

Ermittlung von Einflussfaktoren für das Auftreten von Virämien  
des Porzinen Circovirus Typ 2 in Mastschweinen

von Johanna Elisabeth Stoiber



Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde  
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität  
München

Ermittlung von Einflussfaktoren für das Auftreten von Virämien  
des Porzinen Circovirus Typ 2 in Mastschweinen

von Johanna Elisabeth Stoiber

aus Dingolfing

München 2017



Aus dem Zentrum für Klinische Tiermedizin der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Krankheiten des Schweines

Arbeit angefertigt unter der Leitung von:

Univ.-Prof. Dr. Mathias Ritzmann

Mitbetreuung durch: Dr. Matthias Eddicks



**Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

**Dekan:** Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

**Berichterstatter:** Univ.-Prof Dr. Mathias Ritzmann

**Korreferent/en:** Priv.-Doz. Dr. Bianca Schulz

**Tag der Promotion:11.02.2017**



## *Meinen Eltern*



**INHALTSVERZEICHNIS**

<b>I.</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>II.</b>	<b>LITERATURÜBERSICHT .....</b>	<b>3</b>
<b>1.</b>	<b>Ätiologie.....</b>	<b>3</b>
1.1.	Porzine Circoviren.....	3
1.2.	PCV2 .....	3
<b>2.</b>	<b>Vorkommen von PCV2.....</b>	<b>5</b>
<b>3.</b>	<b>PCV2-assoziierte Krankheitsbilder .....</b>	<b>6</b>
3.1.	PCV2 subclinical infection.....	6
3.2.	PCV2 systemic disease.....	6
3.3.	PCV2 lung disease .....	7
3.4.	PCV2 enteric disease.....	8
3.5.	PCV2 reproductive disease .....	8
3.6.	Porcine Dermatitis and Nephropathy Syndrome (PDNS).....	8
<b>4.</b>	<b>Diagnostik .....</b>	<b>9</b>
4.1.	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	10
4.2.	Antikörper-ELISA.....	11
4.3.	Weitere Verfahren .....	11
<b>5.</b>	<b>Übertragungswege von PCV2 .....</b>	<b>12</b>
<b>6.</b>	<b>Risikofaktoren für eine PCV2-Infektion.....</b>	<b>13</b>
<b>7.</b>	<b>Vakzination gegen PCV2.....</b>	<b>15</b>
<b>III.</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>18</b>
<b>1.</b>	<b>Auswahl der Blutproben.....</b>	<b>18</b>
<b>2.</b>	<b>Probennahme.....</b>	<b>21</b>
2.1.	Blutentnahme .....	21
2.2.	Molekularbiologische Untersuchung auf PCV2 .....	21
2.3.	Quantitative PCR.....	22
2.4.	Statistische Auswertung .....	23
<b>IV.</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>25</b>
<b>1.</b>	<b>Ausgewählte Bestände und Mastschweine.....</b>	<b>25</b>

---

<b>2.</b>	<b>Ergebnisse des qualitativen Nachweises von PCV2-DNA mittels qPCR.....</b>	<b>26</b>
2.1.	Statistische Auswertung der Ergebnisse des qualitativen PCV2-DNA Nachweises.....	29
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse des quantitativen Nachweises von PCV2-DNA mittels qPCR.....</b>	<b>31</b>
3.1.	Statistische Auswertung der quantitativen Ergebnisse.....	32
<b>V.</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>37</b>
<b>1.</b>	<b>Ergebnisse des qualitativen Nachweises von PCV2-DNA mittels qPCR.....</b>	<b>37</b>
1.1.	Einflussfaktoren auf den qualitativen Nachweis von PCV2-DNA .....	37
<b>2.</b>	<b>Ergebnisse der quantitativen Untersuchungen von PCV2-DNA im Serum von Mastschweinen .....</b>	<b>41</b>
2.1.	Einflussfaktoren auf die quantitative Analyse der PCV2-DNA .....	42
2.2.	Einflussfaktoren auf den quantitativen Nachweis von PCV2-DNA .....	43
<b>VI.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>45</b>
<b>VII.</b>	<b>SUMMARY.....</b>	<b>47</b>
<b>VIII.</b>	<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>49</b>
<b>IX.</b>	<b>TABELLENVERZEICHNIS .....</b>	<b>50</b>
<b>X.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>51</b>
<b>XI.</b>	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>67</b>

**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

µl	Mikroliter
APP	Actinobacillus pleuropneumoniae
Bp	Basenpaar(e)
DNA	Deoxyribonucleic acid
ELISA	Enzyme Linked Immunsorbent Assay
FI	Bestand mit PCV2 geimpften Tieren
g	g-Kraft, Lastvielfaches
IgM	Immunglobulin M
IHC	Immunhistochemie
ISH	In-situ-Hybridisierung
kDa	Kilodalton
KSP	Klassische Schweinepest
L. intracellularis	Lawsonia intracellularis
M. hyopneumoniae	Mycoplasma hyopneumoniae
M. hyorhinis	Mycoplasma hyorhinis
Max	Maximum
Min	Minimum
ml	Mililiter
MW	Mittelwert(e)
n	Anzahl
NI	Bestand mit PCV2 ungeimpften Tieren
OR	Odds Ratio
ORF	Open Reading Frame
PASC	Pairwise Sequence Comparisons
PCR	Polymerase Chain Reaction
PCV2-ED	PCV2 enteric disease
PCV2-LD	PCV2 lung disease
PCV2-RD	PCV2 reproductive disease
PCV2-SD	PCV2 systemic disease
PCV2-SI	PCV2 subclinical infection
PDNS	Porcine dermatitis and nephropathy syndrome

---

PMWS	Postweaning multisystemic wasting syndrome
PNP	Proliferative and necrotizing pneumonia
PPE	Porcine proliferative enteropathie
PPV	Porcine parvovirus
PRDC	Porcine respiratory disease complex
PRRSV	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus
qPCR	Quantitative PCR
RT-PCR	Real-time PCR
SI	Bestand mit Tieren von PCV2 geimpften Muttersauen
SPF	Spezifisch pathogenfrei
StabW	Standardabweichung
U/min	Umdrehungen pro Minute

## I. EINLEITUNG

Das Porcine Circovirus Typ 2 (PCV2) gilt weltweit als ubiquitär in der Hausschweinepopulation verbreitet und kann in allen Stufen der Schweineproduktion nachgewiesen werden (SHIBATA et al., 2003; SEGALES et al., 2005a). Mit einer PCV2-Infektion werden verschiedene Krankheitsbilder in Verbindung gebracht, die als porcine circovirus diseases (PCVD) zusammengefasst werden (SEGALES et al., 2005a). Dazu gehören neben dem postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) die PCV2 lung disease (PCV2-LD), die PCV2 reproductive disease (PCV2-RD), die PCV2 enteric disease (PCV2-ED) und subklinische Infektionen (PCV2-SI). Das porcine dermatitis and nephropathy syndrome (PDNS) wird ebenfalls mit einer PCV2-Infektion in Verbindung gebracht (SEGALES, 2012). Die Schwere des Ausprägungsgrads von PMWS hängt von der Menge vorhandener PCV2-DNA ab. BRUNBORG et al. (2004) definieren den Gehalt von  $1,0 \times 10^7$  PCV2-Genomkopien pro ml Serum als Richtwert, um klinische Anzeichen von PMWS hervorzurufen.

Als sehr wirksame Methode zur Kontrolle von PCVD hat sich die Impfung gegen PCV2 erwiesen (FACHINGER et al., 2008; KIXMÖLLER et al., 2008; HAAKE et al., 2014). Effekte einer Ferkelimpfung umfassen eine Reduktion der Anzahl virämischer Tiere, eine kürzere der Dauer der Virämie und signifikant niedrigere Virämien, im Vergleich zu den nicht geimpften Tieren (FACHINGER et al., 2008; KIXMÖLLER et al., 2008). Eine weitere Möglichkeit ist die passive Immunisierung von Ferkeln durch die Aufnahme maternalen Antikörper über das Kolostrum geimpfter Sauen. Es kann eine verringerte Mortalität und vergleichbare Tageszunahmen der Mastschweine im Vergleich zu den geimpften Schweinen erreicht werden (PEJSAK et al., 2010). Weitere Maßnahmen zur Kontrolle von PMWS werden unter anderem im „20-Punkte-Plan“ von MADEC et al. (1999) beschrieben. Diese Punkte beziehen sich hauptsächlich auf eine Optimierung der Betriebshygiene bzw. des Betriebsmanagements, und sollen zusätzlich zur Impfung die Prävalenz von PCVD gering halten. Eine Eradikation des Virus kann jedoch auch durch Massenimpfung nicht erreicht werden (FENG et al., 2014).

Im Rahmen der vorliegenden Untersuchung soll überprüft werden, welche Einflussfaktoren die Chance auf das Vorkommen und den Ausprägungsgrad einer

PCV2-Virämie bei Mastschweinen erhöhen bzw. erniedrigen und in welchem Ausmaß.

Folgende Hypothesen sollten überprüft werden:

1. Die aktive Immunisierung gegen PCV2 ist der passiven Immunisierung gegen PCV2 hinsichtlich des Auftretens und der Höhe von PCV2-Virämien überlegen.
2. PCV2-Virämien können in bestimmten Regionen vermehrt festgestellt werden. Als Gründe hierfür werden vor allem die Tierdichte und der Viehverkehr der entsprechenden Region gesehen.
3. Zusätzliche Schutzimpfungen üben einen protektiven Effekt auf das Vorkommen von PCV2-Virämien aus, da sie Ko-Infektionen reduzieren, die für die Ausprägung von PCVD verantwortlich sind.

## **II. LITERATURÜBERSICHT**

### **1. Ätiologie**

#### **1.1. Porzine Circoviren**

Das Porzine Circovirus (PCV) wird erstmals von TISCHER et al. (1974) als papo- und picornavirus-ähnlicher Kontaminant in porcinen PK/15 Nierenzelllinien beschrieben. TISCHER et al. (1982) zeigen, dass es sich bei dem 1974 beschriebenen Virus um ein unbehülltes Virus mit einem kovalent geschlossenen zirkulären einzelsträngigen DNA-Genom handelt. Aufgrund des zirkulären Genoms erhält das Virus den Namen Circovirus und wird der Familie der Circoviridae zugeordnet (LUKERT et al., 1995). PCV besitzt ein unbehülltes, ikosahedral geformtes Kapsid mit einem Durchmesser von 20,5 Nanometern (TISCHER et al., 1982; CROWTHER et al., 2003). Es ist mit einem Durchmesser von 15 bis 25 Nanometern das kleinste Virus, das in der Lage ist sich autonom in eukaryotischen Zellen zu vermehren (MANKERTZ, 2008). Das Virus besitzt elf offene Leserahmen, sogenannte open reading frames (ORF) (HAMEL et al., 1998). Im ORF1 sind Proteine verschlüsselt, die für die Replikation zuständig sind (MANKERTZ et al., 1998). Das ORF2, stellt jene Sequenz dar, welches die 60 Kapsidproteine zu je 30 kDa des Virus verschlüsselt (NAWAGITGUL et al., 2000). Im Jahr 2005 stellen Liu et al. fest, dass ORF3 ein nichtessenzielles Protein darstellt, es aber beim Apoptoseprozess des Virus eine Rolle spielt (LIU et al., 2005). ORF4 scheint keine Rolle für die Replikation zu spielen, ihm wird jedoch eine Beteiligung für die Unterdrückung der Apoptose zugewiesen (LIN et al., 2016).

#### **1.2. PCV2**

ELLIS et al. (1998) weisen PCV in Läsionen von Schweinen, die das postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) aufweisen, mittels Elektronenmikroskopie, immunhistochemischen Färbungen und in-situ Hybridisierung (ISH) nach. Mit diesen Ergebnissen stellen sie erstmals einen Zusammenhang von PMWS und PCV her (ELLIS et al., 1998). ALLAN et al. (1998) beschreiben, dass bei nordamerikanischen und europäischen PCV-Isolaten, die bei Tieren mit PMWS nachgewiesen werden, ein antigenetischer Unterschied

zu den von TISCHER et al. (1974) in den Nierenzelllinien nachgewiesenen Isolaten vorhanden ist. Weniger als 80% der Nukleotidsequenz stimmen mit dem in den PK/15 Nierenzelllinien detektierten Isolaten überein. Daraus schließen sie, dass es sich um einen anderen, pathogenen PCV-Typ handelt (ALLAN et al., 1998; MEEHAN et al., 1998). Dieses neue Isolat wird daraufhin als Porzines Circovirus Typ 2 (PCV2) bezeichnet und das in der PK/15 Zellkultur gefundene Isolat wird als PCV1 bezeichnet (ALLAN et al., 1998; MEEHAN et al., 1998). Bereits 1986 wird durch eine experimentelle Infektion gezeigt, dass PCV1 für Schweine apathogen ist (TISCHER et al., 1986). Die Prävalenz von PCV1 in der Hausschweinepopulation wird in verschiedenen Studien, in denen Gewebe und Seren von Schweinen mittels PCR und ISH untersucht werden, als gering gesehen (HAMEL et al., 2000; CALSAMIGLIA et al., 2002).

Ab dem Jahr 2004, werden in der kanadischen Hausschweinepopulation schwere Verläufe von PMWS mit deutlichen PCV2-assoziierten histopathologischen Veränderungen beobachtet (GAGNON et al., 2007). Mittels PCR wird bei 13 Tieren, die klinisch PMWS aufwiesen und verstarben, PCV2-Genom nachgewiesen (GAGNON et al., 2007). Bei der darauffolgenden Vollgenomsequenzierung wird ein bis dato noch nicht beschriebener PCV2-Genotyp detektiert. Dieser Genotyp wird daraufhin als PCV2b bezeichnet, während der bereits bekannte Genotyp als PCV2a bezeichnet wird (GAGNON et al., 2007).

Inzwischen wird eine Unterteilung in vier PCV2-Genotypen vorgenommen: PCV2a, PCV2b und PCV2c und PCV2d (SEGALES et al., 2008; FRANZO et al., 2015a). Während PCV2c in Europa bislang nur in einer retrospektiven Untersuchung nachgewiesen wird (DUPONT et al., 2008), konnten FRANZO et al. (2015b) diesen Genotypen auch in der brasilianischen Wildschweinpopulation nachweisen.

Der Genotyp PCV2d wird erstmalig in einer retrospektiven Untersuchung von GUO et al. (2010) in China nachgewiesen. In den USA wird 2012 ein genetisch zu 99,9% homologes PCV2-Isolat bei routinemäßig geimpften Schweinen, an PCVD erkrankten Schweinen nachgewiesen (OPRIESSNIG et al., 2013). Und auch in deutschen Beständen kann PCV2d nachgewiesen werden (EDDICKS et al., 2015; REINER et al., 2015). XIAO et al. (2015) sequenzieren Isolate aus den Jahren 2012 und 2013 und können in 37% den Genotyp PCV2d nachweisen, was

sie auf eine Verschiebung der Prävalenz der Genotypen von PCV2b hin zu PCVd schließen lässt.

## **2. Vorkommen von PCV2**

JACOBSEN et al. (2009) untersuchen retrospektiv das Vorkommen von PCV2 in der norddeutschen Hausschweinepopulation. Dazu werden archivierte Gewebeproben der Jahre 1961 bis 1998, unter Berücksichtigung von Kriterien wie das Gewicht und das Alter der Tiere, sowie histopathologische Veränderungen, die auf eine Infektion mit PCV2 hindeuten, untersucht. Der erste PCV2-Nachweis gelingt aus Proben aus dem Jahr 1962. Es zeigt sich, dass die Inzidenz von PCV2 in den Jahren 1961 bis 1984 gering ist (0-11,7%) und in den Jahren 1985 bis 1998 signifikant ansteigt (14,3-53,3%). Diese Ergebnisse repräsentieren somit den weltweit frühesten Nachweis von PCV2-Genom in der Hausschweinepopulation (JACOBSEN et al., 2009). Gleichzeitig wird festgestellt, dass das Vorkommen von PCV2 nicht notwendigerweise mit histopathologischen Veränderungen einer PCVD einhergeht, da erste histopathologische Veränderungen durch eine PCV2-Infektion erst ab 1985 festgestellt werden (JACOBSEN et al., 2009).

Auch in anderen Ländern wird gezeigt, dass PCV2 schon länger in der Hausschweinepopulation verbreitet ist. Eine retrospektive Untersuchung von Seren nordirischer Schweine aus den Jahren 1973 bis 1999 ergab eine Seroprävalenz von 55% bis 100% (WALKER et al., 2000). Ähnliche Ergebnisse werden aus der Schweiz berichtet (STAEBLER et al., 2005). Bei Paraffinfixierten Gewebeproben von Schweinen kann mittels Immunhistochemie (IHC) retrospektiv bei Proben aus dem Jahr 1986 PCV2-DNA nachgewiesen werden (STAEBLER et al., 2005). In einer Veröffentlichung, in der archivierte Proben von spanischen Mastschweinen mittels ISH analysiert werden, wird dargestellt, dass auch in Spanien bereits in den Jahren 1985 bis 1997 PCV2 nachgewiesen werden kann (RODRIGUEZ-ARRIOJA et al., 2003).

In Kanada wird 1991 erstmalig PMWS als sporadisch vorkommende Erkrankung, mit den klinischen Anzeichen Kümern und Ikterus bei Tieren im Alter von fünf bis 12 Wochen beschrieben (HARDING, 1996; HARDING & CLARK, 1997). Das sporadische Auftreten des Erkrankungsbildes PMWS wandelt sich in einem Zeitraum von fünf Jahren zu einem häufig beschriebenen klinischen Bild (SEGALES & DOMINGO, 2002). Aber auch andere Erkrankungsbilder, wie

Reproduktionsstörungen (WEST et al., 1999; O'CONNOR et al., 2001) oder respiratorische Erkrankungen (HARMS et al., 2002) werden bald mit PCV2 in Verbindung gebracht. PCV2 gilt inzwischen als ubiquitär in der Hausschweinepopulation verbreitet (SEGALES et al., 2005a).

### **3. PCV2-assoziierte Krankheitsbilder**

Die durch PCV2 hervorgerufenen Krankheitsbilder werden unter porcine circovirus diseases (PCVD) (SEGALES et al., 2005a) zusammengefasst. SEGALES (2012) teilt die Krankheitsbilder wie folgt ein, PCV2 subclinical infection (PCV2-SI), PCV2 systemic disease (PCV2-SD), PCV2 lung disease (PCV2-LD), PCV2 enteric disease (PCV2-ED) und PCV2 reproductive disease (PCV2-RD). Das porcine dermatitis and nephropathy syndrome (PDNS) wird auch weiterhin so betitelt, da hier die Ätiologie nicht abschließend geklärt ist (SEGALES, 2012).

#### **3.1. PCV2 subclinical infection**

Obwohl PCV2 in der Hausschweinepopulation ubiquitär vorhanden ist (SEGALES et al., 2005a), liegt die Prävalenz von PCVD viel niedriger, weshalb davon ausgegangen wird, dass die meisten Infektionen mit PCV2 subklinisch verlaufen (SEGALES, 2012). Den häufig subklinischen Verlauf einer PCV2-Infektion belegt auch eine Studie von JACOBSEN et al. (2009), da der erste Nachweis von PCV2 weit vor dem ersten Auftreten von klinischen Anzeichen einer mit PCV2-assoziierten Erkrankung erfolgt. Um eine PCV2-SI nachzuweisen, können labordiagnostische Methoden verwendet werden. Der Nachweis von spezifischen Antikörpern gegen PCV2, oder der Nachweis von PCV2-Genom im Serum der Tiere gelingen auch bei Tieren mit einer PCV2-subclinical infection (PCV2-SI) (SEGALES, 2012). Einzig verminderte Tageszunahmen können bei einer PCV2-SI vereinzelt festgestellt werden (SEGALES, 2012).

#### **3.2. PCV2 systemic disease**

Das Krankheitsbild der PCV2 systemic disease (PCV2-SD) ist auch unter der Bezeichnung postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) bekannt (SEGALES, 2012). PMWS wird erstmals 1991 in Kanada beobachtet (HARDING & CLARK, 1997) und bald danach auch in Europa beschrieben (ALLAN et al.,

1998). Das klinische Bild tritt vorwiegend bei Schweinen in der Vormast (90%) auf, gefolgt von Absetzferkeln (62%) und Tieren in der späteren Mastperiode (39%) (HARDING et al., 1998). Die Morbidität in betroffenen Beständen liegt zwischen 4% und 30% (SEGALES & DOMINGO, 2002), die Letalität wird bei akuten Ausbrüchen mit bis zu 10% beschrieben, in endemisch infizierten Betrieben wird die Letalität allerdings als gering eingestuft (HARDING & CLARK, 1997). PMWS in Verbindung mit Ko-Infektionen erhöht die Mortalität von 1–2% auf 10–25% (CHAE, 2004). Das klinisch am häufigsten zu beobachtende Bild setzt sich aus Kümern, Dyspnoe, Blässe, einem struppigen Haarkleid und Diarrhoe zusammen (HARDING et al., 1998). Pathologisch fällt häufig eine Vergrößerung der Lymphknoten auf, aber auch eine nicht kollabierte Lunge, Magenulcera und eine pulmonale Konsolidierung sind festzustellen (CORREA et al., 2006). Histopathologisch können eine Lymphozytendepletion, Ödeme mit Strukturverlust und lymphohistiozytäre Infiltrate verschiedenen Ausmaßes beobachtet werden (CORREA et al., 2006).

### 3.3. PCV2 lung disease

Zur PCV2 lung disease (PCV2-LD) werden der porcine respiratory disease complex (PRDC) und die proliferative and necrotizing pneumonia (PNP) gezählt (SEGALES, 2012).

Bei der PCV2-LD sind klinische Anzeichen wie Atemnot und respiratorische Störungen charakteristisch (HARMS et al., 2002). Histologisch kann eine bronchointerstitielle Pneumonie mit peribronchialer und peribronchiolärer Fibrose des Lungengewebes nachgewiesen werden (KIM et al., 2003). Diese histopathologischen Befunde der Lunge und auch des Lymphgewebes sind entscheidend für die Diagnose der PCV2-LD (SEGALES, 2012). Ko-Infektionen mit bakteriellen Erregern werden ebenfalls häufig nachgewiesen (KIM et al., 2003). Die in den veränderten Lungen von PCV2-infizierten Tieren am häufigsten isolierten Erreger sind, *Mycoplasma hyopneumoniae* (*M. hyopneumoniae*), *Mycoplasma hyorhinis* (*M. hyorhinis*) und *Pasteurella multocida* (CHOI et al., 2003; HANSEN et al., 2010). Beim Erkrankungstyp PNP werden in den Lungen der mit PCV2-infizierten Tiere, vaskuläre Läsionen, perivaskuläre und intramurale Ödeme, fibrinoide Nekrosen sowie Thromben nachgewiesen (SZEREDI & SZENTIRMAI, 2008). Dadurch wird auf eine Schlüsselrolle von PCV2 bei PNP geschlossen (SZEREDI & SZENTIRMAI, 2008).

### 3.4. PCV2 enteric disease

Tiere mit PCV2 enteric disease (PCV2-ED) mit einem Alter zwischen 40 und 70 Tagen leiden an einem antibiotikaresistentem Durchfall, der sich zu Beginn gelblich und im weiteren Verlauf schwarz darstellt und mit verminderten Tageszunahmen einhergeht (CHAE, 2005). Das klinische Bild der PCV2-ED ähnelt dem von *Lawsonia intracellularis* (*L. intracellularis*) ausgelösten porzinen proliferativen Enteropahtie (PPE), was JENSEN et al. (2006) zu dem Schluss kommen lässt, die PCV2-ED bei 2-4 Monate alten Tieren mit Verdacht auf *L. intracellularis* differentialdiagnostisch in Betracht zu ziehen. Histopathologisch kann eine Lymphozytendepletion mit granulomatöser Entzündung in den Peyerschen Platten festgestellt werden (KIM et al., 2004). In einer Studie von BARO et al. (2015) werden Saugferkel und Absetzer mit intestinalen Störungen und einer PCV2-Infektion untersucht. Die am häufigsten auftretenden Läsionen stellen katarrhalische Enteritiden, gefolgt von fibrinösen Läsionen und granulomatösen Entzündungen dar (BARO et al., 2015). Die Detektion von PCV2-DNA ist in moderaten bis hohen Mengen in der Mukosa des Intestinums, sowie in den Peyerschen Platten möglich (OPRIESSNIG et al., 2007).

### 3.5. PCV2 reproductive disease

Eine intrauterine Übertragung von PCV2 ist möglich (RITZMANN et al., 2005; HA et al., 2008; DVORAK et al., 2013). Klinischen Fälle von PCV2-RD treten meist in neu geschaffenen Populationen oder Jungsauen-Herden auf, wodurch eine niedrige Prävalenz von PCV2-RD entsteht (PENSAERT et al., 2004; OPRIESSNIG et al., 2007; TOGASHI et al., 2011). Klinisch zeigt sich bei PCV2-RD eine hohe Anzahl an Mumifizierungen, Totgeburten und eine hohe neonatale Sterblichkeitsrate (JOHNSON et al., 2002). Bei den infizierten Ferkeln kann eine Menge von mehr als  $1,0 \times 10^7$  Genomkopien pro 500ng PCV2-DNA im Myokard, der Leber und der Milz festgestellt werden (BRUNBORG et al., 2007). Die Autoren schließen daher auf das Myokard als Zielorgan von PCV2 bei Feten (BRUNBORG et al., 2007).

### 3.6. Porcine Dermatitis and Nephropathy Syndrome (PDNS)

WELLENBERG et al. (2004b) zeigen, dass PDNS mit PCV2 assoziiert ist und als Primäragens gesehen werden kann. Die markantesten klinischen Anzeichen für PDNS sind multifokale, manchmal konfluierende Hautläsionen, begleitet von

Hämorrhagien und multifokalen Nekrosen, die im weiteren Verlauf teilweise vernarben (DROLET et al., 1999; WELLENBERG et al., 2004b). Diese Narben sind vor allem abdominal, an den Hinter-, sowie Vordergliedmaßen und an den Ohren charakteristisch für PDNS (WELLENBERG et al., 2004b). Histopathologisch sind eine Vaskulitis in den dermalen und subdermalen Blutgefäßen, eine lymphohistiozytäre Vaskulitis in der Lunge (THIBAUT et al., 1998), sowie renale Läsionen, die sich als Glomerulonephritiden mit fibrinösen Ablagerungen zeigen, typisch (WELLENBERG et al., 2004b). In den Nieren der Tiere sind multiple, fokale Blutungen von 2 bis 4 mm Größe festzustellen und die Nierenrinde stellt sich blass dar (CHOI & CHAE, 2001). Außerdem zeigt sich eine akute nekrotisierende Glomerulonephritis sowie multifokale Synechien zwischen Bowman Kapsel und dem Glomerulum (MAJZOUB et al., 2005).

#### **4. Diagnostik**

Das klinische Bild allein ist keinesfalls ausreichend zur Diagnostik von PCVD (ALLAN & ELLIS, 2000). Um die Diagnose PMWS zu stellen müssen drei Kriterien in einem Schwein erfüllt sein. Klinische Anzeichen von PCVD, histopathologische Läsionen in den lymphatischen Geweben und intraläsionaler Nachweis von PCV2-DNA (ALLAN & ELLIS, 2000; SORDEN, 2000; SEGALES & DOMINGO, 2002). Für die Herdendiagnostik einer PCV2-Infektion sind zwei Punkte essentiell. Zum einen ein signifikanter Anstieg der Mortalität von Absetzferkeln in Verbindung mit klinischen Anzeichen, die eine PCVD vermuten lassen, zum anderen die Diagnose von PCV2-SD in mindestens einem von drei bis fünf seziierten Schweinen (SEGALES, 2012). Beide Punkte müssen zeitgleich erfüllt werden. Zu beachten ist, dass unterschiedlich stark ausgeprägte pathologische Veränderungen sowie PCV2-Virusmengen in den unterschiedlichen Organen gefunden werden können, weshalb mehrere Organe untersucht werden sollten (WELTI et al., 2012). Der Nachweis von Antikörpern gegen PCV2 allein hat keine diagnostische Aussagekraft bezüglich eines PMWS-Ausbruchs (SEGALES, 2012), da PCV2 ubiquitär verbreitet ist und eine Serokonversion sowohl in mit PMWS betroffenen, als auch PMWS freien Herden festgestellt werden kann (LAROCHELLE et al., 2003). Auch für GRAU-ROMA et al. (2009) ist eine histopathologische Untersuchung in Kombination mit dem Nachweis von PCV2-DNA unerlässlich für die Diagnose von PMWS. Ein Nachweis von PCV2-DNA mittels qPCR sowie IHC wird empfohlen (SEGALES, 2012).

#### 4.1. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction – PCR) stellt eine geeignete Methode zur Detektion von PCV2-Genomkopien dar (HAMEL et al., 2000). Die verwendeten Primer basieren auf den DNA-Sequenzen, die in den PCV2-Genomen vorhanden sind (HAMEL et al., 2000). Zum Nachweis von PCV2-DNA mittels PCR eignet sich Material aus Geweben wie der Lunge, den Mesenteriallymphknoten, den Tonsillen (HAMEL et al., 2000) oder das Serum der Tiere (CALSAMIGLIA et al., 2002). Als sensitivste Nachweismethode wird eine PCR aus den oberflächlichen Inguinallymphknoten beschrieben, wobei Serumproben als geeigneter für epidemiologische Studien gesehen werden, da sie von lebenden Tieren gewonnen werden können (CALSAMIGLIA et al., 2002). GRAU-ROMA et al. (2009) kommen beim Vergleich von Serumproben, Nasentupfern und Rektaltupfern zu vergleichbaren Ergebnissen, bezüglich der jeweils detektierten Menge an PCV2-Genomkopien in der qPCR. Mittels TaqMan PCR werden Tupferproben von Schweinen, die klinische Anzeichen von PMWS zeigen analysiert (SEGALES et al., 2005b). Die Ergebnisse weisen die höchste Anzahl von PCV2-Genomkopien in Tracheobronchial-Tupfern auf. Aber auch in Serum, Tonsillar-, Nasal-, Fäkal- und Harntupferproben kann PCV2-DNA nachgewiesen werden (SEGALES et al., 2005b). BRUNBORG et al. (2004) zeigen, dass die quantitative PCR einen geeigneten Indikator darstellt, um festzustellen, ob eine PCV2-Infektion klinische Relevanz aufweist. Die Forscher weisen eine Korrelation zwischen den PCV2-Genomkopien/ml Serum und der Stärke der Läsionen nach. Bei keinem der klinisch unauffälligen Tiere kann eine Virusmenge von mehr als  $1,0 \times 10^6$  Genomkopien pro ml Serum nachgewiesen werden, während alle Tiere, die klinisch PMWS zeigen, ein Gehalt von mindestens  $1,0 \times 10^7$  Genomkopien pro ml Serum aufweisen (BRUNBORG et al., 2004). Die Virusmenge kann auch laut BAUMGARTNER et al. (2012) bei klinisch gesunden Tieren bis zu einem Wert von  $1,0 \times 10^6$  Genomkopien/ml Serum reichen. Als durchschnittlichen Wert, von an PMWS erkrankten Tieren werden  $1,8 \times 10^8$  PCV2-Genomkopien/ml Serum beschrieben (BAUMGARTNER et al., 2012). Die Autoren stellen damit ebenfalls signifikant höhere DNA-Menge fest, als bei klinisch gesunden Tieren. OLVERA et al. (2004) können zusätzlich einen signifikanten Zusammenhang zwischen dem, mittels PCR gemessenen PCV2-DNA Gehalt im Serum und dem Schweregrad histologisch festgestellter PMWS-Läsionen feststellen. Bei Tieren mit schwerwiegenden Läsionen liegt der Gehalt

an PCV2-DNA bei  $3,9 \times 10^5$  bis  $1,8 \times 10^{12}$  Genomkopien pro ml Serum und bei Tieren, die moderate Läsionen aufweisen können Werte von  $2 \times 10^3$  bis  $9,8 \times 10^8$  PCV2-Genomkopien pro ml Serum detektiert werden. In den Serumproben von Tieren mit milden PMWS-Läsionen liegen die Genomkopien pro ml bei  $2,0 \times 10^3$  bis  $8,1 \times 10^7$  (OLVERA et al., 2004).

Im Gegensatz dazu steht die qualitative PCR. Die Aussage über das Vorhandensein von PCV2-Genomkopien stellt keine geeignete Methode zum Nachweis einer PCVD dar (MCNEILLY et al., 2002). Der Grund hierfür ist in dem ubiquitären Charakter von PCV2 und den häufig subklinischen Infektionen zu sehen (SEGALES et al., 2005a).

#### **4.2. Antikörper-ELISA**

Durch das ubiquitäre Vorkommen von PCV2 in allen Altersstufen der Hausschweinepopulation (SEGALES & DOMINGO, 2002), können auch bei klinisch gesunden Tieren PCV2-Antikörper nachgewiesen werden (RODRIGUEZ-ARRIOJA et al., 2003), deshalb ist der qualitative Nachweis von Antikörpern gegen PCV2 allein nicht aussagekräftig, um die Diagnose PMWS zu stellen (SEGALES, 2012). Mit dem „Ingezim PCV IgG<sup>®</sup> and Ingezim IgM<sup>®</sup>“-ELISA gelingt es, spezifische Immunglobuline, IgG und IgM, die gegen PCV2 gerichtet sind, nachzuweisen (SEGALES, 2005). Mit Hilfe dieses Verfahrens lässt sich der Infektionszeitpunkt genauer bestimmen. Ist der IgM-Wert höher als der der IgG, handelt es sich um eine aktive Infektion. Bei IgG-Werten höher als IgM, liegt die Infektion ein bis zwei Monate zurück. Kann nur IgG und kein IgM gefunden werden, handelt es sich um eine alte Infektion und wird weder IgG noch IgM nachgewiesen liegt keine Infektion vor (Gebrauchsanleitung des Ingezim PCV IgG<sup>®</sup> and Ingezim IgM<sup>®</sup>, Ingenasa).

#### **4.3. Weitere Verfahren**

Zusätzliche Methoden, die sich eignen, um auch fixierte Gewebeproben auf PCV2 zu untersuchen, stellen unter anderem die In-situ-Hybridisierung (ISH) (CALSAMIGLIA et al., 2002) und die Immunhistochemie (IHC) dar (MCNEILLY et al., 1999). Mit der ISH ist es möglich PCV2-DNA in formalinfixierten Geweben nachzuweisen (MCNEILLY et al., 1999). Diese Methode ermöglicht zudem den gleichzeitigen Nachweis von PCV2-DNA und die Betrachtung, der durch PCV2 verursachten histopathologischen Veränderungen

(ALLAN et al., 1998). Bei der IHC wird das PCV2-Antigen mit Hilfe von markierten Serumantikörpern detektiert (MCNEILLY et al., 1999). Bei einem Vergleich von in Formalin fixierten Proben mittels ISH mit IHC, erweist sich die IHC als sensitivere Methode (MCNEILLY et al., 1999). Dies führen die Autoren auf den möglichen Abbau der Nukleinsäuren des Virus in Folge der Fixierung zurück. Unter anderem zeigen ALLAN et al. (1989) eine hohe Sensitivität der ISH auf, was MCNEILLY et al. (1999) dazu veranlasste ihre Ergebnisse kritisch zu bewerten. Auch die Elektronenmikroskopie eignet sich als Nachweismethode von PCV2 (STEVENSON et al., 1999). Mit Hilfe der Elektronenmikroskopie lassen sich intrazytoplasmatische und in manchen Zellen intranukleäre Einschlusskörperchen in persistent infizierten PK-15 Nierenzelllinien nachweisen (STEVENSON et al., 1999).

## 5. Übertragungswege von PCV2

Der direkte Kontakt zu PCV2-infizierten Tieren und der Kontakt zu Se- und Exkreten PCV2-infizierter Tiere gilt als wichtiger Faktor für die Übertragung von PCV2 (MADEC et al., 2008; DUPONT et al., 2009). DUPONT et al. (2009) zeigen in einer experimentellen Studie, dass sich Tiere besonders leicht infizieren, wenn PCV2-infizierte Tiere gemeinsam mit nicht infizierten Tieren in einer Bucht aufgestellt sind. Es gelingt ihnen außerdem zu zeigen, dass Tiere, die ausschließlich naso-nasalen Kontakt haben sich gegenseitig infizieren (DUPONT et al., 2009). Die Ausscheidung von PCV2 erfolgt über verschiedenste Se- und Exkrete. BOLIN et al. (2001) weisen PCV2-DNA in Nasen-, Kot- oder Tonsillentupfern, sowie im Urin, im Serum und aus Flüssigkeit bronchioalveolärer Lavage nach. Der Kot infizierter Tiere enthält ebenfalls infektiöses Material (PATTERSON et al., 2011).

WEST et al. (1999) können bei einigen abortierten, mumifizierten Ferkeln einen Zusammenhang zwischen einer PCV2-Infektion und dem Tod der Ferkel nachweisen. Bei den Ferkeln, bei denen eine Myokarditis festgestellt wird, kann PCV2-DNA nachgewiesen werden. Nachdem andere Aborterreger ausgeschlossen worden sind, wird ein direkter Zusammenhang zwischen dem Abort der Ferkel und einer PCV2-Infektion angenommen (WEST et al., 1999). In einem Infektionsversuch von PARK et al. (2005) werden Sauen drei Wochen *ante partum* intranasal mit PCV2 infiziert. Die Untersuchung der Ferkel zeigt, dass in

der Milz, Lunge und Lymphknoten PCV2-DNA nachweisbar ist, was die Autoren als Beleg für eine transplazentare Übertragung sehen. MADSON et al. (2009) untersuchen einen möglichen vertikalen Übertragungsweg, indem sie PCV2-naive Sauen mit kontaminierten Sperma befruchten. Die Ergebnisse der Untersuchung zeigen, dass eine diaplazentare Übertragung auf die Feten möglich ist (MADSON et al., 2009). Die PCV2-Infektion tritt sehr früh auf, vor allem intrauterin während der fetalen Entwicklung, oder während bzw. kurz nach der Geburt (DVORAK et al., 2013). Laut DVORAK et al. (2013) sollte das Risiko einer vertikalen Übertragung von PCV2 nicht unterschätzt werden. Im Gegensatz dazu ist der vertikale Übertragungsweg für HARDING (2004) nicht der primäre Übertragungsweg für PCV2, da in deren Untersuchungen von Fortpflanzungsorganen weder PCV1 oder PCV2 Antigen noch PCV2-DNA mittels PCR nachgewiesen werden können.

## **6. Risikofaktoren für eine PCV2-Infektion**

Zahlreiche Umweltfaktoren werden als Risikofaktoren für das Auftreten von PMWS gesehen (MADEC et al., 2000). Die Relevanz einer guten Betriebshygiene wird durch diverse Studien bestätigt. So wird gezeigt, dass die Tierdichte einer Region, gemischte Herkünfte der Tiere (RITZMANN et al., 2002), häufiges Wechseln der Herkunftsbetriebe, Ko-Infektionen (ROSE et al., 2003) und das allgemeine Hygienemanagement (MADEC et al., 2000; ROSE et al., 2003) die Wahrscheinlichkeit einer Infektion mit PCV2, bzw. eines PMWS-Ausbruchs erhöhen.

Der Einfluss des Standorts des Bestands auf die Wahrscheinlichkeit einer PCV2-Infektion wird hauptsächlich mit der Tierdichte der jeweiligen Region, bzw. den Tiertransporten in Verbindung gebracht. Untersuchungen auf die Prävalenz von PCV2-Infektionen in bayerischen Beständen in den Jahren 1999 bis 2001 zeigen regionale Unterschiede auf (RITZMANN et al., 2002). In 53% der in die Studie eingeschlossenen Betriebe ist mindestens ein Schwein PCV2-DNA positiv und insgesamt wird bei 40% der Tiere eine PCV2-Infektion nachgewiesen (RITZMANN et al., 2002). Die Autoren zeigen durch den Vergleich der Standorte der Tiere, dass in Niederbayern mehr PCV2-infizierte Tiere gefunden werden können, als in den anderen Regierungsbezirken. Niederbayern repräsentiert auf bayerischer Ebene die Region mit der höchsten Tierdichte (RITZMANN et al.,

2002). In britischen Beständen, die weniger als fünf Meilen von einem anderen schweinehaltenden Bestand entfernt sind, wird in den Jahren 2001 bis 2003 bei 32% der untersuchten Tiere eine PCV2-Infektion nachgewiesen (WOODBINE et al., 2007). Im Vergleich dazu sind nur 6% der beprobten Tiere PCV2-positiv, wenn der nächste Bestand mindestens fünf Meilen entfernt ist (WOODBINE et al., 2007).

Das klinische Bild einer PCV2-Infektion, in Form von PMWS, kann in mehreren Studien mit Ko-Infektionen in Zusammenhang gebracht werden (WELLENBERG et al., 2004a; KAWASHIMA et al., 2007). WELLENBERG et al. (2004a) untersuchen das gemeinsame Auftreten von PMWS und einer Infektion mit PRRSV. Dabei weisen sie in 90% der Tiere mit PMWS Antikörper gegen PRRSV und/oder PRRS-RNA nach, und nur bei 45% der Tiere ohne PMWS. Eine erhöhte Anzahl an PCV2-DNA kann auch im Zusammenhang mit einer *M. hyopneumoniae*-Infektion festgestellt werden (OPRIESSNIG et al., 2004). Schweine, die experimentell gleichzeitig mit *M. hyopneumoniae* und PCV2 infiziert werden, weisen häufiger klinische Anzeichen von PCVD und hohe Mengen an PCV2-DNA in den PCV2-assoziierten Läsionen auf, als Tiere, die jeweils nur einem Pathogen ausgesetzt werden. Die Anzahl der Tiere mit klinischem Bild einer PCVD, sowie einer hohen Menge an intraläsionaler PCV2-DNA ist bei den doppelt infizierten Tieren signifikant höher, als bei den Tieren, die jeweils nur mit einem Erreger – PCV2 oder *M. hyopneumoniae* – infiziert werden (OPRIESSNIG et al., 2004).

Ein Einfluss der Bestandsgröße und dem Auftreten von PMWS stellen LOPEZ-SORIA et al. (2005) fest. In ihrer Untersuchung können sie feststellen, dass bei einer Anzahl von bis zu 250 Sauen pro Betrieb der prozentuale Anteil an Tieren mit PMWS bei 31% liegt. Bei Betrieben mit über 500 Sauen sind 56% der Betriebe von PMWS betroffen und bei Betrieben, die zwischen 251 und 500 Sauen aufstallen liegt der Anteil der Tiere mit PMWS bei 13% (LOPEZ-SORIA et al., 2005). Auch die Größe der Abteile selbst, und somit die Tierzahl pro Abteil hat einen Einfluss auf die Prävalenz eines PMWS-Ausbruchs (ROSE et al., 2003). BAUMGARTNER et al. (2012) können in Schweizer Beständen eine Überbelegung der Buchten und große Gruppengrößen als Risikofaktoren eines PMWS-Ausbruchs belegen. Bezüglich des Hygienemanagement gilt bei PCV2 zusätzlich zu beachten, dass PCV2 eine hohe Widerstandsfähigkeit gegenüber

Hitze und Desinfektionsmitteln besitzt (O'DEA et al., 2008; DVORAK et al., 2013).

Neben der Impfung, stellt der „20-Punkte-Plan“ von MADEC et al. (1999) durch Optimierungsmöglichkeiten der allgemeinen Betriebshygiene, eine geeignete Kontrollmaßnahme zur Reduktion von PCV2-Infektionen dar. Die Bereiche auf denen der Fokus liegen soll ist demnach eine Reduktion des direkten Tierkontakts, eine Verbesserung der Hygiene- und Managementmaßnahmen, eine Reduktion von Stressfaktoren, eine angemessene Fütterung der Tiere und eine Kontrolle der Ko-Infektionen.

## **7. Vakzination gegen PCV2**

Als sehr wirksame Methode zur Kontrolle von PCVD hat sich die Impfung gegen PCV2 erwiesen (FACHINGER et al., 2008; KIXMÖLLER et al., 2008; HAAKE et al., 2014). Man unterscheidet die Möglichkeit der aktiven Immunisierung der Ferkel gegen PCV2 von der passiven Immunisierung der Ferkel. Die aktive Immunisierung wird mittels Ferkelimpfung erreicht und die passive Immunisierung der Ferkel erfolgt durch die Aufnahme maternalen Antikörper über das Kolostrum geimpfter Sauen (OPRIESSNIG et al., 2010). In verschiedenen Studien unter Labor- sowie Praxisbedingungen wird die Wirksamkeit der aktiven Immunisierung von Ferkeln gegen PCV2 beschrieben.

Durch die aktive Immunisierung der Ferkel ist es möglich, die Anzahl an PCVD-erkrankten Tieren zu reduzieren. KIXMÖLLER et al. (2008) können zeigen, dass bei aktiv immunisierten Ferkeln die Höhe der Virämie im Vergleich zu den ungeimpften Kontrolltieren signifikant reduziert ist. In einem Betrieb mit PMWS-Ausbrüchen können sie zeigen, dass die geimpften Tiere, gegenüber der Kontrollgruppe ein um 70% geringere mittlere Menge an PCV2-DNA aufweisen und die Dauer der Virämie verkürzt ist. Eine Reduktion der Mortalität um 53%, sowie eine signifikante Verringerung der klinischen Symptome und ein signifikant höheres Körpergewicht zum Ende der Mast können ebenfalls mit der Ferkelimpfung erreicht werden (KIXMÖLLER et al., 2008). Untersuchungen von FRAILE et al. (2012) zeigen, dass über die Dauer der gesamten Mastperiode signifikant höhere Tageszunahmen bei PCV2-geimpften Tieren erzielt werden im Vergleich zu den ungeimpften Tieren.

Das Prinzip der passiven Immunisierung der Ferkel beruht auf der Aufnahme

maternalen Antikörper von Saugferkeln über das Kolostrum geimpfter Muttersauen (OH et al., 2012). Durch die passive Immunisierung kann eine Senkung des Infektionsdrucks erreicht werden, allerdings kommt es zu keiner Eradikation des Virus (FENG et al., 2014). GERBER et al. (2011) stellen beim Vergleich von Kolostrum infizierter, nicht gegen PCV2 geimpfter Sauen, mit dem Kolostrum infizierter und gegen PCV2 geimpfter Sauen eine geringere Ausscheidung von PCV2-DNA über das Kolostrum fest. Bei 71,4% der ungeimpften Sauen kann PCV2-DNA im Kolostrum festgestellt werden, im Vergleich dazu ist bei nur 35% der geimpften Sauen PCV2-DNA zu detektieren (GERBER et al., 2011). Nachgewiesene Effekte der Muttersauenimpfung stellen höhere Tageszunahmen und eine geringere Mortalität der Ferkel dar. So beschreiben KURMANN et al. (2011) bei Ferkeln von geimpften Sauen höhere Tageszunahmen sowie eine kürzere Mastdauer im Vergleich zu denen von ungeimpften Sauen stammenden Tieren. Die Mortalität von Absetzferkeln, die von PCV2-geimpften Sauen stammen, ist im Vergleich zu den Ferkeln PCV2 ungeimpfter Sauen geringer (PEJSAK et al., 2010).

Alle derzeit kommerziell verfügbaren PCV2-Impfstoffe basieren auf dem Genotyp PCV2a (OPRIESSNIG et al., 2007). Eine Kreuzprotektivität der aktuell verfügbaren PCV2a-Impfstoffe gegenüber dem Genotyp PCV2b wird mit Hilfe einer experimentellen Studie bestätigt (OPRIESSNIG et al., 2008). Eine Wirksamkeit der PCV2-Impfstoffe gegen den Genotyp PCV2d wird in experimentellen Studien ebenfalls beschrieben (JEONG et al., 2015; OPRIESSNIG et al., 2016).

Derzeit (Stand 2015) sind in Deutschland fünf PCV2-Impfstoffe zugelassen, welche aus Tabelle 1 entnommen werden können, dabei handelt es sich bei einem Präparat um einen Kombi-Impfstoff mit *M. hyopneumoniae*.

**Tabelle 1: Aufstellung des Paul-Ehrlich-Institutes der in Deutschland zugelassenen Impfstoffe gegen PCV2 (2015)**

<b>Name</b>	<b>Zulassungsinhaber</b>	<b>Anwendung</b>
<b>Circovac<sup>®</sup></b>	Merial Frankreich	Schweine ab einem Alter von 3 Wochen
<b>Ingelvac CircoFLEX<sup>®</sup></b>	Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH	Schweine ab einem Alter von 2 Wochen
<b>Porcilis<sup>®</sup> PCV</b>	Intervet International BV	Schweine ab einem Alter von 3 Tagen
<b>Porcilis<sup>®</sup> PCV M Hyo</b>	Intervet International BV	Schweine ab einem Alter von 3 Wochen
<b>Suvaxyn<sup>®</sup> PCV</b>	Zoetis Deutschland GmbH	Schweine ab einem Alter von 3 Wochen

### **III. MATERIAL UND METHODEN**

Die im Folgenden ausgewerteten Blutproben wurden zu diagnostischen Zwecken in Mastbeständen gewonnen und im Rahmen der vorliegenden Untersuchung retrospektiv molekularbiologisch auf das Vorhandensein von PCV2-DNA untersucht. Insgesamt konnten 1675 Blutproben aus 59 Mastbeständen ausgewertet werden. Der PCV2 Status der jeweiligen Bestände war nicht bekannt. In der folgenden Auswertung wurden die Proben sowie die Bestände unterschiedlichen Kategorien zugeteilt, um Risikofaktoren für das Auftreten von PCV2 Virämien zu eruieren.

#### **1. Auswahl der Blutproben**

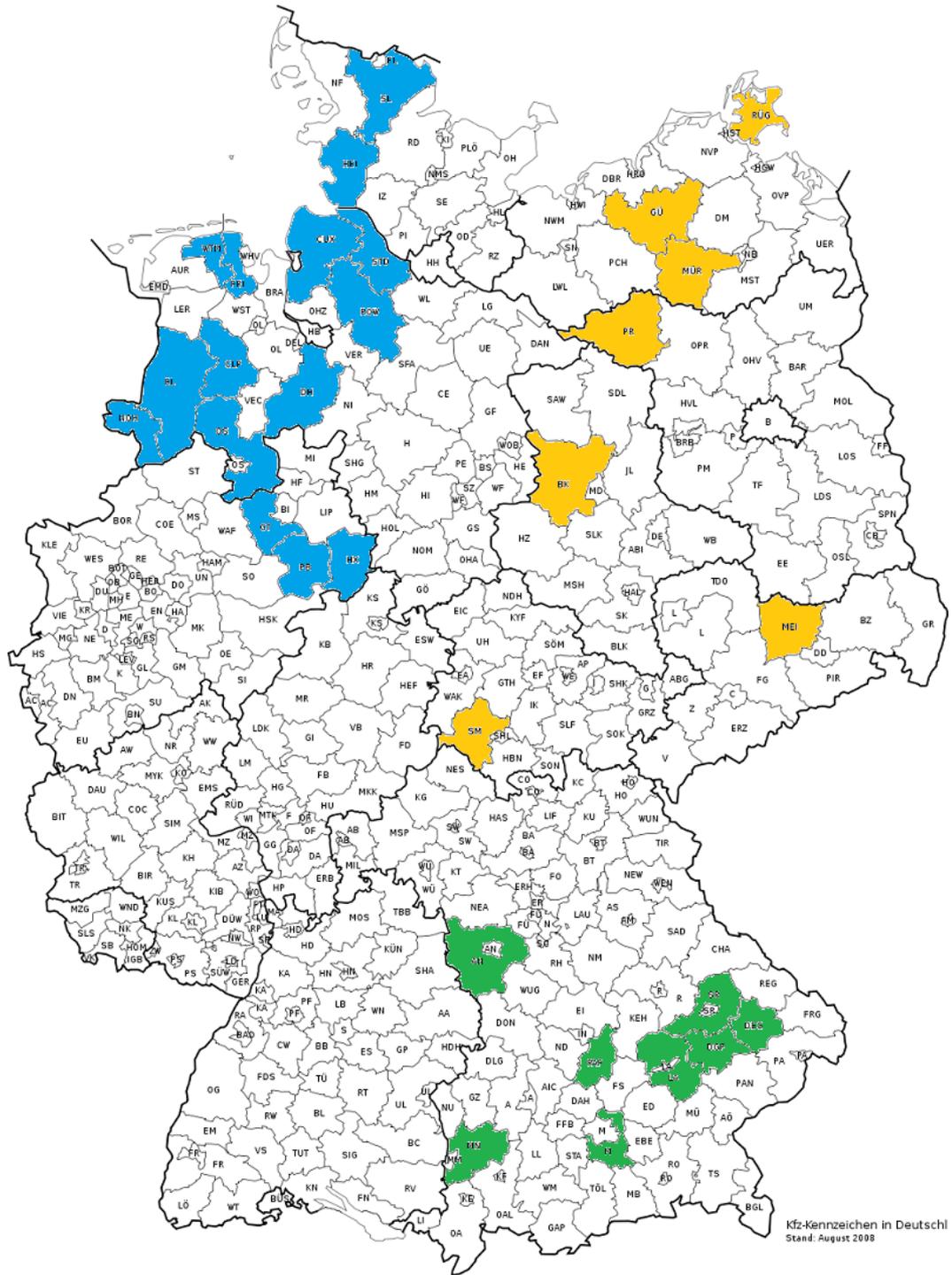
Insgesamt wurden die Blutproben von 59 Beständen zum Screening ausgewählt. Pro Bestand standen 20 (n=9) oder 30 Blutproben (n=50) zur Verfügung (n<sub>gesamt</sub>=1680). Alle Proben stammten von Schweinen, die zwischen 16 und 20 Wochen alt und jeweils aus einem Mastdurchgang waren.

Anhand der Postleitzahl des Betriebsstandortes sowie der Ohrmarkennummern der beprobten Schweine konnten die Proben nach dem jeweiligen Standort unterschieden und den Regionen Nord-, Ost- und Süddeutschland zugeordnet werden. Zusätzlich wurden mittels eines Fragebogens bestandspezifische Management- und Hygienefaktoren abgefragt, die in die folgende statistische Auswertung mit einfließen. In Tabelle 2 sind alle für die folgende Auswertung herangezogenen Faktoren dargestellt.

In Abbildung 1 ist die Zuteilung der Bestände zu den Standortregionen abgebildet. Grün steht für die Bestände die zu Süddeutschland zählen, blau für die Bestände in den norddeutschen und gelb für die Bestände in den ostdeutschen Regionen.

**Tabelle 2: Übersicht über die mittels Fragebogen erhobenen Faktoren**

<b>Kategorie</b>	<b>Definition</b>
<b>PCV2 Immunisierung</b>	Aktive Immunisierung gegen PCV2
	Passive Immunisierung gegen PCV2
	Keine Impfung der Ferkel
<b>Standort des Bestands</b>	Süddeutschland
	Norddeutschland
	Ostdeutschland
<b>Weitere Schutzimpfungen der Ferkel</b>	<i>M. hyopneumoniae</i>
	PRRSV
	APP
<b>Betriebsgröße</b>	0-999 Mastplätze
	1000-1999 Mastplätze
	2000-3999 Mastplätze
	Ab 4000 Mastplätze
<b>Betriebssystem</b>	Geschlossenes System
	Reine Mast
<b>Belegungsverfahren</b>	Kontinuierliche Belegung
	Rein / Raus Abteilweise
	Rein / Raus Stallweise



**Abbildung 1 Einteilung der beprobten Bestände nach Regionen, modifiziert nach GRUPPE (2009)**

## 2. Probennahme

### 2.1. Blutentnahme

Für die Blutentnahme wurden die Schweine mittels Oberkieferschlinge von einer Hilfsperson kurzzeitig fixiert, um die Blutentnahme an der rechten Körperseite in der *Vena jugularis externa* vorzunehmen. Die Blutproben wurden von den jeweiligen bestandsbetreuenden Tierärzten, oder von einer Hilfsperson der Klinik für Schweine, Oberschleißheim genommen.

Zur Blutentnahme wurden Serummonovetten (Primavette<sup>®</sup> V Serum 10 ml der Firma Kabe Labortechnik, Nümbrecht-Elsenroth, Deutschland) verwendet. Die Punktion der Vene erfolgte mittels sterilen Einmal-Kanülen mit der Größe 1,20X100mm (SUPRA<sup>®</sup>, Erhardt-Söhne GmbH, Geislingen, Deutschland). Nach der Entnahme wurden die Blutproben zwischen 2°C und 8°C gekühlt und innerhalb von 24h im Labor der Klinik für Schweine der Ludwig-Maximilians-Universität in München für 10 min bei 1560 g (entspricht 3000 U/min) zentrifugiert (Rotana 460R Zentrifuge, Andreas Hettich<sup>®</sup> GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland). 0,5ml des gewonnenen Serums wurden in 1,4ml PPN-Tubes (MP32022, Micronic<sup>®</sup>, Lelystad, the Netherlands) abpipettiert und mittels EVA capbands (MP227B1, Micronic<sup>®</sup>, Lelystad, the Netherlands) verschlossen und durch das Band zu jeweils 8 Proben verbunden. Das restliche Serum wurde auf 2 Kryoröhrchen mit je 1,5ml Fassungsvermögen (Safe-Lock-Tubes, Eppendorf<sup>®</sup>, Hamburg, Deutschland) verteilt. Alle Röhrchen bzw. Tubes wurden vor Befüllung mit der Bestands- und Probennummer mithilfe eines wasserfesten Stiftes beschriftet. Jeder Bestand erhielt eine fortlaufende Nummer und jede Probe erhielt innerhalb des Bestands eine fortlaufende Nummer. Die Proben wurden in vorher beschrifteten Kryoboxen sortiert und bis zur weiteren Bearbeitung bei -20°C tiefgefroren.

### 2.2. Molekularbiologische Untersuchung auf PCV2

Das von den Endmasttieren gewonnene Serum wurde mittels einer quantitativen real time PCR (RT-PCR) im Swine R&D Biologicals der Firma MSD Animal Health<sup>®</sup> in Boxmeer, Niederlande, untersucht.

### 2.3. Quantitative PCR

Die Proben wurden gekühlt (zwischen 2°C und 4°C) versandt. In einem ersten Schritt wurden jeweils 5 Seren bestandsweise gepoolt untersucht. Im Fall von PCV2-positiven Poolproben wurden alle den Pool bildenden Proben einzeln untersucht. Die Extraktion der DNA erfolgte aus 200 µl Serum mit Hilfe eines handelsfertigen Extraktionskits (MagNA Pure 96 DNA and Viral NA Small Volume Kit, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim).

Der Nachweis von PCV2 erfolgte basierend auf einer bereits publizierten quantitativen TaqMan rt-PCR (BRUNBORG et al., 2004). Die PCR wurde in einem 25µl Gesamtansatz mit einem CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System der Firma Bio-Rad (Fa. Bio-Rad Laboratories GmbH, München) durchgeführt. Für die Serumproben wurden 2,5µl des DNA-Eluats als Vorlage verwendet. Zur Optimierung des Ablaufs wurden sechs unterschiedliche Konzentrationen des rekombinanten pGEX-4T-3-ORF2 benutzt. Die Konzentration lag bei 200nM jeden Primers, die in Tabelle 3 aufgelistet sind,

n x 12,5	µl iQ™ Supermix (BioRad)
n x 7,5	µl Wasser für Injektionszwecke
n x 0,5	µl 10 µM forward primer: F1
n x 0,5	µl 10 µM forward primer: F2
n x 0,5	µl 10 µM reverse primer: R1
n x 0,5	µl 10 µM reverse primer: R2
n x 1,0	µl 10 µM Probe
n x 23,0	µl

Der Wert n steht hier für die Anzahl der Proben, für die der Mastermix gemacht wird. Das Temperaturprofil war 95°C für 10 Minuten bei der initialen Denaturierung, je 38 Zyklen bei 95°C für 15 Sekunden zur Denaturierung und zum Annealing und zur Elongation eine Temperatur von 62°C über 60 Sekunden.

**Tabelle 3: Primer und Sonde für die PCV2-real-time PCR nach BRUNBORG et al. (2004)**

Primer (Biolegio BV, The Netherlands)	PCV-F1: 5'- GTA ACG GGA GTG GTA GGA GAA -3'
	PCV-F2: 5'- GTA GCG GGA GTG GTA GGA GAA -3'
	PCV-R1: 5'- GCC ACA GCC CTA ACC TAT GAC -3'
	PCV-R2: 5'- GCC ACA GCC CTC ACC TAT GAC -3'
Sonde	5'- 6FAM- ATG TAA ACT ACT CCT CCC GCC ATA CCA TA -BHQ1-3'

Der Cut-off Wert lag bei  $1.0 \log_{10}$  c/ $\mu$ l DNA.

#### 2.4. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mittels Microsoft Excel® 2010 sowie IBM SPSS 23 Statistics®. Das Signifikanzniveau lag bei 5 % ( $p=0,05$ ) mit einem Konfidenzintervall von 95%.

Die Kategorien bildeten als unabhängige dichotome Variablen die Einflussgrößen, das Auftreten einer Virämie die abhängige dichotome Zielgröße.

Die Einflussgrößen (unabhängige Variablen) und deren Definitionen sind in Tabelle 2 aufgelistet. Als Zielgrößen (abhängige Variablen) dienten die Ergebnisse der molekularbiologischen Untersuchungen, also das Vorhandensein und die Höhe (Mittelwerte) von PCV2-DNA. Die qualitativen Aussagen wurden univariat per Chi<sup>2</sup>-Test nach Pearson aus einer den Häufigkeitsverteilungen hervorgehenden Kreuztabelle errechnet. Anschließend wurde eine multiple binär logistische Regressionsanalyse mit Einbeziehung der im ersten Schritt ermittelten signifikanten Faktoren durchgeführt. Als Methode wurde der Likelihood-Ratio Test rückwärts durchgeführt. Mit Hilfe der multiplen binär logistischen Regression wurde der Einfluss der erfassten Variablen auf eine PCV2-Virämie untersucht. Aus den Regressionskoeffizienten wurden die Odds Ratios (OR) als Maß für die Stärke des Zusammenhangs berechnet. Ein Faktor mit einer OR > 1 gilt als Faktor der eine erhöhte Chance darstellt und ein Faktor mit einer OR < 1, wird als schützender Faktor gesehen.

Die quantitativen Aussagen basierten auf den Ergebnissen der molekularbiologischen Untersuchungen. Die Darstellung der Mittelwerte erfolgte zusammen mit der Standardabweichung und dem Minimal- sowie Maximalwert. Zunächst wurde der Kolmogorow-Smirnow-Test auf Normalverteilung durchgeführt. Um zu ermitteln, ob einer der durch die Kategorien dargestellter

Einflussfaktor signifikant mit dem Gehalt an PCV2-DNA/ml Serum assoziiert ist, wurden in einem ersten Schritt alle Einflussvariablen einzeln gegen die Zielvariable getestet (Mann-Whitney-U-Test). Signifikante Einflussvariablen wurden dann zur Berücksichtigung des Herdeneffektes in ein Allgemeines Lineares Univariates Model mit den festen Faktoren „signifikante Einflussvariable“ und dem zufälligen Faktor „Betrieb“ durchgeführt.

## IV. ERGEBNISSE

Mit Hilfe der im Material und Methodenteil beschriebenen PCR erfolgte die Auswertung der in die Untersuchung mit einbezogenen Blutproben. Die insgesamt 1680 untersuchten Blutproben aus den 59 Beständen wurden kategorisiert und auf Grundlage der PCR-Ergebnisse miteinander verglichen. Im Anschluss wurde mit den im Material- und Methodenteil beschriebenen statistischen Auswertungen berechnet, welche Faktoren einen Einfluss auf die Chance einer PCV2-Virämie nehmen.

### 1. Ausgewählte Bestände und Mastschweine

Der jeweilige Anteil (%) und die Anzahl (n) der Bestände (n=59) sowie der Einzeltiere (n=1680), der jeweiligen, mittels Fragebogen ermittelten Kategorie sind in Tabelle 4 dargestellt.

**Tabelle 4: Anzahl (n) und Anteil (%) der Einzeltiere und Bestände in der jeweiligen Kategorie (Tiere n=1680, Bestände n=59)**

Kategorie	Tiere in Kategorie n (%)	Bestände n (%)
PCV2- Immuni- sierung	Ferkelimpfung	41 (69,5%)
	Muttertierimpfung	6 (10,2%)
	Keine Impfung	12 (20,3%)
Standort des Bestands	Süddeutschland	21 (35,6%)
	Norddeutschland	30 (50,8%)
	Ostdeutschland	8 (13,6%)
weitere Schutz- impf- ungen	<i>M. hyopneumoniae</i>	48 (81,4%)
	PRRSV	25 (42,4%)
	APP	9 (15,3%)
Bestands- größe	0-999 Mastplätze	11 (18,6%)
	1000-1999 Mastplätze	21 (35,7%)
	2000-3999 Mastplätze	14 (23,7%)
	Ab 4000 Mastplätze	13 (22,0%)
Be- triebs- system	Geschlossenes System	25 (42,4%)
	Reine Mast	34 (57,6%)
Bele- gungs- system	Kontinuierliche Belegung	8 (13,6%)
	Rein / Raus Abteilweise	45 (76,2%)
	Rein / Raus Stallweise	6 (10,2%)

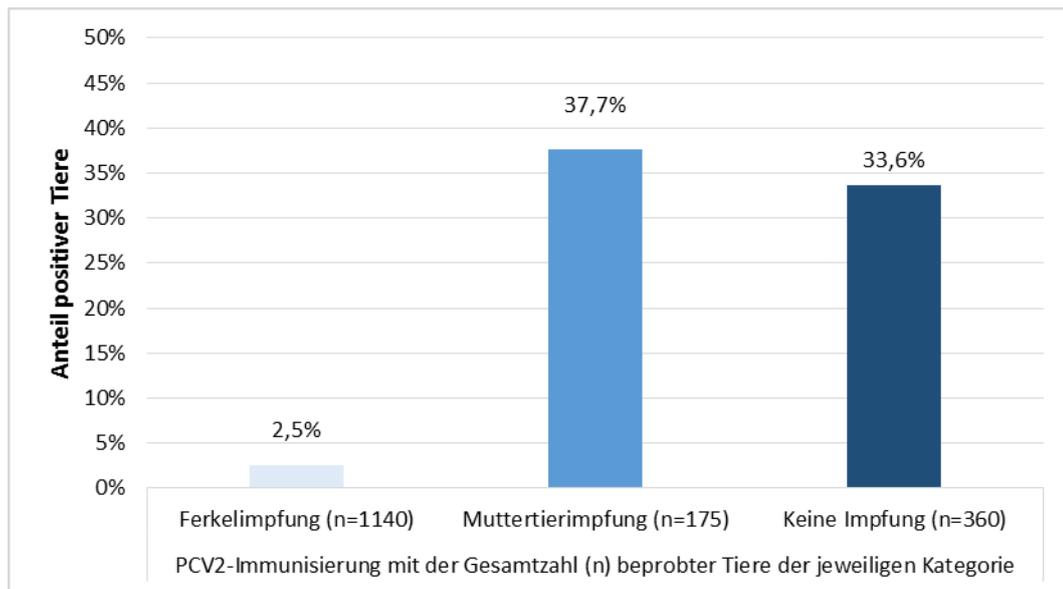
## **2. Ergebnisse des qualitativen Nachweises von PCV2-DNA mittels qPCR**

Im folgenden Kapitel wird die qualitative Auswertung der Ergebnisse der qPCR-Untersuchung der Serumproben angegeben. Insgesamt konnten 1675 Serumproben qualitativ ausgewertet werden. Fünf Proben, die in der Auswertung fehlen, kamen durch eine nicht ausreichende Probenmenge zustande. Alle Seren wurden mithilfe, der im Material- und Methodenteil beschriebenen PCR-Methoden qualitativ und quantitativ auf PCV2-DNA untersucht. Insgesamt war in 42,4% (25/59) der Bestände mindestens eins der untersuchten Seren PCV2-DNA positiv. Auf die Einzeltiere bezogen, konnten bei 12,9% (216/1675) der untersuchten Seren PCV2-DNA nachgewiesen werden. Die qualitativen Ergebnisse der PCR Untersuchung auf PCV2-DNA im Serum nach Kategorien sind in Tabelle 5 dargestellt.

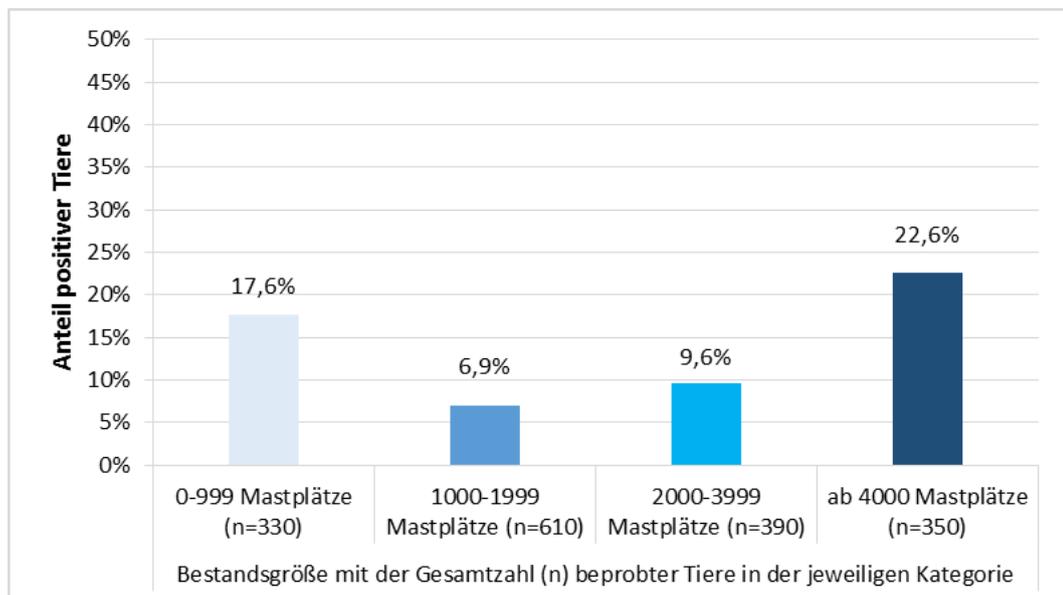
Mithilfe von Balkendiagrammen wurden qualitativen Ergebnisse aus Tabelle 5 auf Einzeltierebene anteilig dargestellt. Der Anteil (%) der PCV2-DNA positiven Tiere des jeweiligen PCV2-Immunisierungskonzepts zeigt Abbildung 2. Abbildung 3 stellt grafisch den Anteil (%) der PCV2-DNA positiven Tiere nach dem Faktor Bestandsgröße dar. In Abbildung 4 erfolgte eine Aufteilung nach der jeweiligen Standortregion, der anteilig (%) PCV2-DNA positiven Tiere.

**Tabelle 5: Anzahl (n) und Anteil (%) PCV2-positiver Seren nach Kategorie an der Gesamttierzahl (n=1675) und an den positiven Tieren (n=216); sowie Darstellung des Anteils PCV2-positiver Bestände nach Kategorie**

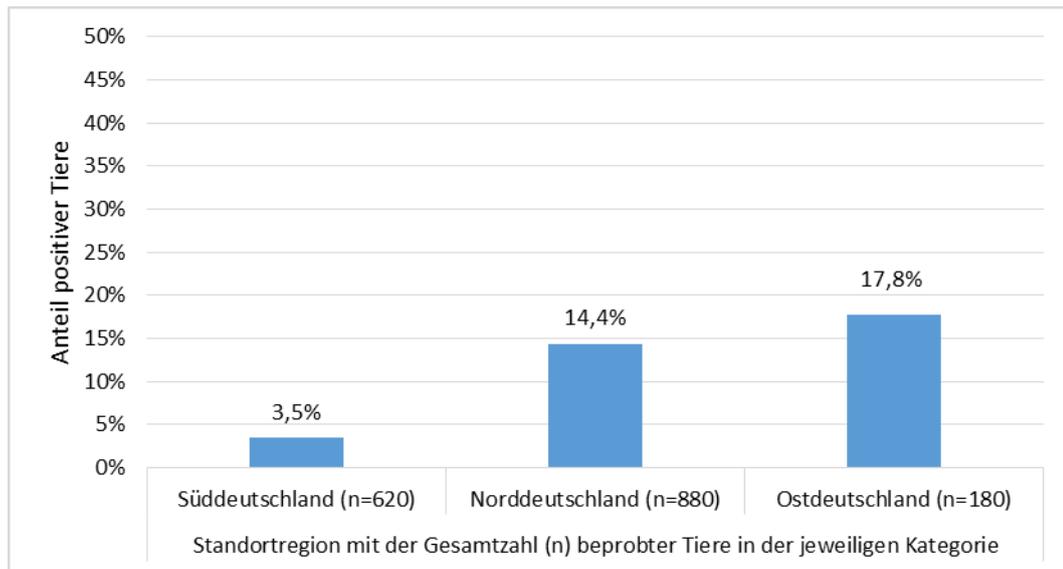
Kategorie		Anzahl und Anteil PCV2-positiver Tiere (n <sub>ges</sub> =1675)	Anteil PCV2-positiver Tiere (n <sub>PCV2pos</sub> =216)	Anteil PCV2-positiver Bestände nach Kategorie
PCV2-Immunsierung	Ferkelimpfung	29 (1,7%)	13,4%	9/41
	Muttertierimpfung	66 (3,9%)	30,6%	6/6
	Keine Impfung	121 (7,2%)	59,0%	10/12
Standort des Bestands	Süddeutschland	58 (3,4%)	27,3%	8/21
	Norddeutschland	126 (7,5%)	58,3%	15/30
	Ostdeutschland	32 (1,9%)	14,8%	2/8
weitere Schutzimpfungen	<i>M. hyopneumoniae</i>	90 (5,3%)	41,7%	16/48
	PRRSV	45 (2,7%)	20,8%	10/25
	APP	18 (1,1%)	8,3%	2/9
Bestandsgröße	0-999 Mastplätze	58 (3,5%)	26,9%	4/11
	1000-1999 Mastplätze	42 (2,5%)	19,4%	7/21
	2000-3999 Mastplätze	37 (2,2%)	17,1%	7/14
	Ab 4000 Mastplätze	79 (4,7%)	36,6%	7/13
Betriebsystem	Geschlossenes System	159 (9,5%)	73,6%	10/25
	Reine Mast	57 (3,4%)	26,4%	15/34
Belegungssystem	Kontinuierliche Belegung	35 (2,1%)	16,2%	3/8
	Rein / Raus Abteilweise	164 (9,8%)	75,9%	20/45
	Rein / Raus Stallweise	17 (1,0%)	7,9%	2/6



**Abbildung 2: Grafische Darstellung des Anteils (%) PCV2-positiver Tiere innerhalb der entsprechenden Impfkategorie**



**Abbildung 3: Grafische Darstellung des Anteils (%) PCV2-positiver Tiere innerhalb der entsprechenden Bestandsgröße**



**Abbildung 4: Grafische Darstellung des Anteils (%) PCV2-positiver Tiere innerhalb der entsprechenden Standortregion**

### 2.1. Statistische Auswertung der Ergebnisse des qualitativen PCV2-DNA Nachweises

Für die Erfassung von Einflussfaktoren auf das Auftreten von PCV2-Virämien wurden in einem ersten Schritt mittels univariater Analyse (Pearsons  $\chi^2$ -Test) alle Einflussfaktoren einzeln auf signifikante Assoziation getestet. Im zweiten Schritt wurde eine multiple logistische Regression mit allen zuvor als signifikant ermittelten Einflussfaktoren durchgeführt. Beide Berechnungen wurden jeweils auf Bestandsebene ( $n=59$ ) sowie auf Einzeltierebene ( $n=1675$ ) durchgeführt.

Die auf Bestandsebene errechneten Ergebnisse der univariaten Analyse, sowie der multiplen binär logistischen Regression kann Tabelle 6 entnommen werden. Als einziger Faktor, der die Chance für einen Nachweis von PCV2-DNA auf Bestandsebene vermindert, konnte die aktive Immunisierung gegen PCV2 ermittelt werden. Die Chance, dass ein Nachweis von PCV2-DNA in einem Bestand erfolgt, der aktiv immunisierte Mastschweine aufgestellt hat, ist 0,035:1.

Die auf Einzeltierebene errechneten Ergebnisse der univariaten Analyse sowie der nachfolgenden multiplen binär logistischen Regression kann Tabelle 7 entnommen werden. Dabei konnten die Faktoren Bestandsgröße von 2000-3999

Mastplätzen, ein stallweises Rein / Raus Verfahren, eine Impfung gegen *M. hyopneumoniae* und eine aktive Immunisierung der Tiere gegen PCV2 als schützend ermittelt werden. Bei Tieren in einem Bestand mit einer Größe von 2000-3999 ist Chance, dass PCV2 nachgewiesen wird 0,518:1. Wenn ein stallweises Rein / Raus Verfahren angewendet wird, ist die Chance eines PCV2 Nachweises 0,085:1, bei einer Impfung der Tiere gegen *M. hyopneumoniae* ist die Chance 0,277:1 und bei einer aktiven Immunisierung der Tiere gegen PCV2 ist die Chance PCV2 nachzuweisen 0,033:1.

Die Faktoren passive Immunisierung gegen PCV2 und ein reiner Mastbestand wurden als Faktoren ermittelt, die die Chance auf einen Nachweis von PCV2-DNA in den untersuchten Mastschweinen erhöhen. Die Chance bei einem Tier PCV2-DNA nachzuweisen, wenn die Muttersau PCV2 geimpft wurde ist 3,644:1. Bei Tieren die aus einem reinen Mastbetrieb stammen, ist die Chance auf einen PCV2-DNA Nachweis 2,035:1.

**Tabelle 6: Darstellung statistisch signifikanter Ergebnisse der univariaten Analysen und der binär logistischen Regressionsanalyse für einen PCV2-DNA Nachweis von 16 bis 20 Wochen alten Mastschweinen auf Bestandsebene**

Faktor	univariate Analyse				binär-logistische Regressionsanalyse			
	OR	untere	obere	p-Wert	OR	untere	obere	p-Wert
<b>PCV2 FI</b>	<b>0,035</b>	<b>0,007</b>	<b>0,182</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>0,035</b>	<b>0,007</b>	<b>0,182</b>	<b>&lt;0,001</b>
<b>Impfung M hyo</b>	0,123	0,024	0,638	0,006				
<b>Mast</b>	0,278	0,094	0,825	0,019				
<b>PCV2 SI</b>	1,316	1,056	1,64	0,003				

Legende: OR = Odds Ratio; untere = unteres Konfidenzintervall für OR; obere = oberes Konfidenzintervall für OR

**Tabelle 7: Darstellung statistisch signifikanter Ergebnisse der univariaten Analysen und der binär-logistischen Regressionsanalyse für einen PCV2-DNA Nachweis von 16 bis 20 Wochen alten Mastschweinen auf Einzeltierebene**

Faktor	univariate Analyse				binär-logistische Regressionsanalyse			
	OR	untere	obere	p-Wert	OR	untere	obere	p-Wert
PCV2 SI	<b>5,45</b>	<b>3,844</b>	<b>7,727</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>3,644</b>	<b>2,191</b>	<b>6,059</b>	<b>&lt;0,001</b>
Mast	<b>0,234</b>	<b>0,17</b>	<b>0,322</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>2,035</b>	<b>1,120</b>	<b>3,696</b>	<b>0,020</b>
Tierzahl 2000-3999	<b>0,66</b>	<b>0,454</b>	<b>0,959</b>	<b>0,03</b>	<b>0,518</b>	<b>0,316</b>	<b>0,849</b>	<b>0,009</b>
Impfung M hyo	<b>0,103</b>	<b>0,075</b>	<b>0,141</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>0,277</b>	<b>0,175</b>	<b>0,440</b>	<b>&lt;0,001</b>
Rein/Raus stallweise	<b>0,56</b>	<b>0,334</b>	<b>0,941</b>	<b>0,03</b>	<b>0,085</b>	<b>0,038</b>	<b>0,193</b>	<b>&lt;0,001</b>
PCV2 FI	<b>0,049</b>	<b>0,032</b>	<b>0,073</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>0,033</b>	<b>0,016</b>	<b>0,067</b>	<b>&lt;0,001</b>
Impfung PRRS	0,306	0,217	0,431	<0,001				
Tierzahl 1000-1999	0,379	0,266	0,539	<0,001				
Impfung APP	0,535	0,323	0,885	<0,001				
Standort Süd	0,586	0,426	0,806	<0,001				
Tierzahl 0-999	1,062	1,153	2,225	<0,001				
Tierzahl ab 4000	2,528	1,86	3,435	<0,001				
geschlossen	4,276	3,104	5,891	<0,001				
Standort Nord	1,327	0,994	1,772	0,055				
Standort Ost	1,541	1,02	2,326	0,04				

Legende: OR = Odds Ratio; untere = unteres Konfidenzintervall für OR; obere = oberes Konfidenzintervall für OR

### 3. Ergebnisse des quantitativen Nachweises von PCV2-DNA mittels qPCR

In Tabelle 8 sind die Mittelwerte (MW) inklusive Min, Max und Standardabweichung nach Kategorisierung aller, in der qPCR PCV2-positiven Seren dargestellt. Abbildung 5 und Abbildung 6 stellen die ermittelten und in Tabelle 8 dargestellten Mittelwerte und Standardabweichungen grafisch dar. Abbildung 5 setzt die Mittelwerte nach dem Impfkonzent und der Bestandsgröße in Beziehung. In Abbildung 6 wird der Mittelwerte des Standorts der Tiere grafisch dargestellt.

### 3.1. Statistische Auswertung der quantitativen Ergebnisse

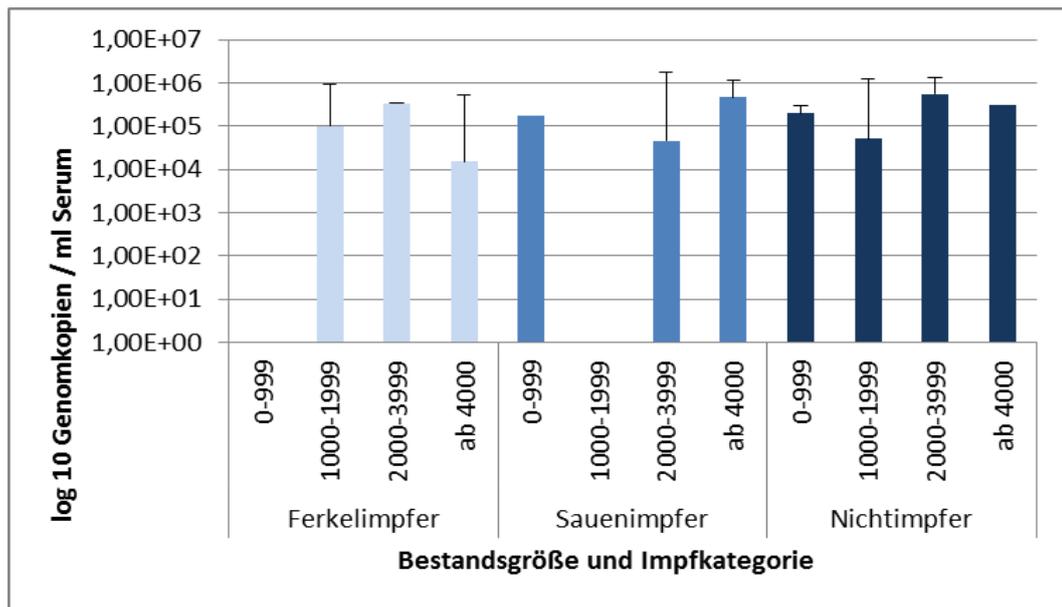
Die in Tabelle 8 dargestellten Mittelwerte wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test auf signifikante Unterschiede in ihrer Höhe untersucht. Dabei wurde beim Vergleich der Mittelwerte der erfassten Standorte (siehe Tabelle 8) ein signifikanter Unterschied bei Tieren mit einem ostdeutschen Standort im Vergleich zu den anderen beiden Standorten ( $p < 0,001$ ) festgestellt. Unter Berücksichtigung des Herdeneffekts (fixer Faktor: Standort; zufälliger Faktor: Betrieb) konnte im Allgemeinen Linearen Univariaten Model kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Standort Ost und den Mittelwerten festgestellt werden.

Beim Vergleich der Mittelwerte der Schutzimpfungen gegen *M. hyopneumoniae*, PRRSV oder APP konnte kein signifikanter Zusammenhang zur mittleren Menge an PCV2-DNA Genomkopien/ml Serum ermittelt werden.

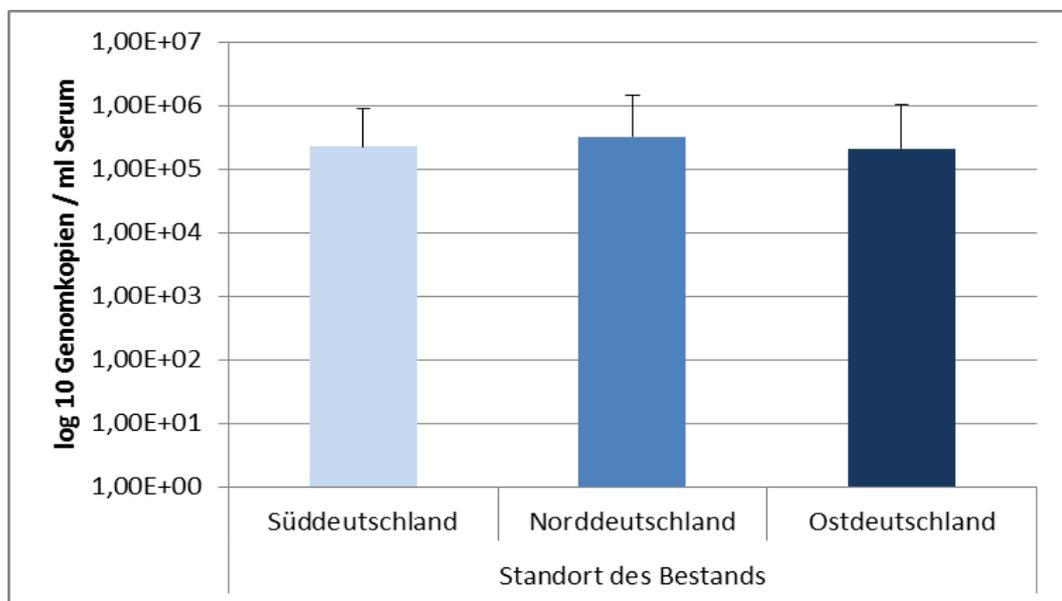
Die Bestandsgröße, wie auch das Betriebssystem hat in der vorliegenden Untersuchung keinen signifikanten Einfluss auf die mittlere Menge an PCV2-DNA genommen. Der Vergleich des Belegungssystems ergab ebenfalls keine signifikanten Differenzen, bezüglich der mittleren Menge von PCV2-DNA.

**Tabelle 8: Mittlere Anzahl an PCV2-Genomkopien pro ml Serum in der jeweiligen Kategorie, inklusive Min, Max, StabW. Die MW errechnen sich ausschließlich aus den Werten der positiven Tiere (n=216)**

Kategorie		MW	Min	Max	StabW
PCV2 Immuni- sierung	Ferkelimpfung	1,33E+05	3,92E+02	2,42E+06	4,59E+05
	Muttersauenimpfung	2,65E+05	3,47E+02	8,93E+06	1,14E+06
	Keine Impfung	2,48E+05	2,81E+02	5,09E+06	7,43E+05
Standort des Bestands	Süddeutschland	2,74E+05	3,92E+02	8,93E+06	1,26E+06
	Norddeutschland	1,78E+05	2,81E+02	4,16E+06	5,63E+05
	Ostdeutschland	4,08E+05	4,38E+03	5,09E+06	9,04E+05
Weitere Schutzimpfungen der Ferkel	M hyo geimpft	1,99E+05	3,47E+02	5,09E+06	6,29E+05
	M hyo ungeimpft	2,92E+05	2,81E+02	8,93E+06	1,10E+06
	PRRSV geimpft	1,71E+05	3,47E+02	5,09E+06	5,52E+05
	PRRSV ungeimpft	4,90E+05	2,81E+02	8,93E+06	1,52E+06
	APP geimpft	2,10E+05	2,81E+02	5,09E+06	6,41E+05
	APP ungeimpft	5,43E+05	1,24E+03	8,93E+06	2,10E+06
Bestandsgröße	0-999 Mastplätze	1,83E+05	3,47E+02	3,83E+06	6,16E+05
	1000-1999 Mastplätze	6,28E+04	3,92E+02	7,13E+05	1,34E+05
	2000-3999 Mastplätze	3,42E+05	2,81E+02	4,16E+06	8,95E+05
	Ab 4000 Mastplätze	3,22E+05	3,92E+02	8,93E+06	1,15E+06
Be- triebs- system	Geschlossenes System	2,34E+05	2,81E+02	5,09E+06	6,87E+05
	Reine Mast	2,48E+05	3,92E+02	8,93E+06	1,22E+06
Belegungs- system	Kontinuierliche Belegung	1,94E+05	5,37E+02	3,83E+06	6,57E+05
	Rein / Raus Abteilweise	2,10E+05	2,81E+02	5,09E+06	6,38E+05
	Rein / Raus Stallweise	5,96E+05	3,92E+02	8,93E+06	2,15E+06



**Abbildung 5: Mittelwerte der PCV2-Genomkopien/ml Serum in Abhängigkeit von Bestandsgröße und der jeweiligen Impfkategorie, inkl. Standardabweichung (n=216)**

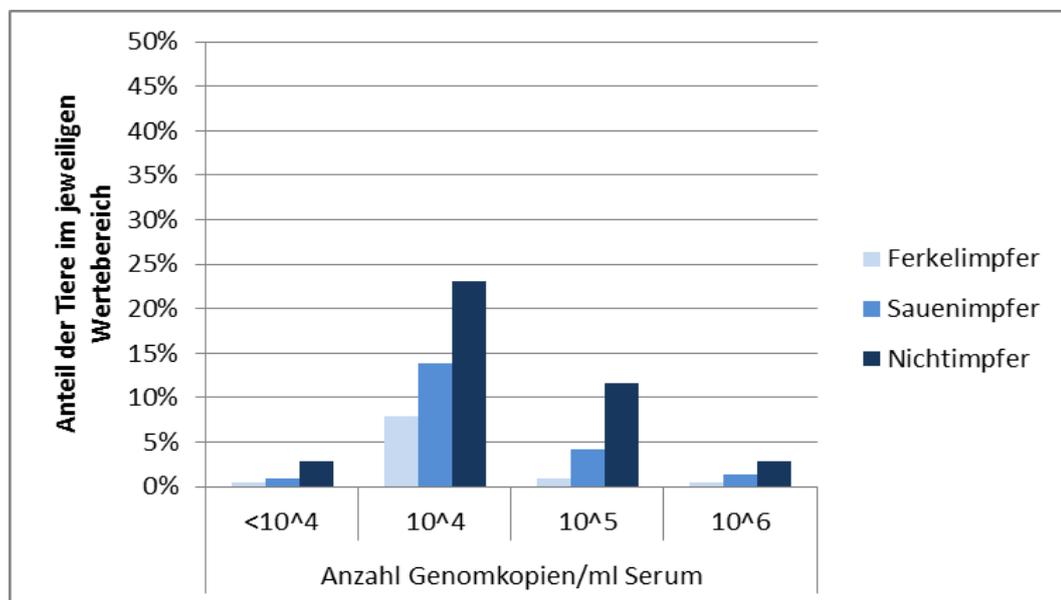


**Abbildung 6: Mittelwerte der PCV2-Genomkopien pro ml Serum in Abhängigkeit des Standorts der Mastschweine, inkl. Standardabweichung (n=216)**

Die Ergebnisse der quantitativen Untersuchung wurden für die Auswertung zusätzlich nach Wertebereichen sortiert, dazu wurden die Werte (Genomkopien/ml Serum) einer Zehnerpotenz jeweils einem Wertebereich zugeordnet. Abbildung 7 zeigt den Anteil (%) aller PCV2-positiven Proben in jedem Wertebereich in Abhängigkeit von der Impfgruppe. Die zugehörige Wertetabelle zeigt Tabelle 9 mit Anzahl (n) und Anteil (%) der Seren im jeweiligen Wertebereich.

**Tabelle 9: Anzahl und Anteil PCV2-DNA positiver Seren nach Wertebereich und Impfkonzept an der Gesamtzahl positiver Seren (n=216)**

Wertebereich Genomkopien/ml Serum	$10^2 - 10^3$	$10^4$	$10^5$	$10^6$
	Anzahl (n) Anteil (%)	Anzahl (n) Anteil (%)	Anzahl (n) Anteil (%)	Anzahl (n) Anteil (%)
Ferkel vakziniert	9 (4,2%)	17 (7,9%)	2 (0,9%)	1 (0,5%)
Sauen vakziniert	24 (11,1%)	30 (13,9%)	9 (4,2%)	3 (1,4%)
Nicht vakziniert	40 (18,5%)	50 (23,1%)	25 (11,6%)	6 (2,8%)
<b>Gesamt</b>	<b>73 (33,8%)</b>	<b>97 (44,9%)</b>	<b>36 (16,7%)</b>	<b>10 (4,6%)</b>



**Abbildung 7: Anteil (%) aller PCV2-positiven Tiere (n=216) nach Wertebereich in Abhängigkeit der Impfkatgorie**

Die erfassten Einflussfaktoren wurden mittels binär-logistischer Regressionsanalyse untersucht, deren Ergebnisse sind in Tabelle 10 dargestellt.

Als einziger Faktor, der die Chance verringert hat, dass bei einem Tier ein Mittelwert von  $10^6$  PCV2-Genomkopien/ml Serum oder höher nachgewiesen wurde, war die aktive Immunisierung der Ferkel. Durch eine Ferkelimpfung ist die Chance auf eine mittlere Menge von PCV2-DNA von  $10^6$  Genomkopien/ml Serum oder höher bei 0,062:1.

**Tabelle 10: Darstellung statistisch signifikanter Ergebnisse der univariaten Analysen und der binär-logistischen Regressionsanalyse für eine PCV2-Virämie von  $10^6$  PCV2-Genomkopien/ml Serum oder höher von 16 bis 20 Wochen alten Mastschweinen auf Einzeltierebene**

Faktor	univariate Analyse				binär-logistische Regressionsanalyse			
	OR	untere	obere	p-Wert	OR	untere	obere	p-Wert
<b>PCV2 FI geschlossen</b>	<b>0,052</b>	<b>0,007</b>	<b>0,41</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>0,062</b>	<b>0,008</b>	<b>0,494</b>	<b>0,009</b>
<b>PCV2 SI</b>	3,615	0,926	14,105	0,048				
<b>Tierzahl 1000-1999</b>	0,635	0,612	0,658	0,017				
<b>Impfung M. hyo</b>	0,223	0,064	0,777	0,01				
<b>Mast</b>	0,195	0,041	0,921	0,022				

Legende: OR = Odds Ratio; untere = unteres Konfidenzintervall für OR; obere = oberes Konfidenzintervall für OR

## **V. DISKUSSION**

Ziel der vorliegenden Untersuchung war es, Einflussfaktoren für das Auftreten von PCV2-Virämien von 16 bis 20 Wochen alten, in Deutschland gemästeten Schweinen zu bestimmen.

### **1. Ergebnisse des qualitativen Nachweises von PCV2-DNA mittels qPCR**

Laut SEGALLES et al. (2005a) ist PCV2 ubiquitär in der Hausschweinepopulation verbreitet. Diese Aussage deckt sich nicht mit den Ergebnissen der vorliegenden Untersuchung. Von den insgesamt 1675 ausgewerteten Blutproben aus 59 Beständen konnte bei 216 Mastschweinen und in 25 Beständen PCV2-DNA nachgewiesen werden. Das entspricht einem Anteil von 12% auf Einzeltierebene und 42% auf Bestandsebene. Die Abweichungen der Ergebnisse der vorliegenden Studie von den Ergebnissen von SEGALLES et al. (2005a) kann zum einen durch die unterschiedlichen Untersuchungsmethoden erklärt werden. SEGALLES et al. (2005a) stützen ihre These auf die Detektion von PCV2-Antikörpern, während in der vorliegenden Untersuchung PCV2-DNA im Serum von einmalig beprobten, klinisch unauffälligen Tieren nachgewiesen wurde. Durch die einmalige molekularbiologische Untersuchung der Tiere in der vorliegenden Studie kann somit nur eine Aussage über eine aktuell vorliegende PCV2-Virämie gegeben werden. Es kann keine Aussage über einen länger zurück liegenden Kontakt der Tiere mit PCV2 getroffen werden, was durch die serologische Untersuchung von SEGALLES et al. (2005a) ermöglicht wird. Des Weiteren muss bedacht werden, dass zum Zeitpunkt der Studie von SEGALLES et al. (2005a) noch keine PCV2-Impfstoffe kommerziell verfügbar waren. In der vorliegenden Untersuchung waren jedoch insgesamt 68% der untersuchten Tiere aktiv gegen PCV2 geimpft und somit überrepräsentiert, was keinen Schluss auf tatsächlich vorliegende Prävalenzen von PCV2-Virämien in deutschen Endmastschweinen erlaubt.

#### **1.1. Einflussfaktoren auf den qualitativen Nachweis von PCV2-DNA**

Als Faktoren, die die Chance auf einen Nachweis von PCV2-DNA verringern, also einen schützenden Einfluss auf eine PCV2-Virämie haben, wurden die Ferkelimpfung, eine Bestandsgröße von 2000-3999 Mastplätzen, eine Impfung

gegen *M. hyopneumoniae* und ein stallweises Rein / Raus Verfahren ermittelt.

Verschiedene Untersuchungen können belegen, dass PCV2-Virämien durch eine aktive Immunisierung gegen PCV2 reduziert werden (FACHINGER et al., 2008; OPRIESSNIG et al., 2010; FRAILE et al., 2012). Dieser Effekt konnte auch in der vorliegenden Untersuchung bestätigt werden, da von den 1140 aktiv geimpften Mastschweinen nur 2,5% (29) virämisch waren. In der binär-logistischen Regressionsanalyse ergab sich eine Chance von 0,033:1, dass eine PCV2-Virämie in einem aktiv immunisierten Tier nachgewiesen wurde.

In der vorliegenden Untersuchung war die Chance eines PCV2-DNA Nachweises in der Endmast in Beständen mit einer Größe von 2000-3999 Mastplätzen 0,518:1. Als Grund für den schützenden Effekt in den Beständen mit einer Größe von 2000-3999 Mastplätzen kann ein besserer Fokus der Betriebsleiter auf die Implementierung von Biosecurity-Maßnahmen vermutet werden. Den besseren Fokus der Betriebsleiter auf eine gute Biosecurity bei mittelgroßen Beständen (2000-4000 Mastplätze) können auch LAANEN et al. (2013) feststellen. Kleinere Betriebe (0-1999) stellen in der vorliegenden Untersuchung keinen schützenden Faktor vor einer PCV2-Virämie dar. RIBBENS et al. (2008) können in ihrer Untersuchung darstellen, dass vor allem bei kleinen Betrieben das Management bezüglich der durchgeführten Hygiene- und Managementmaßnahmen verbesserungswürdig ist. Bereits der „20-Punkte-Plan“, der vor Einführung der Impfung publiziert wird und bei der Bekämpfung von PMWS-Ausbrüchen unterstützen soll, nennt die Management- und Hygienemaßnahmen als entscheidend in der Bekämpfung von PCV2-Virämien (MADEC et al., 1999). Auch bei Mastbeständen mit mehr als 3999 Mastplätzen konnte keine verringerte Chance einer PCV2-Virämie festgestellt werden. Dieser Zusammenhang kann anhand von Studien mit anderen Pathogenen erläutert werden. In einer niederländischen Studie werden bestandsspezifische Faktoren mit der Prävalenz von Ausbrüchen der klassischen Schweinepest (KSP) in Verbindung gebracht (ELBERS et al., 2001). Sie zeigen, dass die Wahrscheinlichkeit einer KSP-Infektion bei einer Bestandssgröße ab 7000 Tieren signifikant höher ist, als in kleineren Beständen. Ähnliche Ergebnisse bezüglich eines Zusammenhangs von Bestandssgröße und einer Wahrscheinlichkeit für Infektionen werden im Zusammenhang mit PRRSV festgestellt (GOLDBERG et al., 2000). Ein Übertragen der Ergebnisse der Studien mit KSP und PRRSV kann somit eine

Erklärungshilfe bieten, bei der Interpretation der Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung. Weiterhin konnte die Studie von ELBERS et al. (2001) ermitteln, dass in Beständen mit erfahrenen Betriebsleitern weniger KSP-Ausbrüche verzeichnet wurden, als in Beständen mit unerfahrenen Betriebsleitern. Die Tatsache, dass laut NAUSE (2003) bei großen landwirtschaftlichen Betrieben (>1000 ha) der Anteil an nicht ständig beschäftigten familienfremden Arbeitskräften (Saisonarbeiter) im Jahr 2001 bei 42% liegt und dass Saisonarbeitskräfte oft Hilfsarbeiter ohne Erfahrung und spezielle Fachkenntnisse darstellen, könnte hier als zusätzliche Erklärung dienen, warum kein protektiver Effekt bei den großen Beständen nachgewiesen werden konnte.

Die Hypothese, dass zusätzliche Schutzimpfungen die Wahrscheinlichkeit einer PCV2-Virämie senken, wurde in vorliegender Studie bestätigt. Es konnte gezeigt werden, dass bei Mastschweinen, die eine *M. hyopneumoniae*-Impfung erhalten haben, die Chance eines PCV2-DNA Nachweises erniedrigt ist (0,277:1). OPRIESSNIG et al. (2004) können experimentell zeigen, dass Tiere, die mit PCV2 und *M. hyopneumoniae* infiziert werden, häufiger PCV2-DNA nachgewiesen werden kann als Tiere, die nur einem der beiden Pathogenen ausgesetzt werden, und stellen so fest, dass PCV2-Virämien mit Infektionen mit *M. hyopneumoniae* zusammenhängen. Obwohl in der vorliegenden Untersuchung keine Informationen über das tatsächliche Vorhandensein von Ko-Infektionen erhoben wurde, können deutsche Studien belegen (BEILAGE et al., 2009), dass *M. hyopneumoniae* als endemisch in der deutschen Hausschweinepopulation gesehen werden kann, was den hier ermittelten protektiven Effekt einer *M. hyopneumoniae*-Impfung erklärt. Im Gegensatz zur Impfung gegen *M. hyopneumoniae* konnte in dieser Untersuchung kein protektiver Effekt einer PRRSV-Impfung oder einer APP-Impfung festgestellt werden. Bezüglich PRRSV können jedoch ROSE et al. (2003) belegen, dass eine Impfung gegen PRRSV zu einer Reduktion von PMWS Ausbrüchen führt. PRRSV wird ähnlich wie *M. hyopneumoniae* als endemisch in den meisten europäischen Staaten gesehen (ALBINA, 1997) und mit einer hohen Seroprävalenz in den Herden (60-80%) angegeben (ZIMMERMAN et al., 2012). Dieser angegebene Wert muss allerdings unter dem Gesichtspunkt gesehen werden, dass es durch den Einsatz modifizierter attenuierter Lebendvakzine nicht möglich ist, mit den herkömmlichen serologischen Untersuchungsmethoden die Impfantikörper von den Antikörpern

einer Feldvirusinfektion zu unterscheiden (ZIMMERMAN et al., 2012). Bezüglich APP konnte durch die geringe Anzahl an Mastschweinen, die in der vorliegenden Untersuchung gegen APP geimpft wurden, kein aussagekräftiges Ergebnis erzielt werden.

Die Art des Belegungssystems hat in dieser Untersuchung einen signifikanten Einfluss auf die Chance eines Tieres auf eine PCV2-Virämie. Die Chance eines Nachweises von PCV2-DNA verringert sich auf 0,085:1 bei einem stallweisen Rein / Raus Verfahren. Bereits im 20-Punkte-Plan von MADEC et al. (1999) wird zu einem stallweisen Rein / Raus Verfahren geraten, um einen direkten Tierkontakt der unterschiedlichen Altersgruppen zu vermeiden. Ein protektiver Effekt des stallweisen Rein / Raus Verfahrens wird auch gegenüber einer Infektion mit PRRSV (GOLDBERG et al., 2000) beschrieben. Die Möglichkeit des stallweisen Rein / Raus Verfahrens könnte die vertikale Übertragung von PCV2-DNA dadurch verhindern, dass die jüngeren Tiere nicht mit den infektiösen Se- und Exkreten (BOLIN et al., 2001) der älteren Mastschweine in Berührung kommen können.

Als Faktoren, die die Chance auf einen PCV2-DNA Nachweis erhöhen, wurde eine passive Immunisierung der Mastschweine und die Aufstallung der Tiere in reinen Mastbeständen ermittelt. Die Regressionsanalyse ergab, dass die Chance auf einen PCV2-DNA Nachweis in der Mast bei passiv immunisierten Tieren 3,644:1 beträgt. Aufgrund von Redundanzen konnten in der Regressionsanalyse jedoch die nicht geimpften Tiere nicht berücksichtigt werden. Dennoch wird beim Vergleich des Anteils an positiven Tieren innerhalb der jeweiligen Impfkategorie deutlich, dass bei den passiv immunisierten Tieren mit 37,7% und bei den nicht geimpften Tieren mit 33,6% vergleichbar viele Tiere eine PCV2-Virämie aufweisen. Auch OPRIESSNIG et al. (2010) bewerten die passive Immunisierung der Ferkel gegen PCV2 als kritisch bei Endmasttieren, da die maternalen Antikörper nur bis zur 15. Lebenswoche der Tiere nachweisbar sind und somit in der späteren Phase der Mast möglicherweise kein protektiver Effekt mehr vorhanden ist. Die Tiere der vorliegenden Untersuchung wurden frühestens ab der 16. Lebenswoche beprobt, und bestätigen somit die Bedenken von OPRIESSNIG et al. (2010). Andere Studien zeigen, dass die passive Immunisierung mit der aktiven Immunisierung der Ferkel gegen PCV2 eine vergleichbare Effektivität bezüglich Mortalität der Mastschweine und Tageszunahmen aufweist (PEJSAK et

al., 2010). Diese Parameter waren nicht Gegenstand der vorliegenden Untersuchung, daher kann in diesem Zusammenhang keine Aussage auf eine Effektivität der passiven Immunisierung gegen PCV2 getroffen werden.

Die Hypothese, dass die PCV2-DNA Nachweisrate im Serum von Mastschweinen mit dem Betriebsstandort zusammenhängt konnte in der vorliegenden Untersuchung nicht bestätigt werden. Aktuelle Ergebnisse von REINER et al. (2010) können ebenfalls keinen Zusammenhang vom Auftreten von PCV2-Virämien mit der Standortregion feststellen. Sie können, wie auch die vorliegende Untersuchung, in keinem der deutschen Bundesländer eine erhöhte Chance für eine PCV2-Virämie nachweisen. RITZMANN et al. (2002) hingegen kommen zu dem Schluss, dass im Regierungsbezirk Niederbayern, in dem die Schweinedichte auf Bayern bezogen am höchsten ist (GEOBASIS-DE, 2013), die meisten PCV2-positiven Betriebe zu finden sind. WOODBINE et al. (2007) gelingt es ebenfalls retrospektiv PMWS-Ausbrüche von 2000 bis 2001 regional zuzuordnen und zu belegen, dass die Ausbrüche vor allem in schweinedichten Regionen (Süd- und Mittelengland) nachweisbar sind. In der Studie in England (WOODBINE et al., 2007), wie auch in der in Deutschland (RITZMANN et al., 2002), werden regelmäßige Ferkelzukäufe und dadurch der periodische Eintrag von immer neuen Erregern für die regionale Ausbreitung von PCV2 verantwortlich gemacht. Diese Form der Ausbreitung, im Zusammenhang mit der damals fehlenden Möglichkeit der Immunisierung gegen PCV2, könnte somit die Abweichung von den Ergebnissen der vorliegenden Untersuchung erklären.

## **2. Ergebnisse der quantitativen Untersuchungen von PCV2-DNA im Serum von Mastschweinen**

BRUNBORG et al. (2004) definieren für das Auftreten von PCV2-assoziierten Krankheitsbildern  $10^7$  Genomkopien/ml Serum für den klinisch relevanten Bereich von PMWS, auch wenn vereinzelt PMWS bei Tieren mit niedrigeren Mittelwerten als  $10^7$  detektiert werden kann. In der vorliegenden Untersuchung lagen die Gehalte zwischen  $10^2$  und  $10^6$  Genomkopien/ml Serum. Die in der vorliegenden Studie ausgewerteten Proben wurden von Tieren genommen, die laut Vorbericht und zum Zeitpunkt der Probenentnahme keine klinischen Anzeichen von PCVD zeigten. Unter Berücksichtigung der Angaben der Richtwerte von BRUNBORG et al. (2004) und der Definition von PCVD nach

SEGALES (2012), sind die in der vorliegenden Untersuchung nachgewiesenen PCV2-Infektionen als subklinisch einzustufen.

### **2.1. Einflussfaktoren auf die quantitative Analyse der PCV2-DNA**

Bei der alleinigen Betrachtung der PCV2-positiven Schweine wurden im Bezug auf die untersuchten Kategorien keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Mittelwerte von PCV2-DNA festgestellt. Anders als in der vorliegenden Untersuchung belegen diverse Studien einen signifikanten Unterschied des Mittelwerts von PCV2-DNA bei aktiv gegen PCV2 immunisierten Tieren im Vergleich zu ungeimpften Tieren (KIXMÖLLER et al., 2008; MARTELLI et al., 2011). Grund für derartige Abweichungen könnte bei KIXMÖLLER et al. (2008) und MARTELLI et al. (2011) dadurch zustande kommen, dass sie Bestände beproben, die eine längerfristig bestehende PMWS Problematik aufweisen und erst mit dem Beginn beider Studien eine PCV2-Impfung etabliert wird. Die Bestände sind wahrscheinlich einem höheren Infektionsdruck ausgesetzt (FENG et al., 2014), als die Bestände der vorliegenden Untersuchung, in der kein Tier PCVD klinisch apparent war.

In Studien von REINER et al. (2015) und SHEN et al. (2012) kann ein Einfluss des Genotyps auf die Höhe der PCV2-Virämie festgestellt werden. Die untersuchten Proben von REINER et al. (2015) stammten von klinisch unauffälligen Tieren, die entweder aktiv PCV2-immunisiert oder nicht immunisiert waren. Sie können feststellen, dass PCV2-immunisierte Tiere vermehrt den Genotyp PCV2b aufweisen und dass PCV2b Proben signifikant höhere Virusmengen im Serum aufweisen, als Isolate mit dem Genotyp PCV2a. SHEN et al. (2012) stellen zudem fest, dass in Proben von nicht geimpften Tieren annähernd gleich häufig die Genotypen PCV2a und PCV2b vorkommen. Diese Beobachtung könnte eine mögliche Erklärung bieten, warum sich die mittlere Menge an PCV2-DNA im Serum von geimpften und ungeimpften Mastschweinen nicht unterscheiden, da in den geimpften Beständen möglicherweise vorwiegend PCV2b vorhanden ist. Dieser Ansatz ist allerdings sehr spekulativ, da in dieser Studie eine Unterscheidung der Genotypen fehlt und zudem eine korrekte Applikation des PCV2-Impfstoffes in den einzelnen Beständen nicht gewährleistet werden kann.

Beim Vergleich der Standorte der Tiere war kein Zusammenhang der mittleren

Anzahl der PCV2-Genomkopien/ml Serum und der jeweiligen Standortregion ermittelbar. Dieses Ergebnis zeigte auch schon die Berechnung des Zusammenhangs von PCV2-Prävalenzen mit der Standortregion. Im Gegensatz dazu können WELTI et al. (2012) bei der Untersuchung von Tieren mit PMWS eine regionale Bündelung (Ostschweiz) in den schweinedichten Gebieten von 2003-2006 feststellen. Den Eintrag über infiziertes Sperma oder eine sukzessive Erregerakkumulation in den Beständen sehen sie als Hauptgründe für die Verbreitung von PCV2. Es gilt auch hier zu bedenken, dass zum Zeitpunkt, zu dem diese Tiere untersucht werden, noch keine PCV2-Impfung verfügbar ist, und somit vermutlich der Ferkelzukauf in den schweinedichten Regionen für die Verbreitung von PCV2 verantwortlich war. Für diese These würde außerdem sprechen, dass in den Kernzuchtbetrieben, in denen kein Zukauf gestattet ist, PMWS erst deutlich später auftrat.

In englischen Mastbetrieben kann mit Hilfe der linearen Regression ein Zusammenhang zwischen den Hygiene- und Managementmaßnahmen und dem Ausprägungsgrad von PMWS dargestellt werden (ALARCON et al., 2011). Als Risikofaktoren für einen hohen Ausprägungsgrad von PMWS beschreiben sie unter anderem das Fehlen von Krankenabteilen, den Zukauf neuer Eber und eine Infektion mit *M. hyopneumoniae*. Als schützende Faktoren können sie eine niedrige Belegdichte, eine angepasste Fütterung während und nach dem Absetzen und ein Verbot für Besucher, innerhalb der letzten 48 Stunden Kontakt zu einem Schweinebestand zu haben. Derartige Zusammenhänge der betriebsspezifischen Faktoren wurden in der vorliegenden Untersuchung nicht mit untersucht, und deshalb ist ein Vergleich zur Studie von ALARCON et al. (2011) nicht möglich.

## **2.2. Einflussfaktoren auf den quantitativen Nachweis von PCV2-DNA**

Als einzig relevanten schützenden Faktor vor Virämien im potentiell klinisch relevanten Bereich von PCV2-DNA ab  $1,0 \times 10^6$  Genomkopien/ml Serum konnte die aktive Immunisierung der Ferkel ermittelt werden. Die Chance eines Nachweises eines Gehalts von  $1,0 \times 10^6$  Genomkopien/ml Serum für geimpfte Tiere war, im Vergleich zu den Tieren, bei denen die Muttersauen geimpft wurden, 0,062:1. Ein ähnliches Ergebnis zeigt auch WALHÖFER (2015) beim Vergleich der Wertebereiche in Abhängigkeit der Impfgruppen und bestätigt somit die zuvor formulierte Theorie des erniedrigten Infektionsdrucks in geimpften Herden (FENG et al., 2014). Den protektiven Einfluss der Impfung

können zahlreiche Studien feststellen (FACHINGER et al., 2008; KIXMÖLLER et al., 2008; FENG et al., 2014). Die in der vorliegenden Untersuchung festgestellte Reduzierung des Gehalts an PCV2-DNA im Serum der Tiere ist nur einer der Effekte, der bei der aktiven Immunisierung der Ferkel gegen PCV2 ermittelt werden kann. Es können zudem höhere Tageszunahmen, eine Reduktion der Mortalität, eine signifikante Reduktion der klinischen Anzeichen von PMWS (KIXMÖLLER et al., 2008) und eine kürzere Mastperiode der Tiere (FACHINGER et al., 2008) festgestellt werden. Bei längerfristiger Massenimpfung kann eine signifikante Reduktion des Infektionsdrucks in den Herden festgestellt werden, dennoch kann keine Eradikation von PCV2 erreicht werden (FENG et al., 2014).

## VI. ZUSAMMENFASSUNG

Ziel der vorliegenden Untersuchung war es, Einflussfaktoren für das Auftreten und die Höhe von PCV2-Virämien bei 16 bis 20 Wochen alten Mastschweinen zu bestimmen.

Insgesamt wurden 1680 Proben aus 59 deutschen Beständen auf PCV2-DNA mittels qPCR untersucht. Die Proben wurden zur Routinediagnostik genommen und stammten von einmalig beprobten Mastschweinen. Die Blutproben wurden vom Department der Swine R&D Biologicals der Firma MSD Animal Health® in Boxmeer analysiert. Um die verschiedenen Einflussfaktoren validierbar machen zu können, wurde ein Fragebogen erstellt. Es wurde zwischen den verschiedenen PCV2-Immunisierungsschemata unterschieden, die aktive Immunisierung mittels Ferkelimpfung, die passive Immunisierung mittels Muttersauenimpfung oder keine Immunisierung. Die Bestände waren in drei deutschen Regionen lokalisiert, (Süddeutschland, Norddeutschland und Ostdeutschland) um einen möglichen Einfluss der Standortregion zu ermitteln. Zur Erhebung der weiteren betriebsspezifischen Einflussfaktoren wurden die Bestandsgröße, das Belegungssystem, das Betriebssystem (geschlossen /reine Mast) und weitere Schutzimpfungen (*M. hyopneumoniae*, APP und PRRSV) erfasst. Die Bestandsgröße wurde in 1000er Schritten skaliert. Als Zielgrößen dienten die Ergebnisse der molekularbiologischen Untersuchungen (Vorhandensein und die Höhe (Mittelwerte) von PCV2-DNA). Die qualitativen Aussagen wurden univariat per Chi<sup>2</sup>-Test nach Pearson aus einer den Häufigkeitsverteilungen hervorgehenden Kreuztabelle errechnet. Anschließend wurde eine multiple binär logistische Regressionsanalyse mit Einbeziehung der im ersten Schritt ermittelten signifikanten Faktoren durchgeführt.

Um zu ermitteln, ob einer der Einflussfaktoren signifikant mit dem Gehalt an PCV2-DNA/ml Serum assoziiert ist, wurden alle Einflussvariablen einzeln gegen die Zielvariable getestet (Mann-Whitney-U-Test). Signifikante Einflussvariablen wurden zur Berücksichtigung des Herdeneffektes in einem Allgemeines Lineares Univariates Model dargestellt.

Bei insgesamt 216 Tieren aus 25 Beständen konnte PCV2-DNA nachgewiesen werden. Faktoren, die die Chance auf eine PCV2-Virämie verringern, sind laut

Regression ein stallweises Rein / Raus Verfahren (OR=0,085:1) eine Impfung gegen *M. hyopneumoniae* (OR=0,277:1) und eine Bestandsgröße von 2000-3999 Mastplätzen (OR=0,518:1). Die geringste Chance einer PCV2-Virämie konnte auf Bestandsebene mit einer Chance von 0,035:1 und auf Einzeltierebene mit 0,033:1 durch eine aktive Immunisierung der Ferkel erzielt werden.

Mit Hilfe der multiplen binär logistischen Regression konnte gezeigt werden, dass sich die Chance auf eine Virämie mit PCV2 erhöht hat, wenn die Tiere in reinen Mastbeständen aufgestellt waren (OR=2,035:1), oder wenn sie passiv gegen PCV2 immunisiert wurden (OR=3,644:1).

Die quantitativen Ergebnisse der PCR lagen zwischen  $10^2$  und  $10^6$  PCV2-Genomkopien / ml Serum. Nach Durchführung des Allgemeinen Linearen Univariaten Modells stellte sich heraus, dass keine der erfassten Faktoren einen signifikanten Einfluss auf die Höhe der PCV2-Virämie hatte. Die Regressionsanalyse ergab lediglich eine verringerte Chance auf eine Virämie im potentiell klinisch relevanten Bereich von mindestens  $1,0 \times 10^6$  Genomkopien/ml Serum durch die aktive Immunisierung der Ferkel.

## VII. SUMMARY

The aim of this study was to determine influence factors for the occurrence and mean load of PCV2-viremia in 16 to 20 week old fattening pigs.

In total, 1680 samples from 59 German herds were examined by qPCR for PCV2-genome copies. The samples were taken from fattening pigs which were sampled only once for routine diagnostics. The blood samples were analyzed by the department of Swine R&D Biologicals of MSD Animal Health® in Boxmeer. For the validation of the different influence factors a questionnaire was conducted. The schemes of immunization were differentiated: active immunization by piglet vaccination, passive immunization by sow vaccination or no vaccination. The examined herds were localized in three different German regions (southern Germany, northern Germany and eastern Germany) to determine a possible influence of the regions. For the evaluation of further herd specific influence factors the herd size, the animal flow, the operating system and further vaccinations (*M. hyopneumoniae*, PRRSV and APP) were recorded. For the factor herd size a scaling system was created (at least 1000 animals per group). The results from the molecular biological examinations (quality and quantity (mean load) of PCV2-DNA) served as target figures. For the statistical analysis, the qualitative results were calculated by Pearsons Chi<sup>2</sup>-test, based on the cross tables of the analysis of the frequency distribution. Subsequently, a multiple binary logistic regression including the significant factors of the Pearsons Chi<sup>2</sup>-test was performed.

To determine if the mean load of PCV2-DNA/ml serum is associated with one of the influence factors, they were tested by using the Mann-Whitney-U-Test. Significant influence factors were presented in a common linear univariate model to include the herd effect.

PCV2-genome was detected in a total of 216 animals out of 25 herds. According to the regression analysis, factors for decreasing the odds for an infection with PCV2 were the all in/all out-system per stable (OR=0,085:1), vaccination against *M. hyopneumoniae* (0,277:1) and a herd size between 2000 and 3999 (0,518:1) fattening pigs. On both the herd level (OR=0,035:1) and the single animal level (0,033:1) the lowest odds for an infection with PCV2 were reached by an active

immunization of the piglets.

The multiple binary logistic regression proved that piglets living in a fattening herd (OR=2,035:1) or receiving a passive immunization (OR=3,644:1) increased the odds for having a PCV2-infection.

The PCV2 values in the quantitative PCR ranged from  $10^2$  to  $10^6$  PCV2-genome copies per ml serum. The general linear univariate model showed that the investigated factors did not have a significant influence on the mean load of the PCV2-viremia. The results of the regression analysis showed decreased odds for a virus load in the clinical relevant range of at least  $1,0 \times 10^6$  genome copies, if the piglets had been actively immunized.

## VIII. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

<i>Abbildung 1 Einteilung der beprobten Bestände nach Regionen, modifiziert nach GRUPPE (2009).....</i>	<i>20</i>
<i>Abbildung 2: Grafische Darstellung des Anteils (%) PCV2-positiver Tiere innerhalb der entsprechenden Impfkategorie .....</i>	<i>28</i>
<i>Abbildung 3: Grafische Darstellung des Anteils (%) PCV2-positiver Tiere innerhalb der entsprechenden Bestandsgröße .....</i>	<i>28</i>
<i>Abbildung 4: Grafische Darstellung des Anteils (%) PCV2-positiver Tiere innerhalb der entsprechenden Standortregion.....</i>	<i>29</i>
<i>Abbildung 5: Mittelwerte der PCV2-Genomkopien/ml Serum in Abhängigkeit von Bestandsgröße und der jeweiligen Impfkategorie, inkl. Standardabweichung (n=216) .....</i>	<i>34</i>
<i>Abbildung 6: Mittelwerte der PCV2-Genomkopien pro ml Serum in Abhängigkeit des Standorts der Mastschweine, inkl. Standardabweichung (n=216).....</i>	<i>34</i>
<i>Abbildung 7: Anteil (%) aller PCV2-positiven Tiere (n=216) nach Wertebereich in Abhängigkeit der Impfkategorie .....</i>	<i>35</i>

## IX. TABELLENVERZEICHNIS

<i>Tabelle 1: Aufstellung des Paul-Ehrlich-Institutes der in Deutschland zugelassene Impfstoffe gegen PCV2 (2015).....</i>	<i>17</i>
<i>Tabelle 2: Übersicht über die mittels Fragebogen erhobenen Faktoren.....</i>	<i>19</i>
<i>Tabelle 3: Primer und Sonde für die PCV2-real-time PCR nach BRUNBORG et al. (2004).....</i>	<i>23</i>
<i>Tabelle 4: Anzahl (n) und Anteil (%) der Einzeltiere und Bestände in der jeweiligen Kategorie (Tiere n=1680, Bestände n=59).....</i>	<i>25</i>
<i>Tabelle 5: Anzahl (n) und Anteil (%) PCV2-positiver Seren nach Kategorie an der Gesamtzahl (n=1675) und an den positiven Tieren (n=216); sowie Darstellung des Anteils PCV2-positiver Bestände nach Kategorie.....</i>	<i>27</i>
<i>Tabelle 6: Darstellung statistisch signifikanter Ergebnisse der univariaten Analysen und der binär logistischen Regressionsanalyse für einen PCV2-DNA Nachweis von 16 bis 20 Wochen alten Mastschweinen auf Bestandsebene .....</i>	<i>30</i>
<i>Tabelle 7: Darstellung statistisch signifikanter Ergebnisse der univariaten Analysen und der binär logistischen Regressionsanalyse für einen PCV2-DNA Nachweis von 16 bis 20 Wochen alten Mastschweinen auf Einzeltierebene .....</i>	<i>31</i>
<i>Tabelle 8: Mittlere Anzahl an PCV2-Genomkopien pro ml Serum in der jeweiligen Kategorie, inklusive Min, Max, StabW. Die MW errechnen sich ausschließlich aus den Werten der positiven Tiere (n=216).....</i>	<i>33</i>
<i>Tabelle 9: Anzahl und Anteil PCV2-DNA positiver Seren nach Wertebereich und Impfkonzentration an der Gesamtzahl positiver Seren (n=216) .....</i>	<i>35</i>
<i>Tabelle 10: Darstellung statistisch signifikanter Ergebnisse der univariaten Analysen und der binär logistischen Regressionsanalyse für eine PCV2-Virämie von 10<sup>6</sup> PCV2-Genomkopien/ml Serum oder höher von 16 bis 20 Wochen alten Mastschweinen auf Einzeltierebene .....</i>	<i>36</i>

## **X. LITERATURVERZEICHNIS**

Alarcon P, Velasova M, Mastin A, Nevel A, Stärk KDC, Wieland B. Farm level risk factors associated with severity of post-weaning multi-systemic wasting syndrome. *Prev Vet Med* 2011; 101: 182-91.

Albina E. Epidemiology of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS): An overview. *Vet Microbiol* 1997; 55: 309-16.

Allan GM, Todd D, Smyth JA, Mackie DP, Burns J, McNulty MS. In situ hybridization - an optimized detection protocol for a biotinylated DNA probe renders it more sensitive than a comparable <sup>35</sup>S-labeled probe. *J Viral Methods* 1989; 24: 181-90.

Allan GM, McNeilly F, Kennedy S, Daft B, Clarke EG, Ellis JA, Haines DM, Meehan BM, Adair BM. Isolation of porcine circovirus-like viruses from pigs with a wasting disease in the USA and Europe. *J Vet Diagn Invest* 1998; 10: 3-10.

Allan GM, Ellis JA. Porcine circoviruses: a review. *J Vet Diagn Invest* 2000; 12: 3-14.

Baro J, Segales J, Martinez J. Porcine circovirus type 2 (PCV2) enteric disease: An independent condition or part of the systemic disease? *Vet Microbiol* 2015; 176: 83-7.

Baumgartner M, Brugnera E, Sydler T, Bürgi E, Hässig M, Sidler X. Risk factors causing postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) onset in Swiss pig farms. *Schweiz Arch Tierheilkd* 2012; 154: 429-36.

Beilage EG, Rohde N, Krieter J. Seroprevalence and risk factors associated with seropositivity in sows from 67 herds in north-west Germany infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Prev Vet Med* 2009; 88: 255-63.

Bolin SR, Stoffregen WC, Nayar GPS, Hamel AL. Postweaning multisystemic

wasting syndrome induced after experimental inoculation of cesarean-derived, colostrum-deprived piglets with type 2 porcine circovirus. *J Vet Diagn Invest* 2001; 13: 185-94.

Brunborg IM, Moldal T, Jonassen CM. Quantitation of porcine circovirus type 2 isolated from serum/plasma and tissue samples of healthy pigs and pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome using a TaqMan-based real-time PCR. *J Virol Methods* 2004; 122: 171-8.

Brunborg IM, Jonassen CM, Moldal T, Bratberg B, Lium B, Koenen F, Schonheit J. Association of myocarditis with high viral load of porcine circovirus type 2 in several tissues in cases of fetal death and high mortality in piglets. A case study. *J Vet Diagn Invest* 2007; 19: 368-75.

Calsamiglia M, Segales J, Quintana J, Rosell C, Domingo M. Detection of porcine circovirus types 1 and 2 in serum and tissue samples of pigs with and without postweaning multisystemic wasting syndrome. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 1848-50.

Chae C. Postweaning multisystemic wasting syndrome: a review of aetiology, diagnosis and pathology. *Vet J* 2004; 168: 41-9.

Chae C. A review of porcine circovirus 2-associated syndromes and diseases. *Vet J* 2005; 169: 326-36.

Choi C, Chae C. Colocalization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus 2 in porcine dermatitis and nephropathy syndrome by double-labeling technique. *Vet Pathol* 2001; 38: 436-41.

Choi YK, Goyal SM, Joo HS. Retrospective analysis of etiologic agents associated with respiratory diseases in pigs. *Can Vet J* 2003; 44: 735-7.

Correa AMR, Pescador CA, Schmitz M, Zlotowski P, Rozza DB, de Oliveira EC,

Barcellos DE, Driemeier D. Clinical and pathological aspects of swine circovirus in Rio Grande do Sul, southern Brazil. *Pesqui Vet Bras* 2006; 26: 9-13.

Crowther RA, Berriman JA, Curran WL, Allan GM, Todd D. Comparison of the structures of three circoviruses: Chicken anemia virus, Porcine circovirus type 2, and Beak and feather disease virus. *J Virol* 2003; 77: 13036-41.

Drolet R, Thibault S, D'Allaire S, Thomson JR, Done SH. Porcine dermatitis and nephropathy syndrome (PDNS): An overview of the disease. *Swine Health Prod* 1999; 7: 283-5.

Dupont K, Nielsen EO, Baekbo P, Larsen LE. Genomic analysis of PCV2 isolates from Danish archives and a current PMWS case-control study supports a shift in genotypes with time. *Vet Microbiol* 2008; 128: 56-64.

Dupont K, Hjulsgaard CK, Kristensen CS, Baekbo P, Larsen LE. Transmission of different variants of PCV2 and viral dynamics in a research facility with pigs mingled from PMWS-affected herds and non-affected herds. *Vet Microbiol* 2009; 139: 219-26.

Dvorak CMT, Lilla MP, Baker SR, Murtaugh MP. Multiple routes of porcine circovirus type 2 transmission to piglets in the presence of maternal immunity. *Vet Microbiol* 2013; 166: 365-74.

Eddicks M, Fux R, Szikora F, Eddicks L, Majzoub-Altweck M, Hermanns W, Sutter G, Palzer A, Banholzer E, Ritzmann M. Detection of a new cluster of porcine circovirus type 2b strains in domestic pigs in Germany. *Vet Microbiol* 2015; 176: 337-43.

Elbers ARW, Stegeman JA, de Jong MCM. Factors associated with the introduction of classical swine fever virus into pig herds in the central area of the 1997/98 epidemic in the Netherlands. *Vet Rec* 2001; 149: 377-82.

Ellis J, Hassard L, Clark E, Harding J, Allan G, Willson P, Strokappe J, Martin K, McNeilly F, Meehan B, Todd D, Haines D. Isolation of circovirus from lesions of pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *Can Vet J* 1998; 39: 44-51.

Fachinger V, Bischoff R, Jedidia B, Saalmüller A, Elbers K. The effect of vaccination against porcine circovirus type 2 in pigs suffering from porcine respiratory disease complex. *Vaccine* 2008; 26: 1488-99.

Feng H, Blanco G, Segales J, Sibila M. Can Porcine circovirus type 2 (PCV2) infection be eradicated by mass vaccination? *Vet Microbiol* 2014; 172: 92-9.

Fraile L, Sibila M, Nofrarias M, Lopez-Jimenez R, Huerta E, Llorens A, Lopez-Soria S, Perez D, Segales J. Effect of sow and piglet porcine circovirus type 2 (PCV2) vaccination on piglet mortality, viraemia, antibody titre and production parameters. *Vet Microbiol* 2012; 161: 229-34.

Franzo G, Cortey M, Olvera A, Novosel D, De Castro A, Biagini P, Segales J, Drigo M. Revisiting the taxonomical classification of Porcine Circovirus type 2 (PCV2): still a real challenge. *Virology* 2015a; 12: 131.

Franzo G, Cortey M, de Castro A, Piovezan U, Szabo MPJ, Drigo M, Segales J, Richtzenhain LJ. Genetic characterisation of Porcine circovirus type 2 (PCV2) strains from feral pigs in the Brazilian Pantanal: An opportunity to reconstruct the history of PCV2 evolution. *Vet Microbiol* 2015b; 178: 158-62.

Gagnon CA, Tremblay D, Tijssen P, Venne MH, Houde A, Elahi SM. The emergence of porcine circovirus 2b genotype (PCV-2b) in swine in Canada. *Can Vet J* 2007; 48: 811-9.

GeoBasis-DE. 2013. Durchschnittliche Größe landwirtschaftlicher Betriebe 2010 Atlas Agrarstatistik NRW. <http://www.atlas-agrarstatistik.nrw.de/>. 22.08.2016

Gerber PF, Garrocho FM, Lana AMQ, Lobato ZIP. Serum antibodies and shedding of infectious porcine circovirus 2 into colostrum and milk of vaccinated and unvaccinated naturally infected sows. *Vet J* 2011; 188: 240-2.

Goldberg TL, Weigel RM, Hahn EC, Scherba G. Associations between genetics, farm characteristics and clinical disease in field outbreaks of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Prev Vet Med* 2000; 43: 293-302.

Grau-Roma L, Hjulsager CK, Sibila M, Kristensen CS, Lopez-Soria S, Enoe C, Casal J, Botner A, Nofrarias M, Bille-Hansen V, Fraile L, Baekbo P, Segales J, Larsen LE. Infection, excretion and seroconversion dynamics of porcine circovirus type 2 (PCV2) in pigs from post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) affected farms in Spain and Denmark. *Vet Microbiol* 2009; 135: 272-82.

Gruppe J. 2009. KFZ-Kennzeichen in Deutschland. Köln. <http://auto-sachverstaendige-koeln.de/info/kfz-kennzeichen-in-deutschland/>. 11.04.2016

Guo LJ, Lu YH, Wei YW, Huang LP, Liu CM. Porcine circovirus type 2 (PCV2): genetic variation and newly emerging genotypes in China. *Virology* 2010; 7: 273.

Ha Y, Lee YH, Ahn KK, Kim B, Chae C. Reproduction of Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome in Pigs by Prenatal Porcine Circovirus 2 Infection and Postnatal Porcine Parvovirus Infection or Immunostimulation. *Vet Pathol* 2008; 45: 842-8.

Haake M, Palzer A, Rist B, Weissenbacher-Lang C, Fachinger V, Eggen A, Ritzmann M, Eddicks M. Influence of age on the effectiveness of PCV2 vaccination in piglets with high levels of maternally derived antibodies. *Vet Microbiol* 2014; 168: 272-80.

Hamel AL, Lin LL, Nayar GPS. Nucleotide sequence of porcine circovirus associated with postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs. *J Virol* 1998; 72: 5262-7.

Hamel AL, Lin LL, Sachvie C, Grudeski E, Nayar GPS. PCR detection and characterization of type-2 porcine circovirus. *Can Vet J* 2000; 64: 44-52.

Hansen MS, Pors SE, Jensen HE, Bille-Hansen V, Bisgaard M, Flachs EM, Nielsen OL. An Investigation of the Pathology and Pathogens Associated with Porcine Respiratory Disease Complex in Denmark. *J Comp Pathol* 2010; 143: 120-31.

Harding JC. Post-weaning multisystemic wasting syndrome: preliminary epidemiology and clinical findings. *Proc Western Can Assoc Swine Pract. Saskatoon, Canada* 1996: 21.

Harding JCS, Clark EG. Recognizing and diagnosing postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *J Swine Health Prod* 1997; 5: 201-3.

Harding JCS, Clark EG, Strokappe JH, Willson PI, Ellis JA. Postweaning multisystemic wasting syndrome: Epidemiology and clinical presentation. *J Swine Health Prod* 1998; 6: 249-54.

Harding JCS. The clinical expression and emergence of porcine circovirus 2. *Vet Microbiol* 2004; 98: 131-5.

Harms PA, Halbur PG, Sorden SD. Three cases of porcine respiratory disease complex associated with porcine circovirus type 2 infection. *J Swine Health Prod* 2002; 10: 27-30.

Jacobsen B, Krueger L, Seeliger F, Bruegmann M, Segales J, Baumgaertner W. Retrospective study on the occurrence of porcine circovirus 2 infection and associated entities in Northern Germany. *Vet Microbiol* 2009; 138: 27-33.

Jensen TK, Vigre H, Svensmark B, Bille-Hansen V. Distinction between porcine circovirus type 2 enteritis and porcine proliferative enteropathy caused by *Lawsonia intracellularis*. *Journal of Comparative Pathology* 2006; 135: 176-82.

Jeong J, Park C, Choi K, Chae C. Comparison of three commercial one-dose porcine circovirus type 2 (PCV2) vaccines in a herd with concurrent circulation of PCV2b and mutant PCV2b. *Vet Microbiol* 2015; 177: 43-52.

Johnson CS, Joo HS, Direksin K, Yoon KJ, Choi YK. Experimental in utero inoculation of late-term swine fetuses with porcine circovirus type 2. *J Vet Diagn Invest* 2002; 14: 507-12.

Kawashima K, Katsuda K, Tsunemitsu H. Epidemiological investigation Of the prevalence and features of postweaning multisystemic wasting syndrome in Japan. *J Vet Diagn Invest* 2007; 19: 60-8.

Kim J, Chung HK, Chae C. Association of porcine circovirus 2 with porcine respiratory disease complex. *Vet J* 2003; 166: 251-6.

Kim J, Ha Y, Jung K, Choi C, Chae C. Enteritis associated with porcine circovirus 2 in pigs. *Can Vet J* 2004; 68: 218-21.

Kixmüller M, Ritzmann M, Eddicks M, Saalmüller A, Elbers K, Fachinger V. Reduction of PMWS-associated clinical signs and co-infections by vaccination against PCV2. *Vaccine* 2008; 26: 3443-51.

Kurmann J, Sydler T, Brugnera E, Buergi E, Haessig M, Suter M, Sidler X. Vaccination of Dams Increases Antibody Titer and Improves Growth Parameters in Finisher Pigs Subclinically Infected with Porcine Circovirus Type 2. *Clin Vaccine Immunol* 2011; 18: 1644-9.

Laanen M, Persoons D, Ribbens S, de Jong E, Callens B, Strubbe M, Maes D, Dewulf J. Relationship between biosecurity and production/antimicrobial treatment characteristics in pig herds. *Vet J* 2013; 198: 508-12.

Larochelle R, Magar R, D'Allaire S. Comparative serologic and virologic study of commercial swine herds with and without postweaning multisystemic wasting

syndrome. *Can Vet J* 2003; 67: 114-20.

Lin C, Je J, Zhou J. Identification and Functional Analysis of the Novel ORF4 Protein Encoded by Porcine Circovirus Type 2. *Proc. 24th Int. Pig Vet. Soc. Congress. Dublin, Ireland 2016*: 474.

Liu J, Chen I, Kwang J. Characterization of a previously unidentified viral protein in porcine circovirus type 2-infected cells and its role in virus-induced apoptosis. *J Virol* 2005; 79: 8262-74.

Lopez-Soria S, Segales J, Rose N, Vinas MJ, Blanchard R, Madec F, Jestin A, Casal J, Domingo M. An exploratory study on risk factors for postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in Spain. *Prev Vet Med* 2005; 69: 97-107.

Lukert PD, de Boer GF, Dale JL, Keese P, McNulty MS, Randles JWT, Tisher I (1995) The Circoviridae. In: *Sixth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, Springer Verlag 1995. 166-8.

Madec F, Eveno É, Morvan P, Hamon L, Morvan L, Albina E, Truong C, Hutet É, Cariolet R, Arnould C, Jestin A. La maladie de l'amaigrissement du porcelet (MAP) en France. 1. Aspects descriptifs, impact en élevage. *Journées de la Rech Porcine en France* 1999; 31: 347-54.

Madec F, Eveno E, Morvan P, Hamon L, Blanchard P, Cariolet R, Amenna N, Morvan H, Truong C, Mahe D, Albina E, Jestin A. Post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs in France: clinical observations from follow-up studies on affected farms. *Livest Prod Sci* 2000; 63: 223-33.

Madec F, Rose N, Grasland B, Cariolet R, Jestin A. Post-weaning multisystemic wasting syndrome and other PCV2-related problems in pigs: a 12-year experience. *Transbound Emerg Dis* 2008; 55: 273-83.

Madson DM, Patterson AR, Ramamoorthy S, Pal N, Meng XJ, Opriessnig T. Effect of natural or vaccine-induced porcine circovirus type 2 (PCV2) immunity on fetal infection after artificial insemination with PCV2 spiked semen. *Theriogenology* 2009; 72: 747-54.

Majzoub M, Ritzmann M, Truyen U, Matiasek K, Heinritzi K, Hermanns W. Porzines Dermatitis-Nephropathie-Syndrom (PDNS) - eine Übersicht über pathomorphologische Veränderungen. *Tierärztl Prax Ausg G Grosstiere Nutztiere* 2005; 33: 169-74.

Mankertz A, Mankertz J, Wolf K, Buhk HJ. Identification of a protein essential for replication of porcine circovirus. *J Gen Virol* 1998; 79: 381-4.

Mankertz A. Molecular biology of Porcine Circoviruses. *Animal Viruses: Molecular Biology*. 2008. Caister Academic Press, UK. 355-374.

Martelli P, Ferrari L, Morganti M, De Angelis E, Bonilauri P, Guazzetti S, Caleffi A, Borghetti P. One dose of a porcine circovirus 2 subunit vaccine induces humoral and cell-mediated immunity and protects against porcine circovirus-associated disease under field conditions. *Vet Microbiol* 2011; 149: 339-51.

McNeilly F, Kennedy S, Moffett D, Meehan BM, Foster JC, Clarke EG, Ellis JA, Haines DM, Adair BM, Allan GM. A comparison of in situ hybridization and immunohistochemistry for the detection of a new porcine circovirus in formalin-fixed tissues from pigs with post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *J Virol Methods* 1999; 80: 123-8.

McNeilly F, McNair I, O'Connor M, Brockbank S, Gilpin D, Lasagna C, Boriosi G, Meehan B, Ellis J, Krakowka S, Allan GM. Evaluation of a porcine circovirus type 2-specific antigen-capture enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs: comparison with virus isolation, immunohistochemistry, and the polymerase chain reaction. *J Vet Diagn Invest* 2002; 14: 106-12.

Meehan BM, McNeilly F, Todd D, Kennedy S, Jewhurst VA, Ellis JA, Hassard LE, Clark EG, Haines DM, Allan GM. Characterization of novel circovirus DNAs associated with wasting syndromes in pigs. *J Gen Virol* 1998; 79: 2171-9.

Nause G. 2003. Zur Entwicklung der in den landwirtschaftlichen Betrieben Deutschlands beschäftigten Arbeitskräfte 1991 bis 2001. Wiesbaden. [https://www.destatis.de/DE/Publikationen/WirtschaftStatistik/LandForstwirtschaft/Arbeitskraefte19912001.pdf?\\_\\_blob=publicationFile](https://www.destatis.de/DE/Publikationen/WirtschaftStatistik/LandForstwirtschaft/Arbeitskraefte19912001.pdf?__blob=publicationFile). 03.09.2016

Nawagitgul P, Morozov I, Bolin SR, Harms FA, Sorden SD, Paul PS. Open reading frame 2 of porcine circovirus type 2 encodes a major capsid protein. *J Gen Virol* 2000; 81: 2281-7.

O'Connor B, Gauvreau H, West K, Bogdan J, Ayroud M, Clark EG, Konoby C, Allan G, Ellis JA. Multiple porcine circovirus 2-associated abortions and reproductive failure in a multisite swine production unit. *Can Vet J* 2001; 42: 551-3.

O'Dea MA, Hughes AP, Davies LJ, Muhling J, Buddle R, Wilcox GE. Thermal stability of porcine circovirus type 2 in cell culture. *J Virol Methods* 2008; 147: 61-6.

Oh Y, Seo HW, Han K, Park C, Chae C. Protective effect of the maternally derived porcine circovirus type 2 (PCV2)-specific cellular immune response in piglets by dam vaccination against PCV2 challenge. *J Gen Virol* 2012; 93: 1556-62.

Olvera A, Sibila M, Calsamiglia M, Segales J, Domingo M. Comparison of porcine circovirus type 2 load in serum quantified by a real time PCR in postweaning multisystemic wasting syndrome and porcine dermatitis and nephropathy syndrome naturally affected pigs. *J Virol Methods* 2004; 117: 75-80.

Opriessnig T, Thacker EL, Yu S, Fenaux M, Meng XJ, Halbur PG. Experimental reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs by dual

infection with *Mycoplasma hyopneumoniae* and porcine circovirus type 2. *Vet Pathol* 2004; 41: 624-40.

Opriessnig T, Meng XJ, Halbur PG. Porcine circovirus type 2-associated disease: Update on current terminology, clinical manifestations, pathogenesis, diagnosis, and intervention strategies. *J Vet Diagn Invest* 2007; 19: 591-615.

Opriessnig T, Ramamoorthy S, Madson DM, Patterson AR, Pal N, Carman S, Meng XJ, Halbur PG. Differences in virulence among porcine circovirus type 2 isolates are unrelated to cluster type 2a or 2b and prior infection provides heterologous protection. *J Gen Virol* 2008; 89: 2482-91.

Opriessnig T, Patterson AR, Madson DM, Pal N, Ramamoorthy S, Meng XJ, Halbur PG. Comparison of the effectiveness of passive (dam) versus active (piglet) immunization against porcine circovirus type 2 (PCV2) and impact of passively derived PCV2 vaccine-induced immunity on vaccination. *Vet Microbiol* 2010; 142: 177-83.

Opriessnig T, Xiao CT, Gerber PF, Halbur PG. Emergence of a novel mutant PCV2b variant associated with clinical PCVAD in two vaccinated pig farms in the US concurrently infected with PPV2. *Vet Microbiol* 2013; 163: 177-83.

Opriessnig T, Xiao C, Halbur P, Matzinger S, Meng XJ. A commercial PCV2a based vaccine protects pigs against experimental PCV2d challenge and reduces transmission to naive pigs. *Proc. 24th Int. Pig Vet. Soc. Congress. Dublin, Ireland* 2016: 486.

Park JS, Kim J, Ha Y, Jung K, Choi C, Lim JK, Kim SH, Chae C. Birth abnormalities in pregnant sows infected intranasally with porcine circovirus 2. *J Comp Pathol* 2005; 132: 139-44.

Patterson AR, Ramamoorthy S, Madson DM, Meng XJ, Halbur PG, Opriessnig T. Shedding and infection dynamics of porcine circovirus type 2 (PCV2) after experimental infection. *Vet Microbiol* 2011; 149: 91-8.

Pejsak Z, Podgorska K, Truszczynski M, Karbowski P, Stadejek T. Efficacy of different protocols of vaccination against porcine circovirus type 2 (PCV2) in a farm affected by postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2010; 33: E1-E5.

Pensaert MB, Sanchez RE, Ladekjaer-Mikkelsen AS, Allan GM, Nauwynck HJ. Viremia and effect of fetal infection with porcine viruses with special reference to porcine circovirus 2 infection. *Vet Microbiol* 2004; 98: 175-83.

Reiner G, Bronnert B, Hohloch C, Fresen C, Haack I, Willems H, Reinacher M. Qualitative and quantitative distribution of PCV2 in wild boars and domestic pigs in Germany. *Vet Microbiol* 2010; 145: 1-8.

Reiner G, Hofmeister R, Willems H. Genetic variability of porcine circovirus 2 (PCV2) field isolates from vaccinated and non-vaccinated pig herds in Germany. *Vet Microbiol* 2015; 180(1-2): 41-8.

Ribbens S, Dewulf J, Koenen E, Mintlens K, De Sadeleer L, de Kruif A, Maes D. A survey on biosecurity and management practices in Belgian pig herds. *Prev Vet Med* 2008; 83: 228-41.

Ritzmann M, Vorbuchner K, Majzoub M, Hermanns W, Heinritzi K, Geissler K, Truyen U. Untersuchungen zur Verbreitung des porzinen Circovirus Typ 2 in Bayern. *Tierärztl Prax Ausg G Grosstiere Nutztiere* 2002; 30: 386-91.

Ritzmann M, Wilhelm S, Zimmermann P, Etschmann B, Bogner KH, Selbitz HJ, Heinritzi K, Truyen U. Prävalenz sowie Assoziation von porzinem Circovirus Typ 2 (PCV2), porzinen Parvovirus (PPV) und porzinem reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in abortierten Feten, mumifizierten Feten, totgeborenen und lebensschwach geborenen Ferkeln. *Dtsch Tierärztl Wochenschr* 2005; 112: 348-51.

Rodriguez-Arriola GM, Segales J, Rosell C, Rovira A, Pujols J, Plana-Duran J, Domingo M. Retrospective study on porcine circovirus type 2 infection in pigs

from 1985 to 1997 in Spain. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 2003; 50: 99-101.

Rose N, Larour G, Le Diguierher G, Eveno E, Jolly JP, Blanchard P, Oger A, Le Dimna M, Jestin A, Madec F. Risk factors for porcine post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in 149 French farrow-to-finish herds. *Prev Vet Med* 2003; 61: 209-25.

Segales J, Domingo M. Postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs. A review. *Vet Q* 2002; 24: 109-24.

Segales J, Allan GM, Domingo M. Porcine circovirus diseases. *Anim Health Res Rev* 2005a; 6: 119-42.

Segales J, Calsamiglia M, Olvera A, Sibila M, Badiella L, Domingo M. Quantification of porcine circovirus type 2 (PCV2) DNA in serum and tonsillar, nasal, tracheo-bronchial, urinary and faecal swabs of pigs with and without postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Vet Microbiol* 2005b; 111: 223-9.

Segales J, Olvera A, Grau-Roma L, Charreyre C, Nauwynck H, Larsen L, Dupont K, McCullough K, Ellis J, Krakowka S, Mankertz A, Fredholm M, Fossum C, Timmusk S, Stockhofe-Zurwieden N, Beattie V, Armstrong D, Grassland B, Baekbo P, Allan G. PCV-2 genotype definition and nomenclature. *Vet Rec* 2008; 162: 867-8.

Segales J. Porcine circovirus type 2 (PCV2) infections: Clinical signs, pathology and laboratory diagnosis. *Virus Res* 2012; 164: 10-9.

Segales J, Rodriguez M.J., Resendes A., Balasch M., Sanz A. J., Plana-Duran J., Veneto A. Humoral immune response and correlation with viremia in pigs subclinically infected with porcine circovirus type 2. *Porc Intern Conf "Animal circoviruses and associated diseases"*. Belfast, UK 2005: 61.

Shen HG, Halbur PG, Opriessnig T. Prevalence and phylogenetic analysis of the current porcine circovirus 2 genotypes after implementation of widespread vaccination programmes in the USA. *J Gen Virol* 2012; 93: 1345-55.

Shibata I, Okuda Y, Yazawa S, Ono M, Sasaki T, Itagaki M, Nakajima N, Okabe Y, Hidejima I. PCR detection of Porcine circovirus type 2 DNA in whole blood, serum, oropharyngeal swab, nasal swab, and feces from experimentally infected pigs and field cases. *J Vet Med Sci* 2003; 65: 405-8.

Sorden SD. Update on porcine circovirus and postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *J Swine Health Prod* 2000; 8: 133-6.

Staebler S, Sydler T, Buergi E, McCullough K, McNeilly F, Allan G, Pospischil A. PMWS: an emerging disease identified in archived porcine tissues. *Vet J* 2005; 170: 132-4.

Stevenson GW, Kiupel M, Mittal SK, Kanitz CL. Ultrastructure of porcine circovirus in persistently infected PK-15 cells. *Vet Pathol* 1999; 36: 368-78.

Szeredi L, Szentirmai C. Proliferative and necrotising pneumonia and severe vascular lesions in pigs naturally infected with porcine circovirus type 2. *Acta Vet Hung* 2008; 56: 101-9.

Thibault S, Drolet R, Germain MC, D'Allaire S, Larochelle R, Magar R. Cutaneous and systemic necrotizing vasculitis in swine. *Vet Pathol* 1998; 35: 108-16.

Tischer I, Rasch R, Tochterm.G. Characterization of papovavirus-like and picornavirus-like particles in permanent pig kidney-cell lines. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg B* 1974; 226: 153-67.

Tischer I, Gelderblom H, Vettermann W, Koch MA. A very small porcine virus with circular single-stranded-DNA. *Nature* 1982; 295: 64-6.

Tischer I, Miels W, Wolff D, Vagt M, Griem W. Studies on epidemiology and pathogenicity of porcine circovirus. *Arch Virol* 1986; 91: 271-6.

Togashi K, Mawatari T, Mitobe S, Moriya S. Reproductive Losses Associated with Porcine Circovirus Type 2 in a Japanese Herd of Seronegative Sows. *J Vet Med Sci* 2011; 73: 941-4.

Walhöfer N. Auswirkungen betriebsspezifischer Faktoren auf den Verlauf von Infektionen mit dem Porcinen Circovirus Typ 2. Diss. med. vet. 2015. Ludwig-Maximilians-Universität. München.

Walker IW, Konoby CA, Jewhurst VA, McNair I, McNeilly F, Meehan BM, Cottrell TS, Ellis JA, Allan GM. Development and application of a competitive enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of serum antibodies to porcine circovirus type 2. *J Vet Diagn Invest* 2000; 12: 400-5.

Wellenberg GJ, Stockhofe-Zurwieden N, Boersma WJA, de Jong MF, Elbers ARW. The presence of co-infections in pigs with clinical signs of PMWS in The Netherlands: a case-control study. *Res Vet Sci* 2004a; 77: 177-84.

Wellenberg GJ, Stockhofe-Zurwieden N, de Jong MF, Boersma WJA, Elbers ARW. Excessive porcine circovirus type 2 antibody titres may trigger the development of porcine dermatitis and nephropathy syndrome: a case-control study. *Vet Microbiol* 2004b; 99: 203-14.

Welti S, Sydler T, Wiederkehr DD, Pospischil A, Hässig M, Bürgi E, Sidler X. Postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) and porcine dermatitis und nephropathy syndrome (PDNS) in der Schweiz in den Jahren 2003-2006. *Schweiz Arch Tierheilkd* 2012; 154: 417-27.

West KH, Bystrom JM, Wojnarowicz C, Shantz N, Jacobson M, Allan GM, Haines DM, Clark EG, Krakowka S, McNeilly F, Konoby C, Martin K, Ellis JA. Myocarditis and abortion associated with intrauterine infection of sows with porcine circovirus 2. *J Vet Diagn Invest* 1999; 11: 530-2.

Woodbine KA, Medley GF, Slevin J, Kilbride AL, Novell EJ, Turner MJ, Keeling MJ, Green LE. Spatiotemporal patterns and risks of herd breakdowns in pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *Vet Rec* 2007; 160: 751-62.

Xiao CT, Halbur PG, Opriessnig T. Global molecular genetic analysis of porcine circovirus type 2 (PCV2) sequences confirms the presence of four main PCV2 genotypes and reveals a rapid increase of PCV2d. *J Gen Virol* 2015; 96: 1830-41.

Zimmerman J, Benfield D, Dee S, Murtaugh M, Stadejek T, Stevenson G, Torremorell M. Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (Porcine Arterivirus). *Diseases of Swine*. 2012. Blackwell Publishing, UK. 461-486.

## **XI. DANKSAGUNG**

Zuerst möchte ich meinem Doktorvater Prof. Mathias Ritzmann für die Möglichkeit danken meine Doktorarbeit an der Klinik für Schweine zu schreiben. Ebenso möchte ich ihm für eine wundervolle und amüsante Zeit an der Klinik danken.

Meinem Betreuer Dr. Matthias Eddicks möchte ich für die viele Geduld, die inspirierenden Ideen und die ganze Hilfe während der Doktorarbeit danken.

Mein größter Dank gilt all meinen Kollegen der Schweineklinik für eine unvergleichliche Zeit voller einmaliger Erlebnisse. Besonders bedanken möchte ich mich bei einer Kollegin und Freundin, Christine Renken. Keiner hat mir so geholfen im praktischen Teil, keine hätte mich so gut ertragen und mit niemandem hätte ich eine so tolle Studie gehabt.

Ich möchte mich auch bei den ganzen Landwirten, die uns in ihren Ställen haben arbeiten lassen und bei den betreuenden Tierärzten bedanken für ihr Vertrauen. Mein Dank gilt außerdem im speziellen den Erzeugergemeinschaften, vor allem der EGN und EGO und den Viehfahrern für die gute und freundliche Zusammenarbeit.

Unbedingt erwähnen möchte ich Dr. Michael Eichelberger und Dr. Siegrun Lauboek, sie waren mir stets verständnisvolle und aufmunternde Mentoren, das werde ich euch nie vergessen.

Meine uneingeschränkte Dankbarkeit gilt meinen Eltern, Geschwistern, meiner Oma und Freunden, für die jahrelange Unterstützung, die Geduld und das grenzenlose Verständnis. Ohne euch hätte ich das nie geschafft!

Zu guter Letzt danke ich der Studie selbst, denn ohne sie hätte ich meinen wundervollen Freund Markus nie kennen gelernt. Seine stets positive und aufbauende Art haben mich immer – oder meistens – motiviert.

Ich kann euch allen nicht genug danken.

Danke, thank you, obrigada, merci, спасибо, vergelt's Gott!