Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde

der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität

München

Verlaufsuntersuchung über die Ausscheidung von *porcine epidemic diarrhea virus* (PEDV) und die Serokonversion nach Feldinfektion bei Saugferkeln und Mastschweinen

von Lisa Tamara Moser

aus Schwäbisch Hall

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. M. Ritzmann

Mitbetreuung durch: Dr. J. Numberger, Dr. J. Stadler

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät

der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, PhD
Berichterstatter:	Univ.-Prof. Dr. Mathias Ritzmann
Korreferent:	Univ.-Prof. Dr. Dr. Michael H. Erhard

Tag der Promotion: 29.07.2017

@ii

INHALTSVERZEICHNIS

I. EINLEITUNG 1

II. LITERATURÜBERSICHT 3

1. Porcine epidemic diarrhea virus 3

1.1. Taxonomie 3

1.2. Morphologie 3

1.2.1. Genom 4

1.2.2. S-Protein 4

1.2.3. N-Protein 4

1.3. Tenazität 5

2. Epidemiologie 6

2.1. Europa bis 2014 6

2.2. Asien 6

2.3. Amerika 7

2.4. Europa seit 2014 8

3. Ausscheidung, Übertragung und Verbreitung 9

4. Inkubationszeit 10

5. Pathogenese 11

6. Pathologie 12

6.1. Makroskopische Läsionen 13

6.2. Histologische Veränderungen 13

7. Immunreaktion 14

7.1. Antikörper 14

7.2. Laktogene Immunität 14

7.3. Kreuzprotektivität 15

8. Therapie und Prophylaxe 16

8.1. Therapie 16

8.2. Prophylaxe 16

9. Diagnostik 17

9.1. Direkter Nachweis 17

9.2. Indirekter Nachweis 19

III. MATERIAL UND METHODEN 21

1. Anzeige des Tierversuchsvorhabens 21

2. Ziel der Untersuchung 21

3. Versuchsaufbau 21

3.1. Studienbetriebe 21

3.2. Beprobungszeitpunkte 24

3.3. Studientiere 24

3.4. Kotproben 25

3.5. Blutproben 26

4. Labordiagnostik 27

4.1. PCR 27

4.2. Sequenzierung des ORF S 28

4.3. ELISA 29

4.3.1. ELISA 1 29

4.3.2. ELISA 2 30

5. Statistik 30

IV. ERGEBNISSE 33

1. Klinische Beobachtung 33

2. Sequenzierung des ORF S 33

3. PCR 36

4. ELISA 40

4.1. ELISA 1 40

4.2. ELISA 2 43

4.3. Serokonversion 45

4.4. Übereinstimmung der ELISAs 49

V. DISKUSSION 51

1. Sequenzierung des ORF S 51

2. Klinik 52

3. Kotproben 54

4. Antikörper 57

4.1. Detektion von IgG 57
4.1.1. Mastschweine 58
4.1.2. Saugferkel 59
4.2. ELISA Vergleich 60

VI. SCHLUSSFOLGERUNG 63

VII. ZUSAMMENFASSUNG 65

VIII. SUMMARY 67

IX. LITERATURVERZEICHNIS 69

X. ABBILDUNGSVERZEICHNIS 91

XI. TABELLENVERZEICHNIS 93

XII. DANKSAGUNG 95

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

µl	Mikroliter
aa	amino acids, Aminosäuren
Abb.	Abbildung
Abs.	Absatz
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cDNA	copy Desoxyribunukleinsäure
Ct	threshold cycle
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dpi	days post inoculation
E	envelope
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
Fa.	Firma
FFN	fluorescent focus neutralisation
FMIA	fluorcent microsphere immunoassay
g	Vielfaches der Erdbeschleunigung (G-Kraft)
h	Stunde(n)
HEV	Hämagglutinierendes Encephalomyelitis Virus
IF	Immunfluoreszenztest
IFA	indirect fluorescent antibody assay
IgA	Immunglubuline A
IgG	Immunglobuline G
IHC	Immunhistochemie
Inc.	incorporation
ISH	In-situ Hybridisierung
Kbp	Kilo-Basenpaare
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
km	Kilometer
M	membrane
min	Minute(n)
ml	Milliliter

mm	Millimeter
N	nucleocapsid
NCBI	national center for biotechnology information
nm	Nanometer
OD	optical densitiy, Optische Dichte
ODn	Optische Dichte der Negativkontrolle
ODp	Optische Dichte der Positivkontrolle
ODs	Optische Dichte der Probe
ORF	open reading frame
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	polymerase chain reaction, Polymerasekettenreaktion
PCV2	Porcines Circovirus 2
PDCoV	Porcines Deltacoronavirus
PED	porcine epidemic diarrhea
PEDV	porcine epidemic diarrhea virus
pH	potentia Hydrogenii
PPDS	Postpartales Dysgalaktie-Syndrom
PRCV	Porcines respiratorisches Coronavirus
RNA	ribonucleid acid, Ribonukleinsäure
RT-PCR	reverse transcription polymerase chain reaction
s	Sekunden
S	spike
S INDEL	Insertion und Deletion im S-Gen
S/P Ratio	sample to positive ratio
S/P%	sample to positive percent
SDPP	spray dried porcine plasma
SE	standard error, Standardfehler
Tab.	Tabelle
TGE	transmissible gastroenteritis
TGEV	transmissible gastroenteritis virus
VN	Virusneutralisationstest
z. B.	zum Beispiel

I. EINLEITUNG

Porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) verursacht ein Durchfallgeschehen bei Schweinen aller Altersgruppen, das durch plötzliches Auftreten von wässrigem Durchfall mit Erbrechen gekennzeichnet ist (PENSAERT & DE BOUCK, 1978). Die Mortalität kann bei Saugferkeln bis zu 100 % betragen (OJKIC et al., 2015), wobei die Ausprägung der klinischen Anzeichen und der Schweregrad des Verlaufes unter anderem abhängig von dem auslösenden Virusstamm sowie dem Alter und Immunstatus der betroffenen Tiere sind (WANG et al., 2014a; ANNAMALAI et al., 2015; GOEDE et al., 2015).

PED wurde erstmals 1977 in Großbritannien beschrieben und trat bis in die 1980er Jahre in Europa auf (PENSAERT & DE BOUCK, 1978; SONG & PARK, 2012). Danach wurde nur noch sporadisch von Ausbrüchen in Europa berichtet (MARTELLI et al., 2008). Seit den 1980er Jahren ist PED in Asien endemisch (SONG & PARK, 2012), wo es auch bei geimpften Tieren kürzlich zu verheerenden Ausbrüchen kam (LI et al., 2012). In den USA trat PED im Frühjahr 2013 erstmalig auf und führt seither zu massiven Verlusten mit bis nahezu 100 % Mortalität bei Saugferkeln (STEVENSON et al., 2013). Die dort isolierten PEDV-Stämme werden als US-Prototypen bezeichnet. Gleichzeitig wurde in den USA eine weniger virulente Variante mit Insertionen und Deletionen im S-Gen (S INDEL) nachgewiesen (VLASOVA et al., 2014; WANG et al., 2014a). Die Produktionsdaten und die Dauer bis zum Erreichen der Leistungsdaten der Basisproduktion werden bei PED-Ausbrüchen mit S INDEL-Stämmen weniger beeinflusst als bei Ausbrüchen mit den Prototyp-Stämmen (GOEDE et al., 2015; GOEDE & MORRISON, 2016).

Seit 2014 tritt PED wieder in Deutschland und anderen europäischen Ländern auf (HANKE et al., 2015; MESQUITA et al., 2015; THEUNS et al., 2015). Obwohl die PEDV-Isolate dieser Ausbrüche eng mit den weniger virulenten S INDEL-Stämmen verwandt sind, beträgt die Mortalität bei Saugferkeln zum Teil bis zu 70 % (STADLER et al., 2015). Bislang wurden nur bei Ausbrüchen in der Ukraine mit dem US-Prototyp verwandte PEDV-Stämme nachgewiesen (DASTJERDI et al., 2015).

Zum Nachweis von PEDV stehen verschiedene direkte und indirekte Nachweisverfahren zur Verfügung. Die PCR hat sich zur Bestätigung der Verdachtsdiagnose etabliert, da sie schnelle und zuverlässige Ergebnisse liefert. Mit serologischen Untersuchungen kann eine vorausgegangene Exposition nachgewiesen werden. In dieser Studie wurden Tiere unterschiedlicher Altersgruppen auf Betrieben ohne bekannte PEDV-Vorgeschichte nach einem akuten Ausbruch von PED beprobt. Kotproben wurden auf PEDV-RNA untersucht und das Serum der Studientiere wurde mit zwei kommerziellen ELISAs auf PEDV-spezifische Antikörper untersucht. Diese unter Feldbedingungen gewonnenen Daten können bei der Wahl des Probenmaterials und der Untersuchungsmethode sowie der Befundinterpretation helfen.

II. LITERATURÜBERSICHT

1. Porcine epidemic diarrhea virus

1.1. Taxonomie

Porcine epidemic diarrhea virus (PEDV), der Erreger von *porcine epidemic diarrhea* (PED), gehört zur Familie *Coronaviridae*, die der Ordnung *Nidovirales* zugeordnet wird (ICTV, 2012). Die Unterfamilie *Coronavirinae* wird in die Gattungen *Alpha-, Beta-, Gamma-* und *Deltacoronaviren* unterteilt (WOO et al., 2009; ICTV, 2012). Coronaviren werden bei verschiedenen Spezies von Vögeln und Säugetieren nachgewiesen (KÖNIG & THIEL, 2015). Bei Schweinen kommen Coronaviren verschiedener Gattungen vor (SAIF et al., 2012). Unter den *Alphacoronaviren* spielen das *transmissible gastroenteritis virus* (TGEV), das erstmals 1946 beschrieben wurde (DOYLE & HUTCHINGS, 1946), das *porcine respiratory coronavirus* (PRCV), eine Variante von TGEV mit Deletionen im S-Gen (SAIF et al., 2012), und PEDV, das zum ersten Mal 1977 auftrat (WOOD, 1977), eine Rolle. Aus der Gattung der *Betacoronaviren* ist das *Hämagglutinierende Encephalomyelitis Virus* (HEV), der Erreger von Erbrechen und Kümmern bei Saugferkeln (*vomiting and wasting disaese*), für Schweine relevant (GREIG et al., 1962). *Porcine Deltacoronaviren* (PDCoV) wurden 2012 erstmals bei an Durchfall erkrankten Schweinen nachgewiesen (WOO et al., 2012).

1.2. Morphologie

PEDV ist ein behülltes, Einzelstrang-Ribonukleinsäure (RNA)-Virus positiver Polarität (ICTV, 2012). Das Virus ist nahezu kugelförmig mit einem Durchmesser von 95-190 nm (PENSAERT & DE BOUCK, 1978). Im elektronenmikroskopischen Bild erscheinen Coronaviren als pleomorphe Viruspartikel mit keulenförmigen Oberflächenprojektionen, sogenannte Peplomere (PENSAERT & DE BOUCK, 1978). Diese 18 nm langen Projektionen verhelfen den Coronaviren zu ihrem Namen (lat. *corona* = Krone) (KÖNIG & THIEL, 2015).

1.2.1. Genom

Das lineare, einzelsträngige Genom von PEDV weist mit einer Größe von 27,6-31 Kbp das größte Genom unter den Coronaviren auf (KÖNIG & THIEL, 2015). Zwischen dem 5‘-Ende mit Cap-Struktur und dem polyadenylierten 3‘-Ende befinden sich untranslatierte Bereiche (untranslated regions, UTR) und sieben offene Leseraster (open reading frames, ORF), wovon vier für Strukturproteine und drei für Nicht-Strukturproteine kodieren (SONG & PARK, 2012). Die Strukturproteine S (spike), E (envelope), M (membrane) und N (nucleocapsid) sind in Richtung zum 3‘-Ende des Genoms lokalisiert (SONG & PARK, 2012). Für die drei Nicht-Strukturproteine kodieren ORF1a und ORF1b (KOCHERHANS et al., 2001) und ORF3 (WANG et al., 2013).

1.2.2. S-Protein

Das S-Protein hat eine Masse von 150-220 kDa (DUARTE & LAUDE, 1994). Es wird auf der Virusoberfläche als keulenförmige, 18-23 nm lange Projektoren exprimiert (PENSAERT & DE BOUCK, 1978). Das S-Protein setzt sich aus 1383 Aminosäuren (aa) zusammen (DUARTE & LAUDE, 1994) und es werden zwei funktionelle Domänen unterschieden: Die S1-Domäne (1-789 aa) spielt eine Rolle bei der Interaktion des Virus mit den Rezeptoren der Zielzellen (BOSCH et al., 2003). Die S2-Domäne (790-1383 aa) ist für die Membranfusion von Viruspartikel und Zielzelle verantwortlich (KÖNIG & THIEL, 2015). Die S1-Domäne ist bei den verschiedenen PEDV-Stämmen sehr variabel, während die S2-Domäne dagegen eher konserviert ist (SUN et al., 2014b). Das S-Protein besitzt Epitope, die die Bildung von neutralisierenden Antikörpern induzieren können (CHANG et al., 2002).

1.2.3. N-Protein

Das N-Protein ist ein basisch phosphoriliertes Protein mit einer Masse von 58 kDa (SONG & PARK, 2012). Es bindet am C-Terminus des M-Proteins und an die virale RNA (KÖNIG & THIEL, 2015). Es bildet die strukturelle Basis des helikalen Nukleokapsids (SPAAN et al., 1988) und kann für die frühe Diagnose von PED verwendet werden (SONG & PARK, 2012). Die Epitope des N-Proteins spielen vor allem bei der Induktion von zellvermittelter Immunität eine Rolle

(SAIF, 1993). Nach natürlichen Infektionen werden Serumantikörper nachgewiesen, die gegen das N-Protein gerichtet sind (KÖNIG & THIEL, 2015).

1.3. Tenazität

PEDV kann durch saure oder alkalische Desinfektionsmittel inaktiviert werden (POSPISCHIL et al., 2002). Bei 4°C und pH 5-9 bleibt das Virus stabil; bei höheren Temperaturen (37°C) verringert sich der Toleranzbereich auf pH 6,5-7,5 (HOFMANN & WYLER, 1989). Geeignete Desinfektionsmittel zur Inaktivierung von PEDV sind z. B. Peroxidverbindungen (Vircon® S), Phenole (One-Stroke Environ; Tek-Trol), 2 %iges Natriumhydroxid (Ätznatron), quartäre Ammoniumverbindungen mit Glutaraldehyden und 1 %ige Formaldehyde (POSPISCHIL et al., 2002; DVG, 2016). Desinfektionsmittel sollten nur auf zuvor gereinigte und abgetrocknete Flächen aufgebracht werden (SPINDLER, 2013). Dabei ist auf eine korrekte Dosierung und Einwirkzeit zu achten (SPINDLER, 2013). Die Dosierungsempfehlungen gelten in der Regel bei einer Raumtemperatur von 20°C, bei niedrigeren Temperaturen muss die Konzentration entsprechend erhöht werden (SPINDLER, 2013). Die Inaktivierung von PEDV ist von der Umgebungstemperatur abhängig: In einem Infektionsversuch konnten THOMAS et al. (2015b) Schweine nicht mit PEDV-haltigem Kot infizieren, wenn dieser für zehn Minuten bei 71°C bzw. sieben Tage bei 20°C gelagert wurde. Bei einer zehnminütigen Lagerung bei 63°C konnte das Virus dagegen nicht inaktiviert werden (THOMAS et al., 2015b). Wird der Kot bei 20°C über 24 Stunden gelagert, ist eine Infektion möglich (THOMAS et al., 2015b). In der Gülle bleibt das Virus bei Raumtemperatur zwei bis vier Wochen infektiös, bei einer Temperatur von -20°C sogar länger als 28 Tage (MORRISON & GOEDE, 2014). In Trockenfutter behält es seine Infektiosität bis zu zwei Wochen, in feuchtem Futter sogar bis zu vier Wochen (MORRISON & GOEDE, 2014). Schwankungen in der Luftfeuchtigkeit zwischen 30-70 % scheinen keine Auswirkung auf die Infektiosität des Virus zu haben (MORRISON & GOEDE, 2014).

2. Epidemiologie

2.1. Europa bis 2014

PED wurde erstmals 1977 in England beschrieben (WOOD, 1977). Es sind alle Altersgruppen betroffen, mit einer Saugferkelsterblichkeit von ca. 30 % (WOOD, 1977). Das klinische Erscheinungsbild ähnelt dem der TGE, TGEV kann aber nicht nachgewiesen werden (WOOD, 1977). Im gleichen Jahr kommt es in Belgien ebenfalls zu Ausbrüchen und der Erreger wird als Coronavirus, Stamm CV777, identifiziert (PENSAERT & DE BOUCK, 1978). In ersten Infektionsversuchen können durch das Isolat CV777 klinische Symptome bei Saugferkeln und Mastschweinen hervorgerufen werden (DE BOUCK & PENSAERT, 1980). Die Erkrankung breitet sich über die angrenzenden Länder wie Deutschland, Niederlande, Frankreich, Bulgarien, Ungarn und die Schweiz aus, wobei die Mortalität bei Saugferkeln 30 bis 80 % beträgt (HESS et al., 1980; SONG & PARK, 2012). Bei einer Prävalenzstudie in Belgien werden 1980 bei 32 % und 1984 bei 19 % der Schlachtschweine Antikörper gegen PEDV gefunden (DE BOUCK et al., 1982). Während der 1980er und 1990er Jahre kommt es vereinzelt zu Ausbrüchen von PED in Europa (CARVAJAL et al., 1995a; NAGY et al., 1996; PRITCHARD et al., 1999; RODÁK et al., 2005). Die Krankheitsdauer beträgt auf Einzeltierebene zwei bis zehn Tage, auf Bestandsebene können klinische Anzeichen über zwei bis acht Wochen beobachtet werden (HESS et al., 1980). Von einem niederländischen Ferkelerzeuger wird berichtet, dass sich das Virus zehn Monate endemisch im Bestand halten konnte (PIJPERS et al., 1993). In der italienischen Po-Ebene, einer Region mit hoher Schweinedichte, kommt es zwischen 2005 und 2006 vermehrt zu PED-Ausbrüchen, bei denen alle Altersgruppen betroffen sind (MARTELLI et al., 2008). Nach dieser Epidemie kommt es bis Ende 2007 noch vereinzelt zu Neuausbrüchen (SOZZI et al., 2010); zwischen 2007 und 2014 tritt PED nur noch sehr sporadisch auf (SOZZI et al., 2014).

2.2. Asien

PED tritt erstmals 1982 in Japan auf (TAKAHASHI et al., 1983). Die Mortalität beträgt über 20 % bei Saugferkeln, die jünger als 20 Tage alt sind (TAKAHASHI et al., 1983). In den 1980er und 1990er Jahren breitet sich PED über die

schweineproduzierenden Länder Asiens aus und führt zu hohen wirtschaftlichen Verlusten (SAIF et al., 2012; SONG & PARK, 2012; ZHAO et al., 2016). Vor allem bei Saugferkeln kommt es zu massiven Verlusten (SONG & PARK, 2012). SUEYOSHI et al. (1995) beschreiben eine typische Epidemie in Japan von 1993 bis 1994, bei der 14 000 Schweine an PED sterben; die Mortalität bei Saugferkeln liegt hier zwischen 30 und 80 %. In Thailand betragen die Saugferkelverluste bis zu 100 % (PURANAVEJA et al., 2009). In einer koreanischen Studie von August 1997 bis Juli 1999 wurde in 50,4 % von 1258 Fällen von Saugferkeldurchfall PED diagnostiziert (CHAE et al., 2000) und bei 48 Sauenbeständen eine durchschnittliche Seroprävalenz von 73,6 % ermittelt (OH et al., 2005). In verschiedenen Regionen Chinas kommt es 2010-2012 zu schweren Ausbrüchen, bei denen die Mortalität bei Saugferkeln auch in geimpften Herden hoch ist (LI et al., 2012; SUN et al., 2012). Neben den klassischen chinesischen Isolaten werden bei diesen Ausbrüchen neue, virulentere PEDV Varianten isoliert, gegen die die verwendeten Impfstoffe keinen ausreichenden Schutz bieten (LI et al., 2012; WANG et al., 2013).

2.3. Amerika

In den USA wird PED erstmals im Frühjahr 2013 auf vier voneinander unabhängigen Beständen nachgewiesen (STEVENSON et al., 2013). Durchfall und Erbrechen wird in allen Altersgruppen beobachtet und die Mortalität bei den Saugferkeln beträgt 90 bis 95 % (STEVENSON et al., 2013). Die Isolate der vier Betriebe weisen untereinander eine hohe Sequenzhomologie auf (STEVENSON et al., 2013). Drei Monate danach gibt es PED-Nachweise aus über elf Bundesstaaten (CIMA, 2013). Bis Anfang Februar 2017 wurde jeweils mindestens ein PED-Ausbruch in 39 Bundesstaaten bestätigt (AASV, 2017). Innerhalb eines Jahres hat PED zu einem Verlust von mehr als 10 % der amerikanischen Schweinepopulation geführt, was etwa sieben Millionen Ferkeln entspricht (CIMA, 2014).

Die identifizierten PEDV-Stämme der ersten Ausbrüche in den USA, sogenannte US-Prototypen, weisen eine hohe Sequenzhomologie zu den chinesischen Isolaten (China/2012/AH2012) von aus den Jahren 2011-2012 auf (HUANG et al., 2013; STEVENSON et al., 2013; CHEN et al., 2014). Seit Januar 2014 werden in

amerikanischen Schweinebeständen PED-Ausbrüche mit milderen klinischen Anzeichen beschrieben, ohne dass vermehrt Todesfälle bei den Saugferkeln auftreten (WANG et al., 2014a). Die PED-Isolate (OH851) dieser Ausbrüche weisen Deletionen und Insertionen am ORF S auf (VLASOVA et al., 2014). Im phylogenetischen Vergleich ähneln sie verschiedenen chinesischen Isolaten (HBQX-2010 und CH/ZMZDY/11), unterscheiden sich aber von den hochvirulenten chinesischen Isolaten (China/2012/AH2012) und den US-Prototypen (VLASOVA et al., 2014). Die Insertionen und Deletionen sind vor allem im 5‘-Ende der S1-Region zu finden, weshalb diese Isolate als S INDEL-Stämme bezeichnet werden (VLASOVA et al., 2014; WANG et al., 2014a). MARTHALER et al. (2014) unterscheiden auf der Basis von Vollgenom-sequenzierungen einen dritten Stamm mit einer Deletion im S2 (S2aa-del).

Im Januar 2014 kommt es zu dem ersten PED-Ausbruch in Kanada auf einem Bestand in Ontario (OJKIC et al., 2015). Die Morbidität und Mortalität bei den Saugferkeln beträgt 100 % und die isolierten Stämme zeigen in Sequenzanalysen eine Übereinstimmung von 99 % mit PEDV-Stämmen aus den USA (OJKIC et al., 2015). Als mögliche Eintragsquelle wird von PASICK et al. (2014) kontaminiertes Futter angesehen, das sprühgetrocknetes Schweineplasma (spray dried porcine plasma, SDPP) mit PEDV-RNA enthält. Andere Studien zeigen wiederum, dass die Sprühtrocknung ausreichend ist, um PEDV zu inaktivieren und somit PEDV in SDPP nicht infektiös ist (GERBER et al., 2014b; OPRIESSNIG et al., 2014). PED breitet sich weiter über den amerikanischen Kontinent aus: neben Mexico (TRUJILLO-ORTEGA et al., 2016) sind auch südamerikanische Staaten wie Peru, Kolumbien und Ecuador betroffen (EFSA, 2014).

2.4. Europa seit 2014

Seit 2014 tritt PED wieder in Europa auf: Der erste Bericht stammt von einem nordwestdeutschen Mastbestand aus dem Frühjahr 2014 (HENNINGER & SCHWARZ, 2014). Es folgen zwei süddeutsche Mastbestände (HANKE et al., 2015) und im September 2014 sind das erste Mal auch Saugferkel betroffen (STADLER et al., 2015). Die Mortalität bei den Saugferkeln beträgt auf einzelnen Betrieben bis 70 % und bei der Sektion zeigen sich die typischen

pathomorphologischen und histologischen Läsionen wie eine dünne, transparente Dünndarmwand mit gelblich, wässrigem Darminhalt (STADLER et al., 2015). Auch bei Sauen wird Durchfall und Inappetenz beobachtet (STADLER et al., 2015). Die Isolate zeigen eine hohe Übereinstimmung mit den amerikanischen S INDEL-Stämmen (OH851) (HANKE et al., 2015; STADLER et al., 2015). Bei weiteren Ausbrüchen in anderen europäischen Ländern wie Frankreich (GRASLAND et al., 2015), Niederlande (VAN DER WOLF et al., 2015), Portugal (MESQUITA et al., 2015), Österreich (STEINRIGL et al., 2015), Belgien (THEUNS et al., 2015) und Italien (ALBORALI et al., 2014; BERTASIO et al., 2016) werden ebenfalls S INDEL-Stämme nachgewiesen. Bei Ausbrüchen in der Ukraine weisen die Isolate eine große Homologie zu den US-Prototypen auf (DASTJERDI et al., 2015).

3. Ausscheidung, Übertragung und Verbreitung

PEDV wird mit allen Se- und Exkreten ausgeschieden (BJUSTROM-KRAFT et al., 2016). Die fäkal-orale Infektion stellt den Hauptübertragungsweg von PEDV dar (WILLIAMSON et al., 2013). Es wird in großen Mengen über den Kot (KIM et al., 2007) ausgeschieden, aber PEDV kann auch in Sauenmilch (LI et al., 2012; SUN et al., 2012) und Ebersperma (SUN et al., 2014a) nachgewiesen werden. Nach experimentellen Infektionen mit einem Prototyp-PEDV ist die PEDV-RNA ein bis drei Tage später in Kotproben nachweisbar (MADSON et al., 2014; THOMAS et al., 2015a; NIEDERWERDER et al., 2016). Nach zwei bis sieben Tagen scheiden alle experimentell infizierten Tiere PEDV-RNA aus (MADSON et al., 2014). Kotproben von an Durchfall erkrankten Schweinen beinhalten 10^2 bis 10^5 PEDV-Genomkopien pro Gramm (KIM et al., 2007).

Die Dauer der Ausscheidung von PEDV nach experimenteller Infektion wird in der Literatur mit 9 bis 21 Tagen nach der Infektion (days post inoculation, dpi) angegeben (CARVAJAL et al., 1995b; NIEDERWERDER et al., 2016); einzelne Tiere scheiden bis zu 28 Tage aus (NIEDERWERDER et al., 2016). Aus China wird von einer Ausscheidung über mindestens 56 Tage berichtet (SUN et al., 2014a). Auf einzelnen Betrieben kann in Sammelkotproben 15 Wochen nach einem S INDEL-PEDV-Ausbruch noch PEDV-RNA nachgewiesen werden (STADLER et al., 2015). Auch STEINRIGL et al. (2015) berichten von

österreichischen Ausbrüchen, bei denen in Sammelkotproben PEDV-RNA bis zu drei Monate nach dem Ausbruch nachweisbar war. Teilweise wird nach mehreren Wochen erneut ein PED-bedingtes Durchfallgeschehen beobachtet (STADLER et al., 2015; BERTASIO et al., 2016).

Innerhalb eines Bestandes wird PEDV über unbelebte und belebte Vektoren übertragen und breitet sich schnell aus (BOWMAN et al., 2015; MESQUITA et al., 2015; STEINRIGL et al., 2015). Die Infektionsdosis für Saugferkel ist geringer als für Aufzuchtferkel (THOMAS et al., 2015a). Es kann gezeigt werden, dass Absetzferkel nach Abklingen des Durchfalls weiter PEDV ausscheiden können (MADSON et al., 2014). Über unbelebte Vektoren wie Transportfahrzeuge (LOWE et al., 2014) und Futter (CFIA, 2014; DEE et al., 2014; BOWMAN et al., 2015), kann PEDV auch zwischen verschiedenen Beständen übertragen werden. Die Infektiosität von sprühgetrocknetem Schweineplasma wird kontrovers diskutiert (GERBER et al., 2014b; OPRIESSNIG et al., 2014; PASICK et al., 2014). Eine Übertragung über Aerosole wird beschrieben (ALONSO et al., 2014). In einer anderen Studie kann keine Übertragung über die Luft im Stallabteil nachgewiesen werden (BJUSTROM-KRAFT et al., 2016). Die Umwelt scheint nicht als Erregerreservoir zu dienen (BJUSTROM-KRAFT et al., 2016).

4. Inkubationszeit

Die Inkubationszeit wird unterschiedlich angegeben: bei Feldausbrüchen in England 19761977 beträgt sie fünf bis acht Tage (WOOD, 1977). Bei den ersten Ausbrüchen in den USA 2013 wird sie mit ein bis sieben Tage angegeben (STEVENSON et al., 2013). Bei experimentellen Infektionen mit CV777 beträgt die Inkubationszeit 22 bis 36 Stunden (PENSAERT & DE BOUCK, 1978; DE BOUCK et al., 1981). In anderen Versuchen kann bei allen Tieren 24 Stunden nach der Infektion PEDV im Kot nachgewiesen werden (MADSON et al., 2014). Eine längere Inkubationszeit von drei bis sechs Tagen ist bei der Infektion von Ferkeln mit einem chinesischen Isolat beschrieben (WANG et al., 2013).

5. Pathogenese

Die Pathogenese von PED ähnelt sehr der von TGEV (DE BOUCK & PENSAERT, 1980; DE BOUCK et al., 1981). Wie für Coronaviren typisch, ist die Erkrankung durch eine kurze Inkubationszeit sowie einen seuchenhaften Verlauf in allen Altersgruppen mit hoher Morbidität und teilweise hoher Mortalität gekennzeichnet (HEINRITZI et al., 1990). Bei PED scheint die Ausprägung der Klinik abhängig von Virusstamm, der Bestandsgröße (MARTELLI et al., 2008), dem Infektionszeitpunkt (STEVENSON et al., 2013) und der möglichen Beteiligung von Sekundärinfektionen (STADLER et al., 2015; BERTASIO et al., 2016) zu sein. Die Morbidität kann bis zu 100 % betragen (LI et al., 2012; STEVENSON et al., 2013; STADLER et al., 2015). Die Schwere der Klinik ist negativ korreliert mit dem Alter der Schweine (SHIBATA et al., 2000). Neugeborene Saugferkel sind empfänglicher als Aufzuchtferkel (JUNG et al., 2015) und zeigen ein ausgeprägteres klinisches Erscheinungsbild (THOMAS et al., 2015a). Der Durchfall ist pastös, breiig bis wässrig und ohne Blut- oder Schleimbeimengungen (STEVENSON et al., 2013; WANG et al., 2013; STADLER et al., 2015). Erbrechen kann ebenfalls bei allen Altersgruppen beobachtet werden (EFSA, 2014) und tritt bereits zwei bis drei Tage nach einer experimentellen Infektion als erstes Anzeichen auf (MADSON et al., 2014; NIEDERWERDER et al., 2016). Die Tiere zeigen unterschiedlich ausgeprägte Lethargie, Apathie und Anorexie (HENNINGER & SCHWARZ, 2014). Aufgrund der reduzierten Futteraufnahme kommt es bei Sauen zu einer verringerten Milchproduktion bis zur Agalaktie (SUEYOSHI et al., 1995).

Die Ausprägung des klinischen Erscheinungsbildes ist abhängig vom auslösenden PEDV-Isolat (WANG et al., 2014a). In experimentellen Infektionen mit neugeborenen Saugferkeln zeigt sich eine niedrigere Pathogenität von S INDEL-Stämmen, bezogen auf die längere Inkubationszeit, den kürzer andauernden Durchfall und einer geringeren, weniger ausgebreiteten Zottenatrophie (LIN et al., 2015b; YAMAMOTO et al., 2015). In den USA werden bei Ausbrüchen durch S INDEL-PEDV-Stämme nur milde klinische Anzeichen beobachtet (WANG et al., 2014a), im Gegensatz zu Europa, wo es bei einzelnen Beständen zu schweren Krankheitsverläufen mit S INDEL-PEDV kommt (MESQUITA et al., 2015; STADLER et al., 2015). Die Mortalität variiert je nach Altersgruppe der betroffenen Tiere: vor allem bei neugeborenen Saugferkeln beträgt die Mortalität

aufgrund der Dehydratation zwischen 70 und 100 % (MARTELLI et al., 2008; STEVENSON et al., 2013; STADLER et al., 2015). Bei älteren Tiere ist die Mortalität niedriger: bei Absetzferkeln wird sie mit 1-3 % angegeben (POSPISCHIL et al., 2002; MARTELLI et al., 2008; STEVENSON et al., 2013). Bei Mastschweinen beträgt die Mortalität 0-4 % (MARTELLI et al., 2008; HENNINGER & SCHWARZ, 2014). In experimentellen Infektionen ist der Durchfall nach sieben bis elf Tagen selbstlimitierend (BJUSTROM-KRAFT et al., 2016; NIEDERWERDER et al., 2016). HENNINGER und SCHWARZ (2014) beschreiben ein Abklingen des klinischen Erscheinungsbildes nach acht Tagen und die Tiergruppe ist nach 14 Tagen wieder unauffällig.

6. Pathologie

Als Alphacoronavirus hat PEDV eine hohe Affinität zu den Epithelzellen des Gastrointestinaltrakts (KÖNIG & THIEL, 2015). Primär befällt das Virus Enterozyten des Dünndarms, vorwiegend im Jejunum und Ileum (DE BOUCK et al., 1981; HUANG et al., 2013), es kann aber auch in Dickdarmepithelzellen nachgewiesen werden (STEVENSON et al., 2013; JUNG et al., 2014; STADLER et al., 2015). Dünndarmepithelzellen von Schweinen weisen einen hohen Anteil an Aminopeptidase N (APN), ein glykoyliertes Transmembranprotein, auf, über das PEDV an die Epithelzellen bindet und diese infiziert (LI et al., 2007). Während der Inkubationszeit können 30-50 % der Epithelzellen mit PEDV infiziert sein und das Virus kann bereits ausgeschieden werden, obwohl die Tiere noch asymptomatisch sind (DE BOUCK et al., 1981). Bereits 12 bis 18 Stunden nach experimenteller Infektion sind erste Darmepithelzellen infiziert (PENSAERT, 1989). Während der ersten 24 bis 60 Stunden nach der Infektion kann ein mittelgradiger bis hochgradiger Anteil an PEDV-positiven Enterozyten im ganzen Darm nachgewiesen werden (DE BOUCK et al., 1981). In einem späteren Stadium (> 72 Stunden) sind noch einzelne infizierte Enterozyten nachweisbar, was auf eine Reinfektion nachgebildeter Enterozyten hinweist (DE BOUCK et al., 1981).

Infizierte Darmepithelzellen werden zerstört und es kann zusätzlich kann zur Abschilferung der Zellen ins Darmlumen kommen (DE BOUCK et al., 1981). Neben einer Malabsorption durch die Zottenatrophie kommt es außerdem zu einer

Maldigestion durch die gestörte Funktion der infizierten Enterozyten (DE BOUCK et al., 1981; JUNG et al., 2006). Die Aktivität membrangebundener Enzyme wie der Alkalischen Phosphatase, Laktase und Maltase, die als Indikatoren für Schäden an der Dünndarmschleimhaut herangezogen werden, ist bei PEDV-Infektionen reduziert (JUNG et al., 2006). Bei akuten PEDV-Infektionen kommt es, wie bei TGE, zur Hyperkaliämie und Azidose, Hypernatriämie und Hyperchlorämie mit niedrigem Kalzium und niedrigem Bikarbonatspiegel (JUNG & SAIF, 2015). Die verminderte Darmintegrität (SCHWEER et al., 2016) und das Erbrechen verstärken die Dehydratation zusätzlich.

6.1. Makroskopische Läsionen

Makroskopische Veränderungen bei PED sind auf den Magen-Darm-Trakt beschränkt (STADLER et al., 2015). Die Dünndarmwand ist dünn, durchscheinend und der Darm ist mit gelblich-wässrigem Inhalt gefüllt (DE BOUCK et al., 1981; SUEYOSHI et al., 1995; STEVENSON et al., 2013). Der Magen ist aufgebläht und dünnwandig (SUEYOSHI et al., 1995) und mehr oder weniger mit geronnener Milch gefüllt (JUNG et al., 2014). Mesenteriale Gefäße können gestaut sein und die mesenterialen Lymphknoten sind teilweise ödematös (JUNG et al., 2014). Durch die drei bis fünf Tage andauernde Inappetenz kümmern die Tiere vermehrt (JUNG et al., 2014).

6.2. Histologische Veränderungen

Während der Inkubationszeit sind bereits Enterozyten infiziert, ohne dass Veränderungen in der Zottenlänge sichtbar sind (DE BOUCK et al., 1981). Ein bis drei Tage nach dem Einsetzen der Symptome zeigt sich eine deutliche Verkürzung der Zotten (JUNG et al., 2014) und eine Zottenfusion, wobei das Zotten-Krypten-Verhältnis 1:1 beträgt (SUEYOSHI et al., 1995; STEVENSON et al., 2013). Die Lamina propria ist mit Entzündungszellen infiltriert: CD4+ und CD8+ T-Zellen, mononukleäre Zellen, eosinophile und neutrophile Granulozyten können 30 bis 120 Stunden nach der Infektion in der Lamina propria des Dünndarms nachgewiesen werden (DE BOUCK et al., 1981; COUSSEMENT et al., 1982; SUEYOSHI et al., 1995). Eine akute, diffuse, schwere atrophische

Enteritis und geringgradige Vakuolation der Oberflächenepithelzellen sowie ein subepitheliales Ödem tritt vor allem im Jejunum und Ileum auf, wird aber auch im Caecum und Colon beobachtet (DE BOUCK et al., 1981; COUSSEMENT et al., 1982; SUEYOSHI et al., 1995; JUNG et al., 2014).

7. Immunreaktion

Wenn die Infektion nicht durch andere Faktoren verkompliziert wird, erholen sich die Tiere nach sieben bis zehn Tagen (POSPISCHIL et al., 2002; MADSON et al., 2014). Unter experimentellen Bedingungen sind zu diesem Zeitpunkt virusneutralisierende Antikörper vorhanden (MADSON et al., 2014) und Serumantikörper sind mittels ELISA nachweisbar (ARRIBA et al., 2002).

7.1. Antikörper

Nach experimenteller Infektion mit dem US-Prototyp-PEDV werden neutralisierende Antikörper im Virusneutralisationstest ab 7 bis 14 Tagen nach Infektion nachgewiesen (THOMAS et al., 2015a). Ihre Konzentration erreicht nach 21 Tagen ihre maximale Höhe (THOMAS et al., 2015a). Bei Sauen sind neutralisierende Antikörper für mindestens sechs Monate nachweisbar (OUYANG et al., 2015). Der Nachweis von Immunglobulinen G (IgG) gelingt neun Tage nach experimenteller Infektion mit PEDV und die Menge an IgG ist 21 Tage nach der Infektion am größten (OKDA et al., 2015). Bei darmpathogenen Erregern korreliert eine Immunität nicht immer mit dem Auftreten von Serumantikörpern, da vor allem die Schleimhautimmunität eine wichtige Rolle beim Schutz vor enteralen Erkrankungen spielt (SAIF et al., 2012).

7.2. Laktogene Immunität

Neugeborene Saugferkel können durch maternale Antikörper, die sie über das Kolostrum und die Sauenmilch aufnehmen, vor verschiedenen Pathogenen geschützt werden (BANDRICK et al., 2014). Es kann gezeigt werden, dass nach einer vorherigen Exposition der Sauen mit PEDV der Schweregrad der Erkrankung bei den Saugferkeln geringer ist (GOEDE et al., 2015). Hohe

Antikörperspiegel im Kolostrum und in der Milch der Sauen können durch Kontakt mit Feldviren oder durch eine Impfung erreicht werden (KWEON et al., 1999; SONG et al., 2007; GERBER et al., 2014a). Die Saugferkel sind bei PED durch die aufgenommenen Immunglobuline für 4 bis 13 Tage geschützt, wobei die Dauer der Immunität von der Höhe der Antikörperkonzentration der Muttertiere abhängig ist (DEARRIBA et al., 1995). Untersuchungen zur laktogenen Immunität bei TGE zeigen, dass eine passive Immunität an die Saugferkel übertragen wird und die Ferkel durch Immunglobuline A (IgA) im Kolostrum bzw. in der Milch geschützt sind, solange sie säugen (SAIF et al., 1972). Bei Rotavirusinfektionen scheint die Morbidität und Mortalität bei Saugferkeln im Allgemeinen geringer zu sein, wenn die Ferkel passiv über das Kolostrum und die Muttermilch immunisiert werden (BOHL, 1978). Dabei scheinen IgA einen größeren virusneutralisierenden Effekt zu haben als IgG, da sie resistenter gegen Proteolyse im Magen-Darm-Trakt sind (OFFIT & CLARK, 1985). Im Serum der Sauen sowie im Kolostrum findet man vor allem IgG, wohingegen in der Sauenmilch hauptsächlich IgA zu finden sind (CURTIS & BOURNE, 1971). Alle Antikörper im Kolostrum stammen aus dem Serum, sodass die Menge an Serumantikörpern ein guter Indikator für die Menge an Kolostrumantikörper darstellt (BOURNE & CURTIS, 1973). Anhand der Messung von Serumantikörpern der Sauen kann so die Herdenimmunität überprüft werden (CLEMENT et al., 2016).

7.3. Kreuzprotektivität

Die Infektion mit S INDEL-PEDV führt zu einem partiellen Schutz gegen Prototyp-Stämme (LIN et al., 2015a). GOEDE et al. (2015) können zeigen, dass Sauen, die eine S INDEL-Infektion durchgemacht haben, ihre Ferkel zwar nicht gegen eine Infektion mit Prototyp-Stämmen schützen können, aber die klinischen Anzeichen und die Mortalität verringert sind. In China kommt es bei Saugferkeln von geimpften (CV777-Totimpfstoff) Muttertieren zu PED-Ausbrüchen, jedoch mit weniger ausgeprägtem klinischen Erscheinungsbild und geringerer Mortalität als bei Ferkeln von ungeimpften Muttersauen (LI et al., 2012; SUN et al., 2012).

8. Therapie und Prophylaxe

Es steht derzeit keine spezifische Therapie gegen PEDV zur Verfügung (EFSA, 2014). Der Bestand muss daher durch eine gute externe und interne Biosicherheit vor dem Eintrag von PEDV geschützt werden (PURANAVEJA et al., 2009; WANG et al., 2014b). Bei infizierten Beständen ist die Unterbrechung von Infektionsketten entscheidend, um die Ausbreitung innerhalb des Bestandes zu verhindern (MADEC & WADDILOVE, 2002; FARZAN et al., 2006; WILLIAMSON et al., 2013). Insbesondere im Abferkelbereich sind diese Maßnahmen von großer Bedeutung, da die Infektionsdosis bei Saugferkeln niedriger ist als bei Aufzuchtferkeln (THOMAS et al., 2015a).

8.1. Therapie

Für die Therapie von PED gelten entsprechende Empfehlungen wie für TGE: die Umgebungstemperatur sollte angehoben werden und es muss eine ausreichende Wasserversorgung der Tiere gewährleistet sein (WENDT et al., 2013). Orale Rehydratationslösungen können den Grad der Exsikkose und der metabolischen Azidose mindern (DROLET et al., 1985). Je nach Ausmaß der Epithelzerstörung kann die Resorption von Glukose aus dem Darm stark reduziert oder kaum mehr möglich sein, wodurch Glukose in den Dickdarm gelangt und zu einer osmotischen Diarrhoe führt (SCHARRER, 1986). Aufgrund der gestörten Resorption kann eine parenterale Gabe von Elektrolyten und Glukose sinnvoll sein (WENDT et al., 2013).

8.2. Prophylaxe

In einer Studie aus den USA kann gezeigt werden, dass die Morbidität und Mortalität bei Saugferkeln von Sauen mit vorherigem Kontakt zu PEDV geringer ist, als bei Ferkeln von naiven Sauen (GOEDE et al., 2015). Durch den Kontakt zu Kot von infizierten Ferkeln (Kontaktsuppe, feedback exposure) kann die laktogene Immunität der tragenden Sauen stimuliert werden (SAIF et al., 2012; CLEMENT et al., 2016). Eine Impfung der Sauen sechs und drei Wochen vor der Geburt stimuliert ebenfalls die laktogene Immunität und kann die Saugferkelmortalität reduzieren (BAEK et al., 2016). Bislang sind auf dem

europäischen Markt, im Gegensatz zu dem asiatischen und US-amerikanischen Markt, keine Impfstoffe gegen PEDV zugelassen (PEI, 2017).

9. Diagnostik

Anhand des klinischen Erscheinungsbildes kann eine Verdachtsdiagnose gestellt werden, die durch geeignete Laboruntersuchungen abzuklären ist (BEER & HAAS, 2015). Andere differentialdiagnostisch in Frage kommende Durchfallerreger für die entsprechenden Altersgruppen müssen durch geeignete Untersuchungen abgeklärt werden (WENDT et al., 2013).

9.1. Direkter Nachweis

Durch den direkten Erregernachweis von PEDV oder dessen Bestandteile, wie der RNA oder einzelner Proteine, kann der klinische Verdacht von PED in der akuten Phase der Infektion bestätigt werden (BEER & HAAS, 2015). PEDV wird mit allen Se- und Exkreten ausgeschieden: In Kotproben (PENSAERT & DE BOUCK, 1978), Darmgewebe (DE BOUCK et al., 1981), Speichel (BJUSTROM-KRAFT et al., 2016), Milch (SUN et al., 2012) und Sperma (SUN et al., 2014a) kann das Virus nachgewiesen werden.

Im Transmissionselektronenmikroskop stellen sich PED-Viren, wie für Coronaviren typisch, als behüllte, pleomorphe Viren mit keulenförmigen Projektionen dar (PENSAERT & DE BOUCK, 1978). Eine Abgrenzung von PEDV gegenüber TGEV und anderen Coronaviren ist nicht möglich (OKANIWA et al., 1968). Die kulturelle Anzucht von PEDV aus Darminhalt ist in der Zellkultur mit Vero-Zellen unter Zusatz von Trypsin möglich, jedoch schwierig und weist nur eine geringe diagnostische Sensitivität auf (HOFMANN & WYLER, 1989; CHEN et al., 2014). In fixierten Darmgewebeschnitten kann PEDV mittels Immunfluoreszenztest (IF) (DE BOUCK et al., 1981), Immunhistochemie (IHC) (GUSCETTI et al., 1998) und In-situ-Hybridisierung (ISH) (KIM & CHAE, 2000) nachgewiesen werden. Des Weiteren sind Sandwich-Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) zum Nachweis von PEDV aus Kotproben beschrieben (CALLEBAUT et al., 1982; CARVAJAL et al., 1995b).

PCR

Bei der Polymerasekettenreaktion (Polymerase chain reaction, PCR) wird im Untersuchungsmaterial enthaltene DNA *in vitro* vervielfältigt (MULLIS & FALOONA, 1987). Für den Nachweis von RNA-Viren muss die virale RNA durch eine Reverse Transkriptase in einem ersten Schritt in Copy-DNA (cDNA) umgeschrieben werden (Reverse-Transkriptase-PCR, RT-PCR) (BEER & HAAS, 2015). Anschließend werden die Amplifikate mittels Agarose-Gelelektrophorese dargestellt (BEER & HAAS, 2015). Bei der Real-Time-RT-PCR ist es bereits während der laufenden Untersuchung möglich, die entstandenen Amplifikate mittels Fluoreszenzmessung nachzuweisen (MACKAY et al., 2002). Dabei gibt der Ct-Wert (threshold cycle, Ct) den Zyklus an, bei dem der Amplifikationsgraph der Probe den berechneten Fluoreszenzschwellenwert kreuzt (BEER & HAAS, 2015).

Für den Nachweis von PEDV ist die PCR die Methode der Wahl (KIM et al., 2007; WANG et al., 2014b; ZHAO et al., 2016). Der Virusnachweis ist aus verschiedenen Probenmaterialien möglich und kann für unterschiedliche Fragestellungen eingesetzt werden: Sowohl native Kotproben und Rektaltupfer (KIM et al., 2007), Darmgewebeproben (CHEN et al., 2014; JUNG & SAIF, 2015) sowie Speichelproben (BJUSTROM-KRAFT et al., 2016) eignen sich als Untersuchungsmaterial von Tieren mit akuten klinischen Anzeichen. Zur Überprüfung möglicher Eintragsquellen kann die PCR aus Futterproben durchgeführt werden (DEE et al., 2014; GERBER et al., 2014b; PASICK et al., 2014; BOWMAN et al., 2015). Im Gegensatz zu anderen beschriebenen Methoden zum direkten Nachweis von PEDV, ist die PCR eine Methode, die auch bei hohem Probendurchsatz schnelle, sensitive und spezifische Ergebnisse liefert (DIEL et al., 2016). Die Ergebnisse liegen bei einem Real-Time-RT-PCR-Ansatz innerhalb von ca. drei Stunden vor (KIM et al., 2007). KIM und CHAE (2002) können zeigen, dass die PCR verglichen mit IF und ISH eine sehr sensitive Methode ist. KIM et al. (2007) geben ein Detektionslimit ihrer Real-Time-RT-PCR von 7×10^1 Genomkopien an. Die Spezifität der PCR ist von den verwendeten Primern abhängig (BEER & HAAS, 2015). Mit Primern für das stark konservierte Gen der RNA-abhängigen-RNA-Polymerase können z. B. Coronaviren verschiedener Genera detektiert werden (LELLI et al., 2013). Werden Primer für Genomabschnitte mit einer höheren Variabilität verwendet, ist

es möglich, zwischen verschiedenen Stämmen zu differenzieren (OKA et al., 2014; WANG et al., 2014a). In der S1-Domäne des ORF S von PEDV befinden sich die charakteristischen Mutationen bei S INDEL-Stämmen (VLASOVA et al., 2014). Daher ist es möglich mit Primern, die spezifisch für diesen Bereich sind, zwischen Prototyp-Stämmen und S INDEL-Stämmen zu unterscheiden (WANG et al., 2014b). Außer der S1-Domäne scheinen die ORFs der anderen Strukturproteine (S2, M, N, E) sehr konservierte Bereiche des PEDV Genoms zu sein (JARVIS et al., 2016). So lassen sich mit Primern für diese Genomabschnitte verschiedene PEDV-Stämme detektieren (ISHIKAWA et al., 1997; KWEON et al., 1997; KIM et al., 2007). Bei der Interpretation der Ergebnisse muss beachtet werden, dass virale RNA detektiert wird, aber keine Aussage über die Infektiosität der Virus gemacht werden kann, da auch Genomfragmente zu einer positiven PCR-Reaktion führen (CRAWFORD et al., 2015; DIEL et al., 2016).

9.2. Indirekter Nachweis

Der indirekte Nachweis von PEDV beruht auf dem Nachweis von PEDV-spezifischen Antikörpern (HAAS & BEER, 2015). Mit serologischen Tests können Antikörper in Serum (GERBER et al., 2016b; STRANDBYGAARD et al., 2016), Kolostrum (GERBER et al., 2014a), Milch (DEARRIBA et al., 1995; CLEMENT et al., 2016), Kot (GERBER & OPRIESSNIG, 2015) und Speichel (BJUSTROM-KRAFT et al., 2016) nachgewiesen werden. Sie werden eingesetzt, um eine Antikörperbildung nach Infektion, eine frühere Exposition oder die Effektivität von Impfungen zu überprüfen (GERBER et al., 2014a; MADSON et al., 2014; OKDA et al., 2015; BJUSTROM-KRAFT et al., 2016). Zum Nachweis von PEDV-spezifischen Antikörpern werden vor allem indirekte ELISAs (HOFMANN & WYLER, 1990; HOU et al., 2007; GERBER et al., 2014a; FAN et al., 2015; GERBER & OPRIESSNIG, 2015; OKDA et al., 2015) und kompetitive ELISAs (CARVAJAL et al., 1995b; OKDA et al., 2015) verwendet. Andere Methoden zum Nachweis von Antikörpern gegen PEDV sind der indirekte Fluoreszenzantikörpertest (indirect fluorescent antibody assay, IFA) (MADSON et al., 2014; THOMAS et al., 2015a), der Virusneutralisationstest (VN) (OKDA et al., 2015), die FFN (fluorescent focus neutralisation) (OKDA et al., 2015; THOMAS et al., 2015a) sowie der FMIA (fluorescent microsphere immunoassay) (OKDA et al., 2015).

Indirekter ELISA

ELISAs zum Nachweis von Antikörpern werden in der Routinediagnostik eingesetzt, da durch die Automatisierung große Probenmengen untersucht werden können (HAAS & BEER, 2015). Die zu untersuchende Probe wird auf eine Mikrotiterplatte aufgebracht, auf der das Virus oder ein virales Protein (Antigen) fixiert sind. Sind passende Antikörper im Untersuchungsmaterial vorhanden, binden diese an die Antigene auf der Platte. Es entsteht ein Antigen-Antikörper-Komplex (HAAS & BEER, 2015). Nach einem Waschschritt wird ein Sekundärantikörper, der gegen die Immunglobuline aus der Probe gerichtet ist, hinzugegeben (HAAS & BEER, 2015). An diese Antikörper ist ein Enzym gebunden (HAAS & BEER, 2015). Nach einem weiteren Waschschritt wird ein Substrat hinzugegeben, das durch das Enzym umgesetzt wird, wodurch es zum Farbumschlag kommt (HAAS & BEER, 2015). Die Intensität des Farbumschlags ist abhängig von der Menge des umgesetzten Substrats und somit von der Antikörpermenge in der Probe (HAAS & BEER, 2015).

HOFMANN und WYLER (1990) verwenden das komplette PED-Virus aus Zellkulturen als Antigen für den ersten ELISA zum Nachweis von Antikörpern gegen PEDV. Einzelne Proteine von PEDV, die von Bakterien exprimiert werden, können ebenfalls als Antigen für ELISAs dienen; so sind ELISAs basierend auf einem rekombinanten N-Protein von PEDV beschrieben (HOU et al., 2007; OKDA et al., 2015), während andere ein rekombinantes S-Protein (LI et al., 2015) bzw. die S1-Untereinheit verwenden (GERBER et al., 2014a; GERBER & OPRIESSNIG, 2015).

III. MATERIAL UND METHODEN

1. Anzeige des Tierversuchsvorhabens

Das Tierversuchsvorhaben wurde nach § 8 Abs. 7 Satz 1 Nr. 2 des Tierschutzgesetzes beim zuständigen Regierungspräsidium Stuttgart angezeigt und wird dort mit dem Zeichen 35-9185.82/0342 geführt.

2. Ziel der Untersuchung

In dieser Feldstudie wurden Schweine auf zwei Mastbetrieben und auf einem Ferkelerzeugerbetrieb mit angeschlossener Teilmast in Süddeutschland von Februar bis Juni 2016 untersucht. Auf diesen Betrieben war PED bislang nicht aufgetreten. Es wurden jeweils 35 Mastschweine bzw. Saugferkel nach einer natürlichen PED-Infektion eingeschlossen und über 63 bzw. 105 Tage beprobt. An sechs bzw. acht Beprobungszeitpunkten wurden individuelle Kotproben mittels Real-Time-RT-PCR auf PEDV-RNA untersucht. Das Vorhandensein von PEDV-spezifischen IgG in den Serumproben wurde mittels zweier ELISAs überprüft.

Die Daten dieser Feldstudie zur Detektion von PEDV-RNA in Kotproben und zum Verlauf der Serumantikörper nach einer Infektion sollen neue Einblicke in die Infektionsdynamik eines akuten S INDEL-PED-Ausbruches verschaffen. Die Ergebnisse aus unterschiedlichen Altersgruppen tragen dazu bei, die zur Verfügung stehenden diagnostischen Tests in unterschiedlichen Situationen interpretieren zu können. Feldstudien liefern hierzu wichtige Daten, da die Schweine diversen Faktoren ausgesetzt sind, die in experimentellen Versuchen nur schwer nachgestellt werden können.

3. Versuchsaufbau

3.1. Studienbetriebe

Unmittelbar nach dem Auftreten von Durchfall auf Betrieben, bei denen PED bislang noch nie diagnostiziert wurde, wurden Sammelkotproben der betroffenen

Tiergruppen mittels Real-Time-RT-PCR auf PEDV-RNA untersucht. Nach Bestätigung des klinischen PED-Verdachts wurden die Betriebe in die Studie eingeschlossen. Die Studie fand von Februar bis Juni 2016 auf drei süddeutschen Betrieben statt. Betriebsdaten zu den drei Studienbetrieben sind in Tabelle 1 zusammengefasst. Keiner der Betriebe impfte gegen PED, da momentan kein Impfstoff gegen PEDV in Deutschland zugelassen ist. Zwischen den drei Betrieben dieser Studie gab es keine Verbindung und es konnte kein Zusammenhang zwischen den Ausbrüchen ermittelt werden. Die Betriebe teilten kein Personal und die Mastbetriebe bezogen Ferkel aus unterschiedlicher Herkunft. Die Entfernung zwischen Betrieb 1 und Betrieb 3 betrug 6 km, während Betrieb 2 ca. 60 km von den anderen Betrieben entfernt war.

Tabelle 1: Betriebsdaten der drei Studienbetriebe

	Betrieb 1	**Betrieb 2**	**Betrieb 3**	
Produktionsart	Mastbetrieb	Mastbetrieb	Ferkelerzeuger mit angeschlossener Teilmast	
Größe	780 Plätze	2500 Plätze	170 Sauen	
Aufstallung	Vollspalten	Vollspalten	Abferkelabteile	konventionelle Abferkelbuchten mit Kastenstand
			Ferkelaufzucht	Plastikvollspalten-boden
			Maststall	Teilspaltenboden mit Auslauf
Management	Rein-Raus	Rein-Raus	Abferkelabteile	Rein-Raus
			Ferkelaufzucht	Rein-Raus
			Maststall	kontinuierliche Belegung

Bei Betrieb 1 handelte es sich um einen konventionellen Mastbetrieb mit 780 Mastplätzen, die mit Schweinen aus einer Herkunft (BW-Hybrid x Piétrain) abteilweise im Rein-Raus-Verfahren belegt wurden. Die Schweine wurden in Buchten zu je 17 Tieren auf Betonvollspalten gehalten und erhielten eine ihrem Alter entsprechende Futterration über Breiautomaten im Tier-Fressplatzverhältnis 4:1. Wasser stand den Tieren jederzeit *ad libitum* über Nippeltränken zur Verfügung.

Bei Betrieb 2 handelte es sich um einen konventionellen Mastbetrieb mit 2500 Mastplätzen. Die Abteile wurden im Rein-Raus-Verfahren mit Schweinen aus einer Herkunft (Topigs) belegt. Die Schweine waren in Gruppen zu 15 Tieren pro Bucht auf Vollspaltenboden aus Beton aufgestallt und erhielten eine ausgewogene Futterration über einen Längstrog mit einem 1:1 Tier-Fressplatz Verhältnis und Wasser *ad libitum* über Nippeltränken.

Bei Betrieb 3 handelte es sich um einen Ferkelerzeuger mit angeschlossener Teilmast, der mit 170 Sauen im Drei-Wochen-Rhythmus produziert (Schwäbisch Hällische x Piétrain). Im Abferkelstall waren die Sauen und ihre Ferkel in konventionellen Abferkelbuchten mit Kastenständen untergebracht. Den Ferkeln stand ein Ferkelnest mit Fußbodenheizung und Rotlichtlampe zur Verfügung. Nach einer vierwöchigen Säugezeit wurden die Ferkel in der Ferkelaufzucht auf Plastikvollspaltenboden gehalten. Die Abteile wurden im Rein-Raus-Verfahren belegt. Im Maststall wurden die Schweine in Buchten mit Teilspaltenboden und eingestreuter Festfläche gehalten, wobei jede Bucht über einen Außenbereich mit Rüssel-zu-Rüsselkontakt zu den Nachbarbuchten verfügt. Der Maststall wurde kontinuierlich buchtenweise belegt.

Auf den beiden Mastbetrieben (Betrieb 1 und 2) wurden die Studientiere für die Dauer der Studie nicht umgestallt und es wurden keine anderen Tiere in die Abteile dazugestallt. Es wurde streng auf Hygiene geachtet; so wurden separate Stiefel beim Betreten des Abteils getragen und beim Betriebsdurchgang wurden die betroffenen Abteile als letztes betreten. Während des Studienzeitraumes waren bei Betrieb 1 alle Abteile von Durchfall betroffen, wohingegen auf Betrieb 2 nur die Schweine in sechs der sieben Abteile von Durchfall betroffen waren. Die Stallabteile wurden jeweils nach Ausstallung der Tiere mit einem Desinfektionsmittel mit Wirkungsspektrum gegen behüllte Viren (DVG, 2016) desinfiziert. Die anschließend in diese Abteile eingestallten Tiere zeigten keinen Durchfall, bei dem PEDV nachgewiesen werden konnte.

Bei Betrieb 3 waren der Abferkelbereich, der Wartestall und die Ferkelaufzucht gleichzeitig von Durchfall betroffen. Im 300 Meter entfernten Maststall kam es zum PED-Ausbruch, als 14 Tage nach dem Ausbruch rekonvaleszente Ferkeln aus der Ferkelaufzucht eingestallt wurden. Die Infektion breitete sich dort dann von Bucht zu Bucht aus. Die Studientiere wurden an den ersten drei Beprobungen im Abferkelstall beprobt. Die nächsten drei Beprobungen erfolgten in der

Ferkelaufzucht und bei den letzten beiden Beprobungen befanden sich die Tiere im Maststall.

3.2. Beprobungszeitpunkte

Der Abstand zwischen dem Auftreten der ersten klinischen Anzeichen in der Tiergruppe und dem ersten Beprobungstag ist in Tabelle 2 dargestellt. Der Tag der ersten Probenentnahme wird nachfolgend für alle Betriebe Tag 0 genannt. Anschließend erfolgte die Beprobung in ein- bis dreiwöchigem Intervall. Alle Studientiere wurden an Tag 7, 14, 28, 42 und 63 beprobt; auf Betrieb 3 wurde zusätzlich an Tag 84 und 105 beprobt (Abbildung 1). Zu allen Zeitpunkten wurden von den Studientieren individuelle Kotproben (Mastschweine) bzw. Kottupfer (Saugferkel) und Blutproben gewonnen.

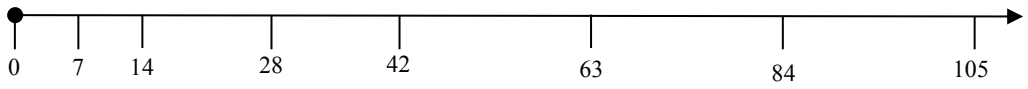

Abbildung 1: Beprobungszeitpunkte Tag 0 bis Tag 105

3.3. Studientiere

In die Studie wurden an Tag 0 insgesamt 105 Tiere auf drei Betrieben eingeschlossen. Pro Betrieb wurden 35 Tiere aus einer Altersgruppe (Tabelle 2) mit Durchfall ausgewählt und in den Versuch eingeschlossen. Die Mastschweine auf Betrieb 1 und 2 hatten ein durchschnittliches Körpergewicht von 35 kg. Auf Betrieb 3 wurden Saugferkel im Alter von einer Woche aus einem Abferkelabteil in die Studie eingeschlossen. Die Ferkel stammten aus insgesamt fünf Würfen; es befanden sich darunter keine Ferkel von Jungsauen. Am Tag des Einschlusses (Tag 0) wurden von den Muttersauen dieser Würfe ebenfalls Kotproben und Blutproben gewonnen. Es wurden ausschließlich Tiere mit Durchfall eingeschlossen. Die Studientiere erhielten auf ihrer Bestandsohrmarke eine Kennzeichnung zur individuellen Identifikation.

Tabelle 2: Alter der eingeschlossenen und Anzahl der ausgewerteten Studientiere, sowie die Tage zwischen dem ersten Auftreten von Durchfall in der Tiergruppe und der ersten Beprobung

	Studientiere	ausgewertete Tiere (n)	Tage von erstem Durchfall bis zur ersten Beprobung (Tag 0)
Betrieb 1	Mastschweine (ca. 35 kg)	34	4
Betrieb 2	Mastschweine (ca. 35 kg)	35	3
Betrieb 3	Saugferkel, eine Woche alt, aus 5 Würfen	34 (Tag 0-Tag 42)	2
		31 (Tag 63-Tag 105)	
	Sauen	5 (Tag 0)	

Tabelle 2 zeigt eine Übersicht über die eingeschlossenen und ausgewerteten Tiere. Auf Betrieb 1 konnten 34 der 35 Tiere ausgewertet werden. Ein Tier war zwischen Tag 14 und 28 verendet, ohne dass ein Zusammenhang zwischen dem Verenden und der PEDV-Infektion vermutet werden konnte. Von Betrieb 2 konnten alle 35 Tiere ausgewertet werden. Auf Betrieb 3 gingen 34 der 35 Studientiere bis einschließlich Tag 42 in die Auswertung ein, ab Tag 63 wurden 31 Tiere ausgewertet. Ein Tier war zwischen Tag 0 und Tag 7 erdrückt worden, ein Tier verendete im Ferkelaufzuchtstall nach Tag 42 und zwei Tiere wurden zwischen Tag 42 und Tag 63 verkauft. Generell war die Mortalität auf den einzelnen Betrieben während und nach des PED-Ausbruches nicht erhöht im Vergleich zu vorher.

3.4. Kotproben

Es wurden individuelle Kotproben von jedem Studientier entnommen. Bei den Saugferkeln wurde ein Trockentupfer (Abstrichbesteck, Fa. Heinz Herenz, Hamburg, Deutschland) rektal entnommen. Bei Mastschweinen wurde eine frisch abgesetzte Kotprobe bzw. Kot aus dem Rektum entnommen und in einem Kotgefäß mit Schraubverschluss aufbewahrt. Um Kreuzkontaminationen zu vermeiden, wurden nach jedem Studientier die Einmalhandschuhe gewechselt. Die Probengefäße und Trockentupfer wurden mit einem wasserfesten Stift mit der

Tiernummer und dem Probentag beschriftet und bis zur weiteren Diagnostik bei -20°C asserviert. Vor der Durchführung der molekularbiologischen Diagnostik wurden ca. 0,5 ml der aufgetauten Kotprobe mit 0,5-1,5 ml phosphatgepufferter Salzlösung (PBS), je nach Konsistenz, suspendiert. Kottupfer wurden in 1,5 ml PBS für 30 Minuten inkubiert. Die Suspensionen wurden anschließend mittels Vortexmischer homogenisiert und 2 Minuten bei 6000 g zentrifugiert, um den fäkalen Debris zu sedimentieren. Es wurden mindestens 500 µl des partikelfreien Überstandes in ein Eppendorf-Gefäß überführt und bis zur Analyse am darauffolgenden Tag bei +4°C aufbewahrt.

3.5. Blutproben

Zur Blutentnahme wurde bei Saugferkel die *Vena cava cranialis* punktiert. Dazu wurden die Ferkel durch eine Hilfsperson in Rückenlage fixiert. Bei Absetzferkeln, Mastschweinen und Sauen erfolgte die Blutentnahme am stehenden Tier aus der *Vena jugularis externa*. Die Tiere wurden mit Hilfe einer Oberkieferschlinge kurzzeitig fixiert. Für die Blutentnahme wurden Primavetten (Sarstedt, Nürmbrecht, Deutschland) und sterile Einmalkanülen (Sterican®, Braun Medical AG, Emmenbrücke, Schweiz) in den Größen 0,8 x 40 mm (Saugferkel), 1,10 x 50 mm (Absetzferkel, Mastschweine), 1,2 x 75 mm (Endmastschweine) bzw. 1,2 x 100 mm (Supra®, Ehrhardt-Söhne GmbH, Geislingen, Deutschland) für Sauen verwendet. Die Primavetten wurden individuell mit einem wasserfesten Stift mit der Kennzeichnungsnummer des Studientieres und dem Beprobungstag beschriftet. Im Labor der Klinik für Schweine wurden die Blutproben 10 Minuten bei 2000 g in einer Zentrifuge (Rotanta 460R Zentrifuge, Andreas Hettich® GmbH & Co.KG, Tuttlingen, Deutschland) zentrifugiert und das Serum in zwei Eppendorf-Gefäße (Eppendorf® Safe-Lock Tubes 2,0 ml, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) aufgeteilt, individuell mit einem wasserfesten Stift beschriftet und bis zur weiteren Untersuchung bei -20°C asserviert.

4. Labordiagnostik

4.1. PCR

Die Kotproben und Rektaltupfer wurden molekularbiologisch am Institut für Infektionsmedizin und Zoonosen der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München mittels Real-Time-RT-PCR auf PEDV untersucht. Die Extraktion der viralen RNA erfolgte aus 100 µl des gewonnenen Überstandes der Proben (siehe 3.4) unter Verwendung eines Microlab® STARLet Pipettierautomaten (Hamilton Robotics GmbH, Martinsried, Deutschland) mit einem kommerziellen RNA Extraktions-Kit (NucleoSpin® Virus Core Kit, Macherey-Nagel GmbH Co. KG, Düren, Deutschland) nach Herstellerangaben.

Eine TaqMan-PCR nach KIM et al. (2007) wurde zur Detektion von PEDV-RNA durchgeführt. Die ursprüngliche PCR wurde leicht modifiziert, indem ein zweiter Forward-Primer (F2) beigefügt wurde. Die Primer- und Sondensequenzen, basierend auf den Nukleotidsequenzen des ORFs des N-Gens, sind in Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 3: Verwendete Primer für modifizierte PCR nach Kim et al. (2007)

Name	Sequenz	Konzentration
Primer F1	5‘-CGC AAA GAC TGA ACC CAC TAA TTT-3‘	500 nM
Primer F2	5‘-CGC AAA GAC TGA ACC CAC TAA CCT-3‘	500 nM
Primer R	5‘-TTG CCT CTG TTG TTA CTT GGA GAT-3‘	800 nM
Sonde	5’- FAM TGT TGC CAT TGC CAC GAC TCC TGC-BHQ1-3‘	300 nM

Für die Real-Time-RT-PCR wurde ein kommerzielles PCR-Kit (QuantiTect Probe RT-PCR Kit, Qiagen, Hilden, Germany) verwendet. Die einzelnen Komponenten wurden entsprechend folgendem Protokoll (Tabelle 4) eingesetzt:

Tabelle 4: Reaktionsansatz für PEDV-PCR

Komponenten	Menge
Eluat	5 µl
PCR Mastermix	12,5 µl
RNA-freies Wasser	5,5 µl
Primer-Sonden-Mix (siehe Tabelle 4)	2 µl
Reverse Transkriptase	0,25 µl

Die Amplifizierung und Fluoreszenzmessung erfolgte in einem Stargene MX3005P (Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland) gemäß nachfolgendem Temperaturprofil (Tabelle 5):

Tabelle 5: Temperaturprofil für die PEDV-PCR

	Schritt	Dauer	Temperatur
Schritt 1 (1x)	Reverse Transkription	30 min	50 °C
	Polymeraseaktivierung	15 min	94 °C
Schritt 2 (42x)	Denaturierung	15 s	94°C
	Annealing/Extension und Messung	60 s	60°C

Nach Reverser Transkription und Polymeraseaktivierung folgten 42 Zyklen mit Denaturierung und Annealing/Extension und Messung. Ct-Werte unter 30 wurden als positiv bewertet, zwischen 30 und 40 als schwach positiv und über 40 als negativ. Jedem Durchlauf wurden eine Positivkontrolle und eine Negativkontrolle (Reaktionsansatz ohne Probenzugabe) beigefügt. Die Auswertung erfolgte mittels der Software Stratagene Mx-Pro.

4.2. Sequenzierung des ORF S

Zur Charakterisierung und zum Vergleich der PEDV-Stämme wurde der komplette ORF S einer zufälligen Probe von jedem Betrieb amplifiziert und

sequenziert. Es wurden hierfür Primer nach HUANG et al. (2013) und STEINRIGL et al. (2015) verwendet. Die aufgereinigten PCR-Produkte wurden bei Eurofins Genomic (Ebersberg, Deutschland) sequenziert.

Zum Vergleich der Sequenzen wurden die DNA STAR Lasergene (DNA STAR, Inc., Madison, USA) und die MEGA6 (Center for Evolutionary Medicine and Informatics, The Biodesign Institute, Tempe, USA) Software verwendet. Es wurde ein phylogenetischer Stammbaum (Neighbour Joining Methode, p-distance-Modell mit 1000 bootstraps) mit den drei Isolaten dieser Studie sowie 23 PEDV Referenzstämmen erstellt.

4.3. ELISA

Die Serumproben wurden auf PEDV-spezifische IgG im Labor der IVD GmbH (Seelze, Deutschland) untersucht. Dazu wurden zwei kommerziell erhältliche ELISA-Kits verwendet, die entsprechend der Herstellerangaben durchgeführt wurden. Bei beiden ELISAs handelte es sich um indirekte ELISAs, die auf einem rekombinanten N-Protein von PEDV basieren. Sie sind in der Lage, PEDV-spezifische IgG in Serumproben zu detektieren. Bei indirekten ELISAs binden die im Untersuchungsmaterial enthaltenen Antikörper an auf der Mikrotiterplatte fixierten Antigenen und werden ihrerseits von enzymmarkierten Konjugaten gebunden. Nichtgebundenes Material wird in Waschschritten entfernt. Nach Zugabe einer Enzymsubstrat-Chromogenlösung kommt es durch Umsetzung des Substrates zum Farbumschlag der Lösung. Die Intensität der Farbe ist proportional zur Menge der im Untersuchungsmaterial enthaltenen Antikörper.

4.3.1. ELISA 1

Bei dem Swinecheck® PED indirect ELISA (Biovet Inc., St-Hyacinthe, Kanada), nachfolgend ELISA 1 genannt, handelt es sich um ein kommerziell verfügbares ELISA-Kit zum Nachweis von PEDV-spezifischen IgG aus Serum von Schweinen. Die Durchführung des Tests und die Auswertung erfolgten gemäß der Anleitung des Herstellers. Für die Auswertung wird die optische Dichte (optical density, OD) der Proben sowie der Positiv- und Negativkontrollen des Reaktionsansatzes bei 450 nm gemessen. Zur Bewertung der Testergebnisse

werden die Mittelwerte der gemessenen OD der Negativkontrolle (M OD_n) und der Positivkontrolle (M OD_p) ermittelt. Nach Herstellerangaben ergibt sich das S/P Ratio aus dem Verhältnis des gemessenen OD-Wertes der Probe (OD_s), um den Mittelwert der OD der Negativkontrolle bereinigt, zum Mittelwert der OD der Positivkontrolle, ebenfalls um den Mittelwert der OD der Negativkontrolle bereinigt:

$$S/P\ Ratio = \frac{OD_s - M\ OD_n}{M\ OD_p - M\ OD_n}$$

Gemäß Gebrauchsanleitung des Herstellers gilt eine S/P Ratio von 0,4 als Cut-off-Wert. Somit werden Proben mit einer S/P Ratio ≥ 0,4 als positiv bewertet; Proben mit einer S/P Ratio < 0,4 als negativ.

4.3.2. ELISA 2

Bei dem ID Screen® PEDV indirect ELISA (ID Vet Genetics, Grabels, Frankreich), nachfolgend ELISA 2 genannt, handelt es sich um ein kommerziell erhältliches ELISA Kit zum Nachweis von PEDV-spezifischen IgG Antikörpern im Serum von Schweinen. Die Durchführung des Tests und die Auswertung erfolgten gemäß der Anleitung des Herstellers. Die Optische Dichte der Proben (OD_{sample}) sowie der Positiv- ($OD_{positive\ controle}$) und Negativkontrolle ($OD_{negative\ controle}$) wurde bei 450 nm gemessen. Für jede Probe wurde die S/P% mit folgender Formel, wie vom Hersteller angegeben, berechnet:

$$S/P\ \% = \frac{OD_{sample} - OD_{negative\ controle}}{OD_{positive\ controle} - OD_{negative\ controle}}\ x\ 100$$

Gemäß der Gebrauchsanleitung des Herstellers wurde ein Cut-off von 60 verwendet. Proben mit S/P% ≥ 60 werden als positiv bewertet. Proben mit einer S/P% < 60 werden als negativ bewertet.

5. Statistik

Die deskriptive Datenauswertung der Ergebnisse der PCR und der ELISAs sowie die Diagrammerstellung wurden mit Hilfe von Microsoft Office Excel 2010, der Statistiksoftware IBM SPSS Statistics 23.0 (IBM® SPSS Inc., Chicago, IL, USA)

sowie MedCalc Software v16.8.4 (Ostend, Belgien) durchgeführt. Für die Ergebnisse der PCR und der ELISAs wurden die Anzahl der positiven Proben insgesamt, für die jeweiligen Betriebe und die verschiedenen Würfe bestimmt. Von den S/P Ratios bzw. S/P% vom ELISA 1 und ELISA 2 wurden der Median, dessen Standardabweichung und die Maximalwerte der Studientiere der verschiedenen Betriebe bestimmt. Das einzelne Studientier stellte eine statistische Einheit dar.

Cohens Kappa (κ) wurde berechnet, um die Übereinstimmung der beiden ELISAs zu bestimmen, die über die Zufällige Übereinstimmung hinausgeht. Die Nullhypothese besagt, dass die beobachtete Übereinstimmung der zufälligen Übereinstimmung entspricht. Die Einteilung der Kappa-Werte erfolgte nach SACHS (2004) folgendermaßen eingeteilt:

< 0,10:	keine Übereinstimmung
0,10-0,40:	schwache Übereinstimmung
0,41-0,60:	deutliche Übereinstimmung
0,61-0,80:	starke Übereinstimmung
0,81-1,00:	(fast) vollständige Übereinstimmung

IV. ERGEBNISSE

In der vorliegenden Studie wurden insgesamt 105 Schweine aus drei Betrieben eingeschlossen. Von allen Studientieren wurden an Tag 0, 7, 14, 28, 42 und 63 individuelle Kotproben und Blutproben entnommen. Die Studientiere aus dem Betrieb 3 wurden zusätzlich an Tag 84 und 105 beprobt. Insgesamt wurden 103 Tiere ausgewertet. Es konnten 34 der 35 Mastschweine aus dem Betrieb 1 und alle 35 Mastschweine aus Betrieb 2 ausgewertet werden. Von den 35 eingeschlossenen Saugferkeln aus dem Betrieb 3 konnten 34 Tiere bis einschließlich Tag 42 ausgewertet werden. Anschließend konnten 31 dieser Tiere bis Tag 105 weiterverfolgt werden.

1. Klinische Beobachtung

An Tag 0 betrug die Morbidität sowohl bei Mastschweinen (Betrieb 1 und 2) als auch bei Saugferkeln (Betrieb 3) nahezu 100 % in der untersuchten Altersgruppe. Alle Studientiere zeigten gering- bis hochgradigen Durchfall von pastöser bis wässriger Konsistenz ohne Blut- oder Schleimbeimengungen. Bei den Mastschweinen (Betrieb 1 und 2) trat vereinzelt Erbrechen auf und die Futteraufnahme war reduziert. Auf Betrieb 3 konnte im Abferkelstall in jeder Abferkelbucht Erbrechen bei einzelnen Saugferkeln und den Sauen beobachtet werden. Zusätzlich war die Futteraufnahme bei den laktierenden Sauen stark reduziert. Da einige Sauen an Postpartalem Dysgalaktie-Syndrom (PPDS) erkrankt waren, wurde den Saugferkeln mehrmals täglich Elektrolytlösung und Milchaustauscher angeboten. Todesfälle traten nicht vermehrt auf.

2. Sequenzierung des ORF S

Die Sequenzen des ORF S der Isolate aus den drei Betrieben sind bei der NCBI Gen Bank hinterlegt und werden unter den Registriernummern KY305287, KY305288 und KY305289 geführt. Die Sequenzhomologie der Isolate betrug 99,8-99,9 % auf Nukleotidbasis und die Sequenzen der ORF S enthielten die bei VLASOVA et al. (2014) beschriebenen S INDEL-PEDV-typischen Insertionen

(ORF S nn 460-465) und Deletionen (ORF S nn 166/167, 174/175 und 416/417). In Abbildung 2 sind die Verwandtschaftsgrade dieser Isolate zu 23 publizierten PEDV-Stämmen dargestellt. Der ursprüngliche europäische PEDV-Stamm (CV777) zeigte nur 95,0-95,2 % Übereinstimmung mit Isolaten dieser Studie und die Sequenzen der retrospektiv in England isolierten PEDV-Stämme (STEINBACH et al., 2016) stimmten zu 91,8 % überein. Die ORF S Sequenzen der vorliegenden Studie weisen im Vergleich zu S INDEL-Stämmen aus den USA (OKA et al., 2014; VLASOVA et al., 2014; WANG et al., 2014a), Belgien (THEUNS et al., 2015), Österreich (STEINRIGL et al., 2015), Slowenien (TOPLAK et al., 2016), den Niederlanden (nicht veröffentlicht, GenBank accession number KR011121, KR011122, Buter 2015) und Frankreich (GRASLAND et al., 2015) eine Übereinstimmung auf Nukleotidbasis von 98,4-98,7 %. Im Vergleich zu den bei HANKE et al. (2015) beschriebenen Isolaten aus Deutschland von 2014 (LM645057, LM645058) zeigten die aktuellen Isolate 98,3-98,7 % Übereinstimmung, vor allem durch Unterschiede in der Sequenz des 5‘-Ende des ORF S. Von PEDV-Stämmen aus den USA (KF272920, KF468753, KM392225, KF468754, KF804028, KM392224) (HOANG et al., 2013; HUANG et al., 2013; MARTHALER et al., 2013; OKA et al., 2014), China (KM242131) (SONG et al., 2014) und dem bislang einzigen europäischen Prototyp-Isolat aus der Ukraine (KP403954) (DASTJERDI et al., 2015), lassen sich die Isolate dieser Studie und die anderen verglichenen S INDEL-Stämme abgrenzen.

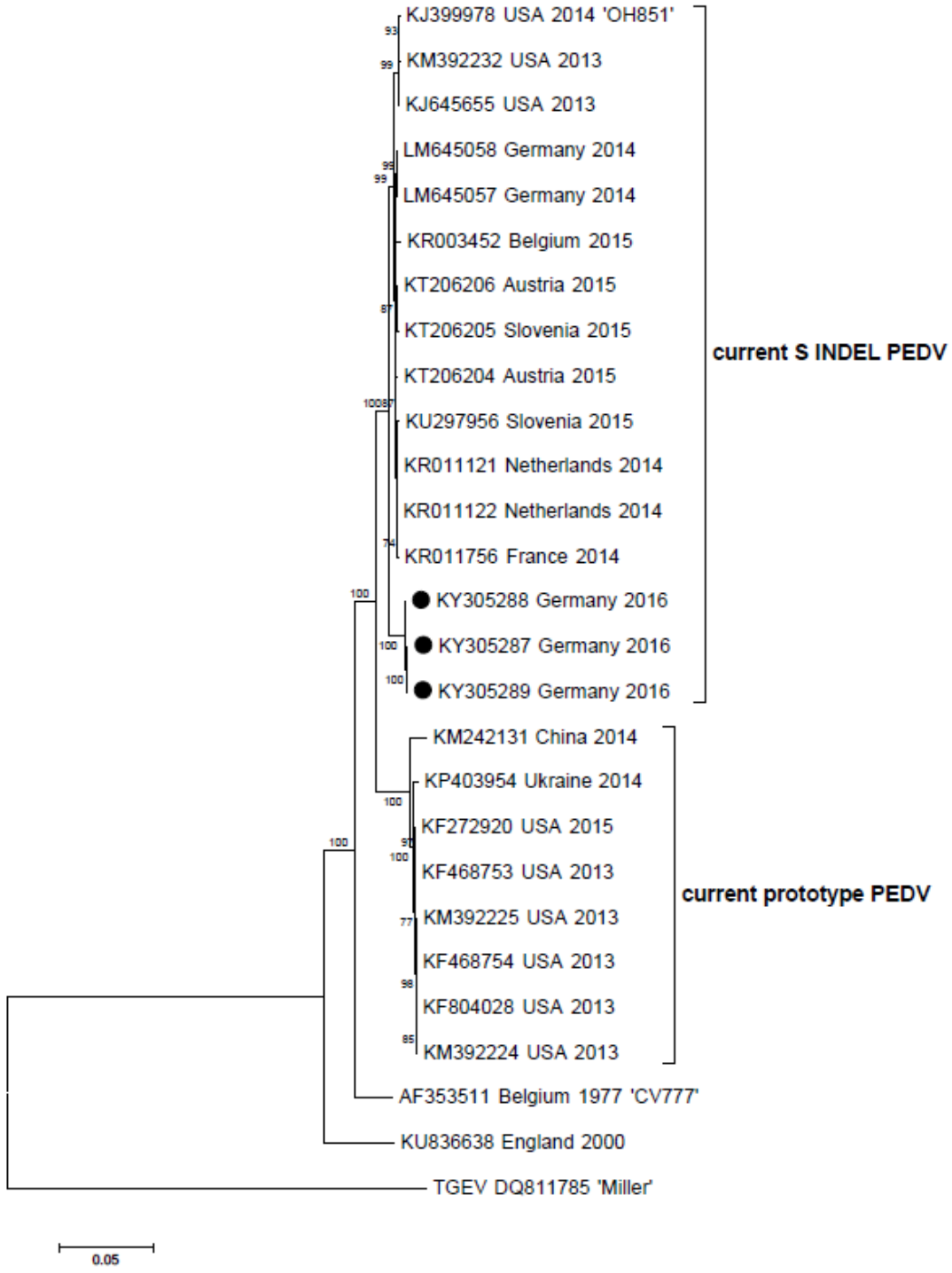

Abbildung 2: Phylogenetischer Stammbaum der PEDV-Isolate der Studienbetriebe (●) und 23 PEDV Referenzstämmen. TGEV wurde zu Outgroup-Routing verwendet.

3. PCR

Die Kotproben der Mastschweine (Betrieb 1 und 2) sowie die Kottupfer der Saugferkel (Betrieb 3) wurden auf das Vorhandensein von PEDV-RNA mittels PEDV Real-Time-RT-PCR untersucht. Am ersten Beprobungstag (Tag 0) konnte in 96,1 % (99/103) der ausgewerteten Kotproben aus allen drei Betrieben PEDV-RNA nachgewiesen werden. An Tag 7 waren 22,3 % (23/103) der Kotproben positiv und an Tag 14 wurde in 11,7 % (12/103) der Kotproben PEDV nachgewiesen. Anschließend konnte bis zum Ende der Studie in keiner der Kotproben PEDV-RNA nachgewiesen werden. Die Ergebnisse der PEDV-Real-Time-RT-PCR sind in Abbildung 3 aufgeteilt nach Betrieben und Beprobungstagen dargestellt. Kotproben, die einen Ct-Wert < 30 aufwiesen wurden als positiv bewertet. Lag der Ct-Wert zwischen 30 und 40 wurde das Ergebnis als schwach positiv bewertet. Bei Ct-Werten > 40 galt die Probe als negativ.

Bei Betrieb 1 waren an Tag 0 in 100 % (34/34) der Kotproben PEDV-RNA nachweisbar und wiesen einen Ct-Wert < 30 auf. An Tag 7 konnte in 11,8 % (4/34) der Kotproben PEDV-RNA nachgewiesen werden, wobei zwei von vier Proben einen Ct-Wert < 30 und zwei von vier Proben einen Ct-Wert zwischen 30 und 40 aufwiesen. An Tag 14 wurde insgesamt in 5,9 % (2/34) der Kotproben PEDV-RNA nachgewiesen, eine Probe wies einen Ct-Wert < 30 auf und eine zwischen 30 und 40.

Auf Betrieb 2 konnte in 91,4 % (32/35) der Kotproben von Tag 0 PEDV-RNA nachgewiesen werden, wobei 30 von 32 positiven Proben einen Ct-Wert < 30 und zwei Proben einen Ct-Wert zwischen 30 und 40 aufwiesen. An Tag 7 waren 14,3 % (5/35) der Proben positiv, wovon drei einen Ct-Wert < 30 aufwiesen und zwei schwach positiv waren mit Ct-Werten zwischen 30 und 40. Bei den Kotproben von Tag 14 gelang der Nachweis von PEDV-RNA in 22,9 % (8/35) der Proben, wobei alle Proben Ct-Werte < 30 aufwiesen.

Bei Betrieb 3 waren an Tag 0 in 97,1 % (33/34) der Kottupfer der Saugferkel und in vier von fünf Kotproben der beprobten Sauen PEDV-RNA enthalten. Von den positiv auf PEDV-RNA getesteten Kottupfern wiesen 27 einen Ct-Wert < 30 auf und sechs waren schwach positiv mit Ct-Werten zwischen 30 und 40. Bei den Kotproben der Sauen waren, von insgesamt fünf Proben, zwei positiv (Ct < 30)

und zwei schwach positiv (Ct 30-40). An Tag 7 waren in 41,2 % (14/34) der Kottupfer der Ferkel PEDV-RNA nachweisbar, wovon acht schwach positiv mit Ct-Werten zwischen 30 und 40 waren und sechs einen Ct-Wert < 30 aufwiesen. In 5,9 % (2/34) der Kottupfer der Ferkel konnte an Tag 14 PEDV-RNA gefunden werden, wobei eine Probe einen Ct-Wert < 30 und die andere einen Ct-Wert zwischen 30 und 40 aufwies.

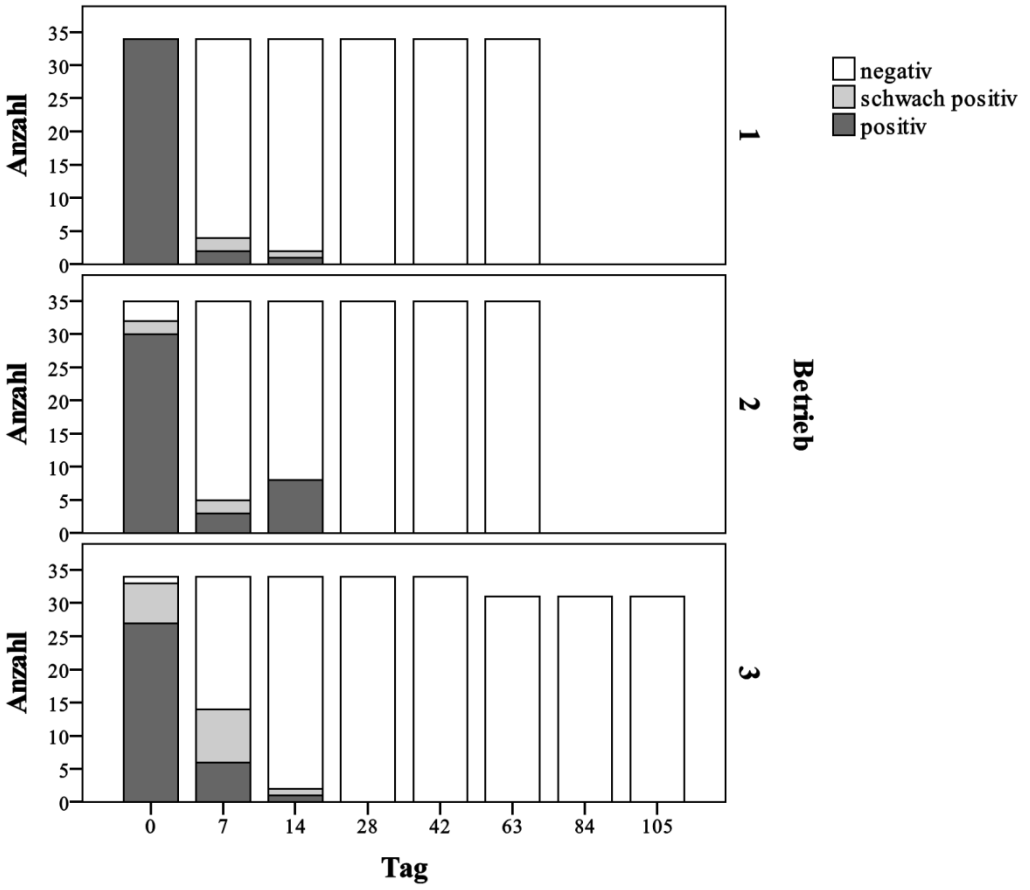

Abbildung 3: Ergebnisse der PEDV Real-Time-RT-PCR aus Kotproben aller Studientiere aufgeteilt nach den drei Studienbetrieben und den Beprobungstagen

Beim Nachweis von PEDV-RNA in den Kotproben bzw. Kottupfern der individuellen Studientiere ließen sich sechs verschiedene Muster erkennen, die in Tabelle 6 aufgeteilt nach Betrieben dargestellt sind. Insgesamt zeigten 67,0 % (69/103) der Studientiere das Muster 1, bei dem am ersten Beprobungstag (Tag 0) PEDV-spezifische RNA in den Kotproben nachgewiesen werden konnte und an Tag 7 und 14 kein Nachweis erfolgte. Bei den Mastschweinen (Betrieb 1 und 2)

zeigten 82,4 % (28/34) bzw. 60,0 % (21/35) der Studientiere dieses Muster und es konnte ebenfalls bei 58,8 % (20/34) der Saugferkel (Betrieb 3) beobachtet werden. In den Proben von sieben Mastschweinen (Betrieb 1: 4/34 (11,8 %); Betrieb 2: 3/35 (8,6 %)) und elf Saugferkeln (32,4 %) war an zwei Beprobungstagen in Folge (Tag 0 und 14) PEDV Genom nachweisbar (Muster 2). Bei zwei Saugferkeln (5,9 %) konnte in den Proben von Tag 0, 7 und 14 PEDV-RNA detektiert werden (Muster 3). Die Proben von insgesamt zehn Mastschweinen waren intermittierend positiv an Tag 0 und 14 (Muster 4). Bei drei Tieren konnte PEDV-RNA erstmals in den Proben von Tag 7 nachgewiesen werden (Muster 5). Aus den Kotproben eines Studientieres erfolgte zu keinem Zeitpunkt ein PEDV-Genomnachweis (Muster 6).

Tabelle 6: Muster des Nachweises von PEDV-RNA in Kotproben der Studientiere aufgeteilt nach Betriebe (Anzahl und Prozente)

	Tag 0	Tag 7	Tag 14	Betrieb 1		Betrieb 2		Betrieb 3	
Muster 1	+	-	-	28/34	82,4%	21/35	60,0%	20/34	58,8%
Muster 2	+	+	-	4/34	11,8%	3/35	8,6%	11/34	32,4%
Muster 3	+	+	+	0/34	0,0%	0/35	0,0%	2/34	5,9%
Muster 4	+	-	+	2/34	5,9%	8/35	22,9%	0/34	0,0%
Muster 5	-	+	-	0/34	0,0%	2/35	5,7%	1/34	2,9%
Muster 6	-	-	-	0/34	0,0%	1/35	2,9%	0/34	0,0%

\+ Ct-Wert ≤ 40 - Ct-Wert > 40

4. ELISA

Von allen Studientieren wurden an den einzelnen Beprobungstagen Blutproben entnommen. Das Serum wurde mittels zweier kommerziell erhältlicher ELISAs auf das Vorhandensein von PEDV-spezifischen IgG untersucht. Die Ergebnisse aller Beprobungstage aufgeteilt nach den Betrieben sind in Abbildung 4 für ELISA 1 und in Abbildung 5 für ELISA 2 als Boxplot dargestellt. Die Länge der Box entspricht dem Interquartilsabstand (IQR), das heißt die mittleren 50 % der Daten liegen in diesem Bereich. Der Median wird als horizontaler Balken in der Box dargestellt. Die Antennen (Whiskers) schließen weitere Werte bis zu einem Maximum des 1,5-fachen IQR ein. Ihre exakte Länge ergibt sich durch den maximalen bzw. minimalen Wert der noch innerhalb dieser Grenze liegt. Alle Werte, die außerhalb der Antennen liegen, sind Ausreißer (o). Sind einzelne Werte mehr als 3 x IQR entfernt, werden sie als extreme Ausreißer eingestuft (*).

4.1. ELISA 1

Die Ergebnisse der Untersuchung der Serumproben auf PEDV-spezifische Antikörper mittels ELISA 1 sind in Abbildung 4 aufgeteilt nach Betrieben dargestellt. Der vom Hersteller angegebene Cut-off bei einer S/P Ratio von 0,4 wurde verwendet. Somit wurde eine S/P Ratio $\geq 0{,}4$ als Nachweis von PEDV-spezifischen Antikörpern angesehen. Serumproben, die eine S/P Ratio $< 0{,}4$ aufwiesen, wurden als negativ für PEDV-spezifische Antikörper bewertet. Die S/P Ratios der Proben erreichten Maximalwerte von 2,57 (Betrieb 1, Tag 7) und 2,61 (Betrieb 2, Tag 28) bei den Mastschweinen. Bei den Saugferkeln konnte ein Maximalwert von 2,21 (Tag 28) nachgewiesen werden.

Am ersten Beprobungstag (Tag 0) konnten bei 29 der 34 (85,3 %) Mastschweine aus dem Betrieb 1 keine Antikörper nachgewiesen werden. Am Tag 7 waren alle Tiere serokonvertiert. Der Median der S/P Ratios der Proben erreichte sein Maximum an Tag 7 mit 1,91 ($\pm$ 0,46). Am Ende des Beprobungszeitraums (Tag 63) fiel der Median unter den Cut-off (0,38 $\pm$ 0,28). Dabei konnten bei 14 von 34 Tieren (41,2 %) noch PEDV-Antikörper nachgewiesen werden.

Auf Betrieb 2 konnte bei 31 von 35 (88,6 %) Mastschweinen keine PEDV-spezifischen Antikörper in den Serumproben von Tag 0 nachgewiesen werden.

Alle Studientiere zeigten an Tag 7 Serokonversion. Der Median der S/P Ratios blieb konstant mit 1,51 (± 0,53) an Tag 7 und 1,48 (± 0,48) an Tag 14; er erreichte sein Maximum an Tag 28 mit 1,52 (± 0,57) und war an Tag 63 über dem Cut-off (0,41 ± 0,40). Es konnten am Ende des Beprobungszeitraums (Tag 63) bei 19 der 35 Tiere (54,3 %) noch PEDV-spezifische Antikörper nachgewiesen werden.

Bei Betrieb 3 waren PEDV-spezifische Antikörper weder bei den Sauen noch bei den Ferkeln an Tag 0 nachweisbar. An Tag 7 waren 20,6 % (7/34) der Saugferkel serokonvertiert und an Tag 14 betrug die Serokonversionrate 52,9 % (18/34). Der Median der S/P Ratios überschritt den Cut-Off an keinem der Beprobungstage, außer an Tag 14 mit 0,46 (± 0,60). Ein Saugferkel serokonvertierte erst an Tag 42. An Tag 63 waren bei 4 der 31 (12,9 %) Ferkel noch Antikörper nachweisbar. Bei drei dieser Ferkel waren Antikörper auch an Tag 84 nachweisbar, eines davon blieb bis Tag 105 positiv. Bei zwei Ferkeln, die am Tag 63 bzw. 84 negativ waren, konnten an Tag 84 bzw. 105 erneut PEDV-spezifische Antikörper nachgewiesen werden.

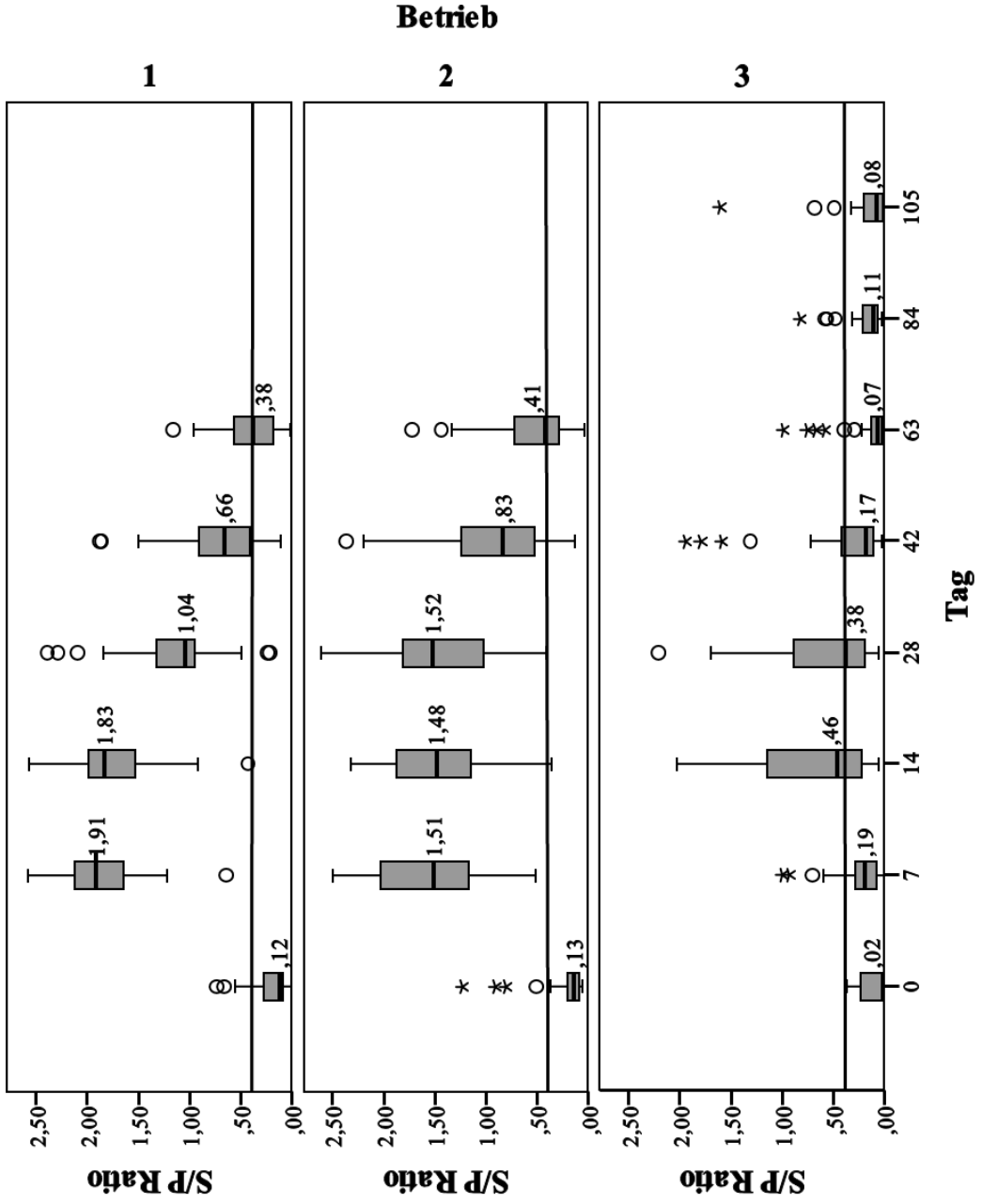

Abbildung 4: Antikörper gemessen mit ELISA 1 (Swinecheck® PED indirect, Biovet Inc., St-Hyacinthe, Kanada) als S/P Ratio, Cut-off = 0,4; aufgeteilt nach Betrieben

4.2. ELISA 2

Die Ergebnisse des ELISA 2 sind nach Betrieben und Untersuchungstagen aufgeteilt in Abbildung 5 dargestellt. Der vom Hersteller angegebene Cut-off von S/P% = 60 wurde verwendet. Proben mit S/P% ≥ 60 waren positiv, während Proben, bei denen S/P% < 60 war, als negativ bewertet wurden. Die S/P% bei Mastschweinen erreichte Maximalwerte von 138 (Betrieb 1, Tag 7) und 143 (Betrieb 2, Tag 7). Der Maximalwert der S/P% bei Saugferkeln betrug 131 (Tag 105).

Bei Betrieb 1 konnten bei 30 der 34 Tiere (88,2%) keine Antikörper an Tag 0 nachgewiesen werden. Der Median der S/P% erreichte seinen Maximalwert (117 ± 16) an Tag 7. Zu diesem Zeitpunkt waren alle Tiere serokonvertiert. An Tag 42 fiel der Median unter den Cut-off (56 ± 23). Am Ende der Studie (Tag 63) waren noch bei 7 von 34 Tieren (20,6 %) Antikörper nachweisbar.

Auf Betrieb 2 konnte bei 31 von 35 (88,6 %) Mastschweinen keine PEDV-spezifischen Antikörper in den Serumproben von Tag 0 nachgewiesen werden. An Tag 7 wiesen alle Serumproben PEDV-spezifische Antikörper auf. Das Maximum der S/P% wurde an Tag 7 (111 ± 15) erreicht. Im Gegensatz zu ELISA 1 fiel der Median der S/P% von ELISA 2 an Tag 63 unter den Cut-off (53 ± 25). An Tag 63 konnten bei 16 von 35 Tieren (45,7 %) Antikörper nachgewiesen werden.

Bei Betrieb 3 waren alle Serumproben von den 34 Saugferkel und 5 Sauen an Tag 0 negativ im ELISA 2. Nachdem an Tag 7 bei 2 von 34 (5,9 %) Ferkeln Antikörper nachweisbar waren, stieg die Serokonversionsrate auf 12 von 34 (35,3 %) Ferkeln an Tag 7 an und erreichte ihr Maximum an Tag 14 mit 13 von 34 (38,2 %) Ferkeln. Zwei Ferkel serokonvertierten erst an Tag 84, zwei weitere erst an Tag 105. Der Median der S/P% blieb die gesamte Zeit unter dem Cut-off von 60 und erreichte sein Maximum an Tag 14 (46 ± 29).

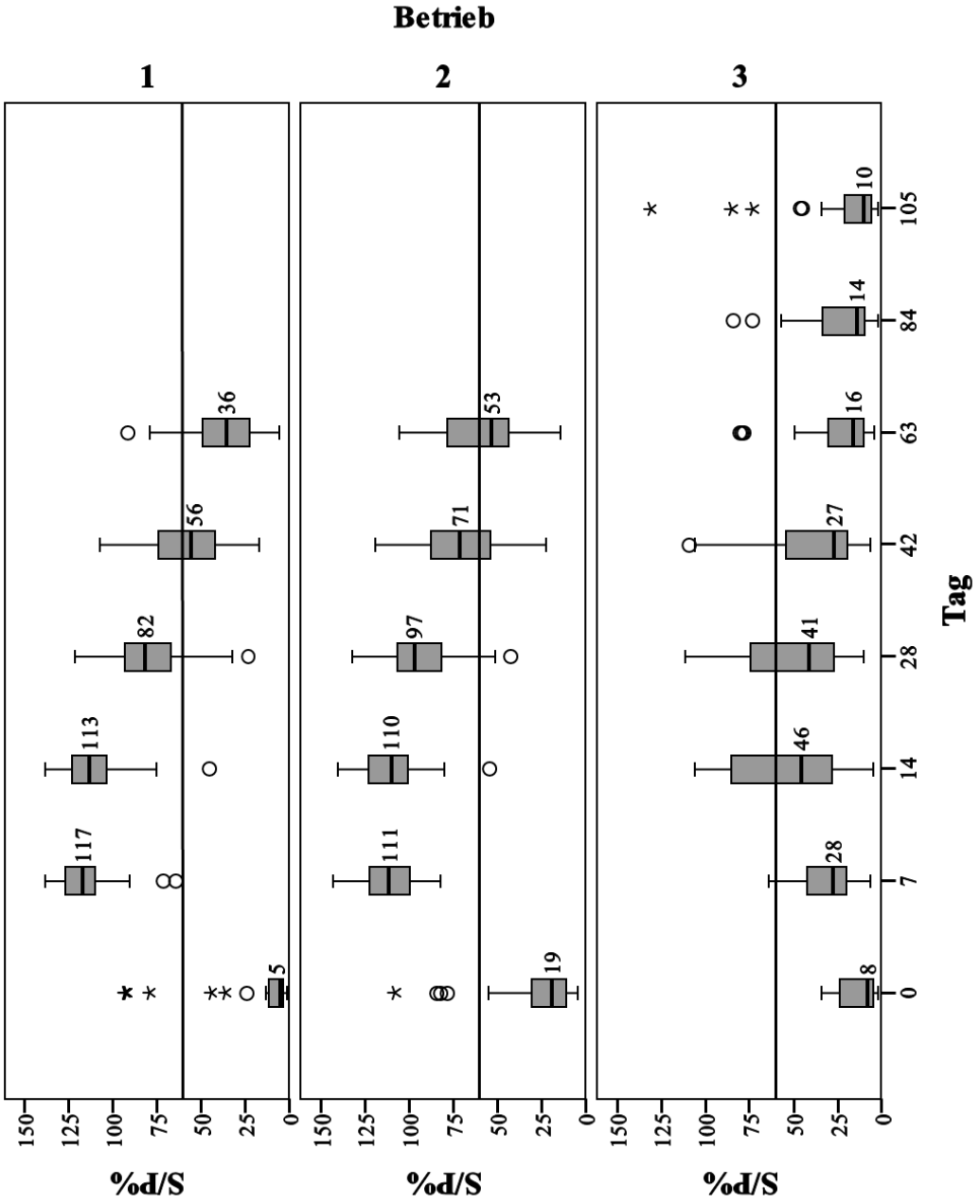

Abbildung 5: Antikörper gemessen mit ELISA 2 (ID Screen® PEDV indirect, ID Vet Genetics, Grabels, Frankreich) als S/P%, Cut-off = 60; aufgeteilt nach Betrieben

4.3. Serokonversion

Am Tag 7 konnte bei allen Mastschweinen (Betrieb 1 und 2) PEDV-spezifische Antikörper mit beiden ELISAs nachgewiesen werden. Bei 12 von 34 (35,3 %) Saugferkeln (Betrieb 3) konnte zu keinem Zeitpunkt mit keinem der beiden ELISAs Antikörper nachgewiesen werden. Insgesamt waren 21 von 34 Tieren (61,8 %) mindestens einmal positiv im ELISA 1 und 17 von 34 Tieren (50,0 %) im ELISA 2.

Tabelle 7 zeigt die Anzahl und den prozentualen Anteil an Tieren von Betrieb 3, bei denen mittels ELISA 1 bzw. ELISA 2 Antikörper nachweisbar waren. Alle Beprobungszeitpunkte sind berücksichtigt.

Tabelle 7: Nachweis von PEDV-spezifischen Antikörpern mit ELISA 1 bzw. ELISA 2 bei den Studientieren von Betrieb 3, alle Beprobungszeitpunkte berücksichtigt

ELISA 1	ELISA 2	Anzahl	Prozent
+	+	16/34	47,1%
+	-	5/34	14,7%
-	+	1/34	2,9%
-	-	12/34	35,3%

Betrachtet man die unterschiedlichen Würfe (Tabelle 8), waren in jedem der fünf Würfe einerseits Tiere zu finden, die serokonvertierten, und andere, bei denen zu keinem Zeitpunkt der Untersuchung Antikörper gegen PEDV nachgewiesen wurden. In Wurf 3 konnten mit ELISA 1 bei allen Ferkeln Antikörper nachgewiesen werden, mittels ELISA 2 konnte eine Serokonversion bei 6 von 7 Ferkeln gezeigt werden.

Tabelle 8: Anzahl der Saugferkel aus Betrieb 3, bei denen an mindestens einem der Beprobungszeitpunkte Antikörper mittels ELISA 1 bzw. ELISA 2 nachweisbar waren, aufgeteilt nach den fünf Würfen

Wurf	ELISA 1	ELISA 2
1	3/6	3/6
2	5/6	4/6
3	7/7	6/7
4	3/9	3/9
5	3/3	1/6

In Abbildung 6 sind die Antikörperverläufe der einzelnen Ferkel von Betrieb 3 mit ELISA 1 und Abbildung 7 mit ELISA 2 dargestellt. Jedes Studientier wird durch eine farbige Linie repräsentiert.

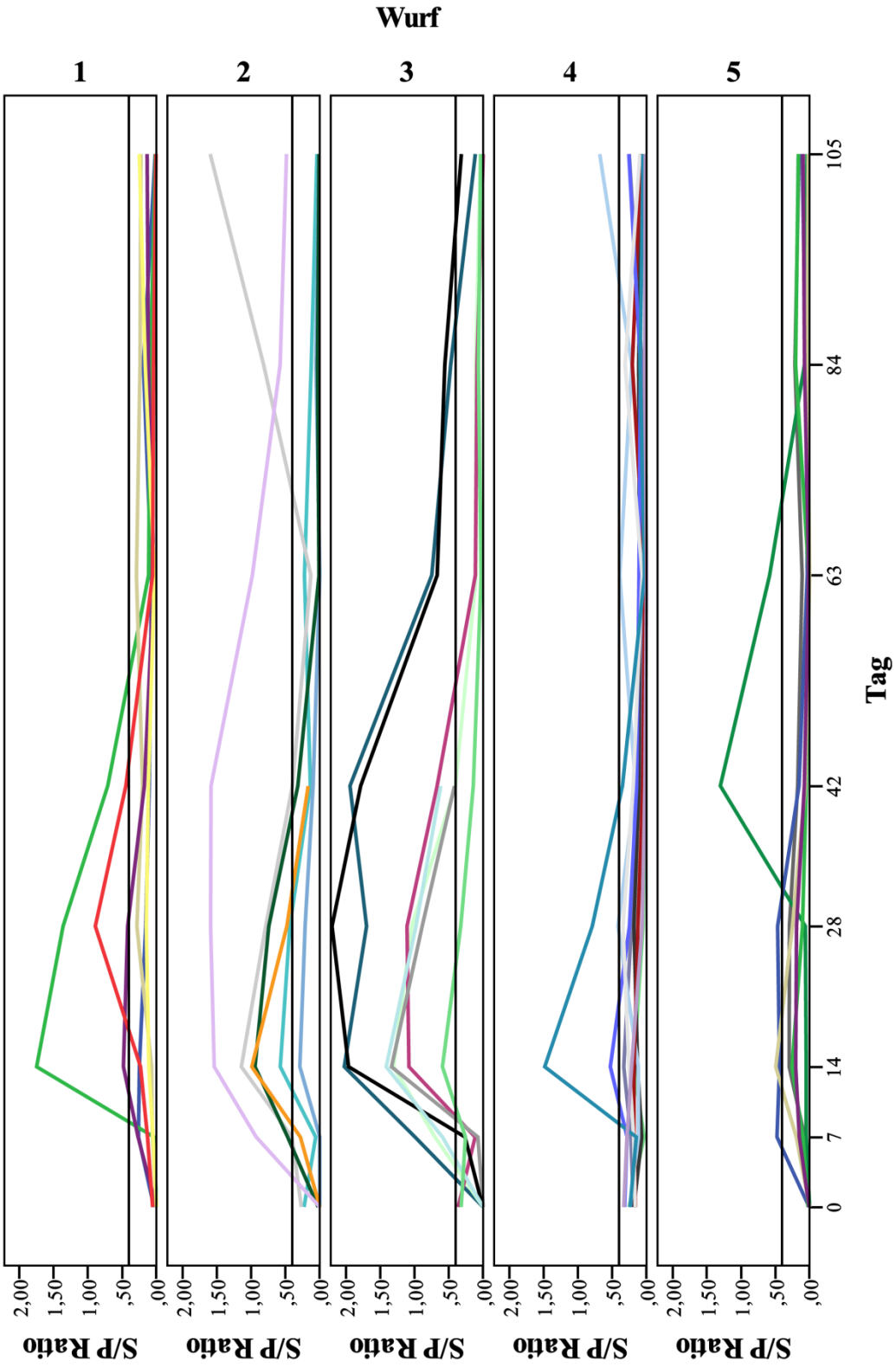

Abbildung 6: Antikörper gemessen mit ELISA 1 (Swinecheck® PED indirect, Biovet Inc., St-Hyacinthe, Kanada), Studientiere von Betrieb 3, Cut-off = 0,4; aufgeteilt nach Würfen

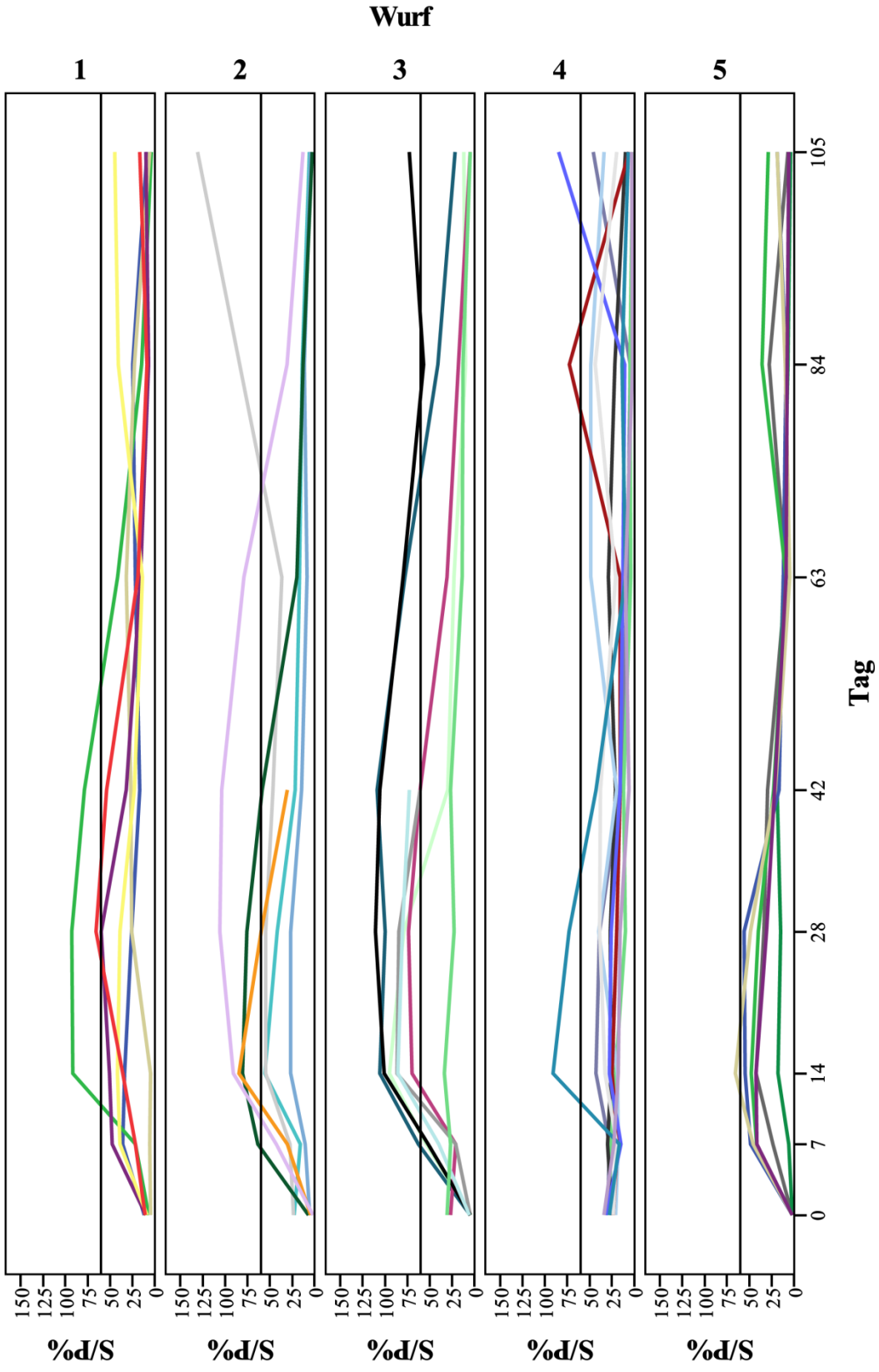

Abbildung 7: Antikörper gemessen mit ELISA 2 (ID Screen® PEDV indirect, ID Vet Genetics, Grabels Frankreich), Studientiere von Betrieb 3, Cut-off = 60; aufgeteilt nach Würfen

4.4. Übereinstimmung der ELISAs

Mit ELISA 1 wurden 367 (54,2 %) von insgesamt 677 Proben als positiv bewertet, dagegen detektierte ELISA 2 307 Proben (45,3 %) als positiv. Die Anzahl positiver Proben pro Beprobungstag und Betrieb sind in Tabelle 9 dargestellt.

Tabelle 9: Anzahl der Serumproben, bei denen an den jeweiligen Beprobungstagen PEDV-spezifische Antikörper mit ELISA 1 bzw. ELISA 2 nachgewiesen wurden, aufgeteilt nach Betrieben

Betrieb	ELISA	Beprobungstag							
		0	7	14	28	42	63	84	105
1	1	5/34	34/34	34/34	32/34	26/34	14/34		
	2	4/34	34/34	33/34	29/34	14/34	7/34		
2	1	4/35	35/35	34/35	35/35	31/35	19/35		
	2	4/35	35/35	34/35	31/35	24/35	16/35		
3	1	0/34	7/34	18/34	17/34	11/34	4/31	4/31	3/31
	2	0/34	2/34	12/34	13/34	7/34	3/31	2/31	3/31

Die Übereinstimmung der beiden ELISAs hinsichtlich des Nachweises von IgG ($\kappa = 0{,}771$, SE = 0,024) ist nach Sachs (2004) als stark einzuordnen, wobei kein Unterschied bei der separaten Betrachtung der Betriebe erkennbar war (Betrieb 1: $\kappa = 0{,}723$, SE = 0,049; Betrieb 2: $\kappa = 0{,}719$, SE = 0,053; Betrieb 3: $\kappa = 0{,}673$, SE = 0,056). Die Übereinstimmung war an Tag 7 fast vollständig ($\kappa = 0{,}882$, SE = 0,051), an Tag 0 ($\kappa = 0{,}551$, SE = 0,151) und Tag 42 ($\kappa = 0{,}571$, SE = 0,071) deutlich. Die p-Werte waren < 0,001. Bei der separaten Betrachtung der Proben von Tag 84 (p = 0,106) und Tag 105 (p = 0,145) konnte kein Kappa-Wert ermittelt werden.

V. DISKUSSION

Porcine epidemic diarrhea (PED) wurde erstmals von WOOD (1977) in England beschrieben. PENSAERT und DE BOUCK (1978) identifizierten bei Ausbrüchen in Belgien ein Coronavirus (CV777) als auslösendes Agens. Nachdem PED in den letzten Jahrzehnten nur sporadisch in Europa aufgetreten ist (NAGY et al., 1996; RODÁK et al., 2005; MARTELLI et al., 2008), kommt es seit 2014 vermehrt zu Ausbrüchen (HENNINGER & SCHWARZ, 2014; GRASLAND et al., 2015; HANKE et al., 2015; MESQUITA et al., 2015; STADLER et al., 2015; THEUNS et al., 2015). Die PEDV-Isolate dieser Ausbrüche unterscheiden sich von den ursprünglichen europäischen Isolaten (CV777) und können als S INDEL-Stämme identifiziert werden (HANKE et al., 2015; STADLER et al., 2015). Bei diesen Ausbrüchen variiert die Mortalität bei den einzelnen Beständen, beträgt jedoch vereinzelt bei Saugferkeln bis zu 70 % (STADLER et al., 2015). Veröffentlichte Daten bezüglich des ökonomischen Schadens, den PED in der europäischen Schweineindustrie verursacht, liegen nicht vor und Prävalenzdaten aus europäischen Ländern sind nur spärlich vorhanden (EFSA, 2014). Kürzlich durchgeführte Untersuchungen in Frankreich an 300 Sauen ergaben eine Seroprävalenz von 4 % und bei einer Untersuchung von 554 Serumproben von Schlachthöfen in Großbritannien betrug die Seroprävalenz 9 % (EFSA, 2016). In Deutschland gibt es bislang kein Überwachungsprogramm für PED und es liegen keine Daten zur Seroprävalenz vor. Die in der vorliegenden Studie erhobenen Daten zur Detektion von PEDV-RNA in Kotproben und dem Nachweis von Serumantikörper (IgG) gegen PEDV sollen neue Einblicke in den Verlauf einer Infektion mit S INDEL-PEDV verschaffen. Zudem sollen diese Daten helfen, die zur Verfügung stehenden diagnostischen Möglichkeiten bei verschiedenen Altersgruppen gezielt einzusetzen und zu interpretieren.

1. Sequenzierung des ORF S

Das S-Protein spielt bei der Infektion der Darmenterozyten eine wichtige Rolle (BOSCH et al., 2003) und besitzt Epitope, die die Bildung von neutralisierenden Antikörpern auslösen können (CHANG et al., 2002). Der ORF S unterliegt einer hohen Mutationsrate, weshalb es neben der Vollgenomsequenzierung zum

phylogenetischen Vergleich von verschiedenen PEDV-Stämme herangezogen wird (SUN et al., 2014b). Die Isolate der vorliegenden Studie wiesen eine Übereinstimmung von 99,8-99,9 % auf Nukleotid-Ebene auf. Daher ist davon auszugehen, dass die Infektion der Schweine aus den drei Betrieben mit einem sehr ähnlichen PEDV-Stamm stattgefunden hat. Die Sequenzen der ORF S enthielten die typischen Insertionen und Deletionen, die S INDEL-PEDV-Stämme charakterisieren (VLASOVA et al., 2014) und bildeten zusammen mit S INDEL aus den USA (OH851) sowie mit den seit 2014 in Europa nachgewiesenen Stämmen ein Cluster. Bislang konnte nur bei einem Ausbruch in der Ukraine ein PED-Virus nachgewiesen werden, das eine hohe Übereinstimmung mit dem Prototyp-PEDV-Stamm USA/Colorado30/2013 (KJ645638) aufwies (DASTJERDI et al., 2015). Von den ursprünglich in Europa zirkulierenden Stämmen (CV777), genauso wie von den in England aus dem Jahr 2000 retrospektiv isolierten Stämmen (STEINBACH et al., 2016), konnten die vorliegenden Isolate ebenfalls deutlich abgegrenzt werden.

Trotz einer generell hohen Übereinstimmung der Sequenzen mit denen der verglichenen S INDEL-Referenzstämmen, wiesen die Sequenzen der Isolate dieser Studie Variationen im 5‘-Ende der codierenden Sequenz des S-Proteins auf. Eine größere Variabilität dieser Region wurde auch bei anderen phylogenetischen Vergleichsstudien beobachtet (SUN et al., 2014b; HANKE et al., 2015).

2. Klinik

Bei experimentellen Studien mit S INDEL-PEDV infizierten Schweinen wurde nach einer Inkubationszeit von ein bis drei Tagen Durchfall für drei bis fünf Tage beobachtet (LIN et al., 2015b). In der vorliegenden Studie konnte bei allen Studientieren an Beprobungstag 0 (Tag 0) Durchfall beobachtet werden. Aufgrund der hohen Kontagiosität von PEDV kann davon ausgegangen werden, dass sich alle Tiere innerhalb kurzer Zeit infiziert hatten, womit sich diese Feldbeobachtungen mit denen aus experimentellen Untersuchungen decken. Die Morbidität betrug bei den Mastschweinen und Saugferkeln dieser Studie bis zu 100 %. Dies ist von anderen Feldbeobachtungen (STADLER et al., 2015) und Infektionsversuchen mit S INDEL-PEDV bekannt und scheint sich auch nicht von Infektionen mit Prototyp-PEDV zu unterscheiden (LIN et al., 2015b). Zusätzlich

zu den Ferkeln auf Betrieb 3 zeigten Sauen ebenfalls wässrigen Durchfall. Dies konnte ebenfalls in experimentellen Infektionen (LIN et al., 2015b) und auch im Feld beobachtet wurden (STADLER et al., 2015). LIN et al. (2015b) vermuteten, dass laktierende Sauen durch die physiologischen Veränderungen von Geburt und Laktation anfälliger für die Infektion sind.

Die Mortalität war infolge des PED-Ausbruchs weder bei den Mastschweinen noch bei den Saugferkeln erhöht. Von den 70 eingeschlossenen Mastschweinen ist ein Studientier (Betrieb 1) zwischen Tag 14 und 28 verendet. Es konnte kein Zusammenhang mit dem PED-Ausbruch festgestellt werden. Diese Beobachtung deckt sich mit den Angaben in der Literatur, wo die Mortalität bei Mastschweinen mit 0-4,5 % angegeben wird (MARTELLI et al., 2008; HENNINGER & SCHWARZ, 2014; STADLER et al., 2015). Von den 35 eingeschlossenen Saugferkeln (Betrieb 3) konnten 34 Ferkel bis Tag 42 verfolgt werden. Ein Saugferkel wurde zwischen Tag 0 und Tag 7 erdrückt. Insgesamt entsprach die Saugferkelsterblichkeit im untersuchten Zeitraum dem betriebstypischen Durchschnitt. Entgegen dieser Beobachtung wird in der Literatur von Mortalitäten bei Saugferkeln bis zu 75 % berichtet (LIN et al., 2015b; MESQUITA et al., 2015; STADLER et al., 2015). Als mögliche Faktoren, die einen Einfluss auf die große Varianz der Mortalität haben könnten, werden die Immunität der Sauen, sowie Management und Biosicherheit der Betriebe diskutiert (STADLER et al., 2015; BERTASIO et al., 2016). Unter experimentellen Bedingungen konnten Unterschiede in der Mortalität einzelner Würfe festgestellt werden, obwohl die Voraussetzungen für alle Studientiere identisch waren (LIN et al., 2015b). In dieser Studie wurden keine Daten diesbezüglich erhoben, sodass der potentielle Einfluss dieser Faktoren nicht geklärt werden kann. Ein weiteres Studientier konnte aufgrund von starkem Kümmern nur bis Tag 42 beprobt werden. Mögliche Ursachen dafür könnten die mangelhafte Milchversorgung während der ersten Lebenswochen oder Resorptionsstörungen aufgrund von Enteropathien gewesen sein (PLONAIT, 2001). Ebenso können Viruserkrankungen wie PCV2 zu Kümmern führen (ALLAN et al., 1998).

Beobachtungen aus den USA lassen einen Einfluss der PEDV-Variante auf die Ausprägung des klinischen Erscheinungsbilds sowie Morbidität und Mortalität vermuten (WANG et al., 2014a). So führen US-Prototyp-PEDV-Stämme zu einer schwereren Klinik mit einer Mortalität bis zu 100 % bei Saugferkeln

(STEVENSON et al., 2013), wohingegen bei Ausbrüchen mit S INDEL-PEDV nur geringgradige klinische Anzeichen und keine erhöhte Mortalität beschrieben wird (WANG et al., 2014a). In Europa hingegen werden nach Infektionen mit S INDEL-PEDV auch hohe Saugferkelverluste beschrieben (MESQUITA et al., 2015; STADLER et al., 2015).

Sekundärinfektionen können das klinische Erscheinungsbild möglicherweise verkomplizieren (STADLER et al., 2015; BERTASIO et al., 2016). Nach Infektionen mit Coronaviren ist der Darm anfälliger für Sekundärinfektionen (COUSSEMENT et al., 1982; JUNG et al., 2006). Durch standardisierte Bedingungen bei experimentellen Infektionen können diese Einflüsse bis zu einem gewissen Grad ausgeschlossen werden. Da in der vorliegenden Feldstudie Sekundärinfektionen nicht erfasst wurden, kann deren Einfluss nicht beurteilt werden.

Nach dem anfänglichen Ausbruch konnte während der Studiendauer kein Wiederauftreten von PED auf den drei untersuchten Betrieben festgestellt werden. Im Gegensatz dazu beschreiben STADLER et al. (2015) ein erneutes PED-Durchfallgeschehen bei einem Ferkelerzeugerbetrieb neun Wochen nach dem ersten Ausbruch und BERTASIO et al. (2016) konnten nach 60 Tagen einen erneuten Ausbruch bei Ferkeln feststellen.

3. Kotproben

Nach experimentellen Infektionen mit S INDEL-PEDV wurden $10^{9,46}$ bis $10^{13,40}$ Genomkopien pro Milliliter Kot nachgewiesen (LIN et al., 2015b). THOMAS et al. (2015a) konnten zeigen, dass die Minimale Infektionsdosis (minimun infectious dose, MID) bei einer Woche alten Saugferkeln 1000fach geringer ist als bei drei Wochen alten Tieren. Mit einem Inokulat, das einen Ct-Wert von 12,2 aufweist, konnten in ihren Untersuchungen 100 % der Saugferkel infiziert werden. Es konnten aber auch 25 % der Ferkel mit einem Inokulat mit Ct-Wert > 45 infiziert werden. Sie vermuteten, dass die Viruskonzentration des Inokulats nur einen geringen Einfluss auf den Verlauf der Klinik, die Menge des ausgeschiedenen Virus, die Ausprägung der histologischen Läsionen sowie die Menge der gebildeten Antikörper hat (THOMAS et al., 2015a). In der

vorliegenden Studie kann aufgrund der hohen ausgeschiedenen Erregermenge und der geringen benötigten Infektionsdosis davon ausgegangen werden, dass alle Studientiere Kontakt mit dem PED-Virus hatten. Bei der ersten Probenentnahme (Tag 0) wurde bei fast allen Tieren PEDV-RNA in den Kotproben nachgewiesen. Bei einzelnen Tieren war PEDV-RNA erst in den Kotproben an Tag 7 nachweisbar. Möglicherweise ist das in den unterschiedlichen Infektionszeitpunkten der individuellen Tiere begründet. Bei einem Mastschwein (Betrieb 2) konnte zu keinem Zeitpunkt PEDV-RNA nachgewiesen werden. Dennoch entwickelte dieses Tier Serumantikörper gegen PEDV, weshalb auch bei diesem Tier von einer Infektion mit PEDV ausgegangen werden kann. Aufgrund der guten Sensitivität der verwendeten PCR, kann davon ausgegangen werden, dass alle Kotproben, die PEDV-RNA enthalten, sicher detektiert wurden. Möglicherweise war bei diesem Tier die Ausscheidung von PEDV-RNA vor der ersten Beprobung bereits beendet oder das Tier schied intermittierend aus, sodass in keiner der Proben PEDV Genomkopien enthalten waren.

PEDV-RNA konnte an Tag 7 in 22,3 % (23/103) und an Tag 14 in 11,7 % (12/103) der Kotproben nachgewiesen werden, obwohl zu diesem Zeitpunkt kein Durchfall mehr bei den untersuchten Tiergruppen auftrat. In keiner der Proben nach Tag 14 war PEDV-RNA nachweisbar. Ähnliche Beobachtungen wurden in experimentellen Infektionen mit S INDEL-PEDV gemacht. Die Tiere schieden in einer Studie von LIN et al. (2015b) PEDV kontinuierlich über 21 Tage nach der Infektion aus, wobei der Durchfall nur drei bis fünf Tage nach der Infektion beobachtet wurde. Genesene Schweine werden daher als Risiko für die Virusübertragung gesehen (MADSON et al., 2014). Wie in einer Studie mit einem Prototyp-PEDV-Stamm gezeigt wurde, scheint die Umgebung nicht als Reservoir für PEDV zu dienen (BJUSTROM-KRAFT et al., 2016). Dagegen werden positive Sammelkotproben aus den Buchten bis zu 15 Wochen bzw. drei Monate nach einem PED-Ausbruch beschrieben, ohne dass die Tiere noch Durchfall zeigten (STADLER et al., 2015; STEINRIGL et al., 2015). Da durch die PCR auch Genomfragmente nachgewiesen werden, ist es nicht auszuschließen, dass es sich bei den positiven Proben in den oben genannten Untersuchungen um eine Kontamination aus der Umwelt handelte. Durch die Untersuchung von Einzeltierkotproben und Rektaltupfern wurde eine solche Kontamination in der vorliegenden Studie ausgeschlossen. Im Gegensatz zu S INDEL-PEDV wird für

Prototyp-PEDV von einer längeren Ausscheidungsdauer berichtet. In Infektionsversuchen wurde eine Virusausscheidung über 24 Tage nach der Infektion (MADSON et al., 2014). CRAWFORD et al. (2015) konnten PEDV-RNA sogar bis zu 43 Tage und BJUSTROM-KRAFT et al. (2016) sogar bis 69 dpi in individuellen Kotproben nachweisen.

Die verschiedenen Altersgruppen dieser Studie zeigten Unterschiede im Muster des Nachweises von PEDV-RNA in den Kotproben. Die Kotproben von Mastschweinen waren zum Teil intermittierend positiv, was bei den Saugferkeln nicht beobachtet werden konnte. Dagegen konnte bei Saugferkeln an Tag 0, 7 und 14 PEDV-RNA in den Kottupfern detektiert werden, wohingegen die Mastschweine maximal an zwei aufeinander folgenden Beprobungen PEDV-RNA in den Kotproben aufwiesen. CRAWFORD et al. (2015) beschreiben einen diskontinuierlichen PEDV-RNA Nachweis in Kotproben von vier Wochen alten Aufzuchtferkeln, die mit einem US-Prototyp-PEDV-Stamm infiziert waren. Im Gegensatz zu den Beobachtungen der vorliegenden Studie zeigten diese Tiere bis 13 dpi kontinuierlich PEDV-RNA positive Kotproben und erst zwischen 14 dpi bis 43 dpi waren die Proben nur noch intermittierend positiv (CRAWFORD et al., 2015). LIN et al. (2015b) beschrieben bei Ferkeln bezüglich der ausgeschiedenen Virusmenge einen wellenförmigen Verlauf bis zu 21 Tage nach experimenteller Infektion mit S INDEL-PEDV: In den Kotproben der Tiere war in ihrer Studie zu allen untersuchten Zeitpunkten PEDV-RNA nachweisbar, jedoch unterschied sich die ausgeschiedene Menge. Möglicherweise sind bei den Mastschweinen bereits wieder empfängliche Darmepithelzellen nachgebildet worden, da die Regenerationszeit der Dünndarmepithelzellen bei Mastschweinen kürzer ist als bei Saugferkeln (MOON et al., 1973). Diese könnten erneut von PEDV infiziert werden, was als zweite Ausscheidungswelle sichtbar wird. Aufgrund des unterschiedlichen Wassergehaltes der einzelnen Proben wurde in der vorliegenden Studie die Menge an PEDV-RNA der einzelnen Proben nicht exakt bestimmt. Es kann nur eine semiquantitative Aussage über die enthaltene Menge an PEDV-RNA der einzelnen Proben gemacht werden. Alle Proben der Mastschweine, die an Tag 14 wieder PEDV-RNA enthielten, wiesen Ct-Werte < 30 auf. Dies entspricht den Werten der Tiere während des akuten Ausbruches an Tag 0. Engere Beprobungsintervalle wären nötig, um genauere Daten über PEDV-RNA im Kot zu erheben.

Die RT-PCR ist eine sehr sensitive diagnostische Methode, die es ermöglicht, kleinste Mengen an viraler RNA in einer Probe zu detektieren (KIM et al., 2007). Durch spezielle Primer für das ORF N, einem sehr konservierten Bereich innerhalb der PED-Viren, ist die PCR auch sehr spezifisch für die Detektion von verschiedenen PEDV-Stämmen. Dennoch ist der Nachweis von viraler RNA nicht unbedingt gleichbedeutend mit der Ausscheidung von infektiösem Virus. Es konnte gezeigt werden, dass PEDV-RNA in Kotproben nur 14 bis 16 Tage nach experimenteller Infektion mit US-Prototyp-PEDV infektiös war (CRAWFORD et al., 2015). Wurden nach diesem Zeitpunkt naive Tiere hinzugestallt, kam es zu keiner Infektion der naiven Tiere, obwohl in den Kotproben der experimentell infizierten Tiere noch bis 43 dpi PEDV-RNA intermittierend nachweisbar war.

In den Kotproben der untersuchten Sauen auf Betrieb 3 war an Tag 0 bei 4 von 5 Sauen PEDV-RNA nachweisbar. Bei einer Sau war zu diesem Zeitpunkt keine PEDV-RNA in der Kotprobe nachweisbar, jedoch zeigte sie Durchfall. Zu dem Beprobungszeitpunkt befand sich diese Sau möglichweise noch in der Inkubationszeit oder war noch nicht mit PEDV infiziert. Möglicherweise kommt es auch bei Sauen zu einer intermittierenden Ausscheidung wie bei den Mastschweinen. Da die Sauen nur an Tag 0 beprobt wurden und keine weiteren Untersuchungen durchgeführt wurden, kann über den Infektionsstatus der Sau nur spekuliert werden.

Eine schnelle, einfache Methode wie die PCR zur Diagnostik von PED bei an Durchfall erkrankten Tieren ist notwendig, um unverzüglich Maßnahmen ergreifen zu können. Länger zurückliegende Ausbrüche können mit der PCR aus Kot jedoch nicht erfasst werden, wie die Ergebnisse dieser Studie vermuten lassen, da PEDV-RNA nur bis kurz nach dem Ausbruch ausgeschieden wird.

4. Antikörper

4.1. Detektion von IgG

Momentan sind zwei kommerzielle PEDV-ELISA-Kits auf dem europäischen Markt erhältlich. Beide basieren auf dem Nukleokapsid-Protein von PEDV. In einer kürzlich veröffentlichen Studie wurden drei N-Protein ELISAs evaluiert (OKDA et al., 2015). PEDV-spezifische Antikörper waren in jener Studie sechs

bis neun Tage nach der Infektion bei vier Wochen alten infizierten Absetzferkeln nachweisbar und konnten bis zum Ende der Studie (43 dpi) nachgewiesen werden. Bei Prototyp-PEDV ist der Nachweis von PEDV-spezifischen IgG ab 10 bis 14 Tagen nach experimenteller Infektion beschrieben (MADSON et al., 2014; THOMAS et al., 2015a; BJUSTROM-KRAFT et al., 2016). In einer Studie mit US-Prototyp- und S INDEL-PEDV infizierten Tieren konnten keine Unterschiede bezüglich des Nachweises der Antikörper mit IFA und ELISA zwischen den Gruppen festgestellt werden (CHEN et al., 2016). Bei beiden Gruppen konnten IgG Antikörper 14 Tage nach der Infektion nachgewiesen werden, wobei neutralisierende Antikörper nach sieben Tagen nachweisbar waren (THOMAS et al., 2015a; CHEN et al., 2016).

Es muss berücksichtigt werden, dass Tag 0 in unserer Studie nicht der Tag der Infektion, sondern der erste Beprobungstag nach Auftreten der klinischen Symptome war. Somit stimmen unsere Beobachtungen mit der Literatur insofern überein, dass alle Mastschweine bis Tag 7 serokonvertierten und die Antikörper-Level nach Tag 14 (Betrieb 1) bzw. Tag 28 (Betrieb 2) wieder abfielen. Im Gegensatz zu OKDA et al. (2015), die nach Tag 43 nicht weiter untersuchten, konnten in dieser Studie PEDV-spezifische IgG bei einzelnen Mastschweinen bis Tag 63 und bei Saugferkeln bis Tag 105 gezeigt werden.

4.1.1. Mastschweine

Bei einzelnen Mastschweinen waren bereits an Tag 0 Antikörper nachweisbar. Da PED sehr kontagiös ist und von einer Inkubationszeit von ein bis drei Tagen bei Infektionen mit S INDEL-PEDV ausgegangen werden muss (LIN et al., 2015b), kann davon ausgegangen werden, dass sich alle Tiere innerhalb weniger Tage infiziert hatten. An Tag 7, Tag 14 und Tag 28 waren IgG bei fast allen Mastschweinen nachweisbar und bei etwa der Hälfte sind an Tag 63 noch Antikörper nachweisbar. Für den untersuchten Zeitraum nach einem PED Ausbruch scheint ein auf dem N-Protein basierender ELISA eine gute Möglichkeit darzustellen, um PEDV-spezifische IgG nachzuweisen. Beim Vergleich der beiden ELISAs der Mastschweine aus Betrieb 1 und 2 fällt auf, dass der Median der S/P Ratios bzw. der S/P% der Proben bei Betrieb 1 von Tag 14 auf Tag 28 abgefallen ist, wohingegen er bei Betrieb 2 relativ konstant von Tag 14

bis 28 blieb. Möglicherweise war es zu einer Reinfektion gekommen, wodurch die Immunantwort geboostert wurde. Darauf könnten auch die PCR-Ergebnisse von Betrieb 2 hindeuten. An Tag 14 konnten dort bei 22,9 % der Tiere erneut PEDV-RNA in den Kotproben nachgewiesen werden, obwohl an Tag 7 kein PEDV Genom nachweisbar war.

4.1.2. Saugferkel

Bei Betrieb 3 konnte am Tag 0 bei keinem der Saugferkel und den dazugehörigen Muttersauen Antikörper nachgewiesen werden. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass die Saugferkel, die zu diesem Zeitpunkt eine Woche alt waren, keine maternalen IgG über das Kolostrum aufgenommen hatten. Für Saugferkel spielt die laktogene Immunität eine entscheidende Rolle. Bei Feldbeobachtungen entwickelten 72-100 % der untersuchten Sauen bis vier Wochen nach Feedback-exposure Antikörper gegen PEDV, die mittels des IFA nachgewiesen werden konnten (ROVIRA, 2015). GOEDE et al. (2015) konnten zeigen, dass Sauen, die Kontakt zu S INDEL-PEDV hatten, einen partiellen Schutz an die Ferkel über sieben Monate weitergaben, was sich in einer geringeren Morbidität, Mortalität und einem geringeren Virusgehalt des Darminhaltes darstellte. Daher kann angenommen werden, dass die Sauen auf Betrieb 3 in den letzten Wochen vor dem Ausbruch keinen Kontakt zu PEDV hatten.

Obwohl bei allen Saugferkeln PEDV-RNA in den Kotproben nachgewiesen wurde, serokonvertierten nicht alle. Die Wurfzugehörigkeit schien keine Rolle zu spielen. Experimentelle Studien über die Antikörperentwicklung bei Saugferkeln fehlen bislang; alle bisher durchgeführten Studien wurden an Absetzferkeln durchgeführt. Nicht nur über das Kolostrum übertragene IgG, sondern auch IgA und zelluläre Immunität in der Sauenmilch tragen zum Schutz der Ferkel bei und sind bei Untersuchungen mit Saugferkeln zu berücksichtigen. Da diese Faktoren in unserer Studie nicht evaluiert wurden, ist es nicht möglich, ihren Einfluss genau zu bestimmen. Im Gegensatz zu unseren Ergebnissen entwickelten alle drei bis sechs Tage alten Saugferkel bei Feldbeobachtungen in Italien Antikörper gegen PEDV innerhalb von drei Wochen nach akutem Ausbruch und die Antikörper waren bis zum 60. bzw. 100. Lebenstag nachweisbar (BERTASIO et al., 2016).

Während alle Mastschweine an Tag 7 bereits serokonvertiert waren, wurden bei

den Saugferkeln das Maximum an positiven Proben mit ELISA 1 an Tag 14 (18/34) und mit ELISA 2 an Tag 28 (13/34) erreicht. In einer experimentellen Studie konnte gezeigt werden, dass acht Wochen alte Schweine PEDV-spezifische Serum-IgG schneller entwickeln als zehn Tage alte, mit Milchaustauscher gefütterte Ferkel (GERBER et al., 2016a). Das unausgereifte Immunsystem der eine Woche alten Saugferkel könnte zu den Unterschieden in der Antikörperantwort der verschiedenen Altersgruppen beigetragen haben (GERBER et al., 2016a). Die Qualität und Quantität des Kolostrums ebenso wie die Milchaufnahme könnten die Immunreaktion beeinflusst haben. Der Gesundheitszustand der Sauen könnte einen direkten Einfluss auf die Qualität und Quantität des Kolostrums und der Milch haben (SONG et al., 2015) und die Geburtsgewichte der Ferkel könnten möglicherweise einen Einfluss auf die aufgenommene Milchmenge der einzelnen Ferkel haben (WOLF et al., 2008). Durch den Nachweis von PEDV-RNA in den Kotproben der Sauen und dem fehlenden Nachweis von Antikörpern zu diesem Zeitpunkt kann davon ausgegangen werden, dass die Sauen zuvor keinen Kontakt zu PEDV hatten und somit auch keine Antikörper über das Kolostrum an die Ferkel weitergegeben hatten. Allerdings muss angenommen werden, dass die Sauen im weiteren Verlauf in Folge der PEDV-Infektion selbst Antikörper gebildet haben und diese über die Sauenmilch auch an die Ferkel weitergegeben haben. Da die Sauen in der vorliegenden Studie nur an Tag 0 beprobt wurden, kann keine Aussage zu diesem Faktor gemacht werden. Neben der humoralen Immunität sollte in weiteren Untersuchungen auch der Einfluss der zellulären Immunität, die die Sauen über die Milch an die Ferkel weitergeben, untersucht werden.

4.2. ELISA Vergleich

Für die Untersuchung einer größeren Anzahl an Proben ist auf ein Verfahren zurückzugreifen, welches kein PEDV aus Zellkulturen benötigt, da die Anzucht von PEDV mühsam und nur unter Zusatz von Trypsin möglich ist (CHEN et al., 2014). Ein schnelles und einfach durchzuführendes Verfahren stellen ELISAs dar. Die ersten ELISA basierten noch auf dem kompletten Virus aus Zellkulturen (KNUCHEL et al., 1992; OH et al., 2005). Neuere indirekte ELISAs, wie auch die beiden in dieser Studie verwendeten, basieren auf rekombinanten N-Protein von PEDV (HOU et al., 2007; FAN et al., 2015).

2016 konnten STRANDBYGAARD et al. (2016) mittels ELISA 1 Antikörper gegen verschiedene PEDV-Stämme detektieren, im Vergleich mit drei in-house ELISAs lieferte ELISA 1 jedoch zum Teil falsch positive Resultate. Für eine aussagekräftige Diagnostik von PEDV bedarf es eines Testverfahrens mit einer hohen Sensitivität und Spezifität, vor allem, wenn die Unverdächtigkeit eines Bestandes überprüft werden soll. In einer anderen Studie konnte beim Vergleich von ELISA 1, ELISA 2 und drei in-house ELISAs eine diagnostische Sensitivität von 68,2 % und eine Spezifität von 97,5 % für ELISA 1 bestimmt werden. Bei ELISA 2 betrug die diagnostische Sensitivität 73,7 % und die Spezifität 98,4 % bei einem Konfidenzintervall von 95 % (GERBER et al., 2016b). Da in der vorliegenden Studie keine Goldstandardmethode verwendet wurde, lässt sich keine Aussage über die Sensitivität und Spezifität treffen. Der Wert von serologischen Analysen mit indirekten ELISAs wird von CHOUDHURY et al. (2016) kritisch gesehen. Ihrer Meinung nach erfüllen weder indirekte ELISA noch Blocking-ELISA die Anforderungen für eine Einzeltierdiagnostik. Neben der Sensitivität und Spezifität eines diagnostischen Tests ist auch die Verfügbarkeit bei der Auswahl der Tests in Betracht zu ziehen. Die beiden in dieser Studie verwendeten ELISAs sind in Europa kommerziell erhältlich und ELISA 1 (Swinecheck® PED indirect, Biovet Inc., St-Hyacinthe, Kanada) wurde bei einer Prävalenzstudie in Frankreich und für ein Überwachungsprogramm in Norwegen verwendet (EFSA, 2016).

Beide ELISAs zeigten in der vorliegenden Studie insgesamt eine starke Übereinstimmung ($\kappa = 0{,}771$, SE = 0,024). Für die Proben aller drei Betriebe ergab sich eine starke Übereinstimmung der beiden ELISAs. Es konnte bezüglich der Übereinstimmung der ELISAs kein Unterschied zwischen den Proben der Mastschweine und der Saugferkel festgestellt werden. Aufgrund der niedrigen Probenzahl an Tag 84 und Tag 105 konnte die Übereinstimmung der beiden ELISAs für diese beiden Tage nicht ermittelt werden.

Beide Tests könnten eine praktikable Methode sein, wenn eine vorangegangene PEDV-Exposition untersucht werden soll. Die Größe der Stichprobe muss entsprechend der erwarteten Prävalenz angepasst werden. Das Alter der zu beprobenden Tiergruppe bei vermuteter Exposition ist ebenfalls zu berücksichtigen, da die Ergebnisse unserer Studie vermuten lassen, dass sich die Seroprävalenz bei Saugferkeln und Mastschweinen deutlich unterscheidet.

VI. SCHLUSSFOLGERUNG

Diese Studie soll dazu beitragen, den Nutzen und die Grenzen von verfügbaren diagnostischen Tests zum Nachweis von PEDV und PEDV-spezifischen Antikörpern besser einschätzen zu können. Der Nachweis von PEDV-RNA mittels RT-PCR aus Kotproben stellt ein adäquates Mittel für die Diagnostik und Bestätigung des klinischen PED-Verdachts im akuten Ausbruch und bei rekonvaleszenten Tieren kurze Zeit nach Abklingen des Durchfalls dar. Um eine länger zurückliegende Exposition nachweisen zu können, sind serologische Untersuchungen die diagnostischen Mittel der Wahl. Bei der Stichprobengröße müssen altersabhängige Unterschiede bei der Seroprävalenz von PEDV-Antikörpern berücksichtigt werden. Bei Mastschweinen konnten an Tag 7 bei allen Tieren Antikörper nachgewiesen werden, die bis Tag 28 auch weiter nachgewiesen wurden. Anschließend fielen die Antikörper ab, sodass am Ende der Studie (Tag 63) noch bei 41,2 % (ELISA 1) bzw. 20,6 % (ELISA 2) bei Betrieb 1 und bei 54,3 % (ELISA 1) bzw. 45,7 % (ELISA 2) der Tiere auf Betrieb 2 Antikörper nachweisbar waren. Im Gegensatz dazu konnte nicht bei allen Saugferkeln PEDV-spezifische Antikörper nachgewiesen werden, weshalb die serologische Untersuchung von Saugferkeln nicht uneingeschränkt empfohlen werden kann. In dieser Studie konnten gezeigt werden, dass die beiden verwendeten, auf dem N-Protein basierenden ELISAs vergleichbare Ergebnisse lieferten. Aufgrund der Ergebnisse der vorliegenden Studie muss davon ausgegangen werden, dass Antikörper zuverlässig detektiert werden, wenn die PED-Erkrankung ein bis vier Wochen zurückliegt. Liegt der PED-Ausbruch länger zurück, sind die Antikörper möglicherweise nicht mehr bei allen Tieren vorhanden.

Die von HENNINGER und SCHWARZ (2014) befürchtete mögliche neue Epidemie von PED in Europa ist bislang nicht eingetreten. Zwar kam es im Winter 2014/2015 gehäuft zu Ausbrüchen mit S INDEL-PEDV, zum Teil auch mit massiven Verlusten (STADLER et al., 2015), im darauffolgenden Winter sind die Ausbrüche aber zurückgegangen. Bislang konnte nur in der Ukraine ein Prototyp PEDV nachgewiesen werden. Eine Impfung gegen PEDV ist auf dem europäischen Markt im Moment nicht zugelassen. Daher bleibt eine gute Biosicherheit der einzige Schutz vor einem Eintrag von PEDV in den Bestand.

VII. ZUSAMMENFASSUNG

Ziel der vorliegenden Studie war es, den individuellen Verlauf der Ausscheidung von *porcine epidemic diarrhea virus* (PEDV) über den Kot und die Serokonversion nach Feldinfektionen bei Saugferkeln und Mastschweinen darzustellen.

Es wurden drei süddeutsche Betriebe mit einem akuten PED-Ausbruch ausgewählt, bei denen PED bislang nicht aufgetreten war. Es wurden auf zwei Mastbetrieben Tiere mit einem durchschnittlichen Körpergewicht von 35 kg in die Studie eingeschlossen, sowie eine Woche alte Saugferkel auf einem ferkelerzeugenden Betrieb: Die erste Beprobung (Tag 0) erfolgte zwei bis vier Tage nach Auftreten der ersten klinischen Anzeichen. Pro Betrieb wurden 35 Tiere, die Durchfall zeigten, individuell markiert und in einem ein- bis dreiwöchigen Abstand über 63 Tage (Mastschweine) bzw. 105 Tage (Saugferkel) beprobt. Von allen Studientieren wurden an Tag 0, 7, 14, 28, 42 und 63 individuelle Kotproben und Blutproben entnommen; die Tiere aus dem ferkelerzeugenden Betrieb wurden zusätzlich an Tag 84 und 105 beprobt. Zur Darstellung des Infektionsverlaufes bei den einzelnen Studientieren wurden die Kotproben mittels Real-Time-RT-PCR auf das Vorhandensein von PEDV-RNA untersucht und die Serumproben wurde mit zwei kommerziell erhältlichen indirekten ELISAs (ELISA 1: Swinecheck® PED indirect, Biovet Inc., St-Hyacinthe, Kanada; ELISA 2: ID Screen® PEDV indirect, ID Vet Genetics, Grabels, Frankreich) auf PEDV-spezifische Serumantikörper untersucht.

Die Tiere zeigten an Tag 0 gering- bis hochgradigen, pastös bis wässrigen Durchfall und vereinzelt konnte Erbrechen beobachtet werden. Die Futteraufnahme war bei den Mastschweinen und den laktierenden Sauen reduziert. Die Sequenzierung des ORF S der Isolate der drei Studienbetriebe ergab eine hohe Übereinstimmung untereinander und sie enthielten die für S INDEL-PEDV-Stämme typischen Insertionen und Deletionen. In den Kotproben von Tag 0, 7 und 14 konnte PEDV-RNA nachgewiesen werden. Bei einzelnen Mastschweinen war PEDV-RNA intermittierend in den Kotproben nachweisbar. Bei allen nachfolgenden Beprobungszeitpunkten konnte in keiner der Proben PEDV-RNA nachgewiesen werden. Während des Studienzeitraums kam es auf

keinem der Studienbetriebe zu einem erneuten PED-Ausbruch. Antikörper gegen PEDV konnten bei allen Mastschweinen an Tag 7 in den Serumproben nachgewiesen werden. Bei den meisten Mastschweinen waren IgG bis Tag 28 nachweisbar. Am Ende des Beprobungszeitraums (Tag 63) waren noch bei 47,8 % (ELISA 1) bzw. 33,3 % (ELISA 2) der Mastschweine Antikörper nachweisbar. Bei den Saugferkeln waren erstmals an Tag 7 bei 20,6 % (ELISA 1) bzw. 5,9 % (ELISA 2) Antikörper nachweisbar. Obwohl bei allen Tieren PEDV-RNA in den Kotproben nachgewiesen wurde, waren über die gesamte Studiendauer nur bei 18 der 34 Saugferkel PEDV-spezifische Serumantikörper nachweisbar. Bei einem Tier waren Antikörper ab einer Woche nach dem Ausbruch bis Tag 105 nachweisbar. Ein Vergleich der beiden ELISAs ergab eine insgesamt starke Übereinstimmung.

In der vorliegenden Feldstudie war der direkte Erregernachweis von PEDV aus Kotproben während des akuten Ausbruchs sowie bis Tag 14 möglich. Dies muss beim Einsatz der PCR im Rahmen von Überwachungsprogrammen berücksichtigt werden. Ein bis vier Wochen nach einem akuten Ausbruch scheinen PED-spezifische IgG bei Mastschweinen zuverlässig detektiert werden zu können. Es scheint allerdings altersabhängige Unterschiede in der humoralen Immunantwort zu geben. Da nicht bei allen Saugferkeln Antikörper gegen PEDV nachgewiesen werden konnten, können serologische Untersuchungen mit den in dieser Studie verwendeten ELISAs für Saugferkel nicht uneingeschränkt empfohlen werden.

VIII. SUMMARY

Follow-up investigation of shedding of *porcine epidemic diarrhea virus* (PEDV) in feces and seroconversion in suckling piglets and fattening pigs after field infection

The aim of this field study was to demonstrate the individual shedding of *porcine epidemic diarrhea virus* (PEDV) in feces and seroconversion in suckling piglets and fattening pigs after field infections.

Three farms in southern Germany were chosen which experienced acute outbreaks of PED but had no known exposure to PED in the past. On two fattening farms fattening pigs with a bodyweight of approximately 35 kg were included into the study, as well as one-week old suckling piglets on a farrow-to-finish-farm. The first sampling (d0) was performed two to four days after the onset of clinical signs. On each farm, 35 animals showing diarrhea were included to the study. The study animals were individually marked and samplings were conducted over 63 days (fattening pigs) and 105 days (suckling piglets) in one to three week intervals. Individual fecal samples and blood samples were taken from every study animal on d0, d7, d14, d28, d42, d63; the animals from the farrow-to-finish farm were additionally sampled on d84 and d105. To show the development of infection for the individual animals, fecal samples were tested for PEDV RNA by real time RT-PCR and serum samples were tested for PEDV specific antibodies by two commercially available ELISAs (ELISA 1: Swinecheck®PED indirect, Biovet Inc., St-Hyacinthe, Canada; ELISA 2: ID Screen® PEDV indirect, ID Vet Genetics, Grabels, France).

The animals presented mild to severe, pasty to watery diarrhea on d0 and vomiting was sporadically observed. Feed uptake was reduced in fattening pigs and lactating sows. Sequencing the isolates from the three farms, the ORF S demonstrated high identity and the sequences contained typical insertions and deletions described for S INDEL strains. PEDV RNA was detectable in fecal samples from d0, d7 and d14. Some fattening pigs showed intermittingly positive fecal samples. In the samples from all subsequent samplings, no PEDV RNA could be detected. No reoccurrence of PED could be observed on the farms for the duration of the study. Antibodies were detectable in the serum samples in all

fattening pigs from d7. For most fattening pigs, IgG were detectable until d28. At the end of the study period (d63), in 47.8% (ELISA 1) or 33.3% (ELISA 2) of the samples of the fattening pigs antibodies could still be detected. In suckling piglets, antibodies were detectable from d7 in 20.6 % (ELISA 1) and 5.9 % (ELISA 2) of the piglets. Although PEDV RNA was detectable in fecal samples of all piglets, only 18 of the 34 piglets developed detectable antibodies. In one animal, antibodies were detectable from d7 to d105. The comparison of both ELISAs showed substantial agreement.

In the present field study, the direct detection of PEDV in fecal samples was possible during the acute outbreak and up to d14. This has to be considered when using PCR within monitoring programs. One to four weeks after an acute outbreak, PEDV specific IgG can be reliably detected in fattening pigs. However, there seem to be age dependent differences in the humoral immune response. Since not all suckling piglets developed detectable antibodies, serological investigation cannot be recommended without restriction for this age group when using the same ELISAs as for this study.

IX. LITERATURVERZEICHNIS

AASV. Porcine Epidemic Diarrhea Virus (PEDv) - What's New This Week? 2017: https://www.aasv.org/Resources/PEDv/PEDvWhatsNew.php. Zugriff am 03.02.2017.

Alborali LG, Boniotti B, Lavazza A. Surveillance and control of PED coronavirus in pig in Italy. International Conference on Swine Enteric Coronavirus DiseasesChicago, IL, USA: 2014: http://www.aphis.usda.gov/animal_health/animal_dis_spec/swine/downloads/meeting/presentations/24%20-%2020%20-%20Alborali.pdf. Zugriff am 15.08.2015.

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.

Alonso C, Goede DP, Morrison RB, Davies PR, Rovira A, Marthaler DG, Torremorell M. Evidence of infectivity of airborne porcine epidemic diarrhea virus and detection of airborne viral RNA at long distances from infected herds. Vet Res 2014; 45: 73.

Annamalai T, Saif LJ, Lu Z, Jung K. Age-dependent variation in innate immune responses to porcine epidemic diarrhea virus infection in suckling versus weaned pigs. Vet Immunol Immunopathol 2015; 168: 193-202.

Arriba ML, Carvajal A, Pozo J, Rubio P. Mucosal and systemic isotype-specific antibody responses and protection in conventional pigs exposed to virulent or attenuated porcine epidemic diarrhoea virus. Vet Immunol Immunopathol 2002; 85: 85-97.

Baek PS, Choi HW, Lee S, Yoon IJ, Lee YJ, Lee du S, Lee S, Lee C. Efficacy of an inactivated genotype 2b porcine epidemic diarrhea virus vaccine in neonatal piglets. Vet Immunol Immunopathol 2016; 174: 45-49.

Bandrick M, Ariza-Nieto C, Baidoo SK, Molitor TW. Colostral antibody-mediated and cell-mediated immunity contributes to innate and antigen-specific immunity in piglets. Dev Comp Immunol 2014; 43: 114-120.

Beer M, Haas L. Direkter Erregernachweis bei Virusinfektionen. In: Tiermedizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre, 10 edn. Selbitz H-J, Truyen U, Valentin-Weigand P, eds. Stuttgart: Enke Verlag 2015: 75-90.

Bertasio C, Giacomini E, Lazzaro M, Perulli S, Papetti A, Lavazza A, Lelli D, Alborali G, Boniotti MB. Porcine epidemic diarrhea virus shedding and antibody response in swine farms: A longitudinal study. Front Microbiol 2016; 7: 2009.

Bjustrom-Kraft J, Woodard K, Gimenez-Lirola L, Rotolo M, Wang C, Sun Y, Lasley P, Zhang J, Baum D, Gauger P, Main R, Zimmerman J. Porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) detection and antibody response in commercial growing pigs. BMC Vet Res 2016; 12: 99.

Bohl EH. Comments on passive immunity in rotaviral infections. J Am Vet Med Assoc 1978; 173: 568-569.

Bosch BJ, van der Zee R, de Haan CA, Rottier PJ. The coronavirus spike protein is a class I virus fusion protein: structural and functional characterization of the fusion core complex. J Virol 2003; 77: 8801-8811.

Bourne FJ, Curtis J. The transfer of immunoglobins IgG, IgA and IgM from serum to colostrum and milk in the sow. Immunology 1973; 24: 157-162.

Bowman AS, Krogwold RA, Price T, Davis M, Moeller SJ. Investigating the introduction of porcine epidemic diarrhea virus into an Ohio swine operation. BMC Vet Res 2015; 11: 1-7.

Callebaut P, De Bouck P, Pensaert M. Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of the coronavirus-like agent and its antibodies in pigs with porcine epidemic diarrhea. Vet Microbiol 1982; 7: 295-306.

Carvajal A, Lanza I, Diego R, Rubio P, Cármenes P. Seroprevalence of porcine epidemic diarrhea virus infection among different types of breeding swine farms in Spain. Prev Vet Med 1995a; 23: 33-40.

Carvajal A, Lanza I, Diego R, Rubio P, Carmenes P. Evaluation of a blocking ELISA using monoclonal antibodies for the detection of porcine epidemic diarrhea virus and its antibodies. J Vet Diagn Invest 1995b; 7: 60-64.

CFIA. CFIA News Release 18 February 2014, Statement on Porcine Epidemic Diarrhea Virus in Feed. 2014: http://www.inspection.gc.ca/animals/terrestrial-animals/diseases/other-diseases/ped/2014-02-18/eng/1392762739620/1392762820068. Zugriff am 02.05.2016.

Chae C, Kim O, Choi C, Min K, Cho WS, Kim J, Tai JH. Prevalence of porcine epidemic diarrhoea virus and transmissible gastroenteritis virus infection in Korean pigs. Vet Rec 2000; 147: 606-608.

Chang SH, Bae JL, Kang TJ, Kim J, Chung GH, Lim CW, Laude H, Yang MS, Jang YS. Identification of the epitope region capable of inducing neutralizing antibodies against the porcine epidemic diarrhea virus. Mol Cells 2002; 14: 295-299.

Chen Q, Li G, Stasko J, Thomas JT, Stensland WR, Pillatzki AE, Gauger PC, Schwartz KJ, Madson D, Yoon KJ, Stevenson GW, Burrough ER, Harmon KM, Main RG, Zhang J. Isolation and characterization of porcine epidemic diarrhea viruses associated with the 2013 disease outbreak among swine in the United States. J Clin Microbiol 2014; 52: 234-243.

Chen Q, Gauger PC, Stafne MR, Thomas JT, Madson DM, Huang H, Zheng Y, Li G, Zhang J. Pathogenesis comparison between the United States porcine epidemic diarrhoea virus prototype and S-INDEL-variant strains in conventional neonatal piglets. J Gen Virol 2016; 97: 1107-1121.

Choudhury B, Dastjerdi A, Doyle N, Frossard JP, Steinbach F. From the field to the lab - An European view on the global spread of PEDV. Virus Res 2016; 226: 40-49.

Cima G. Viral disease affects U.S. pigs: porcine epidemic diarrhea found in at least 11 states. J Am Vet Med Assoc 2013; 243: 30-31.

Cima G. PED virus reinfecting U.S. herds. Virus estimated to have killed 7 million-plus pigs. J Am Vet Med Assoc 2014; 245: 166-167.

Clement T, Singrey A, Lawson S, Okda F, Nelson J, Diel D, Nelson E, Christopher-Hennings J. Measurement of neutralizing antibodies against porcine epidemic diarrhea virus in sow serum, colostrum, and milk samples and in piglet serum samples after feedback. J Swine Health Prod 2016; 24: 147-153.

Coussement W, Ducatelle R, De Bouck P, Hoorens J. Pathology of experimental CV777 coronavirus enteritis in piglets. I. Histological and histochemical study. Vet Pathol 1982; 19: 46-56.

Crawford K, Lager K, Miller L, Opriessnig T, Gerber P, Hesse R. Evaluation of porcine epidemic diarrhea virus transmission and the immune response in growing pigs. Vet Res 2015; 46: 49.

Curtis J, Bourne FJ. Immunoglobulin quantitation in sow serum, colostrum and milk and the serum of young pigs. Biochim Biophys Acta 1971; 236: 319-332.

Dastjerdi A, Carr J, Ellis RJ, Steinbach F, Williamson S. Porcine epidemic diarrhea virus among farmed pigs, Ukraine. Emerg Infect Dis 2015; 21: 2235-2237.

De Bouck P, Pensaert M. Experimental infection of pigs with a new porcine enteric coronavirus, CV 777. Am J Vet Res 1980; 41: 219-223.

De Bouck P, Pensaert M, Coussement W. The pathogenesis of an enteric infection in pigs, experimentally induced by the coronavirus-like agent, CV 777. Vet Microbiol 1981; 6: 157-165.

De Bouck P, Callebaut P, Pensaert M (1982) Prevalence of porcine epidemic diarrhea (PED) virus in the pig population of different countries. 7th Int Pig Vet Soc Congr. Mexico City. 53.

Dearriba ML, Carvajal A, Lanza I, Rubio P, Carmenes P (1995) Development of an ELISA for the detection of antibody isotypes against porcine epidemic diarrhoea virus (PEDV) in sow's milk. Fondation Merieux, Lyons. 222-225.

Dee S, Clement T, Schelkopf A, Nerem J, Knudsen D, Christopher-Hennings J, Nelson E. An evaluation of contaminated complete feed as a vehicle for porcine epidemic diarrhea virus infection of naive pigs following consumption via natural feeding behavior: proof of concept. BMC Vet Res 2014; 10: 176.

Diel DG, Lawson S, Okda F, Singrey A, Clement T, Fernandes MH, Christopher-Hennings J, Nelson EA. Porcine epidemic diarrhea virus: An overview of current virological and serological diagnostic methods. Virus Res 2016; 226: 60-70.

Doyle LP, Hutchings LM. A transmissible gastroenteritis in pigs. J Am Vet Med Assoc 1946; 108: 257-259.

Drolet R, Morin M, Fontaine M. Fluid therapy trials in neonatal piglets infected with transmissible gastroenteritis virus. Can J Comp Med 1985; 49: 357-360.

Duarte M, Laude H. Sequence of the spike protein of the porcine epidemic diarrhoea virus. J Gen Virol 1994; 75: 1195-1200.

DVG. 13. Liste der nach den Richtlinien der DVG (4. Auflage sowie 3. Auflage für Übergangszeit) geprüften und als wirksam befundenen Desinfektionsmittel für den Tierhaltungsbereich (Handelspräparate). 2016; 23.12.2016: http://www.desinfektion-dvg.de/fileadmin/FG_Desinfektion/Dokumente/Listen/Tierhaltungsbereich/DVG-Desinfektionsmittelliste_TH.pdf. Zugriff am 03.02.2016.

EFSA. Scientific Opinion on porcine epidemic diarrhoea and emerging porcine deltacoronavirus. EFSA Journal 2014; 12: 3877.

EFSA. Collection and review of updated scientific epidemiological data on porcine epidemic diarrhoea. EFSA Journal 2016; 14: 4375.

Fan JH, Zuo YZ, Shen XQ, Gu WY, Di JM. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for the monitoring and surveillance of antibodies to porcine epidemic diarrhea virus based on a recombinant membrane protein. J Virol Methods 2015; 225: 90-94.

Farzan A, Friendship RM, Dewey CE, Warriner K, Poppe C, Klotins K. Prevalence of Salmonella spp. on Canadian pig farms using liquid or dry-feeding. Prev Vet Med 2006; 73: 241-254.

Gerber PF, Gong Q, Huang YW, Wang C, Holtkamp D, Opriessnig T. Detection of antibodies against porcine epidemic diarrhea virus in serum and colostrum by indirect ELISA. Vet J 2014a; 202: 33-36.

Gerber PF, Xiao CT, Chen Q, Zhang J, Halbur PG, Opriessnig T. The spray-drying process is sufficient to inactivate infectious porcine epidemic diarrhea virus in plasma. Vet Microbiol 2014b; 174: 86-92.

Gerber PF, Opriessnig T. Detection of immunoglobulin (Ig) A antibodies against porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) in fecal and serum samples. MethodsX 2015; 2: 368-373.

Gerber PF, Xiao C-T, Lager K, Crawford K, Kulshreshtha V, Cao D, Meng X-J, Opriessnig T. Increased frequency of porcine epidemic diarrhea virus shedding and lesions in suckling pigs compared to nursery pigs and protective immunity in nursery pigs after homologous re-challenge. Vet Res 2016a; 47: 118.

Gerber PF, Lelli D, Zhang J, Strandbygaard B, Moreno A, Lavazza A, Perulli S, Botner A, Comtet L, Roche M, Pourquier P, Wang C, Opriessnig T. Diagnostic evaluation of assays for detection of antibodies against porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) in pigs exposed to different PEDV strains. Prev Vet Med 2016b; 135: 87-94.

Goede D, Murtaugh MP, Nerem J, Yeske P, Rossow K, Morrison R. Previous infection of sows with a "mild" strain of porcine epidemic diarrhea virus confers protection against infection with a "severe" strain. Vet Microbiol 2015; 176: 161-164.

Goede D, Morrison RB. Production impact & time to stability in sow herds infected with porcine epidemic diarrhea virus (PEDV). Prev Vet Med 2016; 123: 202-207.

Grasland B, Bigault L, Bernard C, Quenault H, Toulouse O, Fablet C, Rose N, Touzain F, Blanchard Y. Complete genome sequence of a porcine epidemic diarrhea S gene Indel strain isolated in France in December 2014. Genome Announc 2015; 3: e00535-15.

Greig AS, Mitchell D, Corner AH, Bannister GL, Meads EB, Julian RJ. A hemagglutinating virus producing encephalomyelitis in baby pigs. Can J Comp Med Vet Sci 1962; 26: 49-56.

Guscetti F, Bernasconi C, Tobler K, Van Reeth K, Pospischil A, Ackermann M. Immunohistochemical detection of porcine epidemic diarrhea virus compared to other methods. Clin Diagn Lab Immunol 1998; 5: 412-414.

Haas L, Beer M. Indirekter Erregernachweis. In: Tiermedizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre, 10 edn. Selbitz H-J, Truyen U, Valentin-Weigand P, eds. Stuttgart: Enke Verlag 2015: 90-94.

Hanke D, Jenckel M, Petrov A, Ritzmann M, Stadler J, Akimkin V, Blome S, Pohlmann A, Schirrmeier H, Beer M, Hoper D. Comparison of porcine epidemic diarrhea viruses from Germany and the United States, 2014. Emerg Infect Dis 2015; 21: 493-496.

Heinritzi K, Plank G, Eichhorn W. Neue Aspekte im klinischen Verlauf der Coronavirusinfektion der Schweine. Tierarztl Umsch 1990; 43: 39-44.

Henninger T, Schwarz BA. Porcine epidemic diarrhoea (PED) - Neuausbrüche in deutschen Mastschweinebeständen. Tierarztl Umsch 2014; 69: 394-397.

Hess RG, Bollwahn W, Pospischil A, Heinritzi K, Bachmann PA. Current aspects in the etiology of viral diarrheas of swine: occurrence of infections with the epizootic viral diarrhea (EVD) virus. Berl Munch Tierarztl Wochenschr 1980; 93: 445-449.

Hoang H, Killian ML, Madson DM, Arruda PH, Sun D, Schwartz KJ, Yoon KJ. Full-length genome sequence of a plaque-cloned virulent porcine epidemic diarrhea virus isolate (USA/Iowa/18984/2013) from a midwestern U.S. swine herd. Genome Announc 2013; 1: e01049-13.

Hofmann M, Wyler R. Quantitation, biological and physicochemical properties of cell culture-adapted porcine epidemic diarrhea coronavirus (PEDV). Vet Microbiol 1989; 20: 131-142.

Hofmann M, Wyler R. Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of porcine epidemic diarrhea coronavirus antibodies in swine sera. Vet Microbiol 1990; 21: 263-273.

Hou XL, Yu LY, Liu J. Development and evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay based on recombinant nucleocapsid protein for detection of porcine epidemic diarrhea (PEDV) antibodies. Vet Microbiol 2007; 123: 86-92.

Huang YW, Dickerman AW, Pineyro P, Li L, Fang L, Kiehne R, Opriessnig T, Meng XJ. Origin, evolution, and genotyping of emergent porcine epidemic diarrhea virus strains in the United States. MBio 2013; 4: e00737-13.

ICTV (2012) Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses. Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier Academic Press. 1338.

Ishikawa K, Sekiguchi H, Ogino T, Suzuki S. Direct and rapid detection of porcine epidemic diarrhea virus by RT-PCR. J Virol Methods 1997; 69: 191-195.

Jarvis MC, Lam HC, Zhang Y, Wang L, Hesse RA, Hause BM, Vlasova A, Wang Q, Zhang J, Nelson MI, Murtaugh MP, Marthaler D. Genomic and evolutionary inferences between American and global strains of porcine epidemic diarrhea virus. Prev Vet Med 2016; 123: 175-184.

Jung K, Ahn K, Chae C. Decreased activity of brush border membrane-bound digestive enzymes in small intestines from pigs experimentally infected with porcine epidemic diarrhea virus. Res Vet Sci 2006; 81: 310-315.

Jung K, Wang Q, Scheuer KA, Lu Z, Zhang Y, Saif LJ. Pathology of US porcine epidemic diarrhea virus strain PC21A in gnotobiotic pigs. Emerg Infect Dis 2014; 20: 662-665.

Jung K, Saif LJ. Porcine epidemic diarrhea virus infection: Etiology, epidemiology, pathogenesis and immunoprophylaxis. Vet J 2015; 204: 134-143.

Jung K, Annamalai T, Lu Z, Saif LJ. Comparative pathogenesis of US porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) strain PC21A in conventional 9-day-old nursing piglets vs. 26-day-old weaned pigs. Vet Microbiol 2015; 178: 31-40.

Kim O, Chae C. In situ hybridization for the detection and localization of porcine epidemic diarrhea virus in the intestinal tissues from naturally infected piglets. Vet Pathol 2000; 37: 62-67.

Kim O, Chae C. Comparison of reverse transcription polymerase chain reaction, immunohistochemistry, and in situ hybridization for the detection of porcine epidemic diarrhea virus in pigs. Can J Vet Res 2002; 66: 112-116.

Kim SH, Kim IJ, Pyo HM, Tark DS, Song JY, Hyun BH. Multiplex real-time RT-PCR for the simultaneous detection and quantification of transmissible gastroenteritis virus and porcine epidemic diarrhea virus. J Virol Methods 2007; 146: 172-177.

Knuchel M, Ackermann M, Muller HK, Kihm U. An ELISA for detection of antibodies against porcine epidemic diarrhoea virus (PEDV) based on the specific solubility of the viral surface glycoprotein. Vet Microbiol 1992; 32: 117-134.

Kocherhans R, Bridgen A, Ackermann M, Tobler K. Completion of the porcine epidemic diarrhoea coronavirus (PEDV) genome sequence. Virus Genes 2001; 23: 137-144.

König M, Thiel H-J. Familie Coronaviridae. In: Tiermedizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre, 10 edn. Selbitz H-J, Truyen U, Valentin-Weigand P, eds. Stuttgart: Enke Verlag 2015: 555-572.

Kweon C-H, Lee J-G, Han M-G, Kang Y-B. Rapid diagnosis of porcine epidemic diarrhea virus infection by polymerase chain reaction. J Vet Med Sci 1997; 59: 231-232.

Kweon CH, Kwon BJ, Lee JG, Kwon GO, Kang YB. Derivation of attenuated porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) as vaccine candidate. Vaccine 1999; 17: 2546-2553.

Lelli D, Papetti A, Sabelli C, Rosti E, Moreno A, Boniotti MB. Detection of coronaviruses in bats of various species in Italy. Viruses 2013; 5: 2679-2689.

Li BX, Ge JW, Li YJ. Porcine aminopeptidase N is a functional receptor for the PEDV coronavirus. Virology 2007; 365: 166-172.

Li W, Li H, Liu Y, Pan Y, Deng F, Song Y, Tang X, He Q. New variants of porcine epidemic diarrhea virus, China, 2011. Emerg Infect Dis 2012; 18: 1350-1353.

Li Y, Zheng F, Fan B, Muhammad HM, Zou Y, Jiang P. Development of an indirect ELISA based on a truncated S protein of the porcine epidemic diarrhea virus. Can J Microbiol 2015; 61: 811-817.

Lin CM, Gao X, Oka T, Vlasova AN, Esseili MA, Wang Q, Saif LJ. Antigenic relationships among porcine epidemic diarrhea virus and transmissible gastroenteritis virus strains. J Virol 2015a; 89: 3332-3342.

Lin CM, Annamalai T, Liu X, Gao X, Lu Z, El-Tholoth M, Hu H, Saif LJ, Wang Q. Experimental infection of a US spike-insertion deletion porcine epidemic diarrhea virus in conventional nursing piglets and cross-protection to the original US PEDV infection. Vet Res 2015b; 46: 134.

Lowe J, Gauger P, Harmon K, Zhang J, Connor J, Yeske P, Loula T, Levis I, Dufresne L, Main R. Role of transportation in spread of porcine epidemic diarrhea virus infection, United States. Emerg Infect Dis 2014; 20: 872-874.

Mackay IM, Arden KE, Nitsche A. Real-time PCR in virology. Nucleic Acids Res 2002; 30: 1292-1305.

Madec F, Waddilove J (2002) Control PCV2 or control other factors? Several approaches to a complex problem. PMWS and PCV-2 Diseases: Beyond the Debate. Merial Symposium, Ames, IA, USA. 45-53.

Madson DM, Magstadt DR, Arruda PH, Hoang H, Sun D, Bower LP, Bhandari M, Burrough ER, Gauger PC, Pillatzki AE, Stevenson GW, Wilberts BL, Brodie J, Harmon KM, Wang C, Main RG, Zhang J, Yoon KJ. Pathogenesis of porcine epidemic diarrhea virus isolate (US/Iowa/18984/2013) in 3-week-old weaned pigs. Vet Microbiol 2014; 174: 60-68.

Martelli P, Lavazza A, Nigrelli AD, Merialdi G, Alborali LG, Pensaert MB. Epidemic of diarrhoea caused by porcine epidemic diarrhoea virus in Italy. Vet Rec 2008; 162: 307-310.

Marthaler D, Jiang Y, Otterson T, Goyal S, Rossow K, Collins J. Complete Genome Sequence of Porcine Epidemic Diarrhea Virus Strain USA/Colorado/2013 from the United States. Genome Announc 2013; 1: e00555-13.

Marthaler D, Bruner L, Collins J, Rossow K. Third strain of porcine epidemic diarrhea virus, United States. Emerg Infect Dis 2014; 20: 2162-2163.

Mesquita JR, Hakze-van der Honing R, Almeida A, Lourenco M, van der Poel WH, Nascimento MS. Outbreak of Porcine Epidemic Diarrhea Virus in Portugal, 2015. Transbound Emerg Dis 2015; 62: 586-588.

Moon HW, Norman JO, Lambert G. Age dependent resistance to transmissible gastroenteritis of swine (TGE). I. Clinical signs and some mucosal dimensions in small intestine. Can J Comp Med 1973; 37: 157-166.

Morrison B, Goede D (2014) Epidemiology an economic impact of the PED. American Association of Swine Veterinarians Annual Meeting. Dallas, TX, USA. 605-612.

Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. Methods Enzymol 1987; 155: 335-350.

Nagy B, Nagy G, Meder M, Mocsari E. Enterotoxigenic Escherichia coli, rotavirus, porcine epidemic diarrhoea virus, adenovirus and calici-like virus in porcine postweaning diarrhoea in Hungary. Acta Vet Hung 1996; 44: 9-19.

Niederwerder MC, Nietfeld JC, Bai J, Peddireddi L, Breazeale B, Anderson J, Kerrigan MA, An B, Oberst RD, Crawford K, Lager KM, Madson DM, Rowland RR, Anderson GA, Hesse RA. Tissue localization, shedding, virus carriage, antibody response, and aerosol transmission of Porcine epidemic diarrhea virus following inoculation of 4-week-old feeder pigs. J Vet Diagn Invest 2016; 28: 671-678.

Offit PA, Clark HF. Maternal antibody-mediated protection against gastroenteritis due to rotavirus in newborn mice is dependent on both serotype and titer of antibody. J Infect Dis 1985; 152: 1152-1158.

Oh JS, Song DS, Yang JS, Song JY, Moon HJ, Kim TY, Park BK. Comparison of an enzyme-linked immunosorbent assay with serum neutralization test for serodiagnosis of porcine epidemic diarrhea virus infection. J Vet Sci 2005; 6: 349-352.

Ojkic D, Hazlett M, Fairles J, Marom A, Slavic D, Maxie G, Alexandersen S, Pasick J, Alsop J, Burlatschenko S. The first case of porcine epidemic diarrhea in Canada. Can Vet J 2015; 56: 149-152.

Oka T, Saif LJ, Marthaler D, Esseili MA, Meulia T, Lin CM, Vlasova AN, Jung K, Zhang Y, Wang Q. Cell culture isolation and sequence analysis of genetically diverse US porcine epidemic diarrhea virus strains including a novel strain with a large deletion in the spike gene. Vet Microbiol 2014; 173: 258-269.

Okaniwa A, Harada K, Park DK. Structure of swine transmissible gastroenteritis virus examined by negative staining. Natl Inst Anim Health Q (Tokyo) 1968; 8: 175-181.

Okda F, Liu X, Singrey A, Clement T, Nelson J, Christopher-Hennings J, Nelson EA, Lawson S. Development of an indirect ELISA, blocking ELISA, fluorescent microsphere immunoassay and fluorescent focus neutralization assay for serologic evaluation of exposure to North American strains of Porcine Epidemic Diarrhea Virus. BMC Vet Res 2015; 11: 180.

Opriessnig T, Xiao CT, Gerber PF, Zhang J, Halbur PG. Porcine epidemic diarrhea virus RNA present in commercial spray-dried porcine plasma is not infectious to naive pigs. PLoS One 2014; 9: e104766.

Ouyang K, Shyu DL, Dhakal S, Hiremath J, Binjawadagi B, Lakshmanappa YS, Guo R, Ransburgh R, Bondra KM, Gauger P, Zhang J, Specht T, Gilbertie A, Minton W, Fang Y, Renukaradhya GJ. Evaluation of humoral immune status in porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) infected sows under field conditions. Vet Res 2015; 46: 140.

Pasick J, Berhane Y, Ojkic D, Maxie G, Embury-Hyatt C, Swekla K, Handel K, Fairles J, Alexandersen S. Investigation into the role of potentially contaminated feed as a source of the first-detected outbreaks of porcine epidemic diarrhea in Canada. Transbound Emerg Dis 2014; 61: 397-410.

PEI. Schweineimpfstoffe. 2017: http://www.pei.de/DE/arzneimittel/impfstoff-impfstoffe-fuer-tiere/schweine/schweine-alle-table.html;jsessionid=1A03BAE6ABC8127C0AEE79B286D95027.1_cid344?nn=3263758. Zugriff am 19.02.2017.

Pensaert M. Porcine Epidemic Diarrhea Virus. In: Virus Infections of Porcines. Horzinek MC, ed. Amsterdam: Elsevier 1989: 167-176.

Pensaert MB, de Bouck P. A new coronavirus-like particle associated with diarrhea in swine. Archives of Virology 1978; 58: 243-247.

Pijpers A, van Nieuwstadt AP, Terpstra C, Verheijden JH. Porcine epidemic diarrhoea virus as a cause of persistent diarrhoea in a herd of breeding and finishing pigs. Vet Rec 1993; 132: 129-131.

Plonait H. Hautkrankheiten und Hautveränderungen. In: Lehrbuch der Schweinekrankheiten, 4 edn. Waldmann K-H, Wendt M, eds. Stuttgart: Parey Verlag 2001: 61-91.

Pospischil A, Stuedli A, Kiupel M. Diagnostic notes update on porcine epidemic diarrhea. J Swine Health Prod 2002; 10: 81-85.

Pritchard GC, Paton DJ, Wibberley G, Ibata G. Transmissible gastroenteritis and porcine epidemic diarrhoea in Britain. Vet Rec 1999; 144: 616-618.

Puranaveja S, Poolperm P, Lertwatcharasarakul P, Kesdaengsakonwut S, Boonsoongnern A, Urairong K, Kitikoon P, Choojai P, Kedkovid R, Teankum K, Thanawongnuwech R. Chinese-like strain of porcine epidemic diarrhea virus, Thailand. Emerg Infect Dis 2009; 15: 1112-1115.

Rodák L, Valíček L, Šmíd B, Nevoránková Z. An ELISA optimized for porcine epidemic diarrhoea virus detection in faeces. Vet Microbiol 2005; 105: 9-17.

Rovira A (2015) Field application: Results of longitudinal field studies. American Association of Swine Veterinarians Annual Meeting. Orlando, FL, USA. 33-34

Sachs L. Die Auswertung von Vierfeldertafeln. In: Angewandte Statistik - Anwendung statistischer Methoden, 11 edn. Sachs L, ed. Berlin Heidelberg: Springer Verlag 2004: 450-481.

Saif LJ, Bohl EH, Gupta RK. Isolation of porcine immunoglobulins and determination of the immunoglobulin classes of transmissible gastroenteritis viral antibodies. Infect Immun 1972; 6: 600-609.

Saif LJ. Coronavirus immunogens. Vet Microbiol 1993; 37: 285-297.

Saif LJ, Pensaert M, Sestak K, Yeo SG, Jung K. Coronaviruses. In: Diseases of Swine, 10 edn. Zimmerman JJ, Karriker L, Ramirez A, Schwartz KJ, Stevenson GW, eds. Ames: Wiley-Blackwell 2012: 501-524.

Scharrer E. Pathophysiologie der Diarrhoe. Tierarztl Prax Ausg G Grosstiere Nutztiere 1986; 67: 373-379.

Schweer WP, Pearce SC, Burrough ER, Schwartz K, Yoon KJ, Sparks JC, Gabler NK. The effect of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine epidemic diarrhea virus challenge on growing pigs II: Intestinal integrity and function. J Anim Sci 2016; 94: 523-532.

Shibata I, Tsuda T, Mori M, Ono M, Sueyoshi M, Uruno K. Isolation of porcine epidemic diarrhea virus in porcine cell cultures and experimental infection of pigs of different ages. Vet Microbiol 2000; 72: 173-182.

Song D, Park B. Porcine epidemic diarrhoea virus: a comprehensive review of molecular epidemiology, diagnosis, and vaccines. Virus Genes 2012; 44: 167-175.

Song D, Chen Y, Peng Q, Huang D, Zhang T, Huang T, Zhang F, Zhou X, Tang Y. Full-length genome sequence of a variant porcine epidemic diarrhea virus strain, CH/GDZQ/2014, responsible for a severe outbreak of diarrhea in piglets in Guangdong, China, 2014. Genome Announc 2014; 2: e01239-14.

Song D, Moon H, Kang B. Porcine epidemic diarrhea: a review of current epidemiology and available vaccines. Clin Exp Vaccine Res 2015; 4: 166-176.

Song DS, Oh JS, Kang BK, Yang JS, Moon HJ, Yoo HS, Jang YS, Park BK. Oral efficacy of Vero cell attenuated porcine epidemic diarrhea virus DR13 strain. Res Vet Sci 2007; 82: 134-140.

Sozzi E, Luppi A, Lelli D, Martin AM, Canelli E, Brocchi E, Lavazza A, Cordioli P. Comparison of enzyme-linked immunosorbent assay and RT-PCR for the detection of porcine epidemic diarrhoea virus. Res Vet Sci 2010; 88: 166-168.

Sozzi E, Papetti A, Lelli D, Boniotti B, Moreno A, Brocchi E, Alborali LG, Lavazza A, Cordioli P (2014) Diagnosis and investigations on PED in Northern Italy. 8th Annual EPIZONE meeting. Copenhagen, Denmark. 12.

Spaan W, Cavanagh D, Horzinek MC. Coronaviruses: structure and genome expression. J Gen Virol 1988; 69: 2939-2952.

Spindler B, Hartung, J. Reinigung und Desinfektion. In: Diagnostik und Gesundheitsmanagement in Schweinebestand. Grosse Beilage E, Wendt, M., ed. Stuttgart: Verlag Eugen Ulmer 2013: 53-61.

Stadler J, Zoels S, Fux R, Hanke D, Pohlmann A, Blome S, Weissenbock H, Weissenbacher-Lang C, Ritzmann M, Ladinig A. Emergence of porcine epidemic diarrhea virus in southern Germany. BMC Vet Res 2015; 11: 142.

Steinbach F, Dastjerdi A, Peake J, La Rocca SA, Tobin FP, Frossard JP, Williamson S. A retrospective study detects a novel variant of porcine epidemic diarrhea virus in England in archived material from the year 2000. PeerJ 2016; 4: e2564.

Steinrigl A, Fernandez SR, Stoiber F, Pikalo J, Sattler T, Schmoll F. First detection, clinical presentation and phylogenetic characterization of Porcine epidemic diarrhea virus in Austria. BMC Vet Res 2015; 11: 310.

Stevenson GW, Hoang H, Schwartz KJ, Burrough ER, Sun D, Madson D, Cooper VL, Pillatzki A, Gauger P, Schmitt BJ, Koster LG, Killian ML, Yoon KJ. Emergence of Porcine epidemic diarrhea virus in the United States: clinical signs, lesions, and viral genomic sequences. J Vet Diagn Invest 2013; 25: 649-654.

Strandbygaard B, Lavazza A, Lelli D, Blanchard Y, Grasland B, Poder SL, Rose N, Steinbach F, van der Poel WH, Widen F, Belsham GJ, Botner A. Inter-laboratory study to characterize the detection of serum antibodies against porcine epidemic diarrhoea virus. Vet Microbiol 2016; 197: 151-160.

Sueyoshi M, Tsuda T, Yamazaki K, Yoshida K, Nakazawa M, Sato K, Minami T, Iwashita K, Watanabe M, Suzuki Y, et al. An immunohistochemical investigation of porcine epidemic diarrhoea. J Comp Pathol 1995; 113: 59-67.

Sun R, Leng Z, Dekun C, Song C. Multiple factors contribute to persistent porcine epidemic diarrhea infection in the field: An investigation on porcine epidemic diarrhea repeated outbreaks in the same herd. J Anim Vet Adv 2014a; 13: 410-415.

Sun R, Leng Z, Zhai SL, Chen D, Song C. Genetic variability and phylogeny of current Chinese porcine epidemic diarrhea virus strains based on spike, ORF3, and membrane genes. ScientificWorldJournal 2014b; 2014: 208439.

Sun RQ, Cai RJ, Chen YQ, Liang PS, Chen DK, Song CX. Outbreak of porcine epidemic diarrhea in suckling piglets, China. Emerg Infect Dis 2012; 18: 161-163.

Takahashi K, Okada K, Ohshima K. An outbreak of swine diarrhea of a new-type associated with coronavirus-like particles in Japan. Nihon Juigaku Zasshi 1983; 45: 829-832.

Theuns S, Conceicao-Neto N, Christiaens I, Zeller M, Desmarets LM, Roukaerts ID, Acar DD, Heylen E, Matthijnssens J, Nauwynck HJ. Complete genome sequence of a porcine epidemic diarrhea virus from a novel outbreak in Belgium, January 2015. Genome Announc 2015; 3: e00506-15.

Thomas JT, Chen Q, Gauger PC, Gimenez-Lirola LG, Sinha A, Harmon KM, Madson DM, Burrough ER, Magstadt DR, Salzbrenner HM, Welch MW, Yoon KJ, Zimmerman JJ, Zhang J. Effect of porcine epidemic diarrhea virus infectious doses on infection outcomes in naive conventional neonatal and weaned pigs. PLoS One 2015a; 10: e0139266.

Thomas PR, Karriker LA, Ramirez A, Zhang J, Ellingson JS, Crawford KK, Bates JL, Hammen KJ, Holtkamp DJ. Evaluation of time and temperature sufficient to inactivate porcine epidemic diarrhea virus in swine feces on metal surfaces. J Swine Health Prod 2015b; 23: 84-90.

Toplak I, Ipavec M, Kuhar U, Kusar D, Papic B, Koren S, Toplak N. Complete genome sequence of the porcine epidemic diarrhea virus strain SLO/JH-11/2015. Genome Announc 2016; 4: e01752-15.

Trujillo-Ortega ME, Beltran-Figueroa R, Garcia-Hernandez ME, Juarez-Ramirez M, Sotomayor-Gonzalez A, Hernandez-Villegas EN, Becerra-Hernandez JF, Sarmiento-Silva RE. Isolation and characterization of porcine epidemic diarrhea virus associated with the 2014 disease outbreak in Mexico: case report. BMC Vet Res 2016; 12: 132.

Van der Wolf P, Van Walderen A, Meertens M, Van Hout A, Duinhof T, Geudeke M (2015) First case of porcine epidemic diarrhoea (PED) caused by a new variant of PED virus in the Netherlands. 7th ESPHM. Nantes, France. 79.

Vlasova AN, Marthaler D, Wang Q, Culhane MR, Rossow KD, Rovira A, Collins J, Saif LJ. Distinct characteristics and complex evolution of PEDV strains, North America, May 2013-February 2014. Emerg Infect Dis 2014; 20: 1620-1628.

Wang L, Byrum B, Zhang Y. New variant of porcine epidemic diarrhea virus, United States, 2014. Emerg Infect Dis 2014a; 20: 917-919.

Wang L, Zhang Y, Byrum B. Development and evaluation of a duplex real-time RT-PCR for detection and differentiation of virulent and variant strains of porcine epidemic diarrhea viruses from the United States. J Virol Methods 2014b; 207: 154-157.

Wang XM, Niu BB, Yan H, Gao DS, Yang X, Chen L, Chang HT, Zhao J, Wang CQ. Genetic properties of endemic Chinese porcine epidemic diarrhea virus strains isolated since 2010. Arch Virol 2013; 158: 2487-2494.

Wendt M, Epe C, Grummer B, Kamphues J, Kietzmann M, Rohde J, Weissenböck H. Diagnostik, Prophylaxe, Therapie von Erkrankungen des Verdauungstraktes in Schweinebeständen. In: Diagnostik und Gesundheitsmanagement im Schweinebestand. Grosse Beilage E, Wendt M, eds. Stuttgart: Verlag Eugen Ulmer 2013: 271-349.

Williamson S, Strugnell B, Thomson J, Webster G, McOrist S, Clarke H. Emergence of severe porcine epidemic diarrhoea in pigs in the USA. Vet Rec 2013; 173: 146-148.

Wolf J, Žáková E, Groeneveld E. Within-litter variation of birth weight in hyperprolific Czech Large White sows and its relation to litter size traits, stillborn piglets and losses until weaning. Livest Sci 2008; 115: 195-205.

Woo PC, Lau SK, Lam CS, Lai KK, Huang Y, Lee P, Luk GS, Dyrting KC, Chan KH, Yuen KY. Comparative analysis of complete genome sequences of three avian coronaviruses reveals a novel group 3c coronavirus. J Virol 2009; 83: 908-917.

Woo PC, Lau SK, Lam CS, Lau CC, Tsang AK, Lau JH, Bai R, Teng JL, Tsang CC, Wang M, Zheng BJ, Chan KH, Yuen KY. Discovery of seven novel Mammalian and avian coronaviruses in the genus deltacoronavirus supports bat coronaviruses as the gene source of alphacoronavirus and betacoronavirus and avian coronaviruses as the gene source of gammacoronavirus and deltacoronavirus. J Virol 2012; 86: 3995-4008.

Wood EN. An apparently new syndrome of porcine epidemic diarrhoea. Vet Rec 1977; 100: 243-244.

Yamamoto R, Soma J, Nakanishi M, Yamaguchi R, Niinuma S. Isolation and experimental inoculation of an S INDEL strain of porcine epidemic diarrhea virus in Japan. Res Vet Sci 2015; 103: 103-106.

Zhao ZP, Yang Z, Lin WD, Wang WY, Yang J, Jin WJ, Qin AJ. The rate of co-infection for piglet diarrhea viruses in China and the genetic characterization of porcine epidemic diarrhea virus and porcine kobuvirus. Acta Virol 2016; 60: 55-61.

X. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Beprobungszeitpunkte Tag 0 bis Tag 105 ..... *24*

Abbildung 2: Phylogenetischer Stammbaum der PEDV-Isolate der Studienbetriebe (●) und 23 PEDV Referenzstämmen. TGEV wurde zu Outgroup-Routing verwendet. *35*

Abbildung 3: Ergebnisse der PEDV Real-Time-RT-PCR aus Kotproben aller Studientiere aufgeteilt nach den drei Studienbetrieben und den Beprobungstagen *37*

Abbildung 4: Antikörper gemessen mit ELISA 1 (Swinecheck® PED indirect, Biovet Inc., St-Hyacinthe, Kanada) als S/P Ratio, Cut-off = 0,4; aufgeteilt nach Betrieben *42*

Abbildung 5: Antikörper gemessen mit ELISA 2 (ID Screen® PEDV indirect, ID Vet Genetics, Grabels, Frankreich) als S/P%, Cut-off = 60; aufgeteilt nach Betrieben *44*

Abbildung 6: Antikörper gemessen mit ELISA 1 (Swinecheck® PED indirect, Biovet Inc., St-Hyacinthe, Kanada), Studientiere von Betrieb 3, Cut-off = 0,4; aufgeteilt nach Würfen *47*

Abbildung 7: Antikörper gemessen mit ELISA 2 (ID Screen® PEDV indirect, ID Vet Genetics, Grabels Frankreich), Studientiere von Betrieb 3, Cut-off = 60; aufgeteilt nach Würfen *48*

XI. TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Betriebsdaten der drei Studienbetriebe *22*

Tabelle 2: Alter der eingeschlossenen und Anzahl der ausgewerteten Studientiere, sowie die Tage zwischen dem ersten Auftreten von Durchfall in der Tiergruppe und der ersten Beprobung *25*

Tabelle 3: Verwendete Primer für modifizierte PCR nach Kim et al. (2007) *27*

Tabelle 4: Reaktionsansatz für PEDV-PCR *28*

Tabelle 5: Temperaturprofil für die PEDV-PCR *28*

Tabelle 6: Muster des Nachweises von PEDV-RNA in Kotproben der Studientiere aufgeteilt nach Betriebe (Anzahl und Prozente) *39*

Tabelle 7: Nachweis von PEDV-spezifischen Antikörpern mit ELISA 1 bzw. ELISA 2 bei den Studientieren von Betrieb 3, alle Beprobungszeitpunkte berücksichtigt *45*

Tabelle 8: Anzahl der Saugferkel aus Betrieb 3, bei denen an mindestens einem der Beprobungszeitpunkte Antikörper mittels ELISA 1 bzw. ELISA 2 nachweisbar waren, aufgeteilt nach den fünf Würfen *46*

Tabelle 9: Anzahl der Serumproben, bei denen an den jeweiligen Beprobungstagen PEDV-spezifische Antikörper mit ELISA 1 bzw. ELISA 2 nachgewiesen wurden, aufgeteilt nach Betrieben *49*

XII. DANKSAGUNG

An erster Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr. Mathias Ritzmann für die Überlassung dieses aktuellen und äußerst interessanten Themas, sowie für seine Unterstützung und die lehrreiche Zeit an der Klinik für Schweine bedanken.

Ein herzliches Dankeschön an meinen Betreuerinnen Frau Dr. Julia Stadler und Dr. Jasmin Numberger, für die tolle Betreuung und vor allem für ihre Ausdauer und Geduld bei den Korrekturen.

Ein großer Dank gilt Dr. Robert Fux und seinem Team für die Unterstützung bei der Auswertung meiner Proben. Dr. Robert Fux gilt ein ganz besonderer Dank für sein unermüdliches Engagement, die wertvolle Inspiration und schnelle Hilfe, wenn der Hamilton mal streikte.

Bei Frau Dr. Strutzberg-Minder und dem gesamten Team der IVD GmbH möchte ich mich für die Auswertung der Serumproben und die gute Zusammenarbeit bedanken.

Allen Kollegen und Mitdoktoranden danke ich für die Unterstützung bei der Durchführung und vor allem fürs Rücken frei halten in der Endphase. Frau Dr. Susanne Zöls danke ich ganz besonders für ihre Unterstützung bei der statistischen Auswertung.

Ich danke allen Tierärzten, insbesondere den Mitarbeitern des Schweinegesundheitsdienstes Baden-Württemberg, für ihre Mithilfe bei der Betriebssuche. Vielen Dank an die Landwirte, die die Durchführung der Studie ermöglicht haben.

Mein größter Dank gilt dem ganzen Team der Tierarztpraxis Dr. Wesselmann, die mir mich während der ganzen Zeit bedingungslos unterstützt und stets aufmunternde Worte gefunden haben.

Bei meiner Familie bedanke ich mich für die Unterstützung während des gesamten Studiums und der Dissertation und dafür, dass sie immer an mich geglaubt haben. Ganz besonders möchte ich mich bei meiner Schwägerin Karen Moser für ihre gewissenhafte Korrektur bedanken.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei Timo Witt bedanken, der immer für mich da war und mir den Rücken freigehalten hat. Vielen Dank für die Unterstützung bei Formatierungsangelegenheiten sowie die unermüdliche Geduld und Rücksichtnahme während der gesamten Zeit!