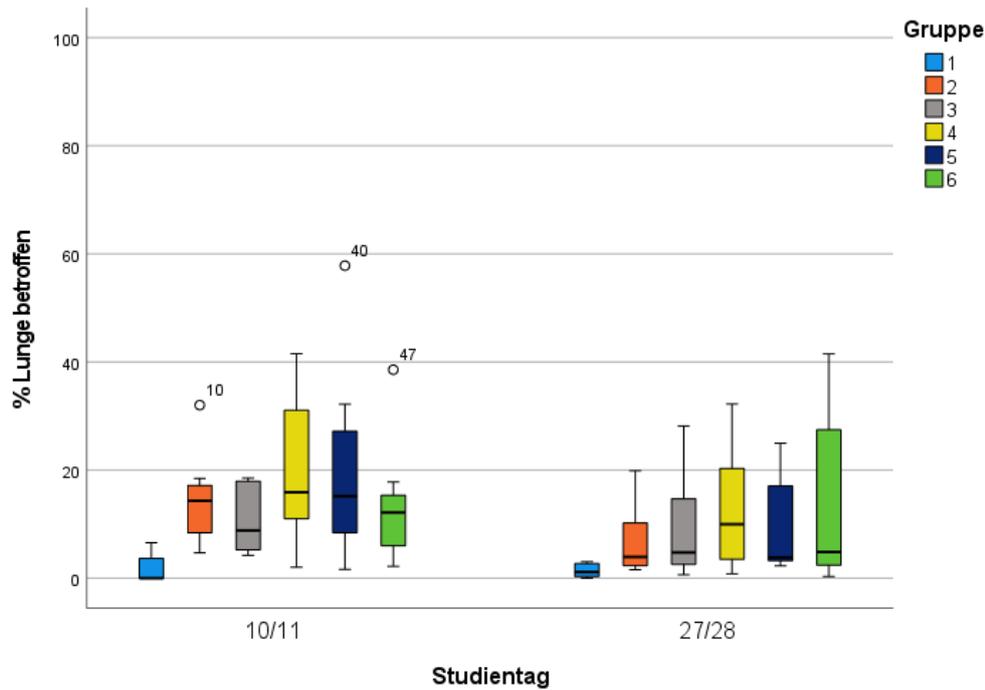


Abb.3 Makroskopische Lungenläsionen. Totaler Gesamtscore der Lungenläsionen (entsprechend dem prozentuellen Anteil der betroffenen Lunge) der Ferkel jeder Gruppe (Gruppe 1 = Negativkontrolle; Gruppe 2 = Positivkontrolle; Gruppe 3 = VACC AUT15-33 intranasal; Gruppe 4 = VACC AUT15-33 transdermal; Gruppe 5 = VACC AUT 15-33 intranasal und transdermal; Gruppe 6 = VACC Lena intranasal) die entweder am 10./11. Studientag oder am 27./28. Studientag seziiert wurden. Die Boxplots zeigen das erste und dritte Quartil und den Median Wert. Die „Whiskers“ zeigen den Maximal- und Minimal-Wert, die im 1,5-fachen Interquartilradius (IQR) enthalten sind. Ausreißer (durch Kreise gekennzeichnet) liegen außerhalb des 1,5-fachen IQR.

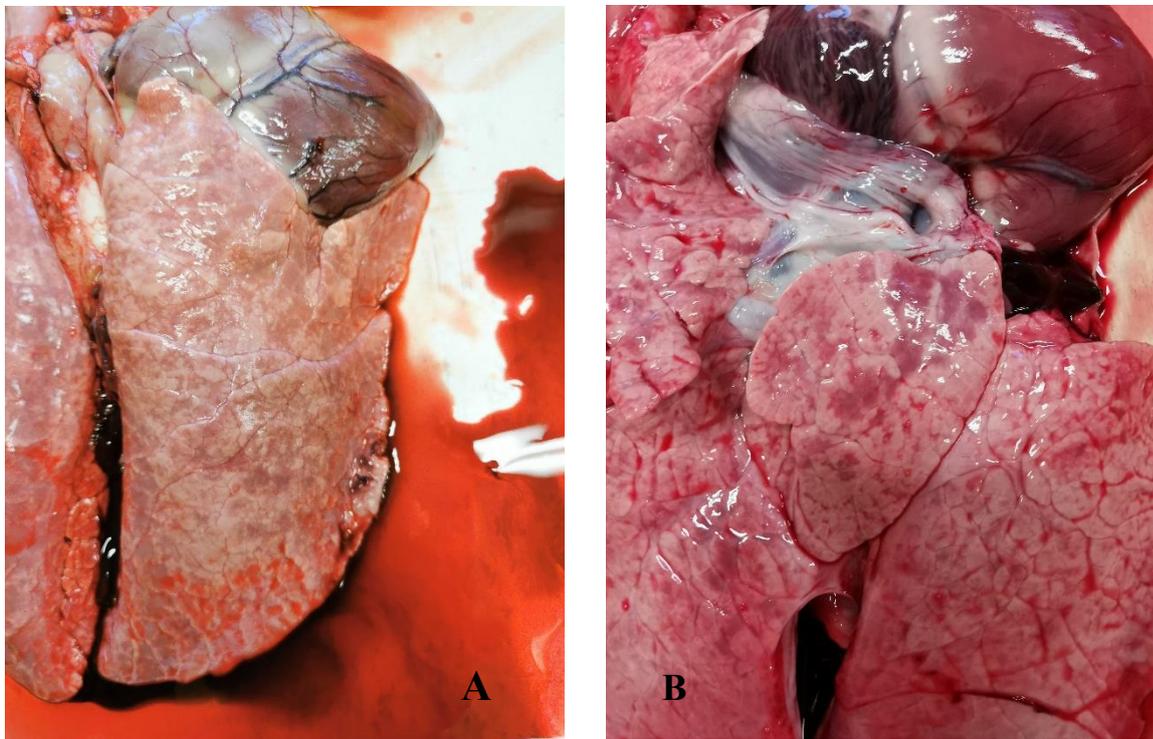


Abb. 4 Pathologisch verändertes Lungengewebe eines Schweines am Tag der Sektion. Deutliche Marmorierung der Lungenoberfläche gekennzeichnet durch sichtbare dunkle Verfärbungen. (A) Lunge im Überblick. (B) Nahaufnahme der Lunge.

3.2 Histologische Lungenveränderungen

Histologische Lungenläsionen konnten ebenso in allen sechs Versuchsgruppen gefunden werden. Die Gruppen 2-6 wiesen sowohl am Studientag 10/11 als auch am Studientag 27/28 einen signifikant ($p < 0,05$) höheren histologischen Gesamtscore als die Gruppe 1 (Negativkontrolle) auf (Abb. 4). Zwischen den geimpften und nichtgeimpften infizierten Schweinen (Gruppe 2-6) gab es keine signifikanten Unterschiede. Auch hier waren, ähnlich der makroskopischen Untersuchung, die histologischen Läsionen am zehnten Tag nach Infektion deutlicher ausgeprägter als am Tag 27 nach Infektion. Läsionen wurden ebenso bei Tieren aus der Negativkontrollgruppe gefunden, aber auch in deutlich geringerem Ausmaß.

Die fünf befundeten Läsionen (Hypertrophie und Hyperplasie von Pneumozyten, septale mononukleäre Infiltration, intraalveolärer nekrotischer Debris, intraalveoläre Ansammlung von Entzündungszellen und perivaskuläre Ansammlung von Entzündungszellen), unterschieden sich ebenso nicht voneinander, egal ob geimpft oder nicht geimpft (Abb.5). Dieselben Läsionen wurden auch bei der Negativkontrollgruppe gefunden, jedoch in einem deutlich geringeren Ausmaß.

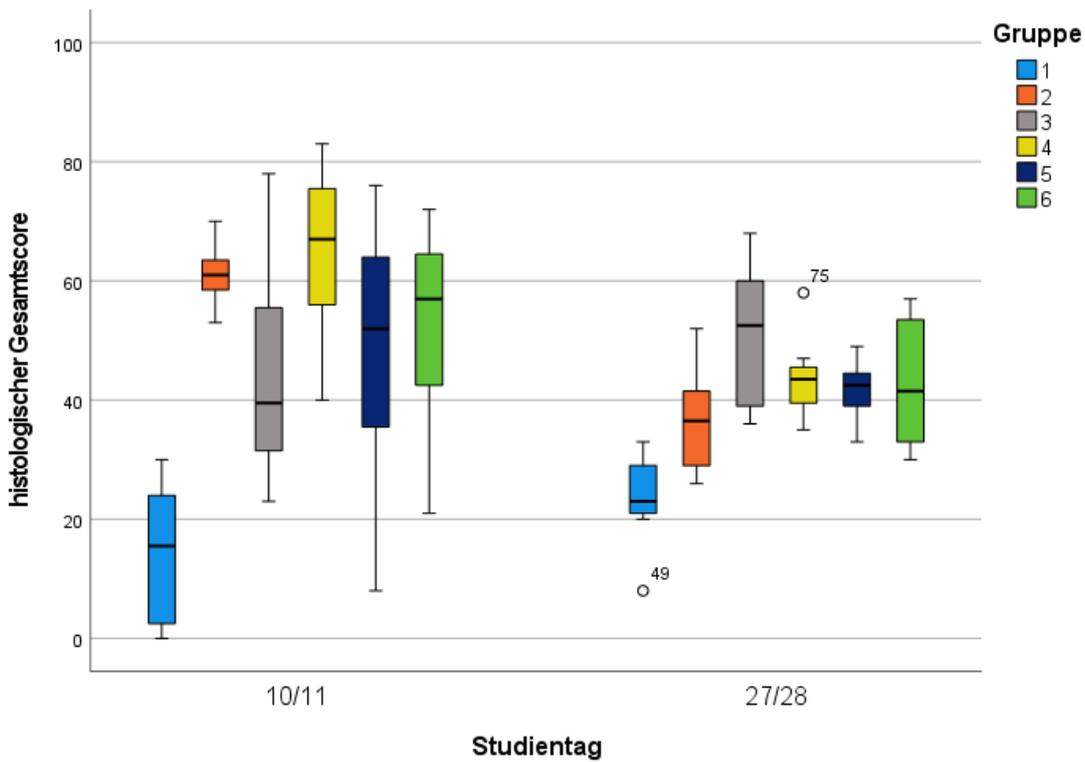


Abb.5 Histologische Lungenläsionen. Histologischer Gesamtscore der Ferkel jeder Gruppe (Gruppe 1 = Negativkontrolle; Gruppe 2= Positivkontrolle; Gruppe 3 = VACC AUT15-33 intranasal; Gruppe 4 = VACC AUT15-33 transdermal; Gruppe 5 = VACC AUT 15-33 intranasal und transdermal; Gruppe 6= VACC Lena intranasal) die entweder am 10./11. Studientag oder am 27./28.Studientag seziiert wurden. Die Boxplots zeigen das erste und dritte Quartil und den Median Wert. Die „Whiskers“ zeigen den Maximal- und Minimal-Wert, die im 1,5-fachen Interquartilradius (IQR) enthalten sind. Ausreißer (durch Kreise gekentzeichnet) liegen außerhalb des 1,5-fachen IQR.

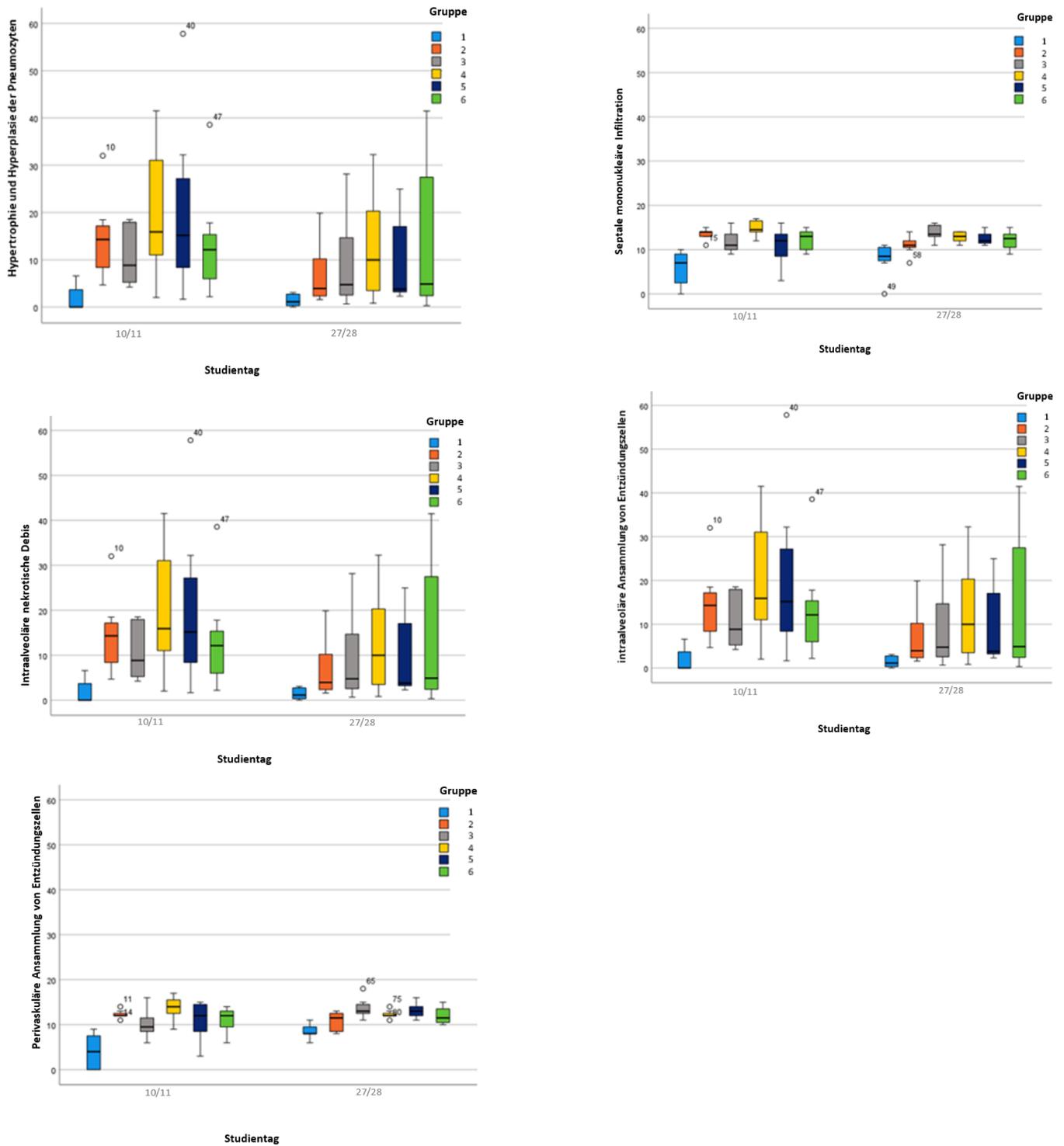


Abb.6 Histologische Lungenläsionen. Histologische Lungenläsionen von Ferkel jeder Gruppe (Gruppe 1 = Negativkontrolle; Gruppe 2= Positivkontrolle; Gruppe 3 = VACC AUT15-33 intranasal; Gruppe 4 = VACC AUT15-33 transdermal; Gruppe 5 = VACC AUT 15-33 intranasal und transdermal; Gruppe 6= VACC Lena intranasal) die entweder am 10./11. Studientag oder am 27./28. Studientag seziiert wurden. Drei Lungenlappen von jedem Ferkel wurden histologisch auf die Ausprägung (keine Läsion (0), geringe (1) mittelgradige (2) oder hochgradige (3) Läsion). folgender fünf Lungenläsionen beurteilt: Hypertrophie und Hyperplasie der Pneumozyten, septale Infiltration, intraalveoläre nekrotische Debris, intraalveoläre Ansammlung von Entzündungszellen und perivaskuläre Ansammlung von Entzündungszellen. Die Boxplots zeigen das erste und dritte Quartil und den Medianwert. Die „Whiskers“ zeigen den Maximal- und Minimalwert, die im 1,5-fachen Interquartilradius (IQR) enthalten sind. Ausreißer (durch Kreise gekennzeichnet) liegen außerhalb des 1,5-fachen IQR.

4 Diskussion

Das Virusisolat AUT33-15 sorgte seit seinem ersten Aufkommen 2015 in Niederösterreich für massive reproduktive Verluste und zeigte sein epidemisches Potential, indem es sich rasant in verschiedene Regionen in Österreich ausbreitete. Außerdem zeigt das Isolat Ähnlichkeiten mit anderen Isolaten aus Ungarn und Slowenien in der ORF 5 Sequenz und Isolaten aus Kroatien in der ORF 7 Sequenz (Sinn et al. 2016, Szabó et al. 2019).

Obwohl es eher schwierig ist mit einer experimentellen Monoinfektion mit dem PRRS-Virus klinische Symptome hervorzurufen, ist es in diesem Versuch erfolgreich gelungen. So zeigten die Ferkel klinische Symptome und pathologische Veränderungen. Das Isolat AUT33-15 eignet sich daher sehr gut für eine experimentelle Infektion, vor allem da es schon in geringer Dosis Symptome verursachen kann (Duerlinger et al. 2022, van Reeth et al. 1996). Durch die erfolgreiche Infektion der Ferkel konnte die Wirksamkeit eines auf dem PRRSV-1 Subtyp 1 Feldvirusisolat „AUT15-33“ basierenden homologen Impfstoffes und eines auf dem PRRSV-1 Subtyp 3 Isolat „Lena“ basierendem Impfstoff getestet werden. Makroskopische und pathohistologische Veränderungen in der Lunge wurden bei nicht geimpften und geimpften Schweinen nach der Infektion verglichen.

Als Sektionstage entschied man sich für den zehnten und den 27. Tag nach Infektion, um die pathologischen Veränderungen an verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion vergleichen zu können. Die makroskopischen Lungenveränderungen, wie marmorierte Areale und verhärtete Konsistenz, waren in diesem Versuch am zehnten Tag etwas ausgeprägter als am 27. Tag, aber nicht schwerwiegend. Dürlinger et al. (2022) hatten bei ihrer Studie signifikantere Unterschiede. Hier wurden drei Ferkelgruppen im Alter von vier Wochen geimpft und 28 Tage danach mit dem AUT15-33 Stamm infiziert. Die Sektion erfolgte in dieser Studie später, am 14. und am 42. Tag nach Infektion. Außerdem wurden die Schweine mit unterschiedlichen Dosierungen (low dose 10^5 TCID₅₀ und high dose 10^3 TCID₅₀) des Virus infiziert. Ein weiterer Unterschied war der verwendete Impfstoff. In der Studie wurde ein anderer Impfstoff, nämlich ein attenuierter Lebendimpfstoff (Ingelvac PRRSFLEX[®]EU (Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH, Germany)) verwendet (Duerlinger et al. 2022). Die Läsionen beginnen nach etwa drei bis vier Wochen abzunehmen, soweit keine Sekundärinfektionen vorliegen (Balka et al. 2013, Mengeling und Lager 2000). Die Ursache für die reduzierten Läsionen am zweiten Sektionstag könnten also am Zeitpunkt der zweiten Sektion liegen.

Es gab auch keinen Unterschied in den Lungenläsionen zwischen den mit dem Lena-Stamm geimpften Schweinen und denen mit dem AUT33-15 Stamm geimpften Tieren. Kreuzmann et

al. (2021) wiesen ähnliche Lungenläsionen in einer Studie nach, wobei diese bei den geimpften Schweinen wesentlich geringer waren. In ihrer Studie wurde ebenso ein anderer Impfstoff verwendet, nämlich der kommerzielle Lebendimpfstoff Suvaxyn® PRRS MLV. Weiters wurden hier, sowie in Duerlinger et al. (2022), die Schweine intramuskulär geimpft (Duerlinger et al. 2022, Kreuzmann et al. 2021). In dieser Studie hingegen wurde die Impfung transdermal bzw. intranasal verabreicht, wobei die verschiedenen Verabreichungswege des Impfstoffes (intranasal, transdermal, intranasal und transdermal), keinen wirklichen Einfluss auf die Ausprägung der Läsionen in dieser Studie hatten.

Auch die histologischen Veränderungen wurden bei den geimpften Schweinen nicht durch die Impfung reduziert. In der Studie wurden drei Lungenlappen auf die folgenden Läsionen untersucht: Hypertrophie und Hyperplasie von Pneumozyten, septale mononukleäre Infiltration, intraalveolärer nekrotischer Debris, intraalveoläre Ansammlung von Entzündungszellen und perivaskuläre Ansammlung von Entzündungszellen. Nach Balka et al. (2013) reduzierten sich am Tag 21 nach Infektion intraalveolärer Debris und intraalveoläre Ansammlung von Entzündungszellen deutlich. Diese zwei Läsionen stellen die akute Phase der Infektion dar, in der die infizierten Makrophagen schädliche Substanzen freisetzen und das Gewebe schädigen. Nach der akuten Phase fängt das Immunsystem an, das nekrotische Gewebe zu entfernen, die neutrophilen Granulozyten verschwinden und untergegangene Pneumozyten werden durch Pneumozyten Typ II ersetzt (Balka et al. 2013).

In diesem Versuch waren diese beiden Läsionen am zweiten Sektionstag ebenso reduziert, aber auch hier nur sehr gering im Vergleich mit dem ersten Sektionszeitpunkt. In der Studie von Dürlinger et al. (2022) waren diese zwei Veränderungen deutlich geringer am Tag 42 nach Infektion (Duerlinger et al. 2022).

So spielte die Impfung auch bei den histologischen Lungenveränderungen keine wirkliche Rolle, da es keinen Unterschied in der Ausprägung der Läsionen zwischen geimpften und nicht-geimpften Ferkeln gab.

Interessant ist jedoch, dass dieselben fünf Läsionen auch bei der Negativkontrollgruppe (nicht geimpft und nicht infiziert) zu finden waren, wenn auch in deutlich geringerem Ausmaß. Die Ursache könnte darin liegen, dass die Ferkel, die in dieser Studie verwendet wurden, ursprünglich aus einem konventionellen Betrieb stammen. Eventuell spielen auch bakterielle Infektionen immer eine Rolle in der Ausprägung der Läsionen.

Wie bereits erwähnt wurde in den oben genannten Studien ein Lebendimpfstoff verwendet, der einen sehr guten Schutz gegen das Virus bildet und die Läsionen in den Lungen verringert. In der Vergangenheit schützten MLVs sehr effektiv gegen Infektionen mit homologen Stämmen

und es wurde auch eine Kreuzprotektivität zu heterologen Stämmen beobachtet (Li et al. 2014, Martelli et al. 2009). Im Gegensatz dazu wurde in dieser Studie ein inaktivierter Impfstoff verwendet. Inaktivierte Impfstoffe zeigten in vergangenen Studien nur eine teilweise effektive Schutzwirkung gegen das PRRS-Virus (Scortti et al. 2007, Vanhee et al. 2009, Zuckermann et al. 2007).

Ein wichtiger Schlüsselfaktor für einen Schutz gegen das Virus sind virusneutralisierende Antikörper. Diese sollen vor allem transplazentäre Infektionen in trächtigen Sauen verhindern. (Lopez und Osorio 2004). In einer Studie von Li et al (2014), die einen attenuierten Lebendimpfstoff verwendeten, waren diese Antikörper in den geimpften Tieren auch deutlich erhöht, im Gegensatz zu den nicht geimpften Tieren. Hingegen konnte in der Studie von Vanhee et al. (2009), die einen inaktivierten Impfstoff verwendeten, keine derartige Erhöhung der neutralisierenden Antikörper bei den geimpften Tieren detektiert werden (Li et al. 2014, Vanhee et al. 2009). In anderen Studien, in denen ebenfalls ein inaktivierter Impfstoff verwendet wurde, konnten aber sehr wohl virusneutralisierende Antikörper gefunden werden. Nichtsdestotrotz war der Schutz vor einer Infektion auch bei diesen Studien nicht sehr effektiv (Scortti et al. 2007, Zuckermann et al. 2007). Im Grunde könnte man sagen, dass die Lebendimpfstoffe eine bessere Wirkung haben, da diese zumindest in den Studien eine Reduzierung der Läsionen in den Lungen bewirkten.

Dennoch sollten die Nebenwirkungen der Lebendimpfstoffe nicht außer Acht gelassen werden. Dadurch, dass die Lebendvaccine zwar abgeschwächte, aber noch lebende Viruspartikel aufweisen, kann es zur Ausscheidung der Viren kommen und so zur Infektion naiver Tiere (Bøtner et al. 1997, Charerntantanakul 2012). Dewey et. al (2004) impften in ihrer Studie tragende Sauen mit einem Lebendimpfstoff. Die Sauen zeigten daraufhin Fieber und gebaren mehr totgeborene Ferkel als Sauen, die erst nach dem Abferkeln geimpft wurden (Dewey et al. 2004). Aus diesem Grund sind Lebendimpfstoffe nicht unbedingt die bessere Wahl. Außerdem haben auch inaktivierte Impfstoffe ihre Wirksamkeit im Feld bewiesen (Papatsiros et al. 2006). Zudem sollte beachtet werden, dass die Schwere der Symptome immer auch vom Alter und dem Immunstatus der infizierten Tiere, vorangegangenen Infektionen bzw. Sekundärinfektionen und dem Betriebsmanagement abhängig sind (Selbitz et al. 2015, Zimmerman et al. 2019). Weiters reagiert jedes Individuum anders, sowohl auf die Infektion als auch auf die Vakzination (Johnson et al. 2004). Deswegen sollte der Impfstoff, den man verwendet, immer individuell auf den jeweiligen Betrieb abgestimmt sein.

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass es mit dem gewählten „Challengevirus“ AUT15-33 möglich war, die Schweine erfolgreich mit dem PRRS-Virus zu infizieren und pathologische Läsionen hervorzurufen. Es konnten Unterschiede zwischen den infizierten und den nichtinfizierten Schweinen in Bezug auf Ausprägung und Schwere der makroskopischen und histologischen Lungenläsionen festgestellt werden.

5 Zusammenfassung

Das Porzine Reproductive und Respiratorische Syndrom Virus (PRRSV) stammt aus der Familie der *Arteriviridae* und führt bei Schweinen zu reproduktiven und respiratorischen Krankheitssymptomen. Es ist auf der ganzen Welt endemisch und führt zu großen ökonomischen Verlusten. Das Virus zeigt einen Tropismus zu monozytischen Zellen und befällt in erster Linie die porzinen Alveolarmakrophagen. Es gibt keine spezifische Therapie gegen das Virus. So setzt man auf die Bekämpfung der Ausbreitung und die Minderung der klinischen Symptome. Eine wichtige Maßnahme hierfür ist die Impfung.

Ziel dieser Arbeit war es, die Wirksamkeit neuartiger homologer und heterologer PRRSV-Inaktivimpfstoffe nach experimenteller Infektion im Ferkelmodell zu untersuchen, wobei in der vorliegenden Arbeit ein Fokus auf pathologische Läsionen gelegt wurde. Die pathologischen Veränderungen der Lunge von geimpften, mit PRRSV infizierten Ferkeln und nicht geimpften, infizierten Ferkeln wurden hierbei makroskopisch und histologisch verglichen.

96 Ferkel aus einem PRRSV freien Betrieb wurden in 6 Gruppen zu je 16 Tieren unterteilt. Gruppen 3-6 wurden am dritten Lebenstag intranasal und/oder intradermal geimpft. Die Gruppen 1 und 2 wurden nicht geimpft. Am 41. Lebenstag wurden alle Ferkel, außer die der negativen Kontrollgruppe (Gruppe 1), mit dem PRRSV- Isolat „AUT15-33“ intranasal infiziert. Als Impfstoff wurden sowohl ein auf dem PRRSV-1 Subtyp 1 Feldvirusisolat „AUT15-33“ basierender homologer Impfstoff als auch ein auf dem PRRSV-1 Subtyp 3 Isolat „Lena“ basierender heterologer Impfstoff verwendet. An den Tagen der Sektion (Tag zehn und Tag 27) zeigten alle infizierten Gruppen makroskopische Lungenläsionen, wie marmorierte Areale und eine feste Konsistenz der Lungenlappen. Die geimpften Tiere zeigten hierbei keine Unterschiede zu den nicht geimpften Tieren. Lediglich die nicht infizierten und nicht geimpften Ferkel wiesen weniger Läsionen auf als die der anderen Gruppen. Bei der histologischen Untersuchung fand man ähnliche Ergebnisse. Bei den fünf histologisch bewerteten Lungenläsionen (Hypertrophie und Hyperplasie von Pneumozyten, septale mononukleäre Infiltration, intraalveolärer nekrotischer Debris, intraalveoläre Ansammlung von Entzündungszellen und perivaskuläre Ansammlung von Entzündungszellen) zeigte die Impfung ebenso keinen wirklichen Schutz.

6 Summary

The porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) belongs to the *Arteriviridae* family and causes reproductive and respiratory symptoms in pigs. It is endemic all over the world and is responsible for economic losses in many countries. The virus has a tropism for monocytic cells especially for porcine alveolar macrophages. There is no specific cure for the disease, so the main focus is on stopping the spread of the virus and on reduction of clinical symptoms. One important method to accomplish this is through vaccination.

The purpose of this study was to determine if new homologous and heterologous inactivated vaccines can reduce gross and histologic lung lesions in pigs after experimental infection with the PRRS virus. Therefore, pathologic lung lesions of vaccinated and infected pigs and non-vaccinated but infected pigs were compared.

96 piglets from a PRRSV free farm were divided into six groups with 16 animals in each group. Groups three to six were vaccinated intranasally and/ or intradermally on the third day of live. Pigs in the first and second group were not vaccinated. At the age of 41 days all piglets, except group 1, were infected with the PRRSV strain AUT15-33. Both the homologous (AUT15-33) and heterologous (Lena strain) protective effects of the vaccine were evaluated. Piglets from all infected groups showed gross lung lesions such as tan mottled areas and areas of firm consistency on both necropsy days (day ten and day 27 post infection). There was no difference between the vaccinated and non-vaccinated pigs. Only the non-vaccinated and non-infected pigs showed less lesions. Similar results were found in the histological examinations. As for the five lung lesions (pneumocytic hypertrophy and hyperplasia, septal infiltration with mononuclear cells, intra-alveolar necrotic debris, intra-alveolar inflammatory cell accumulation, and perivascular inflammatory cell accumulation) vaccination was not able to reduce the severity and extension of lesions either.

7 Abkürzungsverzeichnis

FAT	fluorescent antibody test
EAV	Equine arteriitis virus
h	Stunde
IHC	Immunhistochemie
IPMA	Immunoperoxidase- Monolyer- Assay
IFAT	Indirect Fluorescent Antibody Technique
IQR	Interquartilradius
LDV	Lactate dehydrogenase-elevating virus
McREBEL	Management Changes to Reduce Exposure to Bacteria to Eliminate Losses from PRRS
MLV	modified Live vaccine
nm	Nanometer
NSAIDs	Nichtsteroidale anti-inflammatorische Agenzien
ORF	Open reading frame
PAMs	porzine Alveolarmakrophagen
PEARS	porcine epidemic abortion and respiratory syndrome
PRRSV	Porzine Reproduktive und Respiratorische Syndrom Virus
SHFV	simian hemorrhagic fever virus
SIRS	swine infertility and respiratory syndrome
TCID	50 Tissue Culture Infection Dose 50

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.....	18
Abbildung 2.....	20
Abbildung 3.....	23
Abbildung 4.....	23
Abbildung 5.....	25
Abbildung 6.....	26

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	17
------------------------	-----------

10 Literaturverzeichnis

- Adams MJ, Lefkowitz EJ, King AMQ, Bamford DH, Breitbart M, Davison AJ, Ghabrial SA, Gorbalenya AE, Knowles NJ, Krell P, Lavigne R, Prangishvili D, Sanfaçon H, Siddell SG, Simmonds P, Carstens EB. 2015. Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses (2015). *Archives of virology*, 160 (7): 1837–1850.
- Alarcón LV, Allepuz A, Mateu E. 2021. Biosecurity in pig farms: a review. *Porcine Health Management*, 7 (1): 5.
- Albina E, Leforban Y, Baron T, Plana Duran JP, Vannier P. 1992. An enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies to the porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus. *Annales de recherches veterinaires. Annals of veterinary research*, 23 (2): 167–176.
- Arruda AG, Tousignant S, Sanhueza J, Vilalta C, Poljak Z, Torremorell M, Alonso C, Corzo CA. 2019. Aerosol Detection and Transmission of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV): What Is the Evidence, and What Are the Knowledge Gaps? *Viruses*, 11 (8). DOI 10.3390/v11080712.
- Balka G, Ladinig A, Ritzmann M, Saalmüller A, Gerner W, Käser T, Jakab C, Rusvai M, Weißenböck H. 2013. Immunohistochemical characterization of type II pneumocyte proliferation after challenge with type I porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Journal of comparative pathology*, 149 (2-3): 322–330. DOI 10.1016/j.jcpa.2012.12.006.
- Benfield DA, Nelson E, Collins JE, Harris L, Goyal SM, Robison D, Christianson WT, Morrison RB, Goreyca D, Chladek D. 1992. Characterization of swine infertility and respiratory syndrome (SIRS) virus (isolate ATCC VR-2332). *Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*, 4 (2): 127–133. DOI 10.1177/104063879200400202.
- Bøtner A. 1997. Diagnosis of PRRS. *Veterinary Microbiology*, 55 (1-4): 295–301. DOI 10.1016/S0378-1135(96)01333-8.
- BØTNER A, Strandbygaard B, Sørensen KJ, Have P, Madsen KG, Madsen ES, Alexandersen S. 1997. Appearance of acute PRRS-like symptoms in sow herds after vaccination with a modified live PRRS vaccine. *The Veterinary record*, 141 (19): 497–499. DOI 10.1136/vr.141.19.497.
- Chareerntanakul W. 2012. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccines: Immunogenicity, efficacy and safety aspects. *World journal of virology*, 1 (1): 23–30. DOI 10.5501/wjv.v1.i1.23.
- Cho JG, Dee SA. 2006. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Theriogenology*, 66 (3): 655–662. DOI 10.1016/j.theriogenology.2006.04.024.
- Cho JG, Dee SA, Deen J, Guedes A, Trincado C, Fano E, Jiang Y, Faaberg K, Collins JE, Murtaugh MP, Joo HS. 2006. Evaluation of the effects of animal age, concurrent bacterial infection, and pathogenicity of porcine reproductive and respiratory syndrome virus on virus concentration in pigs. *American journal of veterinary research*, 67 (3): 489–493. DOI 10.2460/ajvr.67.3.489.
- Christensen G, Sørensen V, Mousing J. 1999. Diseases of the respiratory system. In: . *Diseases of swine*. Achte Aufl. Ames LA: Iowa State University Press, 927–928.
- Christianson WT, Choi CS, Collins JE, Molitor TW, Morrison RB, Joo HS. 1993. Pathogenesis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in mid-gestation sows and fetuses. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 57 (4): 262–268.
- Christopher-Hennings J, Nelson EA, Hines RJ, Nelson JK, Swenson SL, Zimmerman JJ, Chase CL, Yaeger MJ, Benfield DA. 1995. Persistence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in serum and semen of adult boars. *Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of*

- the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc, 7 (4): 456–464. DOI 10.1177/104063879500700406.
- Christopher-Hennings J, Nelson EA, Nelson JK, Hines RJ, Swenson SL, Hill HT, Zimmerman JJ, Katz JB, Yaeger MJ, Chase CC. 1995. Detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in boar semen by PCR. *Journal of clinical microbiology*, 33 (7): 1730–1734. DOI 10.1128/jcm.33.7.1730-1734.1995.
- Collins JE, Benfield DA, Christianson WT, Harris L, Hennings JC, Shaw DP, Goyal SM, McCullough S, Morrison RB, Joo HS. 1992. Isolation of swine infertility and respiratory syndrome virus (isolate ATCC VR-2332) in North America and experimental reproduction of the disease in gnotobiotic pigs. *Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*, 4 (2): 117–126. DOI 10.1177/104063879200400201.
- Corzo CA, Mondaca E, Wayne S, Torremorell M, Dee S, Davies P, Morrison RB. 2010. Control and elimination of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virus research*, 154 (1-2): 185–192. DOI 10.1016/j.virusres.2010.08.016.
- Dea S, Gagnon CA, Mardassi H, Pirzadeh B, Rogan D. 2000. Current knowledge on the structural proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus: comparison of the North American and European isolates. *Archives of virology*, 145 (4): 659–688. DOI 10.1007/s007050050662.
- Decorte I, van Campe W, Mostin L, Cay AB, Regge N de. 2015. Diagnosis of the Lelystad strain of Porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in individually housed pigs: comparison between serum and oral fluid samples for viral nucleic acid and antibody detection. *Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*, 27 (1): 47–54. DOI 10.1177/1040638714561252.
- Dee SA, Deen J, Otake S, Pijoan C. 2004. An experimental model to evaluate the role of transport vehicles as a source of transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus to susceptible pigs. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 68 (2): 128–133. PMID: 15188957
- Dewey CE, Wilson S, Buck P, Leyenaar JK. 2004. Effects of porcine reproductive and respiratory syndrome vaccination in breeding-age animals. *Preventive veterinary medicine*, 62 (4): 299–307. DOI 10.1016/j.prevetmed.2003.11.007.
- Done SH, Paton DJ, White M. 2007. Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS): A review, with emphasis on pathological, virological and diagnostic aspects. *The British Veterinary Journal*, 152 (2): 153–174. DOI 10.1016/S0007-1935(96)80071-6.
- Duerlinger S, Knecht C, Sawyer S, Balka G, Zaruba M, Ruemenapf T, Kraft C, Rathkjen PH, Ladinig A. 2022. Efficacy of a Modified Live Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus 1 (PRRSV-1) Vaccine against Experimental Infection with PRRSV AUT15-33 in Weaned Piglets. *Vaccines*, 10:934 (6). DOI 10.3390/vaccines1006093410.
- Forsberg R, Storgaard T, Nielsen HS, Oleksiewicz MB, Cordioli P, Sala G, Hein J, Bøtner A. 2002. The genetic diversity of European type PRRSV is similar to that of the North American type but is geographically skewed within Europe. *Virology*, 299 (1): 38–47. DOI 10.1006/viro.2002.1450.
- Gagnon CA, Lachapelle G, Langelier Y, Massie B, Dea S. 2003. Adenoviral-expressed GP5 of porcine respiratory and reproductive syndrome virus differs in its cellular maturation from the authentic viral protein but maintains known biological functions. *Archives of virology*, 148 (5): 951–972. DOI 10.1007/s00705-002-0943-y.
- Gómez-Laguna J, Salguero FJ, Pallarés FJ, Carrasco L. 2013. Immunopathogenesis of porcine reproductive and respiratory syndrome in the respiratory tract of pigs. *Veterinary journal (London, England : 1997)*, 195 (2): 148–155. DOI 10.1016/j.tvjl.2012.11.012.
- Halbur PG, Andrews JJ, Huffman EL, Paul PS, Meng XJ, Niyo Y. 1994. Development of a streptavidin-biotin immunoperoxidase procedure for the detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus antigen in porcine lung. *Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the*

- American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc, 6 (2): 254–257. DOI 10.1177/104063879400600219.
- Halbur PG, Paul PS, Frey ML, Landgraf J, Eernisse K, Meng XJ, Andrews JJ, Lum MA, Rathje JA. 1996. Comparison of the antigen distribution of two US porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates with that of the Lelystad virus. *Veterinary pathology*, 33 (2): 159–170. DOI 10.1177/030098589603300205.
- Halbur PG, Paul PS, Frey ML, Landgraf J, Eernisse K, Meng XJ, Lum MA, Andrews JJ, Rathje JA. 1995. Comparison of the pathogenicity of two US porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates with that of the Lelystad virus. *Veterinary pathology*, 32 (6): 648–660. DOI 10.1177/030098589503200606.
- Heinritz K, Gindele H. R., Reiner G., Schnurrbusch Ute. 2006. *Schweinekrankheiten*. Erste Aufl. Stuttgart: Eugen Ulmer KG.
- Holtkamp DDM, Kliebenstein JBP, Neumann EJ, Zimmerman JJ, Rotto H, Yoder TK, Chong Wang P, Paul E, Yeske, Christine L. Mowrer, Charles A. Haley. 2013. Assessment of the economic impact of porcine reproductive and respiratory syndrome virus on United States pork producers: 72–84.
- Irannejad R, Tsvetanova NG, Lobingier BT, Zastrow M von. 2015. Effects of endocytosis on receptor-mediated signaling. *Current opinion in cell biology*, 35: 137–143. DOI 10.1016/j.ceb.2015.05.005.
- Janke BDP. 1995. Diagnosis of viral respiratory disease. *Swine Health and Production*, 3. Jg., Nr. 3, S. 117, (3): 116–120.
- Johnson W, Roof M, Vaughn E, Christopher-Hennings J, Johnson CR, Murtaugh MP. 2004. Pathogenic and humoral immune responses to porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) are related to viral load in acute infection. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 102 (3): 233–247. DOI 10.1016/j.vetimm.2004.09.010.
- Keffaber K. 1989. Reproduction failure of unknown etiology. *Am. Assoc. Swine Pract. Newsl.*, 1: 1–9. <https://ci.nii.ac.jp/naid/10024717735/>.
- Kim H, Kim HK, Jung JH, Choi YJ, Kim J, Um CG, Hyun SB, Shin S, Lee B, Jang G, Kang BK, Moon HJ, Song DS. 2011. The assessment of efficacy of porcine reproductive respiratory syndrome virus inactivated vaccine based on the viral quantity and inactivation methods. *Virology journal*, 8: 323. DOI 10.1186/1743-422X-8-323.
- Kim HS, Kwang J, Yoon IJ, Joo HS, Frey ML. 1993. Enhanced replication of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in a homogeneous subpopulation of MA-104 cell line. *Archives of virology*, 133 (3-4): 477–483. DOI 10.1007/BF01313785.
- Kittawornrat A, Prickett J, Chittick W, Wang C, Engle M, Johnson J, Patnayak D, Schwartz T, Whitney D, Olsen C, Schwartz K, Zimmerman J. 2010. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in serum and oral fluid samples from individual boars: will oral fluid replace serum for PRRSV surveillance? *Virus research*, 154 (1-2): 170–176. DOI 10.1016/j.virusres.2010.07.025.
- Klinge KL, Vaughn EM, Roof MB, Bautista EM, Murtaugh MP. 2009. Age-dependent resistance to Porcine reproductive and respiratory syndrome virus replication in swine. *Virology journal*, 6: 177. DOI 10.1186/1743-422X-6-177.
- Krunker S, Nielsen J, Bille-Hansen V, BØTNER A. 1998. Experimental inoculation of swine at various stages of gestation with a Danish isolate of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). *Veterinary Microbiology*, 61 (1-2): 21–31. DOI 10.1016/S0378-1135(98)00176-X.
- Kreutzmann H, Dürlinger S, Knecht C, Koch M, Cabana M, Torrent G, Balasch M, Taylor LP, Balka G, Gerner W, Ladinig A. 2021. Efficacy of a Modified Live Virus Vaccine against Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus 1 (PRRSV-1) Administered to 1-Day-Old Piglets in Front of Heterologous PRRSV-1 Challenge. *Pathogens* (Basel, Switzerland), 10:1342. DOI 10.3390/pathogens10101342.
- Kreutzmann H, Stadler J, Knecht C, Sassu EL, Rucizka U, Zablotki Y, Vatzia E, Balka G, Zaruba M, Chen H-W, Riedel C, Rügenapf T, Ladinig A. 2022. Phenotypic Characterization of a Virulent PRRSV-

- 1 Isolate in a Reproductive Model With and Without Prior Heterologous Modified Live PRRSV-1 Vaccination. *Frontiers in veterinary science*, 9: 820233. DOI 10.3389/fvets.2022.820233.
- Kuhn JH, Lauck M, Bailey AL, Shchetinin AM, Vishnevskaya TV, Bào Y, Ng TFF, LeBreton M, Schneider BS, Gillis A, Tamoufe U, Le Diffo JD, Takuo JM, Kondov NO, Coffey LL, Wolfe ND, Delwart E, Clawson AN, Postnikova E, Bollinger L, Lackemeyer MG, Radoshitzky SR, Palacios G, Wada J, Shevtsova ZV, Jahrling PB, Lapin BA, Deriabin PG, Dunowska M, Alkhovsky SV, Rogers J, Friedrich TC, O'Connor DH, Goldberg TL. 2016. Reorganization and expansion of the nidoviral family Arteriviridae. *Archives of virology*, 161 (3): 755–768. DOI 10.1007/s00705-015-2672-z.
- Lager KM, Mengeling WL. 1995. Pathogenesis of in utero infection in porcine fetuses with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 59 (3): 187–192.
- Lee S-M, Kleiboeker SB. 2007. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus induces apoptosis through a mitochondria-mediated pathway. *Virology*, 365 (2): 419–434. DOI 10.1016/j.virol.2007.04.001.
- Li X, Galliher-Beckley A, Pappan L, Triple B, Kerrigan M, Beck A, Hesse R, Blecha F, Nietfeld JC, Rowland RR, Shi J. 2014. Comparison of host immune responses to homologous and heterologous type II porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) challenge in vaccinated and unvaccinated pigs. *BioMed research international*, 2014: 416727. DOI 10.1155/2014/416727.
- Lopez OJ, Osorio FA. 2004. Role of neutralizing antibodies in PRRSV protective immunity. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 102 (3): 155–163. DOI 10.1016/j.vetimm.2004.09.005.
- Lopez W, Angulo J., Zimmerman J., Linhares DCL. 2018. Porcine reproductive and respiratory syndrome monitoring in breeding herds using processing fluids. *J Swine Health Prod*, 26 (3): 146–150.
- Loving CL, Brockmeier SL, Sacco RE. 2007. Differential type I interferon activation and susceptibility of dendritic cell populations to porcine arterivirus. *Immunology*, 120 (2): 217–229. DOI 10.1111/j.1365-2567.2006.02493.x.
- Loving CL, Osorio FA, Murtaugh MP, Zuckermann FA. 2015. Innate and adaptive immunity against Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 167 (1-2): 1–14. DOI 10.1016/j.vetimm.2015.07.003.
- Lunney JK, Fang Y, Ladinig A, Chen N, Li Y, Rowland B, Renukaradhya GJ. 2016. Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV): Pathogenesis and Interaction with the Immune System. *Annual review of animal biosciences*, 4: 129–154. DOI 10.1146/annurev-animal-022114-111025.
- Madsen KG, Hansen CM, Madsen ES, Strandbygaard B, Bøtner A, Sørensen KJ. 1998. Sequence analysis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus of the American type collected from Danish swine herds. *Archives of virology*, 143 (9): 1683–1700. DOI 10.1007/s007050050409.
- Magar R, Laroche R, Robinson Y, Dubuc C. 1993. Immunohistochemical detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus using colloidal gold. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 57 (4): 300–304.
- Mardassi H, Wilson L, Mounir S, Dea S. 1994. Detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and efficient differentiation between Canadian and European strains by reverse transcription and PCR amplification. *Journal of clinical microbiology*, 32 (9): 2197–2203. DOI 10.1128/jcm.32.9.2197-2203.1994.
- Martelli P, Gozio S, Ferrari L, Rosina S, Angelis E de, Quintavalla C, Bottarelli E, Borghetti P. 2009. Efficacy of a modified live porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) vaccine in pigs naturally exposed to a heterologous European (Italian cluster) field strain: Clinical protection and cell-mediated immunity. *Vaccine*, 27 (28): 3788–3799. DOI 10.1016/j.vaccine.2009.03.028.
- Mengeling WL, Lager KM. 2000. A brief review of procedures and potential problems associated with the diagnosis of porcine reproductive and respiratory syndrome. *Veterinary research*, 31 (1): 61–69. DOI 10.1051/vetres:2000108.

- Mengeling WL, Lager KM, Vorwald AC. 1995. Diagnosis of porcine reproductive and respiratory syndrome. *Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*, 7 (1): 3–16. DOI 10.1177/104063879500700102.
- Mettlen M, Chen P-H, Srinivasan S, Danuser G, Schmid SL. 2018. Regulation of Clathrin-Mediated Endocytosis. *Annual review of biochemistry*, 87: 871–896. DOI 10.1146/annurev-biochem-062917-012644.
- Murtaugh MP, Stadejek T, Abrahante JE, Lam TTY, Leung FC-C. 2010. The ever-expanding diversity of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virus research*, 154 (1-2): 18–30. DOI 10.1016/j.virusres.2010.08.015.
- Murtaugh MP, Xiao Z, Zuckermann F. 2002. Immunological responses of swine to porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. *Viral immunology*, 15 (4): 533–547. DOI 10.1089/088282402320914485.
- Nan Y, Wu C, Gu G, Sun W, Zhang Y-J, Zhou E-M. 2017. Improved Vaccine against PRRSV: Current Progress and Future Perspective. *Frontiers in Microbiology*, 8: 1635. DOI 10.3389/fmicb.2017.01635.
- Nguyen T. 2013. PRRS Control in the Region. In *Compendium of Technical Items of the 28th Conference of the OIE Regional Commission for Asia, the Far East and Oceania* World Organisation for Animal Health.
- Otake S, Dee SA, Moon RD, Rossow KD, Trincado C, Pijoan C. 2003. Evaluation of mosquitoes, *Aedes vexans*, as biological vectors of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 67 (4): 265–270.
- Otake S, Dee SA, Rossow KD, Joo HS, Deen J, Molitor TW, Pijoan C. 2002. Transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by needles. *The Veterinary record*, 150 (4): 114–115.
- Papatsiros VG, Alexopoulos C, Kritas SK, Koptopoulos G, Nauwynck HJ, Pensaert MB, Kyriakis SC. 2006. Long-term administration of a commercial porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV)-inactivated vaccine in PRRSV-endemically infected sows. *Journal of veterinary medicine. B, Infectious diseases and veterinary public health*, 53 (6): 266–272. DOI 10.1111/j.1439-0450.2006.00965.x.
- Pirzadeh B, Gagnon CA, Dea S. 1998. Genomic and antigenic variations of porcine reproductive and respiratory syndrome virus major envelope GP5 glycoprotein. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 62 (3): 170–177.
- Pitkin A, Deen J, Dee S. 2009. Further assessment of fomites and personnel as vehicles for the mechanical transport and transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 73 (4): 298–302.
- Pitkin A, Otake S, Dee S. 2009. Biosecurity protocols for the prevention of spread of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Swine Disease Eradication Center University of Minnesota College of Veterinary Medicine*, 2009: 1–17.
- Plana Duran J, Climent I, Sarraseca J, Urniza A, Cortés E, Vela C, Casal JI. 1997. Baculovirus expression of proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome virus strain Olot/91. Involvement of ORF3 and ORF5 proteins in protection. *Virus genes*, 14 (1): 19–29. DOI 10.1023/a:1007931322271.
- Prather RS, Rowland RRR, Ewen C, Tribble B, Kerrigan M, Bawa B, Teson JM, Mao J, Lee K, Samuel MS, Whitworth KM, Murphy CN, Egen T, Green JA. 2013. An intact sialoadhesin (Sn/SIGLEC1/CD169) is not required for attachment/internalization of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Journal of virology*, 87 (17): 9538–9546. DOI 10.1128/JVI.00177-13.
- Renukaradhya GJ, Meng X-J, Calvert JG, Roof M, Lager KM. 2015a. Inactivated and subunit vaccines against porcine reproductive and respiratory syndrome: Current status and future direction. *Vaccine*, 33 (27): 3065–3072. DOI 10.1016/j.vaccine.2015.04.102.

- Renekaradhya GJ, Meng X-J, Calvert JG, Roof M, Lager KM. 2015b. Live porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccines: Current status and future direction. *Vaccine*, 33 (33): 4069–4080. DOI 10.1016/j.vaccine.2015.06.092.
- Rossow KD. 1998. Porcine reproductive and respiratory syndrome. *Veterinary pathology*, 35 (1): 1–20. DOI 10.1177/030098589803500101.
- Rossow KD, Collins JE, Goyal SM, Nelson EA, Christopher-Hennings J, Benfield DA. 1995. Pathogenesis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in gnotobiotic pigs. *Veterinary pathology*, 32 (4): 361–373. DOI 10.1177/030098589503200404.
- Sarli G, D'Annunzio G, Gobbo F, Benazzi C, Ostanello F. 2021. The Role of Pathology in the Diagnosis of Swine Respiratory Disease. *Veterinary sciences*, 8 (11). DOI 10.3390/vetsci8110256.
- Scotti M, Prieto C, Alvarez E, Simarro I, Castro JM. 2007. Failure of an inactivated vaccine against porcine reproductive and respiratory syndrome to protect gilts against a heterologous challenge with PRRSV. *The Veterinary record*, 161 (24): 809–813.
- Selbitz H, Truyen U, Peter V. 2015. *Tiermedizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre*. 10. Aufl. Stuttgart: Enke.
- Shen G, Jin N, Ma M, Jin K, Zheng M, Zhuang T, Lu H, Zhu G, Jin H, Jin M, Huo X, Qin X, Yin R, Li C, Li H, Li Y, Han Z, Chen Y, Jin M. 2007. Immune responses of pigs inoculated with a recombinant fowlpox virus coexpressing GP5/GP3 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and swine IL-18. *Vaccine*, 25 (21): 4193–4202. DOI 10.1016/j.vaccine.2007.03.010.
- Sinn LJ, Klingler E, Lamp B, Brunthaler R, Weissenböck H, Rümenapf T, Ladinig A. 2016. Emergence of a virulent porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) 1 strain in Lower Austria. *Porcine Health Management*, 2 (1): 28. DOI 10.1186/s40813-016-0044-z.
- Sirinarumit T, Zhang Y, Kluge JP, Halbur PG, Paul PS. 1998. A pneumo-virulent United States isolate of porcine reproductive and respiratory syndrome virus induces apoptosis in bystander cells both in vitro and in vivo. *The Journal of general virology*, 79 (12): 2989–2995. DOI 10.1099/0022-1317-79-12-2989.
- Snijder EJ, Meulenberg JJ. 1998. The molecular biology of arteriviruses. *The Journal of general virology*, 79 (5): 961–979. DOI 10.1099/0022-1317-79-5-961.
- Stadejek T, Oleksiewicz MB, Scherbakov AV, Timina AM, Krabbe JS, Chabros K, Potapchuk D. 2008. Definition of subtypes in the European genotype of porcine reproductive and respiratory syndrome virus: nucleocapsid characteristics and geographical distribution in Europe. *Archives of virology*, 153 (8): 1479–1488. DOI 10.1007/s00705-008-0146-2.
- Suárez P, Díaz-Guerra M, Prieto C, Esteban M, Castro JM, Nieto A, Ortín J. 1996. Open reading frame 5 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus as a cause of virus-induced apoptosis. *Journal of virology*, 70 (5): 2876–2882. DOI 10.1128/JVI.70.5.2876-2882.1996.
- Sur JH, Doster AR, Osorio FA. 1998. Apoptosis induced in vivo during acute infection by porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Veterinary pathology*, 35 (6): 506–514. DOI 10.1177/030098589803500605.
- Szabó I, Molnár T, Nemes I, Abonyi T, Terjék Z, Bálint Á. 2019. PRRSV eradication on large-scale fattening pig farms in Hungary between 2014 and 2019. *Acta veterinaria Hungarica*, 67 (4): 529–542. DOI 10.1556/004.2019.052.
- Terpstra C, Wensvoort G, Pol JM. 1991. Experimental reproduction of porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (mystery swine disease) by infection with Lelystad virus: Koch's postulates fulfilled. *The veterinary quarterly*, 13 (3): 131–136. DOI 10.1080/01652176.1991.9694297.
- van der Linden IFA, Voermans JJM, van der Linde-Bril EM, Bianchi ATJ, Steverink PJGM. 2003. Virological kinetics and immunological responses to a porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection of pigs at different ages. *Vaccine*, 21 (17-18): 1952–1957.

- van Reeth K. 1997. Pathogenesis and clinical aspects of a respiratory porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. *Veterinary Microbiology*, 55 (1-4): 223–230. DOI 10.1016/S0378-1135(96)01331-4.
- Vanhee M, Delputte PL, Delrue I, Geldhof MF, Nauwynck HJ. 2009. Development of an experimental inactivated PRRSV vaccine that induces virus-neutralizing antibodies. *Veterinary research*, 40 (6): 63. DOI 10.1051/vetres/2009046.
- Welch S-KW, Calvert JG. 2010. A brief review of CD163 and its role in PRRSV infection. *Virus research*, 154 (1-2): 98–103. DOI 10.1016/j.virusres.2010.07.018.
- Wenhui L, Zhongyan W, Guanqun Z, Zhili L, Jingyun M, Qingmei X, Baoli S, Yingzuo B. 2012. Complete genome sequence of a novel variant porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) strain: evidence for recombination between vaccine and wild-type PRRSV strains. *Journal of virology*, 86 (17): 9543. DOI 10.1128/JVI.01341-12.
- Wensvoort G, Kluyver EP de, Luitze EA, Besten A den, Harris L, Collins JE, Christianson WT, Chladek D. 1992. Antigenic comparison of Lelystad virus and swine infertility and respiratory syndrome (SIRS) virus. *Journal of veterinary diagnostic investigation: official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*, 4 (2): 134–138. DOI 10.1177/104063879200400203.
- Wensvoort G, Terpstra C, Pol JM, Laak EA ter, Bloemraad M, Kluyver EP de, Kragten C, van Buiten L, Besten A den, Wagenaar F. 1991. Mystery swine disease in The Netherlands: the isolation of Lelystad virus. *The veterinary quarterly*, 13 (3): 121–130. DOI 10.1080/01652176.1991.9694296.
- Wills RW, Zimmerman JJ, Yoon K-J, Swenson SL, Hoffman LJ, McGinley MJ, Hill HT, Platt KB. 1997. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: routes of excretion. *Veterinary Microbiology*, 57 (1): 69–81. DOI 10.1016/S0378-1135(97)00079-5.
- Yaeger M, Prieve T., Collins J, Christopher-Hennings J, Nelson E, Da Benfield. 1993. Evidence for the transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus semen. *Swine Health Prod*, (1): 7–9.
- Yoon IJ, Joo HS, Christianson WT, Kim HS, Collins JE, Morrison RB, Dial GD. 1992. An indirect fluorescent antibody test for the detection of antibody to swine infertility and respiratory syndrome virus in swine sera. *Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*, 4 (2): 144–147. DOI 10.1177/104063879200400205.
- Yoon IJ, Joo HS, Goyal SM, Molitor TW. 1994. A modified serum neutralization test for the detection of antibody to porcine reproductive and respiratory syndrome virus in swine sera. *Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*, 6 (3): 289–292. DOI 10.1177/104063879400600326.
- Zimmerman JJ, Benfield DA, Dee SA. 2019. Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (Porcine Arterivirus). In: *Diseases of swine.*: 685–708.
- Zimmerman JJ, Dee SA, Holtkamp D. J., Murtaugh MP, Stadejek T, Stevenson GW, Torremorell M, Yang H, Zhang J. 2019. Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (Porcine Arterivirus). In: Zimmerman JJ, Karriker L., Ramirez A., Schwartz K., Stevenson GW., Hrsg. *Diseases of swine*. 11th edition. Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell, 685–708.
- Zuckermann FA, Garcia EA, Luque ID, Christopher-Hennings J, Doster A, Brito M, Osorio F. 2007. Assessment of the efficacy of commercial porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) vaccines based on measurement of serologic response, frequency of gamma IFN-producing cells and virological parameters of protection upon challenge. *Veterinary Microbiology*, 123 (1-3): 69–85. DOI 10.1016/j.vetmic.2007.02.009.