

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

Porzines Circovirus Typ 3 in deutschen Mastbeständen -
Vorkommen und genetische Charakterisierung

von Christina Anna Söckler

aus München

München 2018

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

Lehrstuhl für Krankheiten des Schweines

Arbeit angefertigt unter der Leitung von: Univ.-Prof Dr. Mathias Ritzmann

Mitbetreuung durch: Dr. Matthias Eddicks und Dr. Robert Fux

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Mathias Ritzmann

Korreferent: Priv.-Doz. Dr. Nikolai Klymiuk

Tag der Promotion: 27.07.2018

Meiner Familie

Teile dieser Arbeit wurden bereits in folgender wissenschaftlicher Arbeit veröffentlicht:

Fux R, Söckler C, Link EK, Renken C, Krejci R, Sutter G, Ritzmann M, Eddicks M. Full genome characterization of porcine circovirus type 3 isolates reveals the existence of two distinct groups of virus strains. *Virology* 2018; 15: 1-9.

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG.....	1
II.	LITERATURÜBERSICHT	3
1.	Vorkommen von PCV3	3
2.	Mögliche, mit PCV3 assoziierte Krankheitsbilder	8
3.	Morphologie von PCV3	9
4.	Genomstruktur von PCV3	10
5.	Phylogenetische Analysen	12
6.	Nachweis von PCV3	14
6.1.	Genomnachweis mittels real-time PCR.....	14
6.2.	Genomnachweis mittels isothermaler DNA-Amplifikation	15
6.3.	Nachweis von Serumantikörpern mittels ELISA.....	16
6.4.	Pathohistologische Untersuchung	16
6.5.	Virusisolation	18
III.	MATERIAL UND METHODEN	19
1.	Arbeitshypothesen	19
2.	Blutproben	19
3.	Bestandsinformationen	20
4.	Quantitative real-time PCR	21
5.	RCA.....	23
6.	Sequenzierung.....	24
7.	Phylogenetische Analysen	26
8.	Statistische Auswertung	27
IV.	ERGEBNISSE	29
1.	Nachweis von PCV3-DNA mittels real-time PCR	29
1.1.	Vorkommen von PCV3 auf Bestandsebene.....	29
1.2.	Auswertung der Ergebnisse auf Bestandsebene	32
1.3.	Vorkommen von PCV3 auf Einzeltierebene	33

1.4.	Untersuchung von PCV3-positiven Einzelproben auf PCV2-DNA	36
2.	Sequenzierung	37
3.	Ergebnisse der phylogenetischen Analysen	39
4.	Auswertung der Cluster-Zugehörigkeit auf Bestandsebene	46
V.	DISKUSSION	51
1.	Vorkommen von PCV3 in Deutschland	51
1.1.	Auf Bestandsebene	51
1.2.	Auf Einzeltierebene	53
2.	Auswertung der Ergebnisse der real-time PCR	55
3.	Genetische Charakterisierung von PCV3	56
4.	Ergebnisse der phylogenetische Analysen	57
5.	Cluster und Subcluster	58
VI.	ZUSAMMENFASSUNG	61
VII.	SUMMARY	63
VIII.	LITERATURVERZEICHNIS	65
IX.	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	75
X.	TABELLENVERZEICHNIS	79
XI.	ANHANG	81
XII.	DANKSAGUNG	87

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
A	Alanin
aa	amino acid
BB	Brandenburg
bp	base pairs
BW	Baden-Württemberg
BY	Bayern
bzw.	beziehungsweise
Cap	Kapsid
Ct	threshold cycle
DE	Deutschland
DNA	deoxyribonucleic acid
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
F	Phenylalanin
g	Gramm
I	Isoleucin
ID	Identifikationsnummer
IR	intergenische Region
K	Lysin
L	Leucin
LAMP	loop-mediated isothermal amplification
LMU	Ludwig-Maximilians-Universität
MAb 14	monoclonal antibody for clone 14
ml	Milliliter
MV	Mecklenburg-Vorpommern
n	number
n _{ges}	Gesamtanzahl
NI	Niedersachsen
nM	Nanomolar
NW	Nordrhein-Westfalen
ORF	open reading frame
ORI	origin of replication
p	Signifikanzwert
PCR	polymerase chain reaction

PCV	porzines Circovirus
PDNS	porcine dermatitis and nephropathy syndrome
PMWS	post-weaning multisystemic wasting syndrome
PPV	porzines Parvovirus
PRRS	porcine reproductive and respiratory syndrome
PRRSV	porcine reproductive and respiratory syndrome virus
R	Arginin
RCA	rolling circle amplification
RCR	rolling circle replication
Rep	Replikase
rev	reverse
RNase	Ribonuklease
RPA	recombinase polymerase amplification
S	Serin
SH	Schleswig-Holstein
sog.	sogenannt
ST	Sachsen-Anhalt
T	Threonin
TAE	TRIS-Acetat-EDTA
TH	Thüringen
TTSuV	torque teno sus virus
V	Valin
Y	Tyrosin
z. B.	zum Beispiel

I. EINLEITUNG

Im Jahr 2016 wiesen PHAN et al. (2016) und PALINSKI et al. (2017) in nordamerikanischen Schweinebeständen ein Virus mit zirkulärer Einzelstrang-DNA nach. Genetische Analysen ergaben, dass der Genomaufbau dieses Virus dem der porzinen Circoviren (PCV) entspricht (PALINSKI et al., 2017). Mit einer Länge von 2.000 Basenpaaren (bp) ist das Genom dieses Virus jedoch deutlich länger als das der bisher bekannten PCV-Spezies, porzines Circovirus Typ 1 (PCV1) und porzines Circovirus Typ 2 (PCV2) (PHAN et al., 2016). Phylogenetische Analysen zeigten, dass die Sequenzen des in Nordamerika gefundenen Virus in ein gemeinsames Cluster eingeteilt werden können (PALINSKI et al., 2017). Die Sequenzen dieses Clusters konnten in der phylogenetischen Analyse eindeutig von den PCV1- und PCV2-Sequenzen abgegrenzt werden (PALINSKI et al., 2017). Zudem ergab der Vergleich der offenen Leserahmen (ORF) für das Replikase- (Rep; ORF1) und das Nukleokapsidprotein (Cap; ORF2) zwischen den bekannten und dem neuen porzinen Circovirus nur geringe Sequenzidentitäten auf Nukleotidebene (PALINSKI et al., 2017). Basierend auf diesen Erkenntnissen wurde vorgeschlagen, das kürzlich entdeckte porzine Circovirus als neue Circoviruspezies mit der Bezeichnung porzines Circovirus Typ 3 (PCV3) zu führen (PHAN et al., 2016; PALINSKI et al., 2017). Neben den nordamerikanischen Beständen der USA und Mexikos waren auch Bestände in Brasilien (TOCHETTO et al., 2017), China (KU et al., 2017), Thailand (KEDKOVID et al., 2018) und Südkorea (KWON et al., 2017) PCV3-positiv. In Europa konnte PCV3-DNA bisher in Polen (STADEJEK et al., 2017), Italien (FACCINI et al., 2017), Dänemark, Spanien (FRANZO et al., 2018) und im Vereinigten Königreich (COLLINS et al., 2017) nachgewiesen werden.

Basierend auf klinischen Untersuchungen wurde vermutet, dass PCV3 an der Entstehung klinischer Bilder, wie multisystemischen Entzündungen (PHAN et al., 2016), dem *porcine dermatitis and nephropathy syndrome* (PDNS) (PALINSKI et al., 2017) oder Reproduktionsstörungen (KU et al., 2017; PALINSKI et al., 2017) beteiligt sein könnte. Auch das Auftreten von neurologischen (CHEN et al., 2017) oder respiratorischen Problemen (SHEN et al., 2017; ZHAI et al., 2017) sowie das Vorkommen von Durchfall (ZHAI et al., 2017) wurde mit PCV3 in Verbindung gebracht. Einige Autoren berichteten in zahlreichen Beständen über den Nachweis von PCV3-DNA in klinisch unauffälligen Tieren (COLLINS et al., 2017; KWON et al., 2017; STADEJEK et al., 2017).

Im Rahmen der vorliegenden Studie soll durch eine retrospektive Auswertung von Serumproben das Vorkommen von PCV3 in deutschen Mastbeständen untersucht und dessen Genom genetisch charakterisiert und phylogenetisch analysiert werden.

Dabei sollen folgende Arbeitshypothesen überprüft werden:

1. Basierend auf den derzeit vorliegenden Informationen wird innerhalb der deutschen Mastbestände eine vergleichbar hohe PCV3-Prävalenz wie in den Beständen anderer Länder vermutet.
2. Sollte PCV3-DNA in deutschen Mastbeständen nachgewiesen werden, wird aufgrund des ausgeprägten internationalen Handels mit Schweinen oder aus Schweinen gewonnenen Produkten angenommen, dass zwischen deutschen und internationalen PCV3-Varianten eine hohe Sequenzidentität besteht.

II. LITERATURÜBERSICHT

1. Vorkommen von PCV3

PCV3-DNA wird erstmals im Jahr 2016 in nordamerikanischen Schweinebeständen nachgewiesen (PHAN et al., 2016; PALINSKI et al., 2017). Als Untersuchungsmaterial dienen Gewebehomogenate dreier Schweine, die zwischen zwei und zehn Wochen alt sind (PHAN et al., 2016). Auch in Gewebeproben von Sauen, die mit PDNS-ähnlichen Symptomen akut verendet sind sowie in deren abortierten, mumifizierten Feten wird PCV3-DNA nachgewiesen (PALINSKI et al., 2017). Die Bestände, aus welchen die Schweine stammen, liegen in den USA sowie in Mexiko (PHAN et al., 2016; PALINSKI et al., 2017). Die genaue Verteilung der PCV3-positiven Bestände auf die US-Bundesstaaten kann der Abbildung 1 entnommen werden. Des Weiteren wird in zwei Ferkelerzeugerbetrieben im Süden Brasiliens PCV3-DNA in Serumproben von Sauen nachgewiesen (TOCHETTO et al., 2017).

Neben den amerikanischen Schweinebeständen sind auch zahlreiche Bestände in unterschiedlichen Regionen Asiens PCV3-positiv (KU et al., 2017; KWON et al., 2017; ZHAI et al., 2017). Erstmals weisen KU et al. (2017) PCV3-DNA in einigen chinesischen Provinzen sowie in den Städten Chongqin und Shenyang nach. Von den untersuchten Beständen sind 68,6% (24/35) PCV3-positiv. Als Probenmaterial dienen totgeborene Ferkel und Gewebeproben sowie Sperma und Serumproben (KU et al., 2017).



Abbildung 1: Darstellung der US-Bundesstaaten mit dem Nachweis von PCV3-positiven Beständen (rote Umrandung = Nachweis von mindestens einem PCV3-positiven Bestand innerhalb des US-Bundesstaates);

Quelle:

<https://www.weltkarte.com/typo3temp/images/landkarte-usa.png>.

FAN et al. (2017) können in einer retrospektiven Untersuchung ebenfalls PCV3-DNA in den Gewebeproben aus einem Sauenbestand der chinesischen Provinz Hubei detektieren (FAN et al., 2017). Außerdem wird in den chinesischen Provinzen Guangdong und Guangxi PCV3-DNA in Gewebeproben von Ferkeln und Mastschweinen nachgewiesen (CHEN et al., 2017; WEN et al., 2017). ZHENG et al. (2017b) stellen fest, dass auch Schweinebestände der Provinz Shandong PCV3-positiv sind. Hierfür werden die Gewebeproben totgeborener Feten untersucht (ZHENG et al., 2017b). In einer retrospektiven Studie zeigen FU et al. (2017) auf, dass PCV3-DNA in chinesischen Gewebeproben, die von Februar 2015 stammen, nachgewiesen werden kann. Die genaue Lage der PCV3-positiven Bestände in den chinesischen Provinzen ist in Abbildung 2 dargestellt.



Abbildung 2: Darstellung der chinesischen Provinzen mit dem Nachweis von PCV3-positiven Beständen (rote Umrandung = Nachweis von mindestens einem PCV3-positiven Bestand innerhalb der Provinz);

Quelle: <http://www.d-maps.com/m/asia/china/chine/chine29.gif>.

In der Provinz Prachin Buri im Osten Thailands wird in einem Bestand mit 3.000 Sauen PCV3-DNA detektiert (KEDKCOVID et al., 2018). Als Untersuchungsmaterial verwenden KEDKCOVID et al. (2018) Gewebe- und Serumproben von Aufzuchtferkeln sowie Serumproben von Sauen. In Südkorea sind 72,6% (53/73) der beprobten Bestände PCV3-positiv (KWON et al., 2017). Dabei wird PCV3-DNA mit Hilfe von Kastricken im Speichel aller untersuchten Altersklassen (Absetzferkel, Aufzuchtferkel, Mastschwein) und in kranken Schweinen nachgewiesen (KWON et al., 2017). Abbildung 3 zeigt die Verteilung der PCV3-positiven Bestände in den südkoreanischen Provinzen.

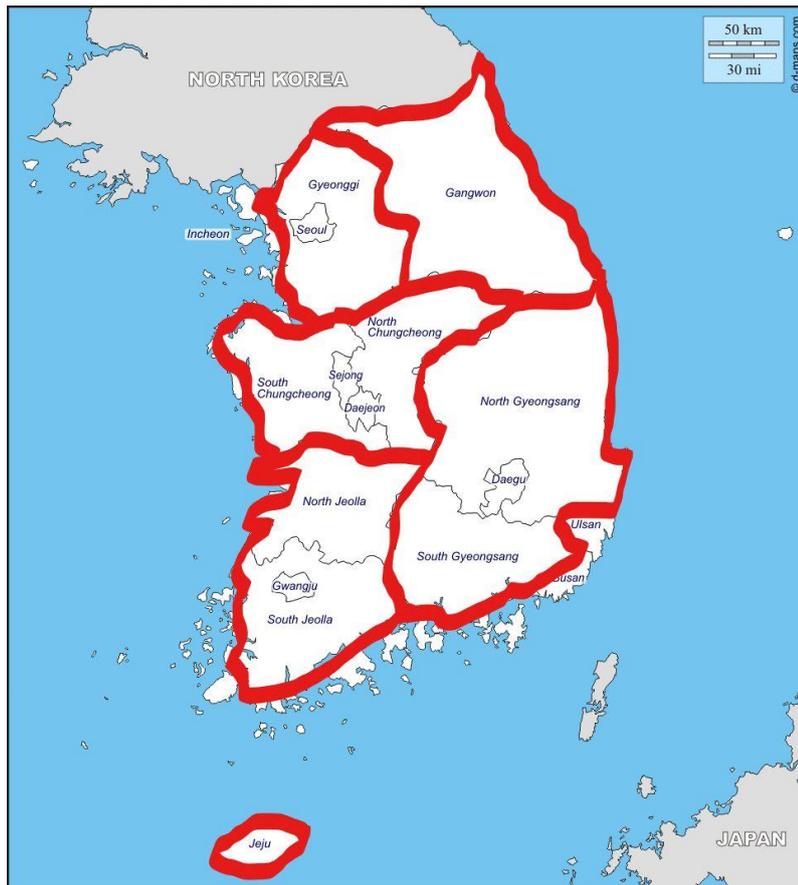


Abbildung 3: Darstellung der südkoreanischen Provinzen mit dem Nachweis von PCV3-positiven Beständen (rote Umrandung = Nachweis von mindestens einem PCV3-positiven Bestand innerhalb der Provinz);

Quelle: http://d-maps.com/carte.php?num_car=5464&lang=en.

Auch in Europa wird aufgezeigt, dass zahlreiche Schweinebestände PCV3-positiv sind (COLLINS et al., 2017; FACCINI et al., 2017; STADEJEK et al., 2017; FRANZO et al., 2018). In 85,7% (12/14) der untersuchten Bestände, die in den polnischen Woiwodschaften Großpolen, Masowien, Kujawien-Pommern, Westpommern und Oppeln liegen, kann PCV3-DNA nachgewiesen werden. Als Untersuchungsmaterial werden 1.050 Serumproben, die sowohl von Sauen als auch von drei bis 20 Wochen alten Schweinen stammen, verwendet, wobei PCV3-DNA am häufigsten innerhalb der Gruppe der Absetzferkel und Mastschweine nachgewiesen werden kann (STADEJEK et al., 2017). In einer Untersuchung zweier Schweinebestände der Provinzen Mantua und Como der italienischen Poebene stellen FACCINI et al. (2017) fest, dass die Gewebeproben von abortierten und

totgeborenen Feten ebenfalls PCV3-DNA enthalten. Des Weiteren detektieren FRANZO et al. (2018) PCV3-DNA in Gewebe-, Serum- und Nasentupferproben, die von Schweinen unterschiedlichen Alters aus italienischen Beständen stammen. Auch in England und Nordirland wird nachgewiesen, dass Fäkal- und Gewebeproben von Schweinen unterschiedlichen Alters, die bereits aus den Jahren 2001 und 2002 stammen, PCV3-positiv sind (COLLINS et al., 2017). Außerdem wird berichtet, dass die Serumproben von Absetzferkeln und Mastschweinen aus spanischen Beständen PCV3-positiv sind (FRANZO et al., 2018). In Dänemark wird PCV3-DNA in Gewebeproben von Sauen sowie in Gewebe- und Serumproben von Schweinen unbekanntem Alters detektiert (FRANZO et al., 2018).

Der Ursprung von PCV3 ist nicht geklärt. PCV3 könnte sich seit einiger Zeit unbemerkt in Schweinen entwickelt haben oder durch speziesübergreifende Übertragung entstanden sein (PALINSKI et al., 2017). Es könnte aber auch aus der Rekombination von unbekanntem Circoviren hervorgegangen sein (PALINSKI et al., 2017). Aufgrund von Sequenzähnlichkeiten zu bestimmten Fledermaus-Circoviren vermuten FU et al. (2017), dass der Ursprung von PCV3 in Wirtstieren der Ordnung Chiroptera (Fledertiere) zu suchen ist. Weiter schlagen FU et al. (2017) aufgrund ihrer phylogenetischen Analysen vor, dass PCV3 seit 1966 innerhalb der Schweinebestände zirkulieren könnte (FU et al., 2017). Wegen der geringen Anzahl an ausgewerteten Sequenzen ist dies jedoch als vorläufig zu betrachten (FU et al., 2017).

2. Mögliche, mit PCV3 assoziierte Krankheitsbilder

Aufgrund des Nachweises von PCV3-DNA in klinisch auffälligen Schweinen unterschiedlichen Alters bringen verschiedene Autoren PCV3 mit unterschiedlichen Krankheitsbildern in Verbindung (PHAN et al., 2016; PALINSKI et al., 2017). PHAN et al. (2016) detektieren PCV3-DNA in drei Aufzuchtferkeln, die entzündliche Veränderungen des Myokards sowie multisystemische Entzündungen aufweisen. Da neben PCV3 kein weiteres bekanntes Pathogen gefunden wird, stellen PHAN et al. (2016) einen kausalen Zusammenhang zwischen PCV3 und den entzündlichen Veränderungen her.

PALINSKI et al. (2017) berichten von einem Bestand mit einer erhöhten Mortalitätsrate, dessen Sauen verringerte Konzeptionsraten aufweisen. Gleichzeitig zeigen die Sauen ein PDNS-ähnliches klinisches Erscheinungsbild (PALINSKI et al., 2017). Außerdem werden bei diesen Sauen vermehrt mumifiziert geborene Ferkel beobachtet (PALINSKI et al., 2017). Während sowohl in den Sauen als auch in deren Feten PCV3-DNA nachgewiesen wird, werden andere mögliche Pathogene, wie das porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV), Influenza A Virus, porcines Parvovirus (PPV) und PCV2, nicht detektiert (PALINSKI et al., 2017). Basierend auf diesen Ergebnissen stellen PALINSKI et al. (2017) zwischen den klinischen Auffälligkeiten des Bestandes und dem Nachweis von PCV3-DNA einen kausalen Zusammenhang her. In einer retrospektiven Untersuchung weisen PALINSKI et al. (2017) in 45 von 48 PCV2-negativen PDNS-Fällen PCV3-DNA nach. Aufgrund dieses Ergebnisses wird vermutet, dass möglicherweise eine Verbindung zwischen dem Nachweis von PCV3-DNA und dem Auftreten von PDNS besteht (PALINSKI et al., 2017). Wegen des häufigen Nachweises von PCV3-DNA in Sauen mit Reproduktionsstörungen sowie in deren Feten assoziieren verschiedene Autoren PCV3 mit reproduktiven Störungen (PALINSKI et al., 2017; TOCHETTO et al., 2017). SHEN et al. (2017) und ZHAI et al. (2017) detektieren PCV3-DNA auch in Ferkeln mit respiratorischen Problemen, wobei 29 von 140 PCV3-positiven Schweinen, die schwere respiratorische Symptome aufweisen, mit PRRSV koinfiziert sind.

Eine Untersuchung von FU et al. (2017) ergibt, dass 22,3% (17/76) des PCV3-positiven Probenmaterials PCV2-DNA enthalten. Neurologische Störungen bei unter drei Tage alten Ferkeln assoziieren CHEN et al. (2017) mit PCV3. Einen möglichen Zusammenhang zwischen PCV3 und dem Auftreten von Durchfall bei Absetzferkeln vermuten ZHAI et al. (2017).

Zum aktuellen Zeitpunkt ist es schwer, PCV3 mit einem Krankheitsbild in Verbindung zu bringen, da hierfür ein Infektionsversuch notwendig wäre, aber noch kein Virus isoliert werden kann (PHAN et al., 2016; CHEN et al., 2017; TOCHETTO et al., 2017).

Andere Autoren hingegen berichten über den Nachweis von PCV3-DNA in Beständen mit klinisch unauffälligen Schweinen (KWON et al., 2017; STADEJEK et al., 2017). STADEJEK et al. (2017) zeigen in ihrer Studie, dass neben den Serumproben von Sauen mit Anzeichen von PDNS oder Reproduktionsstörungen auch die Seren klinisch unauffälliger Schweine PCV3-positiv sind (STADEJEK et al., 2017). Zu einem ähnlichen Ergebnis kommen auch KWON et al. (2017) bei der Untersuchung von Schweinen aus koreanischen Beständen. Auch im Vereinigten Königreich weisen COLLINS et al. (2017) PCV3-DNA in klinisch unauffälligen Schweinen nach. In zahlreichen chinesischen Beständen sind ebenfalls Schweine PCV3-positiv, die keine klinischen Anzeichen aufweisen (WEN et al., 2017; ZHAI et al., 2017; ZHENG et al., 2017b). ZHENG et al. (2017a) stellen in einigen PCV3-positiven Proben eine Koinfektion mit dem Torque Teno Sus Virus (TTSuV) vom Typ 1 (TTSuV1) und Typ 2 (TTSuV2) fest.

3. Morphologie von PCV3

Porzine Circoviren sind DNA-Viren mit einem zirkulären, einzelsträngigen und kovalent geschlossenen Genom (TISCHER et al., 1982). Das Kapsid, welches das DNA-Genom umgibt, ist unbehüllt und ikosahedral geformt (CROWTHER et al., 2003). Mit einem Durchmesser von 17 bis 20 Nanometern gehören die porzinen Circoviren zu den kleinsten Viren (TISCHER et al., 1982; CROWTHER et al., 2003), die zur autonomen Vermehrung in eukaryotischen Zellen fähig sind (MANKERTZ

et al., 2004). Während das Genom von PCV1 etwa 1.760 bp groß ist (CORTEY und SEGALÉS, 2012), variiert die Genomlänge von PCV2 in Abhängigkeit von dem jeweiligen Genotypen. Das Genom von PCV2a ist 1.768 bp groß (FRANZO et al., 2015a), wohingegen das der Genotypen PCV2b, 2c und 2d eine Größe von 1.767 bp (CHEUNG, 2007; GUO et al., 2010) aufweist. Mit einer Länge von 1.777 bp ist das Genom von PCV2e das größte unter den bekannten PCV2-Genotypen (DAVIES et al., 2016). Die genetischen Analysen von PCV3 ergeben, dass dessen zirkuläres, einzelsträngiges DNA-Genom in seinem Aufbau dem der porcinen Circoviren entspricht (PALINSKI et al., 2017). Mit einer Größe von 2.000 bp ist das PCV3-Genom jedoch deutlich länger als das von PCV1 und PCV2 (PHAN et al., 2016).

4. Genomstruktur von PCV3

Wie für PCV1 und PCV2, sind für PCV3 zwei ORFs beschrieben, welche für das Rep- und Cap-Protein kodieren (PALINSKI et al., 2017). Das Rep-Protein besteht vermutlich aus 296 Aminosäuren, da im ORF1 kein kanonisches Startcodon (ATG) vorliegt und daher ein GTC-Codon am 5'-Ende des ORFs als Translationsstart vermutet wird (PALINSKI et al., 2017). Das von ORF2 kodierte Cap-Protein ist 214 Aminosäuren lang (PALINSKI et al., 2017). Der vermeintliche ORF1 von PCV3 ist zwischen den Nukleotidpositionen 216 und 1.106 lokalisiert (PHAN et al., 2016; PALINSKI et al., 2017). ORF2 liegt in entgegengesetzter Leserichtung zwischen den Nukleotiden 1.980 und 1.336 (PHAN et al., 2016; PALINSKI et al., 2017). Das Vorhandensein von alternativen Startcodons wird bereits bei einigen aviären Circoviren aufgezeigt (NIAGRO et al., 1998; BASSAMI et al., 2001; PHENIX et al., 2001). Auch LI et al. (2011) weisen in Schweine- und Rindfleischproben Teilgenomsequenzen nach, die denen von PCV3 ähneln und das alternative Startcodon GTC im ORF1 aufweisen. Es wird vermutet, dass PCV3 auch einen dritten ORF besitzt, der als ORF3 bezeichnet wird und auf demselben DNA-Strang wie ORF1 liegt (PHAN et al., 2016; PALINSKI et al., 2017). Das Startcodon von ORF3 ist ebenfalls nicht eindeutig geklärt (FACCINI et al., 2017; PALINSKI et al., 2017). Das für Serin kodierende, alternative Startcodon TCG zwischen den Nukleotidpositionen 1.900 und 1.902 würde ein 231

Aminosäuren langes Protein ergeben (ORF3₂₃₁) (PALINSKI et al., 2017). Zwischen den Positionen 62 und 64 wäre auch ATG als Startcodon denkbar, das Methionin kodiert und ein 177 Aminosäuren langes Protein synthetisieren würde (ORF3₁₇₇) (PALINSKI et al., 2017). Je nach Startcodon würde ORF3 entweder zwischen den Nukleotiden 1.900 und 595 (Startcodon TCG) oder zwischen 62 und 595 (Startcodon ATG) liegen (PHAN et al., 2016; PALINSKI et al., 2017). FACCINI et al. (2017) zeigen für ORF3 das ungewöhnliche Startcodon TTT auf, das Phenylalanin kodiert. Die Funktion des Proteins, das der vermeintliche ORF3 kodieren könnte, ist noch unbekannt (PALINSKI et al., 2017). Der ORF3 von PCV2 scheint für die Induktion der Apoptose verantwortlich zu sein (LIU et al., 2005). Vermutlich ist ORF4 an der Apoptose-Unterdrückung beteiligt und spielt für die Virusreplikation keine Rolle (HE et al., 2013). Die Abbildung 4 stellt das PCV3-Genom mit ORF1 und ORF2 sowie den beiden möglichen Varianten des ORF3 dar.

Zwischen ORF2 und ORF1 liegt auf dem Rep-Genstrang die 235 Nukleotide lange 5'-intergenische Region (IR) (PALINSKI et al., 2017). Die IR beinhaltet den Replikationsursprung (ORI), der aus einer neun Nukleotide langen stem-loop-Struktur [TAGTATTAC] besteht (PHAN et al., 2016; PALINSKI et al., 2017). Diese stem-loop-Struktur ist auch bei allen anderen Circoviren vorzufinden (MANKERTZ et al., 1997; FAUREZ et al., 2009).

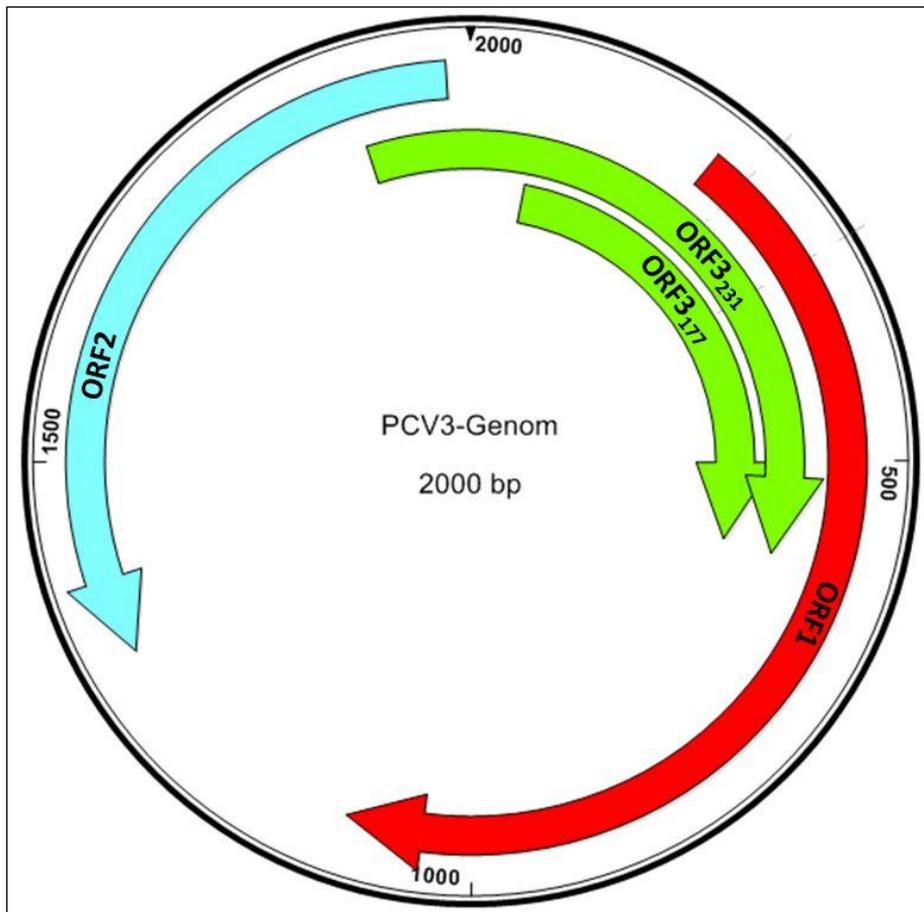


Abbildung 4: Schematische Darstellung des PCV3-Genoms sowie seiner möglichen ORFs (ORF3₂₃₁ für das Startcodon TCG und ORF3₁₇₇ für das Startcodon ATG);

Programm: SeqBuilder 14.

5. Phylogenetische Analysen

Aufgrund der begrenzten Verfügbarkeit an PCV3-Vollgenomsequenzen ist die phylogenetische Auswertung von PCV3 als vorläufig zu betrachten (KU et al., 2017; KWON et al., 2017). Phylogenetische Analysen ergeben, dass alle bisher nachgewiesenen PCV3-Sequenzen von den anderen Spezies der Circoviren, wie PCV1 und PCV2, abzugrenzen sind (CHEN et al., 2017; FU et al., 2017; PALINSKI et al., 2017). PHAN et al. (2016) stellen fest, dass die nordamerikanischen PCV3-Sequenzen mit denjenigen der bisher bekannten Circoviren um weniger als 50% übereinstimmen. Aus diesem Grund wird vorgeschlagen, dass diese Sequenzen einer neuen Spezies, dem porzinen Circovirus Typ 3, zugeordnet werden (PHAN et al., 2016).

PALINSKI et al. (2017) können anhand eines phylogenetischen Stammbaumes aufzeigen, dass die PCV3-Sequenzen der USA und die Teilgenomsequenzen, welche in amerikanischem Schweinefleisch nachgewiesen werden, einem gemeinsamen Cluster zugeordnet werden können. Auch FU et al. (2017) stellen fest, dass die chinesischen PCV3-Vollgenomsequenzen und die in amerikanischem Schweinefleisch nachgewiesenen Sequenzen in ein gemeinsames Cluster eingeteilt werden können. Aus der phylogenetischen Analyse von PALINSKI et al. (2017) ergibt sich, dass zwischen PCV3 und dem caninen Circovirus möglicherweise eine enge evolutionäre Verwandtschaft besteht. Darauf basierend vermuten PALINSKI et al. (2017), dass diese beiden Circoviren einen gemeinsamen Vorfahren besitzen könnten. KU et al. (2017) zeigen durch ihre phylogenetische Analyse auf, dass die chinesischen PCV3-Sequenzen und das bat-Circovirus möglicherweise eng miteinander verwandt sind. PCV3 könnte seinen Ursprung daher auch in den Fledermaus-assoziierten Circoviren haben (FU et al., 2017).

Phylogenetische Analysen unterschiedlicher Autoren veranschaulichen, dass die bisher nachgewiesenen PCV3-Sequenzen, unabhängig von deren Herkunft, einen hohen Verwandtschaftsgrad zueinander aufweisen. Die PCV3-Sequenzen aus Nordamerika (PALINSKI et al., 2017) sind mit den in China (FAN et al., 2017), Polen (STADEJEK et al., 2017), Korea (KWON et al., 2017), Italien (FACCINI et al., 2017) und Brasilien (TOCHETTO et al., 2017) nachgewiesenen Sequenzen eng verwandt. Auch zwischen den in England und Nordirland nachgewiesenen PCV3-Sequenzen und den Sequenzen aus Nordamerika besteht eine enge Verwandtschaft (COLLINS et al., 2017).

Derzeit liegen erste Arbeiten vor, in welchen basierend auf phylogenetischen Analysen und der Bestimmung von Marker-Aminosäuren die PCV3-Varianten in mögliche Cluster und Subcluster unterteilt werden (FU et al., 2017).

6. Nachweis von PCV3

Die dominierende Rolle in der PCV3-Diagnostik stellen Methoden zur Amplifikation PCV3-spezifischer Genomfragmente dar. Hierfür werden neben der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) (KIM et al., 2017; WANG et al., 2017; CHEN et al., 2018) auch weitere Methoden, wie die recombinase polymerase amplification (RPA) (WANG et al., 2017), rolling circle amplification (RCA) (PALINSKI et al., 2017) und loop-mediated isothermal amplification (LAMP) (PARK et al., 2017) genutzt. Der in situ-Nachweis von PCV3 in Geweben gelingt mittels der In-situ-Hybridisierung (PHAN et al., 2016) oder durch Immunhistochemie (PALINSKI et al., 2017). Ebenso wird ein serologischer Nachweis mittels enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) beschrieben (DENG et al., 2017).

6.1. Genomnachweis mittels real-time PCR

Der Goldstandard des Nukleinsäurenachweises in der Molekulardiagnostik ist die PCR (MACKAY et al., 2002). Unter den PCR-Methoden wird aufgrund ihrer Schnelligkeit und einfachen Handhabung sowie ihres geringen Risikos von Kreuzreaktionen mit anderen Erregern häufig die real-time PCR verwendet (MACKAY et al., 2002). Auch in den bisherigen Studien wird häufig das quantitative real-time PCR-Verfahren für den Nachweis von PCV3-DNA durchgeführt (PHAN et al., 2016; PALINSKI et al., 2017). Als Probenmaterial werden Gewebeproben aus dem Herzen (PHAN et al., 2016), der Lunge (WEN et al., 2017), den Nieren und der Leber (ZHENG et al., 2017b; CHEN et al., 2018) verwendet. Daneben wird PCV3-DNA im Thymus und Gehirn (CHEN et al., 2017) sowie in der Milz, den Tonsillen, Lymphknoten und in Nabelschnüren (COLLINS et al., 2017; ZHENG et al., 2017b) nachgewiesen. PALINSKI et al. (2017) detektieren PCV3-DNA auch in der Haut PDNS-ähnlicher Läsionen. Außerdem dienen Speichel- und Kotproben (ZHAI et al., 2017) sowie Serum- (STADEJEK et al., 2017) und Spermaproben (KU et al., 2017) dem Nachweis von PCV3-DNA. Es wird von verschiedenen Möglichkeiten berichtet, PCV3-DNA mittels real-time PCR zu detektieren (KIM et al., 2017; PALINSKI et al., 2017; CHEN et al., 2018). Zum einen kann PCV3-DNA unter Verwendung von

sequenzspezifischen Sonden (z.B. TaqMan) mittels real-time PCR nachgewiesen werden (PALINSKI et al., 2017). Zum anderen gelingt CHEN et al. (2018) der Nachweis von PCV3-DNA mithilfe der SYBR green-based real-time PCR. Ist PCV3-DNA im Probenmaterial enthalten, lagert sich der SYBR Green-Farbstoff darin ein und es werden Fluoreszenzsignale sichtbar (CHEN et al., 2018). Mittels multiplex real-time PCR gelingt KIM et al. (2017) in einem einzigen Verfahren der differenzierte Nachweis von PCV2- und PCV3-DNA. Zur Unterscheidung von PCV2- und PCV3-DNA werden hierbei die Enden der PCV2- bzw. PCV3-spezifischen Sonden mit Farbstoffen markiert, die in unterschiedlichen Farben fluoreszieren (KIM et al., 2017). Die verwendeten Primer sind ebenfalls PCV2- bzw. PCV3-spezifisch (KIM et al., 2017).

6.2. Genomnachweis mittels isothermaler DNA-Amplifikation

Unter den Methoden der isothermalen DNA-Amplifikation finden bisher die RCA, RPA und LAMP Anwendung (PALINSKI et al., 2017; PARK et al., 2017; WANG et al., 2017).

Im Zusammenhang mit PCV3 wird die RCA zur sequenzunabhängigen Anreicherung von zirkulärer DNA verwendet, um den Sequenzierungserfolg zu erhöhen (PALINSKI et al., 2017). Die phi29 DNA-Polymerase vermehrt dabei die zirkuläre PCV3-DNA innerhalb weniger Stunden um ein Vielfaches, wodurch die anschließende Sequenzierung erleichtert wird (NELSON et al., 2002). Die DNA-Produkte werden anschließend entweder direkt sequenziert oder zuvor in Vektoren kloniert (KU et al., 2017; PALINSKI et al., 2017).

Die RPA ist eine Methode der isothermalen DNA-Amplifikation, die einen schnellen Nukleinsäurenachweis ohne eine aufwändige Laborausrüstung ermöglicht (PIEPENBURG et al., 2006). Mithilfe der RPA gelingt WANG et al. (2017) der schnelle Nachweis von PCV3-DNA in Proben der Lunge, Leber, Milz, Niere, Lymphknoten und des Dünndarms sowie in Serumproben.

Die LAMP ist eine schnelle und sensitive Amplifikationsmethode von DNA (NOTOMI et al., 2000). Mithilfe der LAMP gelingt es PARK et al. (2017), das Genom des PCV3-Kapsidproteins in klinischen Proben, die aus PCV3-positiven Beständen stammen, nachzuweisen. Als Probenmaterial dienen fetales Gewebe sowie Gewebe- und Serumproben von kümmernden Ferkeln (PARK et al., 2017). Der Farbumschlag des Indikators Hydroxynaphtholblau von lila nach blau zeigt den optischen Nachweis von PCV3-DNA an (PARK et al., 2017). Bei einer Temperatur von 62°C erzielt die LAMP-Methode mit einer Reaktionszeit von 40 Minuten die besten Ergebnisse (PARK et al., 2017). Die Nachweisgrenze des ORF2 von PCV3 liegt bei 5×10^1 Kopien (PARK et al., 2017).

6.3. Nachweis von Serumantikörpern mittels ELISA

Im Gegensatz zu den zahlreichen Berichten über den Nachweis von PCV3-DNA mittels PCR gibt es bisher nur wenige Informationen über den Nachweis spezifischer PCV3-Serumantikörper mittels ELISA (DENG et al., 2017; PALINSKI et al., 2017). Mithilfe eines rekombinanten PCV3-Cap-Proteins als Antigen werden die Antikörper aus den Serumproben detektiert (DENG et al., 2017; PALINSKI et al., 2017). DENG et al. (2017) können bei dem in ihrer Studie verwendeten ELISA keine Unspezifitäten feststellen.

6.4. Pathohistologische Untersuchung

Derzeit liegen nur wenige Berichte über detaillierte pathohistologische Untersuchungen vor (PHAN et al., 2016; PALINSKI et al., 2017).

PHAN et al. (2016) stellen in der pathologischen Untersuchung eines drei Wochen alten Ferkels myokardiale Entzündungen des Herzens fest. Aus der histologischen Untersuchung mittels Hämatoxylin-Eosin-Färbung geht hervor, dass es sich dabei um eine nicht-eitrige Myokarditis und eine kardiale Arteriolitis handelt (PHAN et al., 2016). Des Weiteren sind Lymphozyten und Histiocyten in der Tunica adventitia und media der kardialen Arteriole erkennbar (PHAN et al., 2016).

Aus der makroskopischen Untersuchung der Haut einer Sau mit PDNS-ähnlichen Läsionen leiten PALINSKI et al. (2017) eine Dermatitis mit multifokalen Papeln und Maculae ab. Histologisch wird innerhalb der akuten, nekrotisierenden Dermatitis und Epidermitis eine perivaskuläre Ansammlung von Lymphozyten festgestellt (PALINSKI et al., 2017). In den Nieren sind eine Dilatation der kortikalen Tubuli sowie eine Infiltration des kortikalen Interstitiums und der Glomeruli mit Lymphozyten und Makrophagen erkennbar (PALINSKI et al., 2017).

Während in beiden Fällen andere mögliche bekannte Pathogene mittels labordiagnostischen Methoden ausgeschlossen werden, ist PCV3-DNA nachweisbar (PHAN et al., 2016; PALINSKI et al., 2017).

In der immunhistochemischen Untersuchung gelingt PALINSKI et al. (2017) der PCV3-Antigen-Nachweis mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern (MAb 14). Als Probenmaterial dienen Gewebeproben aus der Haut, Niere, Lunge und den Lymphknoten von Sauen mit PDNS-ähnlichen Läsionen (PALINSKI et al., 2017). Die MAb 14, welche durch Immunisierung von Mäusen gewonnen werden, detektieren das PCV3-Antigen innerhalb der histologisch typischen PDNS-Läsionen und senden Fluoreszenzsignale aus (PALINSKI et al., 2017).

PHAN et al. (2016) gelingt mittels In-situ-Hybridisierung der Nachweis von PCV3-mRNA in kardialen Läsionen. Nach Hinzufügen von PCV3-spezifischen Sonden zu dem Herzgewebe, können innerhalb der kardialen Zellen rote Hybridisierungssignale festgestellt werden (PHAN et al., 2016). Mit dem Nachweis von PCV3-mRNA in den kardialen Zellen wird die Replikation von PCV3 im Bereich der Herzläsionen dargestellt (PHAN et al., 2016).

6.5. Virusisolation

Derzeit sind in der vorhandenen Literatur keine Berichte über eine erfolgreiche Virusisolierung von PCV3 zu finden. In einem Versuch der Virusisolation beimpfen PALINSKI et al. (2017) porcine Hoden- und Nierenzellen mit fetalen Gewebeproben. Dabei stellen PALINSKI et al. (2017) weder einen zytopathischen Effekt noch Fluoreszenzsignale im Immunfluoreszenztest mittels MAb 14 fest. Auch ein Anstieg der Ct-Werte kann nach jedem Passagieren der Zellkulturen festgestellt werden (PALINSKI et al., 2017).

III. MATERIAL UND METHODEN

1. Arbeitshypothesen

In der vorliegenden Arbeit soll das Vorkommen von PCV3 in deutschen Mastbeständen molekularbiologisch untersucht werden. Bei der Untersuchung handelt es sich um eine retrospektive Auswertung von Serumproben. Diese wurden 2015 im Rahmen eines Gesundheitsmonitorings zur Untersuchung des Vorkommens infektiöser Atemwegserreger entnommen.

Dabei sollen folgende Arbeitshypothesen überprüft werden:

1. Basierend auf den derzeit vorliegenden Informationen wird innerhalb der deutschen Mastbestände eine vergleichbar hohe PCV3-Prävalenz wie in den Beständen anderer Länder vermutet.
2. Sollte PCV3-DNA in deutschen Mastbeständen nachgewiesen werden, wird aufgrund des ausgeprägten internationalen Handels mit Schweinen oder aus Schweinen gewonnenen Produkten angenommen, dass zwischen deutschen und internationalen PCV3-Varianten eine hohe Sequenzidentität besteht.

Neben dem molekularbiologischen Nachweis von PCV3-DNA in den Serumproben war ein weiteres Ziel, die gefundenen PCV3-Varianten genetisch zu charakterisieren. Hierfür wurde das Vollgenom sequenziert und phylogenetisch analysiert.

2. Blutproben

Im Jahr 2015 wurden im Rahmen einer Screening-Untersuchung Serumproben entnommen, um das Vorkommen infektiöser Atemwegserreger in deutschen Mastbeständen mit respiratorischen Anzeichen zu untersuchen. Eine Genehmigung des Gesundheitsmonitorings durch die Ethikkommission des Zentrums für Klinische Tiermedizin der Tierärztlichen Fakultät der LMU München lag unter der Nummer 73-31-05-2016 vor. Dabei wurde in 53 Beständen von je 20 Einzeltieren zu diagnostischen Zwecken einmalig Blut entnommen,

sodass insgesamt 1.060 Serumproben vorlagen. Die Tiere waren zwischen 20 und 24 Wochen alt und deren Auswahl erfolgte zufällig. Bis zur Untersuchung waren die Serumproben bei -20°C tiefgefroren.

3. Bestandsinformationen

Von den beprobten Beständen lagen 20 in Nord-, zehn in Ost- und 23 in Süddeutschland. Die Einteilung der untersuchten Bestände nach den zugehörigen Bundesländern ist der Abbildung 5 zu entnehmen.

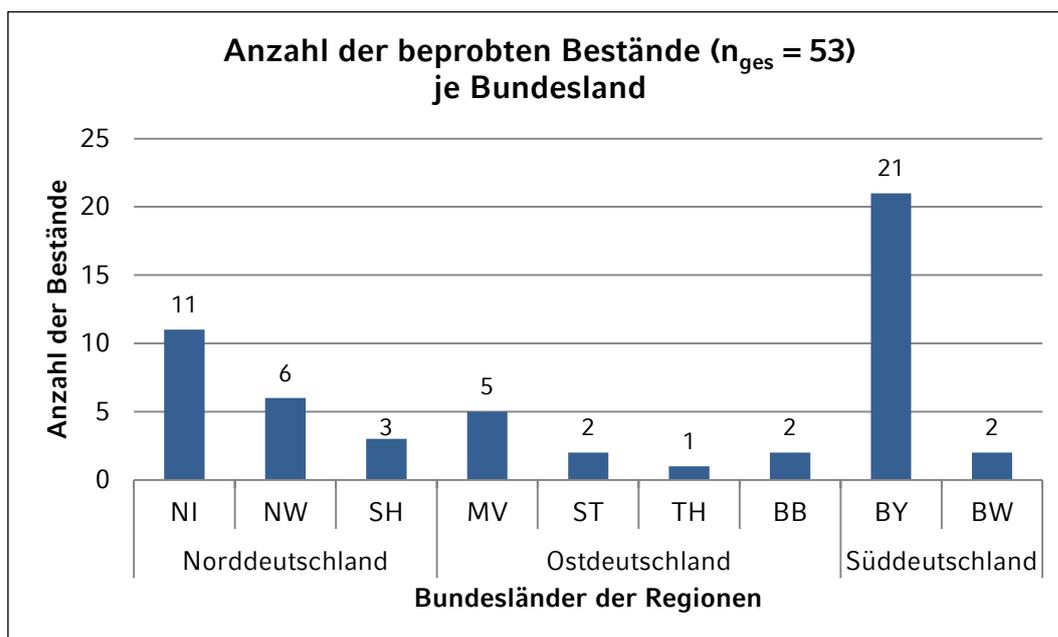


Abbildung 5: Darstellung der Anzahl der beprobten Bestände je Bundesland und deren Einteilung in Nord- Ost- und Süddeutschland (NI = Niedersachsen; NW = Nordrhein-Westfalen; SH = Schleswig-Holstein; MV = Mecklenburg-Vorpommern; ST = Sachsen-Anhalt; TH = Thüringen; BB = Brandenburg; BY = Bayern; BW = Baden-Württemberg).

In 52 von 53 untersuchten Beständen waren die beprobten Mastschweine gegen das porcine Circovirus Typ 2 geimpft. Teilt man die untersuchten Mastbestände nach deren Betriebsform ein, arbeiteten 17 Bestände in einem geschlossenen System, bei welchem die Ferkelproduktion und die Mast in einem Bestand stattfinden. 36 Bestände betrieben eine reine Schweinemast mit Zukauf von Schweinen. Für die Einteilung der Mastbestände nach deren Größe wurden drei Gruppen festgelegt.

Gruppe I umfasste die Bestände mit bis zu 999 Mastplätzen und Gruppe II diejenigen mit 1.000 bis 2.999 Mastplätzen. In Gruppe III fielen die größten Bestände mit 3.000 und mehr Mastplätzen. Die Anzahl der untersuchten Bestände je Gruppe ist in Abbildung 6 dargestellt.

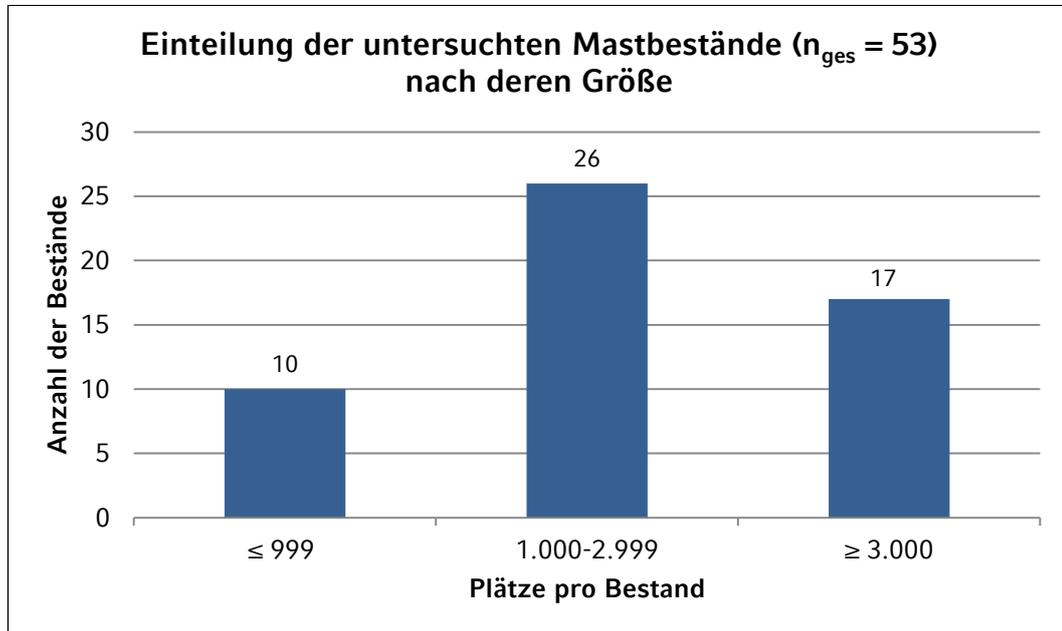


Abbildung 6: Einteilung der untersuchten Bestände nach deren Größe in drei Gruppen (Gruppe I = ≤ 999 Plätze/Bestand; Gruppe II = 1.000-2.999 Plätze/Bestand; Gruppe III = ≥ 3.000 Plätze/Bestand).

Zusätzlich wurden die Bestände nach den Ferkelherkünften eingeteilt. Die Ferkel der untersuchten Bestände stammten aus Nord- (16/53), Ost- (11/53) und Süddeutschland (17/53) sowie aus Dänemark (6/53) und den Niederlanden (3/53).

4. Quantitative real-time PCR

Der PCV3-Genomnachweis erfolgte am Lehrstuhl für Virologie des Instituts für Infektionskrankheiten und Zoonosen der Tierärztlichen Fakultät der LMU München mittels einer quantitativen real-time PCR nach dem Protokoll von PALINSKI et al. (2017). Die dafür nötige Extraktion der Virus-DNA aus den Serumproben erfolgte mithilfe des kommerziell erhältlichen NucleoSpin® 8 Virus Core Kit (Machery-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland) nach Herstellerangaben. Für die Durchführung wurde der Pipettierroboter Microlab® STARlet (Hamilton

Robotics Germany GmbH, Martinsried, Deutschland) eingesetzt. Als Proben- und Elutionsvolumen wurden jeweils 100µl benötigt. Für die real-time PCR wurde das QuantiTect® Probe PCR Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) verwendet. In Tabelle 1 sind die Sequenzen und Konzentrationen der verwendeten Primer sowie der TaqMan Sonde dargestellt.

Tabelle 1: Darstellung der Sequenzen und Konzentrationen der in der vorliegenden Studie verwendeten Vorwärts-(for), Rückwärts-(rev)Primer und TaqMan Sonde (PALINSKI et al., 2017).

Name	Konzentration	Sequenz
Primer PCV3-for	800 nM	5' AGT GCT CCC CAT TGA ACG
Primer PCV3-rev	800 nM	5' ACA CAG CCG TTA CTT CAC
TaqMan Sonde PCV3	200 nM	5' FAM ACC CCA TGG CTC AAC ACA TAT GAC C BHQ1

Je Reaktion wurden 5µl der eluierten DNA zu 20µl Reaktionsmix (12,5µl PCR Mastermix, 5,5µl RNase-freies Wasser und 2µl Primer-Sonden-Mix) hinzugefügt. Die Reaktionsansätze wurden gemeinsam mit einer Positiv- und einer Negativkontrolle (non-template) in den PCR-Cycler (Stratagene Mx 3000/3005P, Agilent Technologies Deutschland GmbH & Co. KG, Waldbronn, Deutschland) gegeben. Folgendes Temperaturprotokoll fand Anwendung: Einmalige Polymeraseaktivierung bei 94°C für 15 Minuten, anschließend 42 Zyklen mit Denaturierung (94°C für 15 Sekunden) und Annealing/Extension (60°C für 60 Sekunden).

Zunächst wurden die Serumproben gepoolt auf PCV3-DNA untersucht. Ein Pool bestand aus fünf Seren, die alle aus demselben Bestand stammten. Im Falle des Nachweises von PCV3-DNA in einem Probenpool, wurden die im Pool enthaltenen Proben nochmals einzeln einem real-time PCR-Verfahren unterzogen. Waren zwei oder mehrere Pools eines Bestandes PCV3-positiv, wurden die Proben des Pools, der den niedrigsten Ct-Wert aufwies, einzeln untersucht. Insgesamt wurden 212 Serumpools und 200 Einzelproben mittels PCV3-spezifischer real-time PCR auf PCV3-DNA getestet.

Die Ergebnisse wurden in vier Kategorien eingeteilt, deren Kriterien Tabelle 2 zu entnehmen sind.

Tabelle 2: Einteilung der real-time PCR-Ergebnisse in vier Kategorien.

Kategorie	Ct-Wert	PCV3
I	≥ 40	negativ
II	35 - 39,9	schwach positiv
III	30 - 34,9	positiv
IV	< 30	stark positiv

Zudem wurde aus jedem PCV3-positiven Bestand die Einzelprobe mittels real-time PCR auf PCV2-DNA untersucht, welche die höchste Menge an PCV3-DNA aufwies.

5. RCA

Das Ziel war es, aus jedem Bestand, in welchem PCV3-DNA nachgewiesen werden konnte, eine PCV3-Sequenz zu erhalten. Dazu wurde aus jedem PCV3-positiven Bestand die Einzelprobe mit dem niedrigsten Ct-Wert ausgewählt. Da die in den Proben enthaltene DNA-Menge für eine erfolgreiche Sequenzierung nicht ausreichte, wurden die Einzelproben zuvor einer RCA zur unspezifischen Voranreicherung der zirkulären DNA unterzogen. Diese wurde am Lehrstuhl für Virologie des Instituts für Infektionskrankheiten und Zoonosen der Tierärztlichen Fakultät der LMU München mithilfe des TempliPhi™ 100 Amplification Kit (GE Healthcare Medical Systems Information Technologies GmbH, München, Deutschland) durchgeführt. Dabei wurde nach den Angaben des Herstellers vorgegangen. Demnach wurde je Probe 1µl der isolierten DNA mit 5µl sample buffer vermischt und anschließend für 3 Minuten bei 95°C erhitzt. Nachdem die Probe auf Raumtemperatur abgekühlt war, wurden 5µl reaction buffer und 0,2µl enzyme buffer hinzugegeben. Dieses Gemisch inkubierte über Nacht bei 30°C, da die Aktivität der enthaltenen DNA-Polymerase des Bakteriophagen phi29 bei dieser Temperatur am größten ist. Am nächsten Tag wurde die phi DNA-Polymerase durch Erhöhung der

Temperatur auf 65°C für 10 Minuten inaktiviert. Vor der Sequenzierung wurden einige Proben erneut einem real-time PCR-Verfahren nach dem Protokoll von PALINSKI et al. (2017) unterzogen. Dies diente der Überprüfung des Erfolges der exponentiellen Amplifikation der PCV3-DNA. Bis zur weiteren Verwendung der Proben wurden diese bei -20°C gelagert.

6. Sequenzierung

Im Anschluss an das RCA-Verfahren wurde die DNA in den Proben amplifiziert und dann sequenziert. Um bei der Sequenzierung die gesamte Genomsequenz von PCV3 zu erhalten, wurden innerhalb der Sequenzierungs-PCR drei sich überlappende PCR-Produkte amplifiziert, welche in Tabelle 3 dargestellt sind.

Tabelle 3: Darstellung der Nukleotid-Spannen der drei PCR-Produkte, die mit Hilfe der nach PALINSKI et al. (2017) modifizierten Sequenzierungs-PCR amplifiziert wurden.

PCR-Produkt	Nukleotid-Spanne
PCR-Produkt 1	74 - 1.144
PCR-Produkt 2	1.137 - 1.561
PCR-Produkt 3	1.427 - 433

Für die Sequenzierungs-PCR wurden die von PALINSKI et al. (2017) verwendeten Primer modifiziert. Die modifizierten Primer können der Tabelle 4 entnommen werden.

Tabelle 4: Darstellung der für die Sequenzierungs-PCR verwendeten, nach PALINSKI et al. (2017) modifizierten Oligonukleotid-Primer (F = Vorwärts-Primer; R = Rückwärts-Primer; * = nur zur Sequenzierung verwendet).

Primer	Sequenz 5'-3'	PCR-Produkt
PCV3 74 F	CAC CGT GTG AGT GGA TAT AC	
PCV3 910 F*	GAC AAT TCC CAC CCA AAC	1.072 bp
PCV3 1144 R	CAC CCC AAC GCA ATA ATT GTA	
PCV3 1137 F	TTG GGG TGG GGG TAT TTA TT	
PCV3 1561 R	ACA CAG CCG TTA CTT CAC	425 bp
PCV3 1427 F	AGT GCT CCC CAT TGA ACG	
PCV3 433 R	CGA CCA AAT CCG GGT AAG C	1.007 bp

Für die Sequenzierungs-PCR wurde das Q5 High Fidelity PCR Kit (New England BioLabs[®] Inc., Ipswich, Massachusetts, USA) verwendet, wobei nach Herstellerangaben vorgegangen wurde. Für jeden Reaktionsansatz wurde ein Gemisch aus 12,5µl Q5 Mastermix, 9µl Wasser, 1,25µl Vorwärts- und 1,25µl Rückwärts-Primer (je 10 µM) hergestellt. Zu jedem Gemisch wurde 1µl des zu untersuchenden RCA-Produktes als Probe hinzugefügt. Nachdem die Reaktionsansätze in den Cyclor gegeben wurden, fand folgendes Temperaturprotokoll Anwendung: Einmalige Polymeraseaktivierung bei 98°C für 5 Minuten, anschließend 30 Zyklen mit Denaturierung (98°C für 30 Sekunden), Annealing (55°C für 60 Sekunden) und Extension (72°C für 2 Minuten). Um zu überprüfen, ob die RCA-Produkte innerhalb der Sequenzierungs-PCR erfolgreich amplifiziert wurden, wurden die PCR-Produkte einer Agarose-Gelelektrophorese unterzogen. Nach Anlegen einer Spannung von 50 Volt für 60 Minuten fand die Auswertung der Gelelektrophorese statt. Die PCR-Produkte, welche PCV3-DNA enthielten, wurden mithilfe des Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up Systems (Promega Corporation, Madison, Wisconsin, USA) aufgereinigt. Anschließend wurden die Proben unter Verwendung der Primer aus Tabelle 4 zur Sequenzierung nach Eurofins Genomics (Eurofins Genomics GmbH, Ebersberg, Deutschland) gesendet.

7. Phylogenetische Analysen

Die Sequenzierung der PCR-Produkte wurde bei Eurofins Genomics (Eurofins Genomics GmbH, Ebersberg, Deutschland) durchgeführt. Das Assembling und die Annotation der Genomfragmente erfolgten mithilfe der DNASTAR Lasergen-Software (DNASTAR[®] Inc., Madison, Wisconsin, USA) am Lehrstuhl für Virologie des Instituts für Infektionskrankheiten und Zoonosen der Tierärztlichen Fakultät der LMU München.

Für die phylogenetischen Analysen wurde die MEGA6 Software (Molecular Evolutionary Genetics Analysis, Tempe, Arizona, USA) verwendet. Zur Erstellung eines phylogenetischen Stammbaumes wurde nach dem Alignment mit CLUSTAL W (EMBL-EBI, The European Bioinformatics Institute, Cambridge, UK) der Neighbor-Joining-Algorithmus (p-distance-Modell, 1000 bootstraps) angewendet. Für den Vergleich mit den PCV3-Sequenzen aus dieser Arbeit wurden 84 verfügbare PCV3-Genomsequenzen aus der NCBI GenBank (National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine, Bethesda, Maryland, USA) verwendet. Die Herkunftsländer dieser internationalen Sequenzen waren USA (5/84), China (63/84), Brasilien (2/84), Südkorea (12/84) und Italien (2/84) (siehe Tabellen 14a bis f im Anhang).

Um für die phylogenetischen PCV3-Cluster spezifische Aminosäure- oder Nukleotidsequenz-Motive zu definieren, wurden sowohl ORF1 als auch ORF2 aller verfügbarer Sequenzen mittels CLUSTAL W (EMBL-EBI, The European Bioinformatics Institute, Cambridge, UK) ausgerichtet und manuell auf auffällige Motiv-Varianten (Nukleotid- und Aminosäureebene) untersucht.

8. Statistische Auswertung

Die statistische Datenauswertung erfolgte mithilfe der Programme IBM SPSS Statistics® (Version 23.0, IBM® SPSS Inc., Chicago, IL, USA) und Microsoft Excel® (2010, Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA). Dabei wurde jeder einzelne Bestand als eine statistische Einheit betrachtet. Das Signifikanzniveau der Untersuchung lag bei 5% ($p = 0,05$) mit einem Konfidenzintervall von 95%. Um zu ermitteln, ob ein möglicher Zusammenhang zwischen den bestandsspezifischen Faktoren (= unabhängige Variablen) und dem Nachweis von PCV3-DNA (= abhängige Variable) bestand, wurden Kreuztabellen und der χ^2 -Test nach Pearson verwendet. Dabei wurde untersucht, ob die Region, Größe, Betriebsform sowie die Ferkelherkunft der Bestände oder der PCV2-Impfstatus der Mastschweine einen signifikanten Einfluss auf das Vorkommen von PCV3-DNA auf Bestandesebene haben. In Tabelle 5 können die Definitionen der unabhängigen Variablen entnommen werden. Bei der abhängigen Variable wurde zwischen den Serumproben unterschieden, die mittels real-time PCR positiv getestet wurden (= 1) und denjenigen, die PCV3-negativ waren (= 0).

Tabelle 5: Definition der zur statistischen Analyse verwendeten unabhängigen Variablen.

Unabhängige Variable	Definition
Bestandsregion	1 = Norddeutschland
	2 = Ostdeutschland
	3 = Süddeutschland
Ferkelherkunft	1 = Norddeutschland
	2 = Ostdeutschland
	3 = Süddeutschland
	4 = Dänemark
	5 = Niederlande
Bestandsgröße	1 = ≤ 999 Plätze/Bestand
	2 = 1.000 – 2.999 Plätze/Bestand
	3 = ≥ 3.000 Plätze/Bestand
Betriebsform	0 = geschlossene Betriebsform
	1 = reine Masthaltung
PCV2-Impfstatus der Mastschweine	0 = keine Impfung
	1 = Impfung

IV. ERGEBNISSE

1. Nachweis von PCV3-DNA mittels real-time PCR

1.1. Vorkommen von PCV3 auf Bestandesebene

Die Untersuchung mittels PCV3-spezifischer real-time PCR ergab, dass in 75,5% (40/53) der untersuchten Bestände PCV3-DNA detektiert werden konnte. In Abbildung 7 ist die Verteilung der PCV3-positiven Bestände auf die Bundesländer dargestellt.



Abbildung 7: Darstellung der Bundesländer mit dem Nachweis von PCV3-positiven Beständen (rote Umrandung = Nachweis von mindestens einem PCV3-positiven Bestand innerhalb des Bundeslandes; Quotient = Anteil der Bestände mit PCV3-Nachweis);

Quelle: <https://de.fotolia.com/id/88123802>.

Aus jedem der 53 Bestände wurden vier Poolproben mittels real-time PCR auf PCV3-DNA untersucht. Die Abbildung 8 zeigt die Ct-Werte auf, welche sich für die vier Pools innerhalb der einzelnen Bestände ergaben.

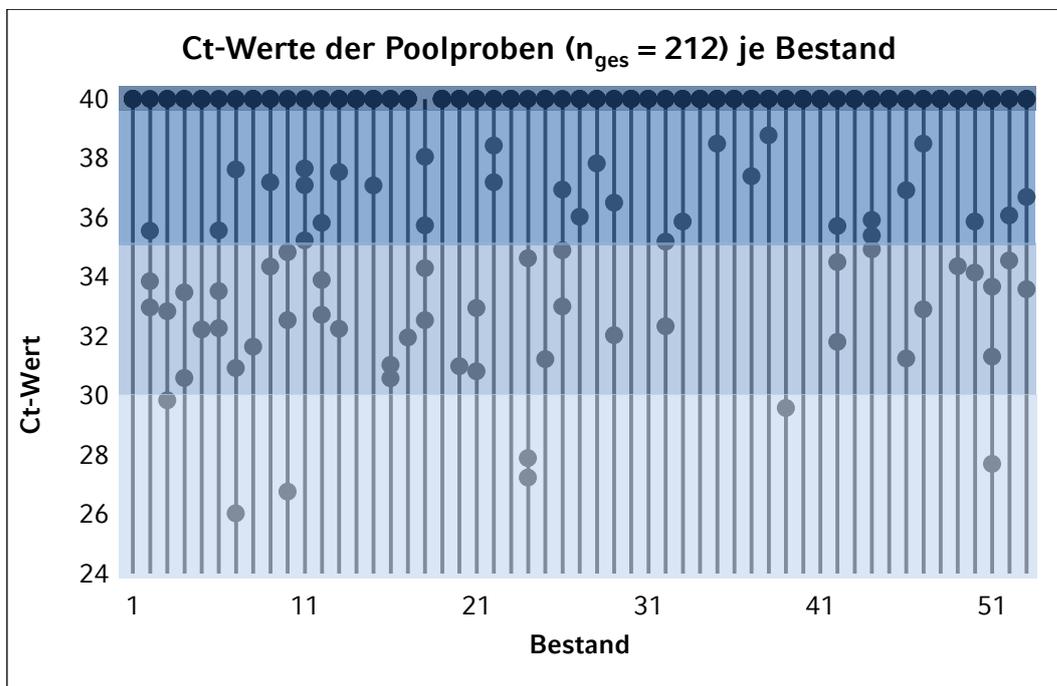


Abbildung 8: Darstellung der Ct-Werte der vier Poolproben (●) je Bestand (■ = Ct-Wert ≥ 40 ; ■ = Ct-Wert 35 – 39,9; ■ = Ct-Wert 30 - 34,9; ■ = Ct-Wert < 30 ; falls innerhalb eines Bestandes mehr als eine Poolprobe PCV3-negativ war (Ct-Wert ≥ 40), kam es zur optischen Überlagerung der Proben (●)).

Von den untersuchten Poolproben waren 37,3% (79/212) PCV3-positiv. Die 79 positiven Pools verteilten sich auf 40 Mastbestände. In Abbildung 9 ist die prozentuale Verteilung der Poolproben auf die vier Kategorien in Abhängigkeit von deren Ct-Werten dargestellt.

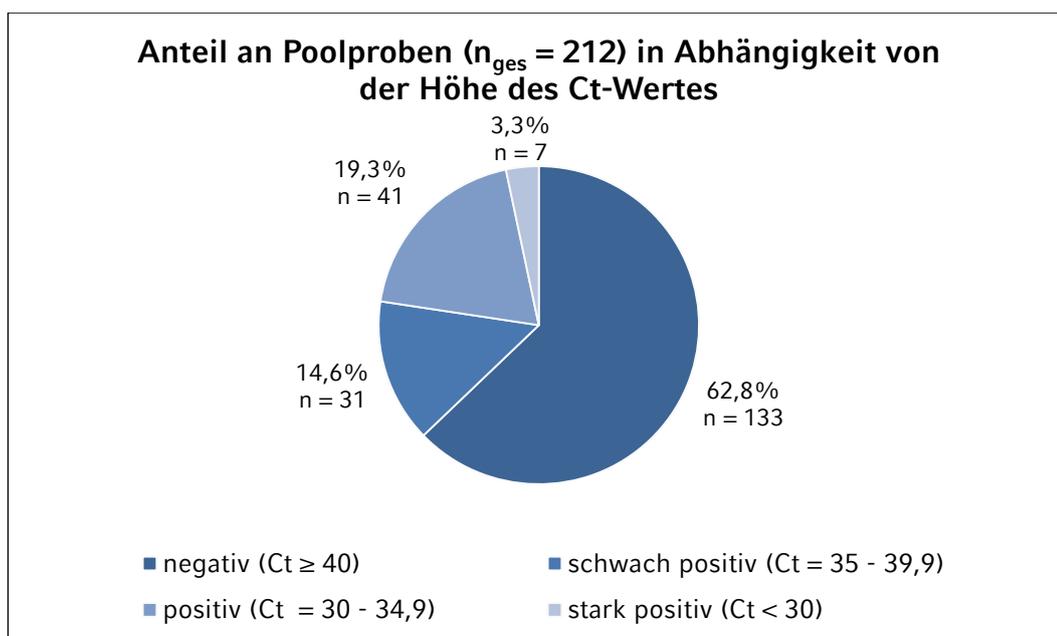


Abbildung 9: Prozentualer Anteil an Poolproben in Abhängigkeit von der Höhe der Ct-Werte. Einteilung der Höhe der Ct-Werte in vier Kategorien (Kategorie I: negative Poolproben mit Ct-Werten ≥ 40 ; Kategorie II: schwach positive Poolproben mit Ct-Werten = 35 – 39,9; Kategorie III: positive Poolproben mit Ct-Werten = 30 – 34,9; Kategorie IV: stark positive Poolproben mit Ct-Werten < 30).

Der Tabelle 6 kann der prozentuale Anteil an Beständen in Abhängigkeit von der Anzahl der PCV3-positiven Poolproben innerhalb eines Bestandes entnommen werden.

Tabelle 6: Prozentualer Anteil der Bestände in Abhängigkeit von der Anzahl der PCV3-positiven Poolproben innerhalb eines Bestandes (1 = eine von vier Poolproben PCV3-positiv; 2 = zwei von vier Poolproben PCV3-positiv; 3 = drei von vier Poolproben PCV3-positiv; 4 = alle vier Poolproben PCV3-positiv).

	Anzahl PCV3-positiver Poolproben			
	1	2	3	4
Anteil der Bestände	35% (n=14)	35% (n=14)	27,5% (n=11)	2,5% (n=1)

1.2. Auswertung der Ergebnisse auf Bestandsebene

Von den 40 PCV3-positiven Beständen lagen 35% (14/40) in Nord-, 20% (8/40) in Ost- und 45% (18/40) in Süddeutschland. Dabei waren 14 von 20 norddeutschen Beständen PCV3-positiv. In acht von zehn ostdeutschen Beständen konnte PCV3-DNA nachgewiesen werden. Von 23 süddeutschen Beständen war in 18 PCV3-DNA nachweisbar. Die statistischen Auswertungen ergaben, dass zwischen der Lage des Bestandes und dem Nachweis von PCV3-DNA kein signifikanter Zusammenhang bestand ($p > 0,05$). Auch die Bestandsgröße war nicht mit dem Vorkommen von PCV3 assoziiert ($p > 0,05$). Die prozentualen Anteile an PCV3-positiven Beständen in Abhängigkeit von deren Größe können der Abbildung 10 entnommen werden.

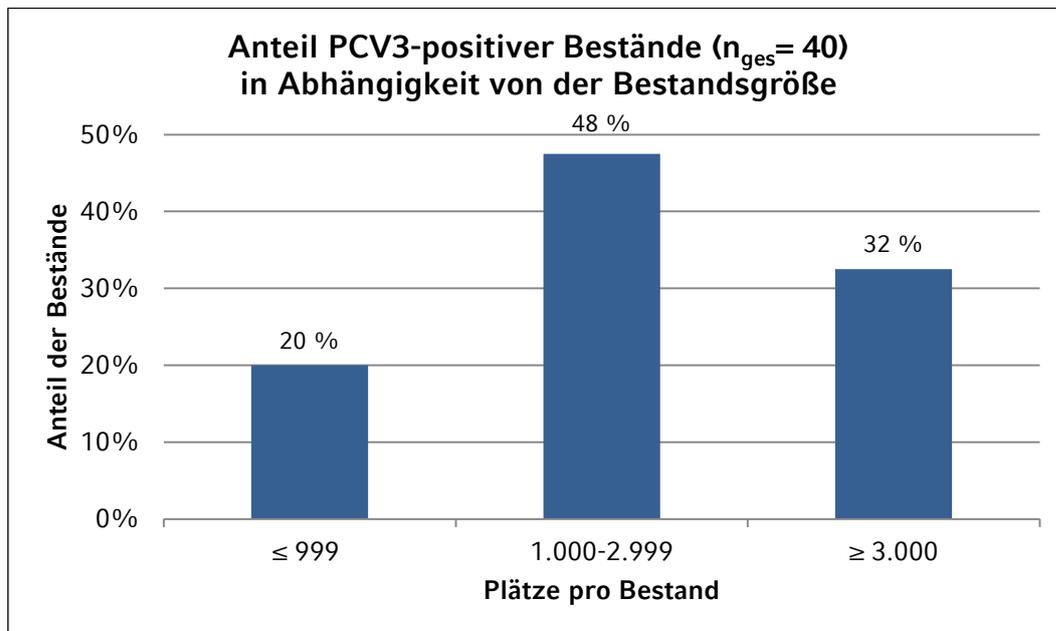


Abbildung 10: Prozentualer Anteil der PCV3-positiven Bestände in Abhängigkeit von deren Bestandsgröße (Gruppe I = ≤ 999 Plätze/Bestand; Gruppe II = 1.000-2.999 Plätze/Bestand; Gruppe III = ≥ 3.000 Plätze/Bestand).

Von den PCV3-positiven Beständen arbeiteten 32,5% (13/40) in einem geschlossenen System. 67,5% (27/40) der Bestände, in welchen PCV3-DNA nachgewiesen wurde, betrieben eine reine Masthaltung. Innerhalb der geschlossenen Bestände waren 13 von 17 PCV3-positiv. Von 36 Beständen mit reiner Masthaltung konnte in 27 PCV3-DNA

nachgewiesen werden. Aus der statistischen Analyse ging hervor, dass zwischen dem Nachweis von PCV3-DNA und der Betriebsform keine signifikante Abhängigkeit bestand ($p > 0,05$). In Abbildung 11 ist der prozentuale Anteil an PCV3-positiven Beständen in Abhängigkeit von deren Ferkelherkunft dargestellt. Zwischen der Ferkelherkunft und dem Vorkommen von PCV3 konnte kein signifikanter Zusammenhang festgestellt werden ($p > 0,05$).

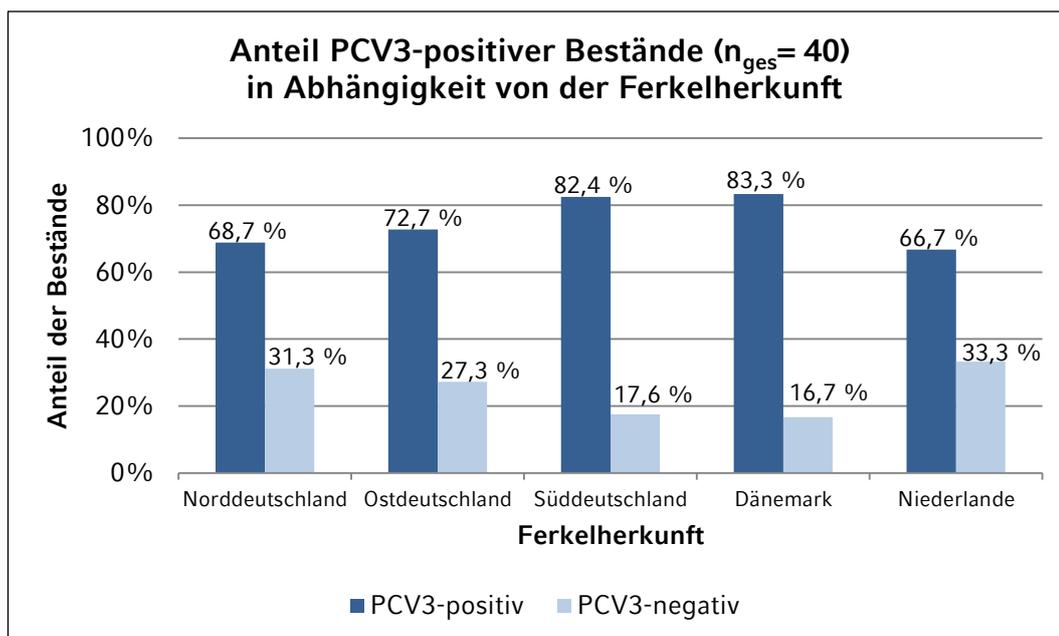


Abbildung 11: Prozentualer Anteil an PCV3-positiven Beständen in Abhängigkeit von deren Ferkelherkunft.

In 75% (39/52) der Bestände, deren Mastschweine gegen PCV2 geimpft waren, konnte PCV3-DNA detektiert werden. In dem einen Bestand, dessen Schweine nicht gegen PCV2 geimpft waren, konnte ebenfalls PCV3-DNA nachgewiesen werden.

1.3. Vorkommen von PCV3 auf Einzeltierebene

Aus jedem der 40 PCV3-positiven Bestände wurden die fünf Einzelblutproben des Pools mit dem niedrigsten Ct-Wert ($n_{\text{ges}} = 200$) mittels real-time PCR auf PCV3-DNA untersucht.

Der Abbildung 12 können die Ct-Werte der fünf Blutproben entnommen werden, die sich innerhalb der einzelnen Bestände ergaben.

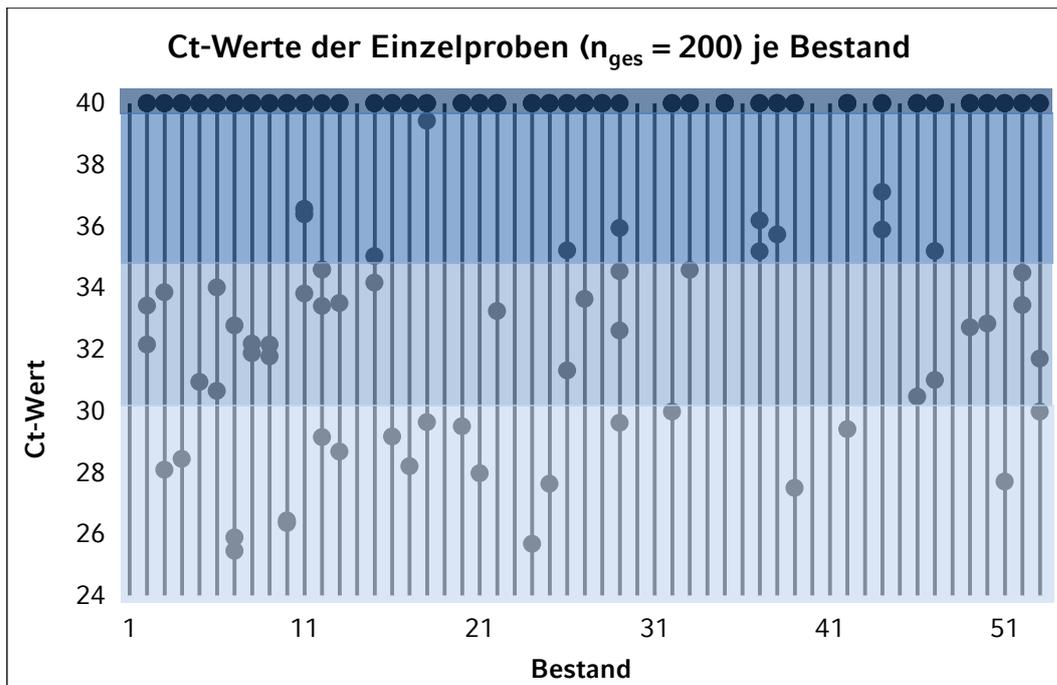


Abbildung 12: Darstellung der Ct-Werte der fünf Einzelproben (●) je Bestand ((■ = Ct-Wert ≥ 40 ; ■ = Ct-Wert 35 – 39,9; ■ = Ct-Wert 30 - 34,9; ■ = Ct-Wert < 30 ; falls innerhalb eines Bestandes mehr als eine Einzelprobe PCV3-negativ war (Ct-Wert ≥ 40), kam es zur optischen Überlagerung der Proben (●); im Bestand 10 sind zwei Proben (●) mit Ct-Werten von 26,4 und 26,4 optisch übereinander gelagert; im Bestand 12 kommt es ebenfalls zur optischen Überlagerung zweier Proben (●) mit Ct-Werten von 34,6).

Von den untersuchten Einzelblutproben waren 31,5% (63/200) PCV3-positiv. Die Ct-Werte der Proben, die sich bei der Untersuchung mittels real-time PCR ergaben, wurden erneut in vier Kategorien eingeteilt. Die Abbildung 13 stellt die prozentuale Verteilung der Einzeleren auf die vier Kategorien in Abhängigkeit von deren Ct-Werten dar.

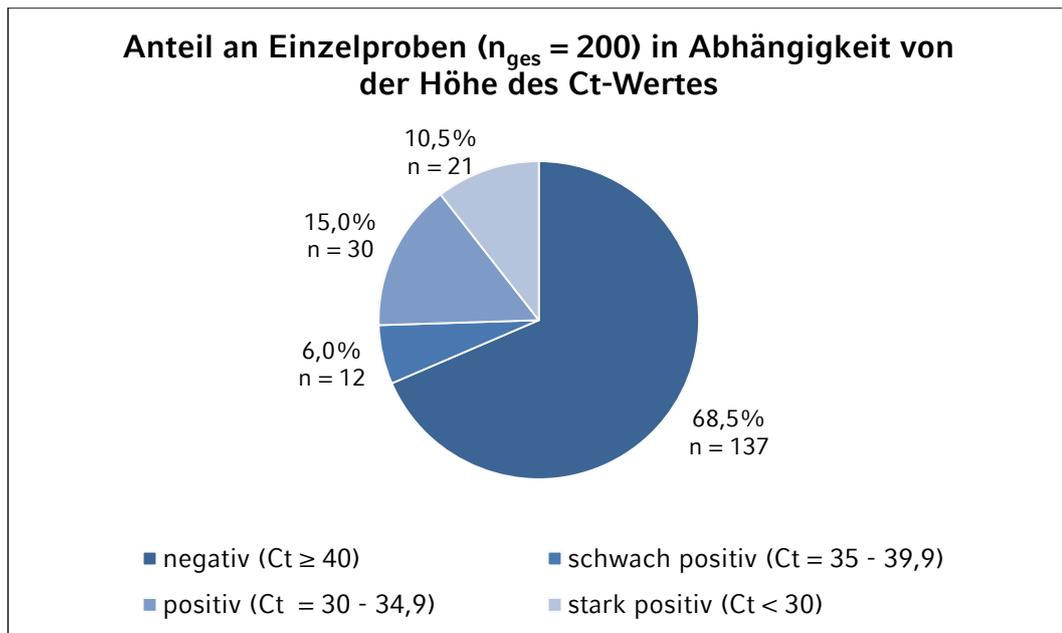


Abbildung 13: Prozentualer Anteil an Einzelproben in Abhängigkeit von der Höhe der Ct-Werte. Einteilung der Höhe der Ct-Werte in vier Kategorien (Kategorie I: negative Poolproben mit Ct-Werten ≥ 40 ; Kategorie II: schwach positive Poolproben mit Ct-Werten = 35 – 39,9; Kategorie III: positive Poolproben mit Ct-Werten = 30 – 34,9; Kategorie IV: stark positive Poolproben mit Ct-Werten < 30).

In Tabelle 7 ist der prozentuale Anteil an Beständen in Abhängigkeit von der Anzahl der PCV3-positiven Einzelproben innerhalb eines Bestandes dargestellt.

Tabelle 7: Prozentualer Anteil der Bestände in Abhängigkeit von der Anzahl an PCV3-positiven Einzelproben innerhalb eines Bestandes (0 = keine der fünf Einzelproben PCV3-positiv; 1 = eine von fünf Einzelproben PCV3-positiv; 2 = zwei von fünf Einzelproben PCV3-positiv; 3 = drei von fünf Einzelproben PCV3-positiv; 4 = vier von fünf Einzelproben PCV3-positiv; 5 = alle fünf Einzelproben PCV3-positiv).

	PCV3-positive Einzelproben pro Bestand					
	0	1	2	3	4	5
Anteil der Bestände	7,5% (n=3)	47,5% (n=19)	35% (n=14)	5% (n=2)	5% (n=2)	0% (n=0)

1.4. Untersuchung von PCV3-positiven Einzelproben auf PCV2-DNA

Die 40 Proben, welche für die PCV3-Sequenzierung vorgesehen waren, wurden mittel real-time PCR auf PCV2-DNA untersucht. In 87,5% (35/40) der untersuchten Proben konnte keine PCV2-DNA nachgewiesen werden. 12,5% (5/40) der Seren waren sowohl PCV3- als auch PCV2-positiv. In Tabelle 8 sind die Ct-Werte der real-time PCR dieser fünf Proben dargestellt.

Tabelle 8: Darstellung der Ct-Werte der PCV2- und PCV3-positiven Einzelproben.

Bestand	Ct-Wert PCV2	Ct-Wert PCV3
4	39,3	28,4
35	35,2	34,6
40	38,9	35,7
51	33,4	32,7
55	29,3	30,0

Die Proben, in welchen PCV2- und PCV3-DNA nachgewiesen wurde, stammten aus nord- (3/5), ost- (1/5) und süddeutschen (1/5) Beständen. Die Bestände dieser Proben wiesen eine Größe von 1.000 bis 2.999 Plätzen (2/5) und von über 3.000 Plätzen (3/5) auf. Die Ferkel der Bestände, aus welchen die fünf Proben entnommen wurden, kamen aus Norddeutschland (2/5) und Dänemark (3/5). Eine der fünf Proben stammte aus einem Bestand, der in einem geschlossenen System arbeitete. Die restlichen vier Einzeleren wurden aus Beständen entnommen, die eine reine Masthaltung betrieben. Die Proben wurden sowohl von Mastschweinen genommen, die gegen PCV2 geimpft waren (4/5) als auch von denjenigen, die nicht gegen PCV2 geimpft waren (1/5).

2. Sequenzierung

Um bei den Proben, die geringe PCV3-DNA-Konzentrationen aufwiesen, die Chancen für eine qualitativ ausreichende Sequenzierung zu erhöhen, wurde vor der Amplifikation der PCV3-spezifischen Genomfragmente eine unspezifische Anreicherung der zirkulären DNA mittels RCA durchgeführt. Um die Effizienz der RCA abschätzen zu können, wurden einzelne Proben vor und nach der Reaktion mittels PCV3-spezifischer real-time PCR quantitativ untersucht. Die Höhe der Ct-Werte, die dabei ermittelt wurden, können der Tabelle 9 entnommen werden.

Tabelle 9: Vergleich der Höhe der Ct-Werte der PCV3-spezifischen real-time PCR vor und nach Durchführung der RCA.

Einzelprobe	Ct-Wert vor RCA	Ct-Wert nach RCA
2.8	32,2	30,4
4.3	28,4	18,6
5.15	30,9	22,3
6.1	30,7	24,9
7.3	26,0	16,7
48.7	29,7	17,6

Die vollständige Sequenzierung des PCV3-Genoms ist bei 15 Serumproben gelungen. Bei neun weiteren Proben wurden ORF1, ORF2 und ORF3₂₃₁ des PCV3-Genoms sequenziert. ORF1 wurde auf dem positiven DNA-Strang zwischen den Nukleotiden 216 und 1.106 identifiziert und ORF2 auf dem negativen DNA-Strang zwischen den Nukleotiden 1.980 und 1.336. Innerhalb der Nukleotidpositionen 1.900 und 595 lag ORF3₂₃₁.

Die vollständigen und partiellen PCV3-Sequenzen sowie deren Bezeichnung bei NCBI GenBank sind in Tabelle 10 dargestellt.

Tabelle 10: Darstellung der vollständigen PCV3-Sequenzen (links) und der partiellen PCV3-Sequenzen (ORF1, ORF2 und ORF3₂₃₁ vollständig sequenziert) (rechts).

vollständige PCV3-Sequenz	GenBank	partielle PCV3-Sequenz	GenBank
DE3.7	MG014362	DE2.8	MG014377
DE4.3	MG014363	DE5.15	MG014378
DE7.3	MG014364	DE6.1	MG014379
DE13.20	MG014365	DE12.19	MG014380
DE18.2	MG014366	DE14.15	MG014381
DE19.15	MG014367	DE15.19	MG014382
DE23.17	MG014368	DE17.20	MG014383
DE26.17	MG014369	DE28.12	MG014384
DE27.16	MG014370	DE31.17	MG014385
DE34.5	MG014371		
DE41.16	MG014372		
DE48.7	MG014373		
DE52.18	MG014374		
DE53.8	MG014375		
DE55.1	MG014376		

Von den 15 PCV3-Vollgenomen, die amplifiziert und sequenziert wurden, wiesen 13 ein zirkuläres Genom mit einer Länge von 2.000 bp auf.

Die Genomsequenz DE41.16 zeigte an Nukleotidposition 1.224 eine Deletion, die in einem vermutlich nicht translatierten Bereich zwischen ORF1 und ORF2 liegt. Aufgrund der Deletion wies das Genom der Sequenz DE41.16 eine Länge von 1.999 bp auf.

Die Sequenz DE26.17 hingegen enthielt zwischen den Nukleotiden sechs und sieben eine Insertion. Daher ergab sich für deren Genom eine Länge von 2.001 bp. Diese Insertion würde einen Codon-Shift im ORF₂₃₁ hervorrufen. Daraus ergibt sich an Aminosäureposition 47 ein Stoppcodon, das zum Syntheseabbruch führt. Außerdem wies die Sequenz DE15.17 im ORF₂₃₁ an Aminosäureposition 21 ein Stoppcodon auf. Die ORF₂₃₁ der beiden Sequenzen DE26.17 und DE15.17 wären aufgrund der Mutationen nicht in der Lage, ein funktionsfähiges ORF₂₃₁-Protein zu synthetisieren. Die Funktion des alternativen ORF₁₇₇, welcher erst an Aminosäureposition 62 des ORF₂₃₁ beginnt, wäre durch diese beiden, weiter aminoterminal im Genom liegenden Mutationen nicht beeinträchtigt.

3. Ergebnisse der phylogenetischen Analysen

In den Abbildungen 14 und 15 sind die phylogenetischen Stammbäume dargestellt, welche mittels Neighbor-Joining-Algorithmus basierend auf ORF2 erstellt wurden. Darin lässt sich eine klare Zweiteilung der PCV3-Sequenzen in die beiden Cluster a und b erkennen, wobei vor allem Cluster b in weitere Subcluster (b1, b2 und b3) unterteilt werden kann. Die Sequenzen, welche in Subcluster a2 eingeteilt wurden, liegen zwischen den Ästen a1 und b. Die Tabelle 11 stellt die Cluster- und Subcluster-Zugehörigkeit der deutschen PCV3-Sequenzen, die aus der vorliegenden Studie hervorgegangen sind, dar. Die Sequenzen DE 55.1, DE19.15 und DE 48.7 konnten keinem b-Subcluster eindeutig zugeordnet werden. Daher wurden diese drei Sequenzen in dem phylogenetischen Stammbaum aus Abbildung 14 nicht farblich markiert und in Tabelle 11 mit bx gekennzeichnet.

Die in der vorliegenden Arbeit charakterisierten PCV3-Stämme waren in allen Ästen der phylogenetischen Stammbäume enthalten. Auch die PCV3-Sequenzen aus Amerika und Asien waren über alle Äste verteilt. Daraus lässt sich eine global auftretende Heterogenität der PCV3-Varianten ableiten. Keiner der Äste der phylogenetischen Stammbäume konnte mit einer bestimmten geographischen Region in Verbindung gebracht werden.

Tabelle 11: Darstellung der Cluster- und Subcluster-Zugehörigkeit der aus dieser Studie hervorgegangenen, deutschen PCV3-Sequenzen.

Cluster a		Cluster b			
a1	a2	b1	b2	b3	bx
DE 17.20	DE 6.1	DE 3.7	DE 2.8	DE 4.3	DE 55.1
DE 53.8		DE 31.17	DE 28.12	DE 34.5	DE 19.15
DE 7.3		DE 26.17	DE 27.16	DE 52.18	DE 48.7
DE 12.19		DE 23.17		DE 15.19	
DE 13.20		DE 41.16		DE 18.2	
DE 5.15		DE 14.15			

Anhand eines Alignments der Aminosäuren von ORF1 und ORF2 konnten cluster-spezifische Aminosäuren bzw. Codons ausfindig gemacht werden. Hierbei handelte es sich um die Aminosäure 122 des ORF1 sowie um die Aminosäuren 24, 27, 77, 104 und 150 des ORF2 (siehe Abbildung 15b und Tabellen 12a bis d). Die Unterteilung in die beiden Hauptgruppen a und b war über die Aminosäuren 122-ORF1, 24-ORF2 und 27-ORF2 möglich. Für die Gruppe a ergab sich hieraus das Aminosäuren-Motiv A V K, wohingegen sich für Gruppe b das Motiv S A R zeigte. Die weitere Unterteilung in b-Subcluster war über die Aminosäuren 77-ORF2, 104-ORF2 und 150-ORF2 möglich. Für Subcluster b1 stellte sich das Motiv S F I dar, während für b2 das Motiv T F L ermittelt wurde und sich für b3 S Y I als Motiv zeigte. Die Vertreter des Subclusters a2 zeigten kein einheitliches Aminosäuren-Motiv, vielmehr stellten sie Mischformen der klassischen a- und b-Motive dar. Aus diesem Grund wird a2 in den Tabellen 12a bis d nicht separat aufgeführt.

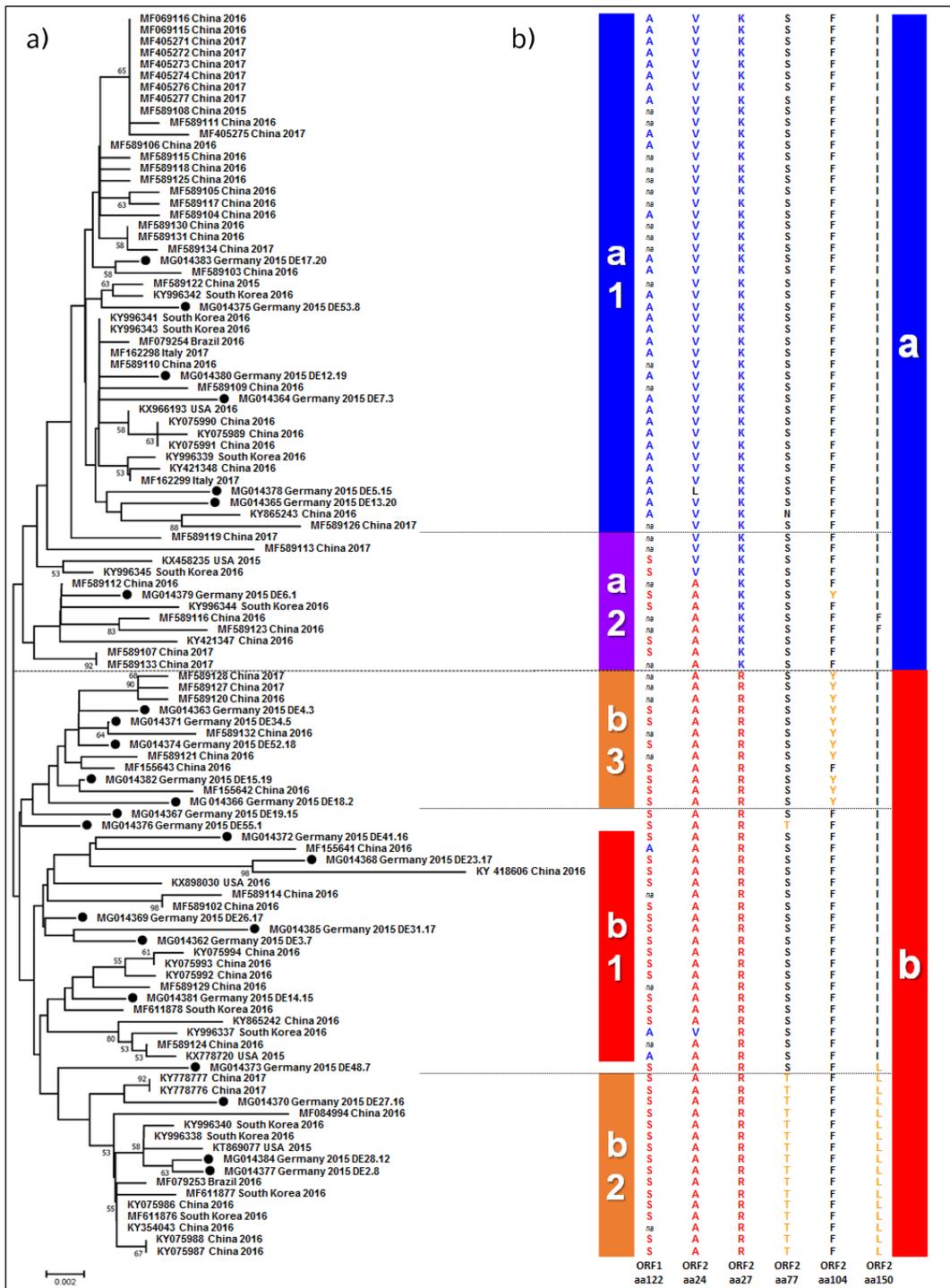


Abbildung 15: a) Phylogenetischer Stammbaum basierend auf ORF2 von 24 deutschen PCV3-Genomen der vorliegenden Studie (●) und von 84 auf NCBI GenBank verfügbaren PCV3-Referenzgenomen unter Angabe der GenBank-Nummer und des Herkunftslandes der Sequenz sowie des Jahres der Probenahme; b) Alignment der Aminosäuren der ORF1-Sequenzen an Position 122 und der ORF2-Sequenzen an den Positionen 24, 27, 77, 104 und 150 zur Identifizierung gruppenspezifischer Aminosäuren-Motive (na = keine verfügbare ORF1-Sequenz).

Tabelle 12: Darstellung der gruppenspezifischen Marker-Codons und Aminosäuren an Position 122 des ORF1 sowie an den Positionen 24, 27, 77, 104 und 150 des ORF2 zur Einteilung der PCV3-Sequenzen in Subcluster (unterstrichenes Nukleotid = für das Codieren der jeweiligen Aminosäure signifikant; Anzahl der PCV3-Sequenzen = Anzahl der ORF1- bzw. ORF2-Sequenzen mit dem jeweiligen Motiv).

a) Subcluster a1

ORF	Position	Codon	Aminosäure	Anzahl der PCV3-Sequenzen
ORF1	122	<u>G</u> CG	Alanin	31 von 31
ORF2	24	G <u>I</u> C	Valin	44 von 45
ORF2	27	<u>A</u> AA	Lysin	45 von 45
ORF2	77	A <u>G</u> C	Serin	44 von 45
ORF2	104	T <u>I</u> C	Phenylalanin	45 von 45
ORF2	150	<u>A</u> TT	Isoleucin	45 von 45

b) Subcluster b1

ORF	Position	Codon	Aminosäure	Anzahl der PCV3-Sequenzen
ORF1	122	<u>I</u> CG	Serin	14 von 17
ORF2	24	G <u>C</u> C	Alanin	19 von 20
ORF2	27	<u>A</u> G <u>A</u> / <u>C</u> G <u>A</u>	Arginin	20 von 20
ORF2	77	A <u>G</u> C	Serin	20 von 20
ORF2	104	T <u>I</u> C/ <u>T</u> I <u>I</u>	Phenylalanin	20 von 20
ORF2	150	<u>A</u> TT	Isoleucin	20 von 20

c) Subcluster b2

ORF	Position	Codon	Aminosäure	Anzahl der PCV3-Sequenzen
ORF1	122	<u>I</u> CG	Serin	15 von 15
ORF2	24	G <u>C</u> C	Alanin	16 von 16
ORF2	27	AG <u>A</u> / <u>C</u> GA	Arginin	16 von 16
ORF2	77	A <u>C</u> C	Threonin	16 von 16
ORF2	104	T <u>I</u> C	Phenylalanin	16 von 16
ORF2	150	<u>C</u> TT/ <u>C</u> TA	Leucin	16 von 16

d) Subcluster b3

ORF	Position	Codon	Aminosäure	Anzahl der PCV3-Sequenzen
ORF1	122	<u>I</u> CG	Serin	7 von 7
ORF2	24	G <u>C</u> C	Alanin	12 von 12
ORF2	27	AG <u>A</u>	Arginin	12 von 12
ORF2	77	AG <u>C</u>	Serin	12 von 12
ORF2	104	T <u>A</u> C	Tyrosin	11 von 12
ORF2	150	<u>A</u> TT	Isoleucin	12 von 12

Die Aminosäuren und Codons, welche sich für die deutschen Sequenzen DE19.15, DE55.1 und DE48.7 ergaben, die anhand der phylogenetischen Analysen keinem eindeutigen Subcluster zugeordnet werden konnten, sind in Tabelle 13 dargestellt.

Tabelle 13: Darstellung der Aminosäuren und Codons der Sequenzen DE19.15, DE55.1 und DE48.7.

Sequenz	ORF	Position	Codon	Aminosäure
DE19.15	ORF1	122	TCG	Serin
	ORF2	24	GCC	Alanin
	ORF2	27	AGA	Arginin
	ORF2	77	AGC	Serin
	ORF2	104	TTC	Phenylalanin
	ORF2	150	ATT	Isoleucin
DE55.1	ORF1	122	TCG	Serin
	ORF2	24	GCC	Alanin
	ORF2	27	AGA	Arginin
	ORF2	77	ACC	Threonin
	ORF2	104	TTC	Phenylalanin
	ORF2	150	ATT	Isoleucin
DE48.7	ORF1	122	TCG	Serin
	ORF2	24	GCC	Alanin
	ORF2	27	AGA	Arginin
	ORF2	77	AGC	Serin
	ORF2	104	TTC	Phenylalanin
	ORF2	150	CTT	Leucin

Die Sequenz DE5.15 wurde anhand des phylogenetischen Stammbaumes eindeutig dem Subcluster a1 zugeordnet. Als Aminosäuren-Motiv ergab sich für diese Sequenz A L K S F I, welches eine Mischform der Subcluster a1 und b2 darstellt. DE6.1 war im phylogenetischen

Stammbaum in Subcluster a2 enthalten. Diese Sequenz weist mit dem Aminosäuren-Muster S A K S Y I eine Mischung aus den Motiven der Subcluster a2 und b3 auf. Für die Sequenz MF155643 China ergab sich S A R S F I als Muster, welches eine Mischform der Subcluster des Clusters b darstellt. A A R S F I bzw. A V R S F I wiesen die Aminosäuren MF155641 China und KX778720 USA bzw. KY996337 South Korea auf. Diese wurden anhand des phylogenetischen Stammbaumes in Subcluster b1 eingeordnet, deren Aminosäuren weisen jedoch Parallelen zu denjenigen des Clusters a auf.

4. Auswertung der Cluster-Zugehörigkeit auf Bestandsebene

Von den 24 deutschen PCV3-Voll- bzw. Teilgenomsequenzen, die im Zuge dieser Studie sequenziert wurden, wurden sieben dem Cluster a zugeordnet. Die verbliebenen 17 Sequenzen waren in Cluster b enthalten. Die prozentuale Verteilung der deutschen PCV3-Sequenzen auf Cluster a und b kann der Abbildung 16 entnommen werden. Dadurch, dass jede dieser Sequenzen aus einem anderen deutschen Mastbestand stammte, ist in dieser Abbildung auch gleichzeitig die Verteilung der Bestände auf die beiden Cluster a und b dargestellt.

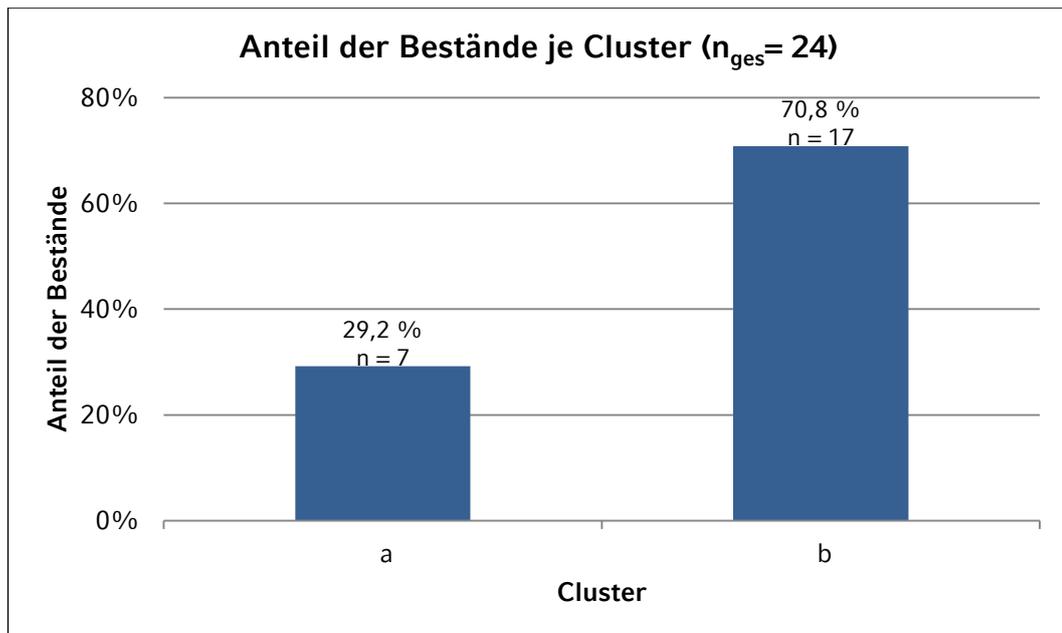


Abbildung 16: Einteilung der 24 PCV3-Voll- bzw. Teilgenomsequenzen nach deren Cluster-Zugehörigkeit. Darstellung des prozentualen Anteils der Bestände je Cluster.

In Abbildung 17 ist die prozentuale Verteilung der 24 Sequenzen auf Cluster a und b in Abhängigkeit von der Lage ihrer Herkunftsbestände dargestellt. Zwischen der Lage der Bestände innerhalb Deutschlands und der Cluster-Zugehörigkeit der nachgewiesenen Sequenzen konnte kein signifikanter Zusammenhang festgestellt werden ($p > 0,05$).

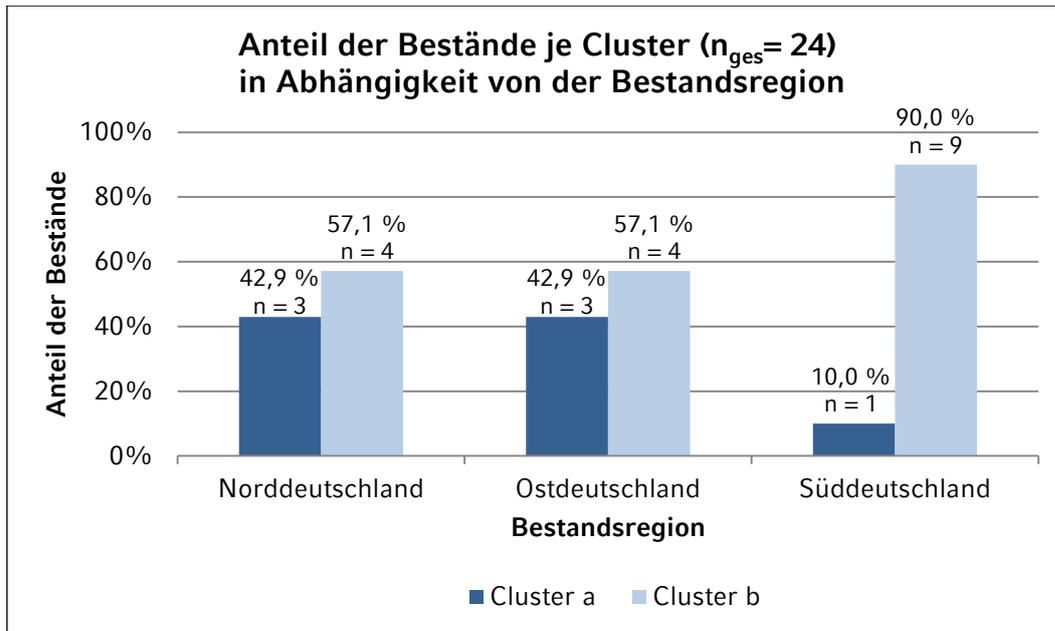


Abbildung 17: Einteilung der 24 PCV3-Voll- bzw. Teilgenomsequenzen nach deren Cluster-Zugehörigkeit in Abhängigkeit von der Lage ihrer Herkunftsbestände. Darstellung des prozentualen Anteils der Bestände je Cluster in Abhängigkeit von der Region des Bestandes.

Auch die Bestandsgröße hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Einordnung der Sequenzen in Cluster a oder b ($p > 0,05$). Die Sequenzen, welche in Cluster a enthalten waren, stammten aus Beständen der Kategorie II (1.000-2.999 Plätze/Bestand) (4/7) und der Kategorie III (≥ 3.000 Plätze/Bestand) (3/7). Innerhalb der Bestände der Kategorie I mit weniger als 1.000 Plätzen wurde keine Sequenz des Clusters a nachgewiesen. Die Herkunftsbestände der Sequenzen des Clusters b wiesen eine Größe der Kategorie I (5/17), der Kategorie II (6/17) und der Kategorie III (6/17) auf. Die Abbildung 18 zeigt die prozentuale Verteilung der 24 Sequenzen auf Cluster a und b in Abhängigkeit von der Betriebsform ihrer Herkunftsbestände. Alle Sequenzen, die in Cluster a enthalten waren, stammten aus Beständen, die eine reine Masthaltung betrieben (7/7). Die Sequenzen des Clusters b verteilten sich auf die Bestände, die in einem geschlossenen Betriebssystem arbeiteten (8/17) und auf diejenigen, die eine reine Masthaltung ausübten (9/17). Der χ^2 -Test nach Pearson ($n = 24$) ergab eine signifikante Assoziation zwischen der Betriebsform und dem Vorkommen von Sequenzen des

Clusters b. Demnach konnte in den geschlossenen Beständen signifikant häufiger Cluster b als Cluster a nachgewiesen werden ($p = 0,026$).

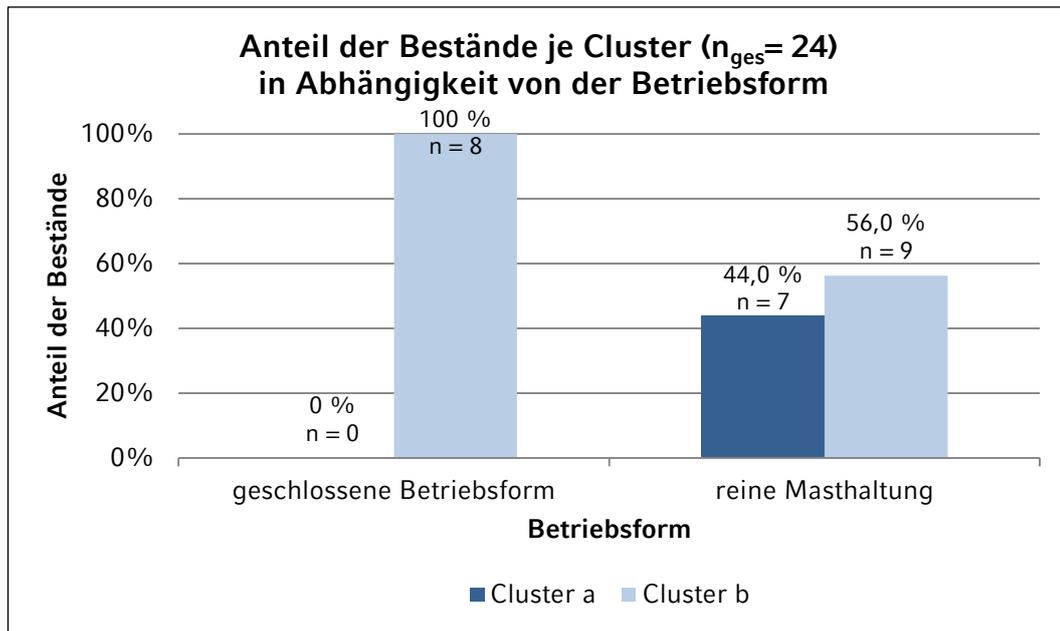


Abbildung 18: Einteilung der 24 PCV3-Voll- bzw. Teilgenomsequenzen nach deren Cluster-Zugehörigkeit in Abhängigkeit von der Betriebsform ihrer Herkunftsbestände. Darstellung des prozentualen Anteils der Bestände je Cluster in Abhängigkeit von der Betriebsform des Bestandes.

Die Ferkel der Herkunftsbestände der Sequenzen, die dem Cluster a zugeordnet wurden, stammten aus Nord- (1/7), Ost- (3/7) und Süddeutschland (1/7) sowie aus den Niederlanden (2/7). Die Ferkelherkünfte der Sequenzen des Clusters b waren Nord- (4/17), Ost- (3/17) und Süddeutschland (8/17) sowie Dänemark (2/17). Es war keine signifikante Abhängigkeit der Cluster-Zugehörigkeit der Sequenzen von der Ferkelherkunft ihrer Herkunftsbestände zu erkennen ($p > 0,05$). Zwischen dem PCV2-Impfstatus der Mastschweine und der Einordnung der Sequenzen in Cluster a oder b bestand ebenfalls kein signifikanter Zusammenhang ($p > 0,05$).

V. DISKUSSION

1. Vorkommen von PCV3 in Deutschland

1.1. Auf Bestandsebene

Im Rahmen der vorliegenden Studie war in 75,5% der untersuchten Mastbestände mindestens eine der 20 Serumproben, die von zufällig ausgewählten Mastschweinen stammten, PCV3-positiv. Damit lag die Nachweisrate von PCV3-DNA der in der vorliegenden Studie untersuchten, deutschen Mastbestände in einem vergleichbaren Rahmen zu den PCV3-Prävalenzen, die in China (KU et al., 2017), Südkorea (KWON et al., 2017) und Polen (STADEJEK et al., 2017) festgestellt wurden. Während der Anteil der in China untersuchten, PCV3-positiven Bestände mit 68,6% (KU et al., 2017) etwas geringer war als derjenige, welcher in den eigenen Studien für Deutschland festgestellt wurde, war der Anteil in Südkorea mit 72,6% PCV3-positiven Mastbeständen (KWON et al., 2017) nahezu gleich groß. Der bis dato höchste Anteil an PCV3-positiven Beständen wurde mit 85,7% in Polen festgestellt (STADEJEK et al., 2017). Daneben wurde PCV3-DNA in den Gewebeproben von Schweinen aus Mastbeständen in Nordamerika (PHAN et al., 2016; PALINSKI et al., 2017), Italien (FACCINI et al., 2017) und im Vereinigten Königreich (COLLINS et al., 2017) nachgewiesen. Die frequente Detektion von PCV3-DNA innerhalb der deutschen und internationalen Mastbestände weist auf eine ubiquitäre Verbreitung des Virus hin. In der vorliegenden Studie waren die Standorte der PCV3-positiven Bestände über Nord-, Ost- und Süddeutschland in den Regionen mit den höchsten Schweinedichten verteilt. Auch die polnischen (STADEJEK et al., 2017), chinesischen (KU et al., 2017) und südkoreanischen (KWON et al., 2017) Bestände, in welchen PCV3-DNA nachgewiesen werden konnte, stammten aus unterschiedlichen Regionen bzw. Provinzen. Die weite Verbreitung der PCV3-positiven Bestände innerhalb der Länder bekräftigt nochmals das ubiquitäre Vorkommen des Virus innerhalb der Hausschweinepopulation.

Eine mögliche Ursache für die weitläufige Verbreitung von PCV3 stellt der internationale Handel mit Schweinen dar. Für PCV2 wurde der weltweite Handel von subklinisch infizierten Schweinen bereits als ein möglicher Grund für die rasche und weite Verbreitung des Erregers diskutiert (FRANZO et al., 2015c). Diese Vermutung erklärt möglicherweise, dass auch in der vorliegenden Studie die Ferkelherkunft der untersuchten Bestände keinen signifikanten Einfluss auf den Nachweis von PCV3-DNA hatte. Unabhängig davon, ob die Ferkel aus Nord-, Ost-, Süddeutschland, Dänemark oder den Niederlanden stammten, waren die untersuchten Bestände PCV3-positiv. Da PCV3-DNA auch im Sperma von Ebern nachgewiesen werden kann (KU et al., 2017), spielt möglicherweise auch der internationale Handel von Schweinesperma eine Rolle für das weitläufige Vorkommen von PCV3. MENG (2012) zeigte für PCV2 auf, dass sich das Virus sowohl durch den direkten Kontakt mit infizierten Tieren als auch über infektiöses Sperma rasch verbreitet.

Denkbar wäre auch, dass das Virus schon seit längerem innerhalb der Schweinebestände zirkuliert, dessen Nachweis aber erst 2016 unter Verwendung der neuen Next Generation Sequencing-Methode in den Gewebeproben von Schweinen aus nordamerikanischen Beständen gelungen ist (PHAN et al., 2016; PALINSKI et al., 2017). Ein Hinweis dafür wäre, dass PCV3-DNA in Probenmaterial nachgewiesen wurde, welches aus den Jahren 2001 und 2002 stammte (COLLINS et al., 2017). Bei den Teilgenomsequenzen, die 2010 in amerikanischen Schweinefleischproben nachgewiesen wurden (LI et al., 2010) und einen hohen Verwandtschaftsgrad zu den nordamerikanischen PCV3-Sequenzen aufwiesen (PHAN et al., 2016; PALINSKI et al., 2017), könnte es sich bereits um das PCV3-Virus gehandelt haben. Auch FU et al. (2017) vermuteten aufgrund ihrer phylogenetischen Berechnungen, dass PCV3 schon seit 1966 innerhalb der Schweinebestände zirkuliert und es sich dabei um kein erst kürzlich aufgetretenes Virus handelt.

Ähnlich zu PCV2d, könnte es sich bei PCV3 auch um ein Virus handeln, das erst seit kurzer Zeit innerhalb der Schweinebestände zirkuliert und die Fähigkeit zur schnellen Verbreitung besitzt. Erstmals wurde PCV2d

2009 in China entdeckt (WANG et al., 2009) und verbreitete sich sehr rasch in China und Nordamerika (OPRIESSNIG et al., 2013; XIAO et al., 2015). Auch in Europa breitete sich der Genotyp schnell aus (TOPLAK et al., 2012; EDDICKS et al., 2015; FRANZO et al., 2015c). Da PCV3 als porcines Circovirus zu den unbehüllten DNA-Viren (TISCHER et al., 1982) zählt, könnte eine hohe Tenazität im Zusammenhang mit einer leichten Übertragbarkeit die Fähigkeit der schnellen Verbreitung des Virus mit sich bringen. Für die leichte Übertragbarkeit von PCV3 würde sprechen, dass die untersuchten Bestände der vorliegenden Studie, unabhängig von deren Größe und Betriebsform, PCV3-positiv waren. Sowohl in den geschlossenen Beständen mit Ferkelproduktion und Mast in einem Bestand als auch in reinen Mastbeständen mit frequentem Tierverkehr konnte PCV3-DNA detektiert werden.

Zusammenfassend deutet die Mehrzahl der Berichte darauf hin, dass PCV3 als wenig pathogenes Virus schon seit längerer Zeit in den Schweinebeständen vorhanden ist und dessen Nachweis in klinisch auffälligen Tieren erst kürzlich gelungen ist.

1.2. Auf Einzeltierebene

In der vorliegenden Studie konnte in 31,5% der Serumproben, die aus den 40 Pools, welche die niedrigsten Ct-Werte aufwiesen, einzeln untersucht wurden, PCV3-DNA nachgewiesen werden. Da es sich bei den einzeln untersuchten Serumproben um vorselektierte Proben aus PCV3-positiven Pools handelt, wird die hier dargestellte Prävalenz auf Einzeltierebene als überschätzt eingestuft. Dennoch wurde in der Untersuchung von STADEJEK et al. (2017) eine ähnlich hohe Nachweisrate von PCV3-DNA in den Serumproben von Mastschweinen festgestellt. Dabei wurde beobachtet, dass in den Blutproben von drei bis vier Wochen alten Ferkeln nahezu keine PCV3-DNA detektiert werden konnte (STADEJEK et al., 2017). In den Serumproben von Absetzferkeln und Mastschweinen hingegen konnte PCV3-DNA am häufigsten nachgewiesen werden (STADEJEK et al., 2017). Auch KWON et al. (2017) kamen in ihren Untersuchungen zu ähnlichen Ergebnissen. Daher vermuten STADEJEK et al. (2017), dass die Saugferkel durch die maternale Immunität vor einer Virämie geschützt sind. Diese Vermutung

kann anhand analoger Beobachtungen bei PCV2-Infektionen unterstützt werden. So zeigten beispielsweise MCKEOWN et al. (2005), dass zwischen der Höhe der maternalen PCV2-Antikörper und der Anzahl an virämischen Tiere eine Korrelation bestand. Je geringer die Menge an maternalen PCV2-Antikörpern war, desto größer war die Anzahl an virämischen Tieren (MCKEOWN et al., 2005). Auch eine Studie von LAROCHELLE et al. (2003) ergab, dass die Höhe der maternalen Antikörpertiter bis zur elften Lebenswoche der Ferkel auf ein Minimum gesunken waren.

Die Proben der vorliegenden Studie wurden von zufällig ausgewählten Mastschweinen aus Beständen entnommen, von denen vorherichtlich bekannt war, dass deren Schweine wiederholt an Atemwegserkrankungen litten. Dazu liegen derzeit nur die Ergebnisse einer ähnlichen Untersuchungen von ZHAI et al. (2017) vor. Daraus ging hervor, dass PCV3-DNA in den Serumproben von Absetzferkeln mit schweren respiratorischen Anzeichen signifikant häufiger nachweisbar war (63,8%), als in den Blutproben von asymptomatischen Tieren (1,9%) (ZHAI et al., 2017). Auffällig war, dass von den 140 PCV3-positiven Serumproben, die aus Absetzferkeln mit schweren respiratorischen Anzeichen entnommen wurden, 29 mit PRRSV koinfiziert waren (ZHAI et al., 2017). In den PCV3-positiven Blutproben der asymptomatischen Absetzferkel hingegen wurde keine Koinfektion mit PRRSV festgestellt (ZHAI et al., 2017). Für PCV2 wurde bereits aufgezeigt, dass eine PRRSV-Koinfektion einen synergistischen Effekt auf die Ausprägung des PCV2-Krankheitsbildes hat (HARMS et al., 2001). Auch weitere infektiöse Atemwegserreger, wie Influenza A Virus (KIM et al., 2003), *Pasteurella multocida* (QUINTANA et al., 2001) oder *Mycoplasma hyopneumoniae* (OPRIESSNIG et al., 2004) zeigten begünstigende Auswirkungen auf die Ausprägung der PCV2-assozierten Erkrankungen. Möglicherweise besteht auch zwischen der Koinfektion mit einem infektiösen Atemwegserreger und dem Nachweis von PCV3 ein synergistischer Effekt.

2. Auswertung der Ergebnisse der real-time PCR

Mit einem prozentualen Anteil von 33,9% wiesen die Poolproben in der vorliegenden Studie größtenteils relativ hohe Ct-Werte zwischen 30 und 39,9 auf. Nur bei einem geringen Anteil (3,3%) an Proben konnte eine hohe Viruslast mit Ct-Werten kleiner 30 festgestellt werden. Die Ct-Werte der Einzelproben lagen überwiegend (15,0%) zwischen 30 und 34,9. Obwohl in 10,5% der Einzelproben eine hohe Viruslast nachgewiesen wurde, konnte darunter, im Gegensatz zu anderen Studien (ZHAI et al., 2017), keine Probe mit einem Ct-Wert kleiner als 25 detektiert werden. Für PCV2 wurde festgestellt, dass zwischen der Virusmenge, die im Blut (HARDING et al., 2008) und in den Geweben infizierter Schweine (BRUNBORG et al., 2004) nachgewiesen werden kann und dem Schweregrad der Erkrankung ein signifikanter Zusammenhang besteht. ZHAI et al. (2017) beobachteten in ihren Untersuchungen zu PCV3, dass niedrige Ct-Werte unter 25 nur in den Serumproben nachgewiesen wurden, die aus Schweinen mit respiratorischen Anzeichen stammten. Daher vermuteten ZHAI et al. (2017), dass ähnlich zu PCV2 (BRUNBORG et al., 2004; HARDING et al., 2008), hohe PCV3-Mengen klinische Erscheinungsbilder hervorrufen könnten. Obwohl die Proben der vorliegenden Untersuchung aus Beständen mit wiederkehrender Atemwegssymptomatik stammten, kann diese Fragestellung hier nicht beantwortet werden. Dazu wären verlässliche Erkenntnisse bezüglich einer möglichen Pathogenität sowie histopathologischer Gewebeläsionen basierend auf kontrollierten Infektionen mit PCV3 nötig.

In der vorliegenden Untersuchung wurde in drei Poolproben, die aus unterschiedlichen Mastbeständen stammten, PCV3-DNA detektiert, wohingegen die Einzelproben dieser Pools PCV3-negativ waren. Die Ct-Werte der Poolproben lagen zwischen 35,9 und 38,5 in einem schwach positiven Bereich. Denkbar wäre, dass die drei Pools aufgrund einer unzureichenden Spezifität der real-time PCR falsch positiv getestet wurden.

3. Genetische Charakterisierung von PCV3

Entsprechend den Erkenntnissen von PHAN et al. (2016) und PALINSKI et al. (2017) wiesen 13 der 15 PCV3-Vollgenomsequenzen dieser Studie ein zirkuläres Genom mit einer Länge von 2.000 bp auf. Auch die beiden ORFs, ORF1 und ORF2, konnten an denselben Positionen identifiziert werden wie in den Untersuchungen von PHAN et al. (2016) und PALINSKI et al. (2017). ORF1 lag zwischen den Nukleotiden 216 und 1.106 auf dem positiven DNA-Strang und ORF2 wurde auf dem negativen DNA-Strang zwischen den Nukleotiden 1.980 und 1.336 identifiziert.

In dieser Studie war das Genom der Sequenz DE41.16 aufgrund einer Deletion an Aminosäure 1.224 nur 1.999 bp lang. Da die Deletion zwischen ORF1 und ORF2 in einem nicht translatierten Bereich lag, wäre die Synthese der beschriebenen PCV3-Proteine durch diese Mutation nicht beeinträchtigt. Auch WEN et al. (2017) wiesen in ihren Untersuchungen nach, dass eine PCV3-Sequenz wegen einer Deletion an Position 1.155 nur 1.999 bp lang war. Da diese weder innerhalb der ORFs noch am ORI lag, wären auch hier die Replikation sowie die Synthese des Rep- bzw Cap-Proteins nicht beeinflusst (WEN et al., 2017).

Die Sequenz DE26.17 dieser Studie enthielt zwischen den Nukleotiden sechs und sieben eine Insertion, weshalb sich für deren Genom eine Länge von 2.001 bp ergab. Die Insertion würde im ORF3₂₃₁, der nach Angaben von PALINSKI et al. (2017) zwischen den Nukleotiden 1.900 und 595 liegt, beginnend an Position 1.900 einen Codon-Shift hervorrufen. Aufgrund des Stoppcodons an Position 47, welches aus dem Codon-Shift hervorgeht, könnte kein ORF3₂₃₁ entsprechendes Protein synthetisiert werden. ORF3₁₇₇, der zwischen den Nukleotiden 62 und 595 liegt (PALINSKI et al., 2017), wäre von dieser Mutation nicht betroffen. Daher sprechen diese Daten für die Existenz des alternativen ORF3₁₇₇. Dafür würde zudem sprechen, dass die Sequenz DE15.17 im ORF3₂₃₁ an Position 21 ein Stoppcodon aufwies, wodurch auch hier kein ORF3₂₃₁ entsprechendes Protein synthetisiert werden könnte.

Für PCV2 wurde bereits festgestellt, dass dessen Genomlänge schwanken kann (CHEUNG, 2007; GUO et al., 2010; FRANZO et al., 2015a). Eine Länge von 1.767 bp weisen die Genome der Genotypen PCV2b, 2c und 2d auf (CHEUNG, 2007; GUO et al., 2010), während das Genom von PCV2a 1.768 bp (FRANZO et al., 2015a) und das von PCV2e 1.777 bp (DAVIES et al., 2016) lang ist.

4. Ergebnisse der phylogenetische Analysen

Aus der phylogenetischen Analyse dieser Studie ging hervor, dass zwischen den PCV3-Sequenzen auch über weite geographische Distanzen ein hoher Verwandtschaftsgrad bestand. Des Weiteren war anhand des Alignments ein hoher Übereinstimmungsgrad zwischen den Nukleotiden der PCV3-Sequenzen der vorliegenden Studie und denjenigen der internationalen, auf GenBank verfügbaren PCV3-Sequenzen zu erkennen. Auch andere Autoren stellten fest, dass die PCV3-Sequenzen, unabhängig von ihrem Ursprungsland, zueinander identisch und eng miteinander verwandt waren (CHEN et al., 2017; FACCINI et al., 2017; KWON et al., 2017).

Für die Identität und den engen Verwandtschaftsgrad der Sequenzen, auch über große Entfernungen hinweg, könnte der internationale Schweinehandel ursächlich sein. Dass zwischen dem weltweiten Schweinehandel und der raschen Verbreitung von gleichartigen Sequenzen vermutlich ein Zusammenhang besteht, wurde bereits für PCV2 festgestellt (FRANZO et al., 2016). Wahrscheinlich waren die PCV2d-Sequenzen, welche in China (GUO et al., 2010) und Nordamerika (OPRIESSNIG et al., 2013) detektiert wurden, aus diesem Grund 99,9% homolog zueinander. Mit 98,9% bis 99,1% wiesen auch die Nukleotide der in Nordamerika (PHAN et al., 2016; PALINSKI et al., 2017) und China (KU et al., 2017) detektierten PCV3-Sequenzen einen hohen Übereinstimmungsgrad auf. Neben dem Handel von lebenden Schweinen könnte auch der Handel von Fleisch und Fleischprodukten eine mögliche Übertragungsquelle von identischen bzw. eng miteinander verwandten Sequenzen sein. Die phylogenetischen Analysen von PHAN et al. (2016) zeigten, dass zwischen den PCV3-Sequenzen, die aus ihrer Studie

hervorgingen und den Teilgenomsequenzen, welche in Schweinefleisch nachgewiesen wurden (LI et al., 2010), ein hoher Verwandtschaftsgrad bestand. OPRIESSNIG et al. (2009) konnten in ihren Untersuchungen PCV2-DNA in Fleisch von PCV2-infizierten Schweinen nachweisen. Daher könnte PCV3 auch durch den Export von PCV3-positivem Schweinefleisch in naive Populationen eingetragen worden sein.

Des Weiteren war anhand der phylogenetischen Analysen zu erkennen, dass die PCV3-Sequenzen eines Herkunftslandes verschiedenen Clustern zugeordnet werden konnten. Auch aus den Untersuchungen von KU et al. (2017) ging hervor, dass die chinesischen PCV3-Sequenzen auf zwei Cluster verteilt waren. Für den Fall, dass PCV3 ein ebenso großes genetisches Rekombinationspotential besitzt wie PCV2 (GAGNON et al., 2010; FRANZO et al., 2016), könnte auch dies der Grund für die Verbreitung von Sequenzen unterschiedlicher Cluster innerhalb des Herkunftslandes sein.

5. Cluster und Subcluster

Um die Behauptung zu bestärken, dass die ORF2-Sequenzen in zwei Cluster und mehrere Subcluster eingeteilt werden können, wie es aus den phylogenetischen Stammbäumen hervorging, wurden Alignments der Aminosäuresequenzen des Rep- und Cap-Proteins durchgeführt. Dabei wurden gruppenspezifische Marker-Codons und Aminosäuren für ORF1 und ORF2 bestimmt. Wie bereits für PCV2 gezeigt wurde, stellt dies in Kombination mit den phylogenetischen Analysen eine hilfreiche Methode zur Bestimmung von Genotypen dar (FRANZO et al. 2015b). Diese Methodik verwendeten FRANZO et al. (2015b), um die vier Genotypen PCV2a, PCV2b, PCV2c und PCV2d zu definieren. Auch die beiden Genotypen PCV2e (DAVIES et al., 2016) und PCV2f wurden auf diese Weise bestimmt (BAO et al., 2017). Im Vergleich zu der Untersuchung von FUX et al. (2018) konnten in der vorliegenden Studie zusätzlich die spezifische Aminosäure und das Marker-Codon der Position 104 des ORF2 ausfindig gemacht werden. Dadurch war eine weitere Unterteilung des Subclusters b1 (S A R S E I) möglich, woraus b3 (S A R S Y I) hervorging. Eine Einteilung der ORF2-Sequenzen in Cluster und

Subcluster kann durch eine Studie von FU et al. (2017) bestätigt werden. Cluster PCV3a aus den Untersuchungen von FU et al. (2017) würde mit dem Aminosäuren-Motiv A R an Position 24-ORF2 und 27-ORF2 dem Cluster b der vorliegenden Studie entsprechen. Cluster PCV3c mit dem Motiv V K (FU et al., 2017) stimmt mit Cluster a übereinstimmen. Die Sequenzen, welche das Motiv A K an den Positionen 24 und 27 aufwiesen, fassten FU et al. (2017) unter dem Cluster PCV3b zusammen, welches in der vorliegenden Untersuchung a2 entsprechen würde. In der vorliegenden Studie stellte das Aminosäuren-Motiv des Subclusters a2 mit S A/V K eine Mischform aus den Motiven der Subcluster a1 und b1 dar, weshalb a2 durch eine evolutionäre Verknüpfung von a1 und b1 oder durch genetische Rekombination entstanden sein könnte. Dass durch die Rekombination von zwei Genotypen ein neuer Cluster entstehen kann, wurde bereits für PCV2 aufgezeigt (HU et al., 2015). Daher sind zusätzliche phylogenetische Analysen aus weiteren PCV3-Sequenzen notwendig, um eine sichere Aussage darüber treffen zu können, ob Subcluster a2 als solcher tatsächlich existiert. Die Unterteilung des Clusters PCV3a in die Subcluster PCV3a1, PCV3a2 und PCV3a3 durch FU et al. (2017) kongruiert in der vorliegenden Studie mit der Gliederung des Clusters b in b1, b2 und b3. Auch FU et al. (2017) erkannten, dass die Positionen 77-ORF2, 104-ORF2 und 150-ORF2 für die Typisierung geeignet sind und zeigten die drei Aminosäuren-Motive T F L, S Y I und S F I auf. Aufgrund unzureichender und unsauberer Analysen gelang es FU et al. (2017) nicht, die drei Motive einem dazugehörigen Subcluster eindeutig zuzuordnen. Beruhend auf den derzeit vorliegenden Ergebnissen ist eine Unterteilung der PCV3-Sequenzen in Cluster und Subcluster wahrscheinlich. Möglicherweise könnte es sich bei den beiden Clustern a und b um PCV3-Genotypen handeln.

Die Sequenzen DE5.15, DE6.1 und MF155643 China, deren Aminosäuren-Motive Mischformen aus den Motiven unterschiedlicher Subcluster darstellten, könnten Ergebnisse von Rekombinationen sein. Dass eine Sequenz aus der Rekombination zweier Sequenzen hervorgehen kann, stellten FRANZO et al. (2015a) für PCV2 dar.

Dies könnte auch für die Sequenzen MF155641 China, KX778720 USA und KY996337 South Korea zutreffen, welche anhand des phylogenetischen Stammbaumes in Subcluster b1 eingeordnet wurden, deren Aminosäuren jedoch Parallelen zu denjenigen des Clusters a aufwiesen.

Basierend auf phylogenetischen Analysen stellten JAGANATHAN et al. (2011) fest, dass der Import von Zuchtschweinen eine Eintrittspforte von PCV2 in das jeweilige Land darstellt. Auf Bestandsebene übertragen würde das bedeuten, dass in Bestände mit reiner Masthaltung durch den Zukauf von Schweinen ein leichter Eintrag von PCV2 ermöglicht wird. In der vorliegenden Studie wurden innerhalb der Bestände, die eine reine Masthaltung ausübten, Sequenzen der Clusters a und b detektiert. Den Beobachtungen von JAGANATHAN et al. (2011) entsprechend ist in diesen Beständen aufgrund des frequenten Tierverkehrs ein leichter Eintrag neuer Viren möglich. Im Umkehrschluss dazu, ist der Eintritt neuer Viren in Bestände, die in einem geschlossenen Betriebssystem ohne Zukauf von Tieren arbeiten, erschwert. Dadurch dass in der vorliegenden Studie innerhalb der geschlossenen Bestände nur Sequenzen des Clusters b festgestellt wurden, könnte Cluster a die jüngere Form der beiden darstellen. Um diese Vermutung zu bestärken, wäre eine Untersuchung von PCV3-Sequenzen aus älterem Probenmaterial notwendig.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Im Jahr 2016 wurde PCV3-DNA erstmals in Hausschweinen aus nordamerikanischen Beständen nachgewiesen. Nachfolgend wurden in zahlreichen Ländern PCV3-positive Schweinebestände detektiert.

Basierend auf diesen Untersuchungen wurde in der vorliegenden Studie durch eine retrospektive Auswertung von Serumproben das Vorkommen von PCV3 in deutschen Mastbeständen untersucht. Die 1.060 Serumproben, welche mittels real-time PCR auf PCV3-DNA untersucht wurden, stammten aus einem Gesundheitsmonitoring von 2015. Die 53 untersuchten Mastbestände, von welchen vorberichtlich bekannt war, dass deren Schweine wiederholt an Atemwegserkrankungen litten, lagen in Nord-, Ost- und Süddeutschland. Des Weiteren unterschieden sie sich in ihrer Größe und Betriebsform. Auch die Herkunft der Ferkel sowie der PCV2-Impfstatus der Mastschweine waren innerhalb der Bestände unterschiedlich. In jedem Bestand wurden 20 zufällig ausgewählte Mastschweine im Alter von 20 bis 24 Wochen beprobt. Die Untersuchung der Serumproben mittels real-time PCR ergab, dass 75,5% (40/53) der deutschen Mastbestände PCV3-positiv waren. In der statistischen Auswertung ergab sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen den bestandsspezifischen Faktoren und dem Nachweis von PCV3-DNA. Damit konnte der Verdacht des ubiquitären Vorkommens von PCV3 innerhalb der deutschen Mastbestände bestätigt werden.

Des Weiteren wurde in dieser Studie das Genom von PCV3 genetisch charakterisiert und phylogenetisch analysiert. Von 40 PCV3-positiven Serumproben, die aus unterschiedlichen Beständen stammten, gelang nach vorheriger rolling circle amplification (RCA) die Sequenzierung von 15 PCV3-Voll- bzw. neun Teilgenomsequenzen. Bei den neun PCV3-Teilgenomsequenzen erfolgte die Sequenzierung des ORF1, ORF2 und ORF3₂₃₁. Von den 15 zirkulären, einzelsträngigen PCV3-Vollgenomsequenzen wiesen 13 eine Länge von 2.000 bp auf. Das Genom einer weiteren Sequenz war aufgrund einer Deletion 1.999 bp lang. Wegen einer Insertion wies das Genom einer anderen Sequenz eine

Länge von 2.001 bp auf. Während ORF1 (Nukleotide 216 bis 1.106) und ORF2 (Nukleotide 1.980 bis 1.336) von diesen Mutationen nicht beeinträchtigt sind, könnte ORF3₂₃₁ (Nukleotide 1.900 bis 595) kein funktionsfähiges Protein synthetisieren. Da die Funktion des ORF3₁₇₇ (Nukleotide 62 bis 595) von diesen Mutationen nicht betroffen wäre, scheint dessen Existenz an Stelle des ORF3₂₃₁ wahrscheinlicher. Aus den phylogenetischen Analysen der 24 deutschen PCV3-ORF2-Sequenzen dieser Studie sowie der 84 internationalen, in der NCBI GenBank verfügbaren ORF2-Sequenzen ging hervor, dass sich diese in zwei phylogenetisch abgrenzbare Gruppen (Cluster a und b) unterteilen lassen, welche eventuell PCV3-Genotypen darstellen. Weiter war zu erkennen, dass diese Hauptgruppen in weitere Subcluster unterteilt werden können. Für die Unterscheidung der beiden Hauptgruppen wurden die drei Aminosäurepositionen 122-ORF1, 24-ORF2 und 27-ORF2 als Marker genutzt. In gleicher Weise wurden die Aminosäurepositionen 77-ORF2, 104-ORF2 und 150-ORF2 zur Differenzierung der Subcluster der Gruppe b verwendet.

VII. SUMMARY

In 2016, PCV3 DNA was detected in domestic pigs from North American farms for the first time. Subsequently, PCV3 positive pig farms were detected in numerous countries.

Based on these investigations, the occurrence of PCV3 in German fattening farms was examined in the present study by a retrospective evaluation of serum samples. The 1,060 serum samples which were analyzed for PCV3 DNA by real-time PCR were obtained from a monitoring programme in 2015. The 53 examined fattening farms, of which was known beforehand that their pigs repeatedly suffered from respiratory diseases, were located in northern, eastern and southern Germany. Furthermore, they differed in their size and operating form. Moreover, the origin of the piglets and the PCV2 vaccination status of the fattening pigs varied among the farms. In each farm 20 randomly selected fattening pigs were sampled at the age of 20 to 24 weeks. The examination of the serum samples using real-time PCR revealed that 75.5% (40/53) of the German fattening farms were PCV3 positive. In the statistical analysis, there was no significant correlation between the farm-specific factors and the detection of PCV3 DNA. This confirmed the suspicion of the ubiquitous occurrence of PCV3 within German fattening farms.

Furthermore, the genome of PCV3 was genetically characterized and phylogenetically analyzed in this study. Of 40 PCV3 positive serum samples, which were obtained from different farms, sequencing of 15 PCV3 full or nine partial sequences was achieved after previous rolling circle amplification (RCA). Sequencing of ORF1, ORF2 and ORF3₂₃₁ was successful for the nine PCV3 partial sequences. Of the 15 circular, single-stranded PCV3 full genome sequences 13 had a length of 2,000 bp. Due to a deletion the genome of another sequence was 1,999 bp long. Due to an insertion the genome of another sequence was 2,001 bp in length. While ORF1 (nucleotides 216 to 1.106) and ORF2 (nucleotides 1.980 to 1.336) are not affected by these mutations, ORF3₂₃₁ (nucleotides

1.900 to 595) could not synthesize any functional protein. Since the function of ORF3₁₇₇ (nucleotides 62 to 595) would not be affected by these mutations, its existence in place of ORF3₂₃₁ seems more likely. The phylogenetic analyses of the 24 German PCV3 ORF2 sequences of this study and the 84 international ORF2 sequences available at NCBI GenBank revealed that these can be subdivided into two phylogenetically definable groups (cluster a and b) which may represent PCV3 genotypes. It could also be seen that these main groups can be divided into further subclusters. For the distinction of the two main groups the three amino acid positions 122-ORF1, 24-ORF2 und 27-ORF2 were used as markers. Similarly, amino acid positions 77-ORF2, 104-ORF2 und 150-ORF2 were used to differentiate subgroups of group b.

VIII. LITERATURVERZEICHNIS

Bao F, Mi S, Luo Q, Guo H, Tu C, Zhu G, Gong W. Retrospective study of porcine circovirus type 2 infection reveals a novel genotype PCV2f. *Transbound Emerg Dis* 2017; 65: 1-9.

Bassami MR, Ypelaar I, Berryman D, Wilcox GE, Raidal SR. Genetic diversity of beak and feather disease virus detected in psittacine species in Australia. *Virology* 2001; 279: 392-400.

Brunborg IM, Moldal T, Jonassen CM. Quantitation of porcine circovirus type 2 isolated from serum/plasma and tissue samples of healthy pigs and pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome using a TaqMan-based real-time PCR. *J Virol Methods* 2004; 122: 171-178.

Chen GH, Mai KJ, Zhou L, Wu RT, Tang XY, Wu JL, He LL, Lan T, Xie QM, Sun Y, Ma JY. Detection and genome sequencing of porcine circovirus 3 in neonatal pigs with congenital tremors in South China. *Transbound Emerg Dis* 2017; 64: 1650-1654.

Chen GH, Tang XY, Sun Y, Zhou L, Li D, Bai Y, Mai KJ, Li YY, Wu QW, Ma JY. Development of a SYBR green-based real-time quantitative PCR assay to detect PCV3 in pigs. *J Virol Methods* 2018; 251: 129-132.

Cheung AK. Homologous recombination plays minor role in excision of unit-length viral genomes from head-to-tail direct tandem repeats of porcine circovirus during DNA replication in *Escherichia coli*. *Arch Virol* 2007; 152: 1531-1539.

Collins PJ, McKillen J, Allan G. Porcine circovirus type 3 in the UK. *Vet Rec* 2017; 181: 599-600.

Cortey M, Segales J. Low levels of diversity among genomes of porcine circovirus type 1 (PCV1) points to differential adaptive selection between porcine circoviruses. *Virology* 2012; 422: 161-164.

Crowther RA, Berriman JA, Curran WL, Allan GM, Todd D. Comparison of the structures of three circoviruses: chicken anemia virus, porcine circovirus type 2, and beak and feather disease virus. *J Virol* 2003; 77: 13036-13041.

Davies B, Wang X, Dvorak CM, Marthaler D, Murtaugh MP. Diagnostic phylogenetics reveals a new porcine circovirus 2 cluster. *Virus Res* 2016; 217: 32-37.

Deng J, Li X, Zheng D, Wang Y, Chen L, Song H, Wang T, Huang Y, Pang W, Tian K. Establishment and application of an indirect ELISA for porcine circovirus 3. *Arch Virol* 2017; 163: 479-482.

Eddicks M, Fux R, Szikora F, Eddicks L, Majzoub-Altweck M, Hermanns W, Sutter G, Palzer A, Banholzer E, Ritzmann M. Detection of a new cluster of porcine circovirus type 2b strains in domestic pigs in Germany. *Vet Microbiol* 2015; 176: 337-343.

Faccini S, Barbieri I, Gilioli A, Sala G, Gibelli LR, Moreno A, Sacchi C, Rosignoli C, Franzini G, Nigrelli A. Detection and genetic characterization of porcine circovirus type 3 in Italy. *Transbound Emerg Dis* 2017; 64: 1661-1664.

Fan S, Ku X, Chen F, Wang Y, Yu X, He Q. Complete genome sequence of a novel porcine circovirus type 3 strain, PCV3/CN/Hubei-618/2016, isolated from China. *Genome Announc* 2017; 5: 1-2.

Faurez F, Dory D, Grasland B, Jestin A. Replication of porcine circoviruses. *Virol J* 2009; 6: 1-8.

Franzo G, Cortey M, de Castro AM, Piovezan U, Szabo MP, Drigo M, Segales J, Richtzenhain LJ. Genetic characterisation of porcine circovirus type 2 (PCV2) strains from feral pigs in the Brazilian Pantanal: an opportunity to reconstruct the history of PCV2 evolution. *Vet Microbiol* 2015a; 178: 158-162.

Franzo G, Cortey M, Olvera A, Novosel D, Castro AM, Biagini P, Segales J, Drigo M. Revisiting the taxonomical classification of porcine circovirus type 2 (PCV2): still a real challenge. *Virology* 2015b; 12: 1-8.

Franzo G, Tucciarone CM, Dotto G, Gigli A, Ceglie L, Drigo M. International trades, local spread and viral evolution: the case of porcine circovirus type 2 (PCV2) strains heterogeneity in Italy. *Infect Genet Evol* 2015c; 32: 409-415.

Franzo G, Cortey M, Segales J, Hughes J, Drigo M. Phylodynamic analysis of porcine circovirus type 2 reveals global waves of emerging genotypes and the circulation of recombinant forms. *Mol Phylogenet Evol* 2016; 100: 269-280.

Franzo G, Legnardi M, Hjulsager CK, Klaumann F, Larsen LE, Segales J, Drigo M. Full-genome sequencing of porcine circovirus 3 field strains from Denmark, Italy and Spain demonstrates a high within-Europe genetic heterogeneity. *Transbound Emerg Dis* 2018;

Fu X, Fang B, Ma J, Liu Y, Bu D, Zhou P, Wang H, Jia K, Zhang G. Insights into the epidemic characteristics and evolutionary history of the novel porcine circovirus type 3 in southern China. *Transbound Emerg Dis* 2017; 65: 1-8.

Fux R, Söckler C, Link EK, Renken C, Krejci R, Sutter G, Ritzmann M, Eddicks M. Full genome characterization of porcine circovirus type 3 isolates reveals the existence of two distinct groups of virus strains. *Virology* 2018; 15: 1-9.

Gagnon CA, Music N, Fontaine G, Tremblay D, Harel J. Emergence of a new type of porcine circovirus in swine (PCV): a type 1 and type 2 PCV recombinant. *Vet Microbiol* 2010; 144: 18-23.

Guo LJ, Lu YH, Wei YW, Huang LP, Liu CM. Porcine circovirus type 2 (PCV2): genetic variation and newly emerging genotypes in China. *Virology* 2010; 7: 1-12.

Harding JC, Baker CD, Tumber A, McIntosh KA, Parker SE, Middleton DM, Hill JE, Ellis JA, Krakowka S. Porcine circovirus-2 DNA concentration distinguishes wasting from nonwasting pigs and is correlated with lesion distribution, severity, and nucleocapsid staining intensity. *J Vet Diagn Invest* 2008; 20: 274-282.

Harms PA, Sorden SD, Halbur PG, Bolin SR, Lager KM, Morozov I, Paul PS. Experimental reproduction of severe disease in CD/CD pigs concurrently infected with type 2 porcine circovirus and porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet Pathol* 2001; 38: 528-539.

He J, Cao J, Zhou N, Jin Y, Wu J, Zhou J. Identification and functional analysis of the novel ORF4 protein encoded by porcine circovirus type 2. *J Virol* 2013; 87: 1420-1429.

Hu J, Zhai SL, Zeng SY, Sun BB, Deng SF, Chen HL, Zheng Y, Wang HX, Li XP, Liu JK, Cheng S, Zhou X, Zhai JQ, Luo ML. Identification of natural recombinants derived from PCV2a and PCV2b. *Genet Mol Res* 2015; 14: 11780-11790.

Jaganathan S, Toung OP, Yee PL, Yew TD, Yoon CP, Keong LB. Genetic characterization of porcine circovirus 2 found in Malaysia. *Virology* 2011; 8: 1-10.

Kedkovid R, Woonwong Y, Arunorat J, Sirisereewan C, Sangpratum N, Lumyai M, Kedsangsakonwut S, Teankum K, Jittimane S, Thanawongnuwech R. Porcine circovirus type 3 (PCV3) infection in grower pigs from a Thai farm suffering from porcine respiratory disease complex (PRDC). *Vet Microbiol* 2018; 215: 71-76.

Kim HR, Park YR, Lim DR, Park MJ, Park JY, Kim SH, Lee KK, Lyoo YS, Park CK. Multiplex real-time polymerase chain reaction for the differential detection of porcine circovirus 2 and 3. *J Virol Methods* 2017; 250: 11-16.

Kim J, Chung HK, Chae C. Association of porcine circovirus 2 with porcine respiratory disease complex. *Vet J* 2003; 166: 251-256.

Ku X, Chen F, Li P, Wang Y, Yu X, Fan S, Qian P, Wu M, He Q. Identification and genetic characterization of porcine circovirus type 3 in China. *Transbound Emerg Dis* 2017; 64: 703-708.

Kwon T, Yoo SJ, Park CK, Lyoo YS. Prevalence of novel porcine circovirus 3 in Korean pig populations. *Vet Microbiol* 2017; 207: 178-180.

Larochelle R, Magar R, D'Allaire S. Comparative serologic and virologic study of commercial swine herds with and without postweaning multisystemic wasting syndrome. *Can J Vet Res* 2003; 67: 114-120.

Li L, Kapoor A, Slikas B, Bamidele OS, Wang C, Shaukat S, Masroor MA, Wilson ML, Ndjango JB, Peeters M, Gross-Camp ND, Muller MN, Hahn BH, Wolfe ND, Triki H, Bartkus J, Zaidi SZ, Delwart E. Multiple diverse circoviruses infect farm animals and are commonly found in human and chimpanzee feces. *J Virol* 2010; 84: 1674-1682.

Li L, Shan T, Soji OB, Alam MM, Kunz TH, Zaidi SZ, Delwart E. Possible cross-species transmission of circoviruses and cycloviruses among farm animals. *J Gen Virol* 2011; 92: 768-772.

Liu J, Chen I, Kwang J. Characterization of a previously unidentified viral protein in porcine circovirus type 2-infected cells and its role in virus-induced apoptosis. *J Virol* 2005; 79: 8262-8274.

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

Mankertz A, Persson F, Mankertz J, Blaess G, Buhk HJ. Mapping and characterization of the origin of DNA replication of porcine circovirus. *J Virol* 1997; 71: 2562-2566.

Mankertz A, Caliskan R, Hattermann K, Hillenbrand B, Kurzendoerfer P, Mueller B, Schmitt C, Steinfeldt T, Finsterbusch T. Molecular biology of porcine circovirus: analyses of gene expression and viral replication. *Vet Microbiol* 2004; 98: 81-88.

McKeown NE, Opriessnig T, Thomas P, Guenette DK, Elvinger F, Fenaux M, Halbur PG, Meng XJ. Effects of porcine circovirus type 2 (PCV2) maternal antibodies on experimental infection of piglets with PCV2. *Clin Diagn Lab Immunol* 2005; 12: 1347-1351.

Meng XJ. Spread like a wildfire-the omnipresence of porcine circovirus type 2 (PCV2) and its ever-expanding association with diseases in pigs. *Virus Res* 2012; 164: 1-3.

Nelson JR, Cai YC, Giesler TL, Farchaus JW, Sundaram ST, Ortiz-Rivera M, Hosta LP, Hewitt PL, Mamone JA, Palaniappan C, Fuller CW. TempliPhi, phi29 DNA polymerase based rolling circle amplification of templates for DNA sequencing. *BioTechniques* 2002; 32: 44-47.

Niagro FD, Forsthoefel AN, Lawther RP, Kamalanathan L, Ritchie BW, Latimer KS, Lukert PD. Beak and feather disease virus and porcine circovirus genomes: intermediates between the geminiviruses and plant circoviruses. *Arch Virol* 1998; 143: 1723-1744.

Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, Hase T. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res* 2000; 28: 1-7.

Opriessnig T, Thacker EL, Yu S, Fenaux M, Meng XJ, Halbur PG. Experimental reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs by dual infection with mycoplasma hyopneumoniae and porcine circovirus type 2. *Vet Pathol* 2004; 41: 624-640.

Opriessnig T, Patterson AR, Meng XJ, Halbur PG. Porcine circovirus type 2 in muscle and bone marrow is infectious and transmissible to naive pigs by oral consumption. *Vet Microbiol* 2009; 133: 54-64.

Opriessnig T, Xiao CT, Gerber PF, Halbur PG. Emergence of a novel mutant PCV2b variant associated with clinical PCVAD in two vaccinated pig farms in the U.S. concurrently infected with PPV2. *Vet Microbiol* 2013; 163: 177-183.

Palinski R, Pineyro P, Shang P, Yuan F, Guo R, Fang Y, Byers E, Hause BM. A novel porcine circovirus distantly related to known circoviruses is associated with porcine dermatitis and nephropathy syndrome and reproductive failure. *J Virol* 2017; 91: 1-13.

Park YR, Kim HR, Kim SH, Lee KK, Lyoo YS, Yeo SG, Park CK. Loop-mediated isothermal amplification assay for the rapid and visual detection of novel porcine circovirus 3. *J Virol Methods* 2017; 253: 26-30.

Phan TG, Giannitti F, Rossow S, Marthaler D, Knutson TP, Li L, Deng X, Resende T, Vannucci F, Delwart E. Detection of a novel circovirus PCV3 in pigs with cardiac and multi-systemic inflammation. *Virol J* 2016; 13: 1-8.

Phenix KV, Weston JH, Ypelaar I, Lavazza A, Smyth JA, Todd D, Wilcox GE, Raidal SR. Nucleotide sequence analysis of a novel circovirus of canaries and its relationship to other members of the genus circovirus of the family circoviridae. *J Gen Virol* 2001; 82: 2805-2809.

Piepenburg O, Williams CH, Stemple DL, Armes NA. DNA detection using recombination proteins. *PLoS biology* 2006; 4: 1115-1121.

Quintana J, Segales J, Rosell C, Calsamiglia M, Rodriguez-Arrijo GM, Chianini F, Folch JM, Maldonado J, Canal M, Plana-Duran J, Domingo M. Clinical and pathological observations on pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *Vet Rec* 2001; 149: 357-361.

Shen H, Liu X, Zhang P, Wang L, Liu Y, Zhang L, Liang P, Song C. Genome characterization of a porcine circovirus type 3 in South China. *Transbound Emerg Dis* 2017; 65: 264-266.

Stadejek T, Wozniak A, Milek D, Biernacka K. First detection of porcine circovirus type 3 on commercial pig farms in Poland. *Transbound Emerg Dis* 2017; 64: 1350-1353.

Tischer I, Gelderblom H, Vettermann W, Koch MA. A very small porcine virus with circular single-stranded DNA. *Nature* 1982; 295: 64-66.

Tochetto C, Lima DA, Varela APM, Loiko MR, Paim WP, Scheffer CM, Herpich JI, Cerva C, Schmitd C, Cibulski SP, Santos AC, Mayer FQ, Roehe PM. Full-genome sequence of porcine circovirus type 3 recovered from serum of sows with stillbirths in Brazil. *Transbound Emerg Dis* 2017; 65: 5-9.

Toplak I, Lazic S, Lupulovic D, Prodanov-Radulovic J, Becskei Z, Dosen R, Petrovic T. Study of the genetic variability of porcine circovirus type 2 detected in Serbia and Slovenia. *Acta Vet Hung* 2012; 60: 409-420.

Wang F, Guo X, Ge X, Wang Z, Chen Y, Cha Z, Yang H. Genetic variation analysis of Chinese strains of porcine circovirus type 2. *Virus Res* 2009; 145: 151-156.

Wang J, Zhang Y, Zhang R, Han Q, Wang J, Liu L, Li R, Yuan W. Recombinase polymerase amplification assay for rapid detection of porcine circovirus 3. *Mol Cell Probes* 2017; 36: 58-61.

Wen S, Sun W, Li Z, Zhuang X, Zhao G, Xie C, Zheng M, Jing J, Xiao P, Wang M, Han J, Ren J, Liu H, Lu H, Jin N. The detection of porcine circovirus 3 in Guangxi, China. *Transbound Emerg Dis* 2017; 65: 27-31.

Xiao CT, Halbur PG, Opriessnig T. Global molecular genetic analysis of porcine circovirus type 2 (PCV2) sequences confirms the presence of four main PCV2 genotypes and reveals a rapid increase of PCV2d. *J Gen Virol* 2015; 96: 1830-1841.

Zhai SL, Zhou X, Zhang H, Hause BM, Lin T, Liu R, Chen QL, Wei WK, Lv DH, Wen XH, Li F, Wang D. Comparative epidemiology of porcine circovirus type 3 in pigs with different clinical presentations. *Virology* 2017; 14: 1-6.

Zheng S, Shi J, Wu X, Peng Z, Xin C, Zhang L, Liu Y, Gao M, Xu S, Han H, Yu J, Sun W, Cong X, Li J, Wang J. Presence of torque teno sus virus 1 and 2 in porcine circovirus 3-positive pigs. *Transbound Emerg Dis* 2017a; 65: 1-4.

Zheng S, Wu X, Zhang L, Xin C, Liu Y, Shi J, Peng Z, Xu S, Fu F, Yu J, Sun W, Xu S, Li J, Wang J. The occurrence of porcine circovirus 3 without clinical infection signs in Shandong Province. *Transbound Emerg Dis* 2017b; 64: 1337-1341.

IX. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Darstellung der US-Bundesstaaten mit dem Nachweis von PCV3-positiven Beständen (rote Umrandung = Nachweis von mindestens einem PCV3-positiven Bestand innerhalb des US-Bundesstaates) 4

Abbildung 2: Darstellung der chinesischen Provinzen mit dem Nachweis von PCV3-positiven Beständen (rote Umrandung = Nachweis von mindestens einem PCV3-positiven Bestand innerhalb der Provinz) 5

Abbildung 3: Darstellung der südkoreanischen Provinzen mit dem Nachweis von PCV3-positiven Beständen (rote Umrandung = Nachweis von mindestens einem PCV3-positiven Bestand innerhalb der Provinz)... 6

Abbildung 4: Schematische Darstellung des PCV3-Genoms sowie seiner möglichen ORFs (ORF₃₂₃₁ für das Startcodon TCG und ORF₃₁₇₇ für das Startcodon ATG) 12

Abbildung 5: Darstellung der Anzahl der beprobten Bestände je Bundesland und deren Einteilung in Nord- Ost- und Süddeutschland (NI = Niedersachsen; NW = Nordrhein-Westfalen; SH = Schleswig-Holstein; MV = Mecklenburg-Vorpommern; ST = Sachsen-Anhalt; TH = Thüringen; BB = Brandenburg; BY = Bayern; BW = Baden-Württemberg). 20

Abbildung 6: Einteilung der untersuchten Bestände nach deren Größe in drei Gruppen (Gruppe I = ≤ 999 Plätze/Bestand; Gruppe II = 1.000-2.999 Plätze/Bestand; Gruppe III = ≥ 3.000 Plätze/Bestand). 21

Abbildung 7: Darstellung der Bundesländer mit dem Nachweis von PCV3-positiven Beständen (rote Umrandung = Nachweis von mindestens einem PCV3-positiven Bestand innerhalb des Bundeslandes; Quotient = Anteil der Bestände mit PCV3-Nachweis); 29

Abbildung 8: Darstellung der Ct-Werte der vier Poolproben (●) je Bestand (■ = Ct-Wert ≥ 40 ; ■ = Ct-Wert 35 – 39,9; ■ = Ct-Wert 30 - 34,9; ■ = Ct-Wert < 30 ; falls innerhalb eines Bestandes mehr als eine Poolprobe PCV3-negativ war (Ct-Wert ≥ 40), kam es zur optischen Überlagerung der Proben (●)). 30

Abbildung 9: Prozentualer Anteil an Poolproben in Abhängigkeit von der Höhe der Ct-Werte. Einteilung der Höhe der Ct-Werte in vier Kategorien (Kategorie I: negative Poolproben mit Ct-Werten ≥ 40 ; Kategorie II: schwach positive Poolproben mit Ct-Werten = 35 – 39,9; Kategorie III: positive Poolproben mit Ct-Werten = 30 – 34,9; Kategorie IV: stark positive Poolproben mit Ct-Werten < 30). 31

Abbildung 10: Prozentualer Anteil der PCV3-positiven Bestände in Abhängigkeit von deren Bestandsgröße (Gruppe I = ≤ 999 Plätze/Bestand; Gruppe II = 1.000-2.999 Plätze/Bestand; Gruppe III = ≥ 3.000 Plätze/Bestand). 32

Abbildung 11: Prozentualer Anteil an PCV3-positiven Beständen in Abhängigkeit von deren Ferkelherkunft. 33

Abbildung 12: Darstellung der Ct-Werte der fünf Einzelproben (●) je Bestand ((■ = Ct-Wert ≥ 40 ; ■ = Ct-Wert 35 – 39,9; ■ = Ct-Wert 30 - 34,9; ■ = Ct-Wert < 30 ; falls innerhalb eines Bestandes mehr als eine Einzelprobe PCV3-negativ war (Ct-Wert ≥ 40), kam es zur optischen Überlagerung der Proben (●); im Bestand 10 sind zwei Proben (●) mit Ct-Werten von 26,4 und 26,4 optisch übereinander gelagert; im Bestand 12 kommt es ebenfalls zur optischen Überlagerung zweier Proben (●) mit Ct-Werten von 34,6). 34

Abbildung 13: Prozentualer Anteil an Einzelproben in Abhängigkeit von der Höhe der Ct-Werte. Einteilung der Höhe der Ct-Werte in vier Kategorien (Kategorie I: negative Poolproben mit Ct-Werten ≥ 40 ; Kategorie II: schwach positive Poolproben mit Ct-Werten = 35 – 39,9; Kategorie III: positive Poolproben mit Ct-Werten = 30 – 34,9; Kategorie IV: stark positive Poolproben mit Ct-Werten < 30). 35

Abbildung 14: Phylogenetischer Stammbaum aus den ORF2-Sequenzen der 24 deutschen PCV3-Genome der vorliegenden Studie und den ORF2-Sequenzen von 84 auf NCBI GenBank verfügbaren PCV3-Referenzgenomen unter Angabe der GenBank-Nummer und des Herkunftslandes der Sequenz sowie des Jahres der Probennahme (blau = Subcluster a1; lila = Subcluster a2; rot = Subcluster b1; orange = Subcluster b2; gelb = Subcluster b3). 41

Abbildung 15: a) Phylogenetischer Stammbaum basierend auf ORF2 von 24 deutschen PCV3-Genomen der vorliegenden Studie (●) und von 84 auf NCBI GenBank verfügbaren PCV3-Referenzgenomen unter Angabe der GenBank-Nummer und des Herkunftslandes der Sequenz sowie des Jahres der Probennahme; b) Alignment der Aminosäuren der ORF1-Sequenzen an Position 122 und der ORF2-Sequenzen an den Positionen 24, 27, 77, 104 und 150 zur Identifizierung gruppenspezifischer Aminosäuren-Motive (na = keine verfügbare ORF1-Sequenz). 42

Abbildung 16: Einteilung der 24 PCV3-Voll- bzw. Teilgenomsequenzen nach deren Cluster-Zugehörigkeit. Darstellung des prozentualen Anteils der Bestände je Cluster. 47

Abbildung 17: Einteilung der 24 PCV3-Voll- bzw. Teilgenomsequenzen nach deren Cluster-Zugehörigkeit in Abhängigkeit von der Lage ihrer Herkunftsbestände. Darstellung des prozentualen Anteils der Bestände je Cluster in Abhängigkeit von der Region des Bestandes. 48

Abbildung 18: Einteilung der 24 PCV3-Voll- bzw. Teilgenomsequenzen nach deren Cluster-Zugehörigkeit in Abhängigkeit von der Betriebsform ihrer Herkunftsbestände. Darstellung des prozentualen Anteils der Bestände je Cluster in Abhängigkeit von der Betriebsform des Bestandes.

.....49

X. TABELLENVERZEICHNIS

<i>Tabelle 1: Darstellung der Sequenzen und Konzentrationen der in der vorliegenden Studie verwendeten Vorwärts-(for), Rückwärts-(rev)Primer und TaqMan Sonde (PALINSKI et al., 2017).</i>	22
<i>Tabelle 2: Einteilung der real-time PCR-Ergebnisse in vier Kategorien..</i>	23
<i>Tabelle 3: Darstellung der Nukleotid-Spannen der drei PCR-Produkte, die mit Hilfe der nach PALINSKI et al. (2017) modifizierten Sequenzierungs-PCR amplifiziert wurden.</i>	24
<i>Tabelle 4: Darstellung der für die Sequenzierungs-PCR verwendeten, nach PALINSKI et al. (2017) modifizierten Oligonukleotid-Primer (F = Vorwärts-Primer; R = Rückwärts-Primer; * = nur zur Sequenzierung verwendet).</i>	25
<i>Tabelle 5: Definition der zur statistischen Analyse verwendeten unabhängigen Variablen.</i>	28
<i>Tabelle 6: Prozentualer Anteil der Bestände in Abhängigkeit von der Anzahl der PCV3-positiven Poolproben innerhalb eines Bestandes (1 = eine von vier Poolproben PCV3-positiv; 2 = zwei von vier Poolproben PCV3-positiv; 3 = drei von vier Poolproben PCV3-positiv; 4 = alle vier Poolproben PCV3-positiv).</i>	31
<i>Tabelle 7: Prozentualer Anteil der Bestände in Abhängigkeit von der Anzahl an PCV3-positiven Einzelproben innerhalb eines Bestandes (0 = keine der fünf Einzelproben PCV3-positiv; 1 = eine von fünf Einzelproben PCV3-positiv; 2 = zwei von fünf Einzelproben PCV3-positiv; 3 = drei von fünf Einzelproben PCV3-positiv; 4 = vier von fünf Einzelproben PCV3-positiv; 5 = alle fünf Einzelproben PCV3-positiv).</i>	35

<i>Tabelle 8: Darstellung der Ct-Werte der PCV2- und PCV3-positiven Einzelproben.</i>	<i>36</i>
<i>Tabelle 9: Vergleich der Höhe der Ct-Werte der PCV3-spezifischen real-time PCR vor und nach Durchführung der RCA.....</i>	<i>37</i>
<i>Tabelle 10: Darstellung der vollständigen PCV3-Sequenzen (links) und der partiellen PCV3-Sequenzen (ORF1, ORF2 und ORF3₂₃₁ vollständig sequenziert) (rechts).</i>	<i>38</i>
<i>Tabelle 11: Darstellung der Cluster- und Subcluster-Zugehörigkeit der aus dieser Studie hervorgegangenen, deutschen PCV3-Sequenzen.</i>	<i>40</i>
<i>Tabelle 12: Darstellung der gruppenspezifischen Marker-Codons und Aminosäuren an Position 122 des ORF1 sowie an den Positionen 24, 27, 77, 104 und 150 des ORF2 zur Einteilung der PCV3-Sequenzen in Subcluster (unterstrichenes Nukleotid = für das Codieren der jeweiligen Aminosäure signifikant; Anzahl der PCV3-Sequenzen = Anzahl der ORF1- bzw. ORF2-Sequenzen mit dem jeweiligen Motiv).</i>	<i>43</i>
<i>Tabelle 13: Darstellung der Aminosäuren und Codons der Sequenzen DE19.15, DE55.1 und DE48.7.</i>	<i>45</i>
<i>Tabelle 14: Darstellung der zur Erstellung der phylogenetischen Stammbäume verwendeten ORF2-Sequenzen.</i>	<i>81</i>

XI. ANHANG

Tabelle 14: Darstellung der zur Erstellung der phylogenetischen Stammbäume verwendeten ORF2-Sequenzen.

a) Nordamerikanische ORF2-Sequenzen

GenBank	Zeitpunkt der Probensammlung	ID	Genotyp
KT869077	2015	29160	b2
KX458235	2015	2164	a2
KX778720	2015	PCV3-US/MO2015	b1
KX898030	2016	PCV3-US/MN2016	b1
KX966193	2016	PCV3-US/SD2016	a1

b) Brasilianische ORF2-Sequenzen

GenBank	Zeitpunkt der Probensammlung	ID	Genotyp
MF079253	2016	PCV3-BR/RS/6	b2
MF079254	2016	PCV3-BR/RS/8	a1

c) Chinesische ORF2-Sequenzen

GenBank	Zeitpunkt der Probensammlung	ID	Genotyp
KY075986	2016	PCV3/CN/Fujian-5/2016	b2
KY075987	2016	PCV3/CN/Fujian-12/2016	b2
KY075988	2016	PCV3/CN/Henan-13/2016	b2
KY075989	2016	PCV3/CN/Jiangxi-62/2016	a1
KY075990	2016	PCV3/CN/Chongqing-147/2016	a1

KY075991	2016	PCV3/CN/Chongqing-148/2016	a1
KY075992	2016	PCV3/CN/Chongqing-150/2016	b1
KY075993	2016	PCV3/CN/Chongqing-155/2016	b1
KY075994	2016	PCV3/CN/Chongqing-156/2016	b1
KY354043	2016	PCV3/CN/Fujian-1/2016	b2
KY418606	2016	GD2016	b1
KY421347	2016	PCV3-CHN/GD2016	a2
KY421348	2016	PCV3-CHN/CC2016	a1
KY778776	2017	PCV3/CN/Shandong-1/201703	b2
KY778777	2017	PCV3/CN/Shandong-2/201703	b2
KY865242	2016	CHN_Shanghai_0706_2016	b1
KY865243	2016	CHN_Shanghai_0708_2016	a1
MF069115	2016	PCV3/CN/GDLC1/2016	a1
MF069116	2016	PCV3/CN/GDHE2/2016	a1
MF084994	2016	PCV3/CN/Anhui-14/201611	b2
MF155641	2016	PCV3-China/GX2016-1	b1
MF155642	2016	PCV3-Chian/GX2016-2	b3
MF155643	2016	PCV3-China/GX2016-3	b3
MF405271	2017	PCV3/CN/GDSJ1/2017	a1
MF405272	2017	PCV3/CN/GDBL1/2017	a1
MF405273	2017	PCV3/CN/GXHJ1/2017	a1
MF405274	2017	PCV3/CN/GXLJ2/2017	a1
MF405275	2017	PCV3/CN/GDQG1/2017	a1

MF405276	2017	PCV3/CN/GXLJ1/2017	a1
MF405277	2017	PCV3/CN/GXHJ2/2017	a1
MF589102	2016	PCV3/CN/Guangdong- HY1/2016	b1
MF589103	2015	PCV3/CN/Guangdong- HZ4/2015	a1
MF589104	2015	PCV3/CN/Guangdong- MX3/2015	a1
MF589105	2016	PCV3/CN/Guangdong- SG1/2016	a1
MF589106	2016	PCV3/CN/Jiangxi-3/2016	a1
MF589107	2017	PCV3/CN/Jiangxi-B1/2017	a2
MF589108	2015	PCV3/CN/Fujian-FZ/2015	a1
MF589109	2016	PCV3/CN/Fujian-HWK1/2016	a1
MF589110	2016	PCV3/CN/Fujian-HWK2/2016	a1
MF589111	2016	PCV3/CN/Fujian-KP1/2016	a1
MF589112	2016	PCV3/CN/Guangdong- CH/2016	a2
MF589113	2017	PCV3/CN/Guangdong- GZ/2017	a2
MF589114	2016	PCV3/CN/Guangdong- HY/2016	b1
MF589115	2016	PCV3/CN/Guangdong- JM1/2016	a1
MF589116	2016	PCV3/CN/Guangdong- MX1/2016	a2
MF589117	2016	PCV3/CN/Guangdong- SG/2016	a1
MF589118	2016	PCV3/CN/Guangdong- X1/2016	a1
MF589119	2017	PCV3/CN/Guangxi-L2/2017	a2
MF589120	2016	PCV3/CN/Guangxi-LD4/2016	b3

MF589121	2016	PCV3/CN/Guangxi-LD5/2016	b3
MF589122	2015	PCV3/CN/Guangxi-NK/2015	a1
MF589123	2016	PCV3/CN/Guangxi-WZ/2016	a2
MF589124	2016	PCV3/CN/Hunan-B8/2016	b1
MF589125	2016	PCV3/CN/Hunan-CD33/2016	a1
MF589126	2017	PCV3/CN/Hunan-CZ/2017	a1
MF589127	2017	PCV3/CN/Hunan-HWF2/2017	b3
MF589128	2017	PCV3/CN/Hunan-HWF3/2017	b3
MF589129	2016	PCV3/CN/Hunan-XHD2/2016	b1
MF589130	2016	PCV3/CN/Jiangxi-1/2016	a1
MF589131	2016	PCV3/CN/Jiangxi-G1/2016	a1
MF589132	2016	PCV3/CN/Jiangxi-QN3/2016	b3
MF589133	2017	PCV3/CN/Jiangxi-S1/2017	a2
MF589134	2017	PCV3/CN/Jiangxi-XY/2017	a1

d) Deutsche ORF2-Sequenzen

GenBank	Zeitpunkt der Probensammlung	ID	Genotyp
MG014362	2015	DE3.7	b1
MG014363	2015	DE4.3	b3
MG014364	2015	DE7.3	a1
MG014365	2015	DE13.20	a1
MG014366	2015	DE18.2	b3
MG014367	2015	DE19.15	bx
MG014368	2015	DE23.17	b1
MG014369	2015	DE26.17	b1

MG014370	2015	DE27.16	b2
MG014371	2015	DE34.5	b3
MG014372	2015	DE41.16	b1
MG014373	2015	DE48.7	bx
MG014374	2015	DE52.18	b3
MG014375	2015	DE53.8	a1
MG014376	2015	DE55.1	bx
MG014377	2015	DE2.8	b2
MG014378	2015	DE5.15	a1
MG014379	2015	DE6.1	a2
MG014380	2015	DE12.19	a1
MG014381	2015	DE14.15	b1
MG014382	2015	DE15.19	b3
MG014383	2015	DE17.20	a1
MG014384	2015	DE28.12	b2
MG014385	2015	DE31.17	b1

e) Italienische ORF2-Sequenzen

GenBank	Zeitpunkt der Probensammlung	ID	Genotyp
MF162298	2017	PCV3-IT/CO2017	a1
MF162299	2017	PCV3-IT/MN2017	a1

f) Südkoreanische ORF2-Sequenzen

GenBank	Zeitpunkt der Probensammlung	ID	Genotyp
KY996337	2016	PCV3/KU-1601	b1
KY996338	2016	PCV3/KU-1602	b2
KY996339	2016	PCV3/KU-1603	a1
KY996340	2016	PCV3/KU-1604	b2
KY996341	2016	PCV3/KU-1605	a1
KY996342	2016	PCV3/KU-1606	a1
KY996343	2016	PCV3/KU-1607	a1
KY996344	2016	PCV3/KU-1608	a2
KY996345	2016	PCV3/KU-1609	a2
MF611876	2016	PCK3-1701	b2
MF611877	2016	PCK3-1702	b2
MF611878	2016	PCK3-1703	b1

XII. DANKSAGUNG

Mein herzlichster Dank gilt zunächst meinem Doktorvater Prof. Dr. Mathias Ritzmann, der es mir ermöglichte meine Doktorarbeit unter seiner Leitung an der Klinik für Schweine anzufertigen. Ebenso möchte ich ihm für die Bereitstellung dieses interessanten und hochaktuellen Themas bedanken und dafür, dass er bei Fragen immer helfend zur Seite stand. In der Klinik sorgte er stets für eine angenehme Arbeitsatmosphäre, wofür ich ihm ebenfalls sehr dankbar bin.

Außerdem möchte ich meinem Betreuer Dr. Matthias Eddicks von Herzen dafür danken, dass er mich durch seine konstruktiven Gedanken und wertvollen Inspirationen in meiner Doktorarbeit unterstützt hat. Bei Frage- und Problemstellungen war er immer eine sehr große Hilfe, weshalb ein besonderer Dank an ihn geht.

Ein herzlicher Dank geht an Dr. Robert Fux, Dr. Ellen Link und an alle anderen Mitarbeiter des Lehrstuhls für Virologie, die einen erheblichen Teil zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Sie haben mich jederzeit bei meinen labordiagnostischen Tätigkeiten mit größter Geduld unterstützt haben und waren durch ihre umfassende Beantwortung meiner Fragen eine großartige Hilfe.

Ich möchte mich auch besonders bei meinen Kolleginnen und Kollegen der Klinik für Schweine bedanken, die mir eine unglaublich tolle Zeit an der Klinik für Schweine ermöglicht haben. Ein besonderer Dank gilt an Dr. Christine Renken, die durch ihre außerordentliche Unterstützung wesentlich zum Gelingen meiner Doktorarbeit beigetragen hat. Ein genauso großer Dank geht an Dr. Steffanie Senf, die mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite stand.

Von ganzem Herzen möchte ich meiner Familie und meinem Freund Flavio für ihre jahrelange Unterstützung danken. Ohne ihr großes Vertrauen in mich sowie ihre fortwährende Ermunterung und ihr grenzenloses Verständnis wäre das alles nicht möglich gewesen.