

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

Untersuchung zum Vorkommen des Porzinen  
Epizootischen Diarrhoe Virus beim Wildschwein und zu  
den Übertragungswegen zwischen Haus- und  
Wildschweinen

von Annalena Sophia Scheffler  
aus Bietigheim-Bissingen

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. Jasmin Numberger, Dr. Julia Stadler

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: Univ.-Prof. Dr. Kaspar Matiasek

Tag der Promotion: 27.07.2018

Meiner Familie

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>I.</b>	<b>EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
<b>II.</b>	<b>LITERATURÜBERSICHT .....</b>	<b>2</b>
<b>1.</b>	<b>Porzines Coronavirus .....</b>	<b>2</b>
1.1.	Taxonomie .....	2
1.2.	Morphologie .....	2
1.3.	Porzine Coronaviren im Überblick.....	3
<b>2.</b>	<b>Vorkommen von PEDV .....</b>	<b>4</b>
2.1.	Europa bis 2013.....	4
2.2.	Asien .....	5
2.3.	Nordamerika .....	6
2.4.	Europa ab 2014.....	6
<b>3.</b>	<b>Genotypen.....</b>	<b>7</b>
<b>4.</b>	<b>Tenazität .....</b>	<b>10</b>
4.1.	Allgemein.....	10
4.2.	Gülle.....	10
<b>5.</b>	<b>Pathogenese.....</b>	<b>11</b>
<b>6.</b>	<b>Klinik .....</b>	<b>11</b>
6.1.	Inkubationszeit.....	11
6.2.	Saugferkel (Ferkel bis zum Absetzen).....	12
6.3.	Aufzuchtferkel und Mastschweine.....	13
6.4.	Sauen und Eber .....	13
<b>7.</b>	<b>Übertragung .....</b>	<b>13</b>
7.1.	Ausscheidung und Inkorporation .....	13
7.2.	Vektoren .....	14
<b>8.</b>	<b>Pathologie .....</b>	<b>15</b>
8.1.	Makroskopische Veränderungen .....	15
8.2.	Histopathologische Veränderungen .....	16
<b>9.</b>	<b>Bekämpfung.....</b>	<b>18</b>
9.1.	Immunreaktion und Vakzination.....	18
9.2.	Kolostrale und laktogene Immunität.....	19

9.3.	Infektionskettenunterbrechung .....	19
9.4.	Therapie.....	20
<b>10.</b>	<b>Diagnostik .....</b>	<b>21</b>
10.1.	Direkter Nachweis .....	21
10.2.	Indirekter Nachweis.....	22
<b>11.</b>	<b>Wildschweine .....</b>	<b>24</b>
11.1.	Population.....	24
11.2.	Ernährung.....	25
11.3.	Lebensraum/Ausbreitung .....	25
11.4.	Krankheiten.....	26
<b>III.</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>28</b>
<b>1.</b>	<b>Ziel der Arbeit .....</b>	<b>28</b>
<b>2.</b>	<b>Studienaufbau.....</b>	<b>29</b>
<b>3.</b>	<b>Auswahl der Beprobungsgebiete und des Versuchsbetriebs ....</b>	<b>29</b>
<b>4.</b>	<b>Probenmaterial .....</b>	<b>34</b>
4.1.	Kot .....	34
4.2.	Blut .....	34
4.3.	Gülle.....	34
4.4.	Weitere statistische Erhebungen .....	35
<b>5.</b>	<b>Labordiagnostische Untersuchungen .....</b>	<b>35</b>
5.1.	Direkter Nachweis von PEDV .....	35
5.1.1.	Probenvorbereitung.....	35
5.1.2.	RNA-Extraktion.....	35
5.1.3.	PCR .....	35
5.2.	Indirekter Nachweis von Antikörpern.....	37
<b>6.</b>	<b>Statistische Auswertung .....</b>	<b>38</b>
<b>IV.</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>39</b>
<b>1.</b>	<b>Studienteil 1: Vorkommen von PEDV bei Wildschweinen in Süddeutschland .....</b>	<b>39</b>
1.1.	PCR .....	39
1.2.	ELISA .....	39

<b>2.</b>	<b>Studienteil 2: Übertragung von PEDV über Gülle .....</b>	<b>41</b>
2.1.	Gülleuntersuchung mittels PCR.....	41
2.2.	Treib- und Ansitzjagden .....	41
2.2.1.	PCR .....	41
2.2.2.	ELISA .....	41
<b>3.</b>	<b>Zusammenfassung der Untersuchungsergebnisse aus beiden Studienteilen.....</b>	<b>43</b>
3.1.	PCR .....	43
3.2.	ELISA .....	43
<b>4.</b>	<b>Auswertung des Fragebogens .....</b>	<b>44</b>
4.1.	Geschlecht und Alter .....	44
4.2.	Gewicht.....	46
4.3.	Jagdjahr .....	47
<b>V.</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>49</b>
1.	Nachweis PEDV-spezifischer RNA mittels PCR .....	49
2.	Nachweis PEDV-spezifischer Antikörper mittels ELISA .....	51
3.	Gülleuntersuchung .....	54
4.	Übertragung von PEDV.....	55
4.1.	Hypothese 1 .....	56
4.2.	Hypothese 2.....	59
<b>VI.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>62</b>
<b>VII.</b>	<b>SUMMARY .....</b>	<b>64</b>
<b>VIII.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>66</b>
<b>IX.</b>	<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>89</b>
<b>X.</b>	<b>TABELLENVERZEICHNIS .....</b>	<b>90</b>
<b>XI.</b>	<b>ANHANG.....</b>	<b>91</b>
<b>XII.</b>	<b>DANKSAGUNG.....</b>	<b>92</b>

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

°C	Grad Celsius
aa	Amino acids, Aminosäuren
AASV	American Association of Swine Veterinarians
AG	Antigen
bzw.	Beziehungsweise
cDNA	Complementary DNA, Komplementäre DNA
Ct	Cycle threshold, Zyklus-Schwellenwert
DNA	Desoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure
EFSA	European Food Safety Authority
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay, Antikörperbasiertes Nachweisverfahren
E-Protein	Envelope-Protein
EVD	Epidemic Viral Diarrhea
FFN	Fluorescent focus neutralisation
FMIA	Fluorescent microsphere immunoassay
h	Stunde(n)
HE-Protein	Hämagglutinin-Esterase-Protein
ICTV	International Committee on Taxonomy of Viruses
IF	Immunfluoreszenz
IFA	Indirekter Fluoreszenzantikörpertest
IgA	Immunglobulin A
IgG	Immunglobulin G
ICH	Immunhistochemie
IQR	Interquartilsabstand

ISH	In-situ-Hybridisierung
$\kappa$	Kappa-Koeffizient nach Cohen; Maß für die Übereinstimmung zweier Stichproben
kbP	Kilobasenpaare
km	Kilometer
KSP	Klassische Schweinepest
lat.	Lateinisch
LAZBW	Landwirtschaftliches Zentrum Baden-Württemberg
LT	Lebenstag
M OD <sub>N</sub>	Mittelwert der Negativkontrollen
M OD <sub>P</sub>	Mittelwert der Positivkontrollen
M-Protein	Membran-Protein
N-Protein	Nukleokapsid-Protein
nm	Nanometer
OD	Optical density, Optische Dichte
OD <sub>s</sub>	Optische Dichte der Probe
OMAFRA	Ontario Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs
ORF	Open reading frame, Offenes Leseraster
p	Signifikanzwert
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase chain reaction, Polymerase-Kettenreaktion
PCV2	Porzines Circovirus Typ 2
PDCV	Porzines Deltacoronavirus
PED	Porzine Epizootische Diarrhoe
PEDV	Porzines Epizootisches Diarrhoe Virus

pH	Potentia Hydrogenii, Maß für den sauren oder basischen Charakter einer wässrigen Lösung
PHEV	Porzines Hämagglutinierendes Enzephalomyelitis Virus
p.i.	Post infectionem
PRCV	Porzines Respiratorisches Coronavirus
PRRSV	Porzines Reproduktives und Respiratorisches Syndrom Virus
qRT-PCR	Quantitative / Echtzeit RT-PCR
real-time RT-PCR	Echtzeit RT-PCR
RNA	Ribonucleic acid, Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkriptase
RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR
S/P Ratio	Sample to positive ratio
SHV1	Suides Herpesvirus 1, Aujeszky'sche Krankheit
SIV	Schweineinfluenzavirus
S-INDEL	S-Insertion und Deletion
S-Protein	Spike-Protein
TIERSCHNUTZTV	Tierschutz-Nutztierhaltungsverordnung
TGE	Transmissible Gastroenteritis
TGEV	Transmissibles Gastroenteritis Virus
US	United States, Vereinigte Staaten
USDA	United States Department of Agriculture
USA	United States of America, Vereinigte Staaten von Amerika
UV-Strahlung	Ultraviolettstrahlung
VN	Virusneutralisationstest

## I. EINLEITUNG

Die Porzine Epizootische Diarrhoe (PED) gehört, vor allem in der Ferkelerzeugung, zu den ökonomisch bedeutsamsten viralen Erkrankungen in der Schweineproduktion (RODÁK et al., 2005; LEE, 2015). PED wird verursacht durch das Porzine Epizootische Diarrhoe Virus (PEDV), welches sich bei Infektion naiver Schweine durch ähnliche Symptome wie eine Infektion mit dem Transmissiblen Gastroenteritis Virus (TGEV) auszeichnet (SOZZI et al., 2010). In den 1970er- und 1980er-Jahren kommt es durch PED zu schweren Verlusten in vielen schweineproduzierenden Ländern (SAIF et al., 2012). Im Jahre 2013 tritt PED erstmals in den USA (STEVENSON et al., 2013; CHEN et al., 2014) und 2014 in Deutschland nach Jahren der Abwesenheit wieder auf (HANKE et al., 2015; STADLER et al., 2015).

Aufgrund des hohen Verwandtschaftsgrades zwischen Haus- und Wildschweinen (MEYNHARDT, 1989a) können viele porzine Infektionskrankheiten auch bei Wildschweinen nachgewiesen werden (ALBINA et al., 2000; LADDOMADA, 2000; GORTAZÁR et al., 2006; GROISMAIER, 2011). Deshalb ist anzunehmen, dass Wildschweine auch für das Porzine Epizootische Diarrhoe Virus empfänglich sind (LEE et al., 2016). Bezüglich der Übertragung von Tier zu Tier als auch zwischen unterschiedlichen Hausschweinebeständen wurden in den vergangenen Jahren zahlreiche Untersuchungen durchgeführt (WILLIAMSON et al., 2013; ALONSO et al., 2014; DEE et al., 2014; LOWE et al., 2014; STIEBRITZ, 2017). Diskutable Eintragswege in die Wildschweinpopulationen sowie Übertragungsmöglichkeiten zwischen Hausschweinen und Wildschweinen wurden in Hinblick auf PED bisher wenig beleuchtet. Aufgrund der Ausscheidung über den Kot (KIM et al., 2007) wird mit PED-Viren belastete Gülle auf umliegende Ackerflächen ausgebracht, wo sie bei bestehender Infektiosität potenziell zu einer Infektion der dort lebenden Wildschweine führen kann. In der vorliegenden Studie wurde deshalb der Fokus auf das Vorkommen von PEDV in Wildschweinpopulationen sowie die Übertragungswege zwischen Haus- und Wildschweinen durch Gülle gelegt.

## II. LITERATURÜBERSICHT

### 1. Porzines Coronavirus

#### 1.1. Taxonomie

Porzine Coronaviren gehören der Familie der *Coronaviridae* innerhalb der Ordnung *Nidovirales* an (ICTV, 2016). Es existieren zwei Subfamilien, *Coronavirinae* und *Torovirinae* (ICTV, 2016). Die Subfamilie *Coronavirinae* wird in die Genera *Alpha-*, *Beta-*, *Gamma-* und *Deltacoronavirus* eingeteilt (ICTV, 2016). Sie beherbergen verschiedene Erreger, die für unterschiedliche Säuger und Vögel relevant sind (KÖNIG & THIEL, 2011).

#### 1.2. Morphologie

ALMEIDA et al. (1968) entdecken 1968 eine neue Gruppe RNA-Viren. Im Elektronenmikroskop sind im Profil mehr oder weniger runde Partikel zu erkennen, die von einem Saum umgeben sind, welcher aus kleinen abgerundeten blütenblattähnlichen Projektionen besteht (ALMEIDA et al., 1968). Die Erscheinung ähnelt dem Sonnenkranz (lat. *corona* = Kranz/Krone) (ALMEIDA et al., 1968), was der Virusgruppe 1975 ihren Namen verleiht (ICTV, 1975).

Coronaviren haben eine komplexe pleomorphe Struktur mit 120 - 160 nm Durchmesser, sind behüllt durch eine zelluläre Lipidmembran und stellen die größten bekannten RNA-Viren dar (KÖNIG & THIEL, 2011). Das Genom besteht aus einer nicht segmentierten, einsträngigen RNA positiver Polarität (STADLER et al., 2003; KÖNIG & THIEL, 2011). Es beinhaltet 4 - 14 offene Leseraster (open reading frames, ORFs), die vier bis fünf Strukturproteine, bis zu 16 Nicht-Strukturproteine sowie weitere akzessorische Proteine kodieren (KÖNIG & THIEL, 2011). Alle Coronaviren besitzen ein Spike-Protein (S-Protein), das glykosyliert ist (SAIF et al., 2012), und in Trimeren die 20 nm großen Peplomere auf der Oberfläche des Virus bildet (KÖNIG & THIEL, 2011), welche die blütenblattähnlichen Projektionen und damit die elektronenmikroskopisch sichtbare Corona darstellen (ALMEIDA et al., 1968; STADLER et al., 2003). Im Transmissionselektronenmikroskop können einzelne Coronaviren nicht voneinander unterschieden werden (OKANIWA et

al., 1968).

### 1.3. Porzine Coronaviren im Überblick

Laut SAIF (2012) sind für das Schwein vier Spezies porziner Coronaviren von Bedeutung. Darüber hinaus listet das INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES (ICTV) (2016) einen weiteren Vertreter porziner Coronaviren. Die genannten Viren sind das Transmissible Gastroenteritis Virus (TGEV), das Porzine Epizootische Diarrhoe Virus (PEDV) sowie das Porzine Respiratorische Coronavirus (PRCV) aus dem Genus Alphacoronavirus, das Porzine Hämagglutinierende Enzephalomyelitis Virus (PHEV) aus dem Genus Betacoronavirus sowie das Porzine Deltacoronavirus (PDCV) aus dem Genus Deltacoronavirus (SAIF, 1993; ICTV, 2008; ICTV, 2016).

Eine Infektion mit dem Porzinen Epizootischen Diarrhoe Virus (PEDV) ist klinisch nicht von einer Infektion mit TGEV zu unterscheiden (PRITCHARD et al., 1999). Es zeigt sich bei neugeborenen Saugferkeln innerhalb von zwei bis drei Tagen eine Mortalität von bis zu 90 - 95 % (STEVENSON et al., 2013). Die Erkrankung betrifft aber Schweine jeden Alters (STEVENSON et al., 2013). Sie äußert sich in Form einer gelblich wässrigen, übelriechenden Diarrhoe und Erbrechen (MADSON et al., 2016). Es kommt zu einer schwerwiegenden Atrophie der Villi in allen Abschnitten des Dünndarms, wodurch eine Malabsorptionsdiarrhoe hervorgerufen wird, welche eine Dehydratation der Tiere zu Folge hat (STEVENSON et al., 2013). Das Genom des PED-Virus ist mit einer Genomgröße von 27,6 - 31 Kbp (Kilobasenpaare) das größte Genom unter den Coronaviren (KÖNIG & THIEL, 2011) und beinhaltet sieben offene Leseraster (SONG & PARK, 2012). Das S-Protein besteht aus 1383 Aminosäuren (aa), welche für zwei funktionelle Domänen kodieren (DUARTE & LAUDE, 1994). Die S1-Domäne ist für die Interaktion des Virus mit den Rezeptoren der Zielzelle verantwortlich (BOSCH et al., 2003) und ist zwischen verschiedenen PEDV-Stämmen sehr variabel (SUN et al., 2014a), während die S2-Domäne die Membranfusion zwischen Virus und Epithelzelle ermöglicht (KÖNIG & THIEL, 2011). Die Aminosäuresequenz, die im S2-Protein für das Antigen-Gen kodiert, zeigt in PED-Stämmen aus verschiedenen geographischen Gegenden höchste Homologie, was für einen hohen Konservierungsgrad dieses Gens spricht (CHANG et al., 2002; SUN et al., 2014a). Das N-Protein (Nukleokapsid-Protein) ist strukturgebend für die

helikale Form des Nuklokapsids (SPAAN et al., 1988) und dient aufgrund seiner Immunogenität (SAIF, 1993) häufig der frühzeitigen Diagnose von PED (SONG & PARK, 2012). Es induziert zellvermittelte Immunität (SAIF, 1993). Das Genom kodiert weiterhin für das integrale Membran-Protein (M-Protein), das glykosyliert ist und das Envelope-Protein (E-Protein) (SAIF et al., 2012), welches zusammen mit dem M-Protein einen Teil der Virushülle darstellt (KÖNIG & THIEL, 2011). Nach natürlichen Infektionen können im Serum der Tiere S-, N- und M-Protein-spezifische Serumantikörper nachgewiesen werden (KÖNIG & THIEL, 2011). Eine in-vitro Vermehrung des Virus gelingt bisher nur auf Vero-Zell-Kulturen mit Trypsin-Zusatz (HOFMANN & WYLER, 1988).

## **2. Vorkommen von PEDV**

### **2.1. Europa bis 2013**

In den frühen 1970er-Jahren verbreitet sich PED ausgehend von England (1971) (SAIF et al., 2012) über Belgien (1972) in andere europäische Länder (PENSAERT & MARTELLI, 2016). Symptomatisch stellen sich alle Ausbrüche sehr ähnlich dar (PENSAERT & MARTELLI, 2016). Es zeigt sich eine geringe Mortalität, die hauptsächlich Aufzuchtferkel und Mastschweine betrifft, Saugferkel sind hingegen nicht betroffen (PENSAERT & MARTELLI, 2016). Erkrankte Muttersauen weisen gelegentlich Agalaktie auf, was zum Tod der Ferkel durch Verhungern führt (PENSAERT & MARTELLI, 2016). Im Jahre 1977 kommt es zeitgleich zu Ausbrüchen in vier belgischen Schweinezuchtbetrieben, bei denen sich der klinische Verlauf von dem früherer PED-Fälle unterscheidet (PENSAERT & DE BOUCK, 1978). Bei Saugferkeln bis zum siebten Lebenstag zeigt sich hier eine Mortalität von bis zu 50 %, wobei diese mit zunehmendem Alter der Tiere sinkt (PENSAERT & DE BOUCK, 1978). Bei Sauen ist die Morbidität variabel und kann bis zu 100 % betragen (PENSAERT & DE BOUCK, 1978; HESS et al., 1980). Sie haben drei bis vier Tage wässrige Diarrhoe und genesen anschließend (PENSAERT & DE BOUCK, 1978). Auch in Deutschland tritt PED 1979 und 1980 wieder auf (HESS et al., 1980). In den 1980er- und 1990er- Jahren werden PED-Ausbrüche in Europa allerdings seltener, wobei PEDV-assoziierte Erkrankungen in unregelmäßigen Abständen immer wieder auftreten

(MARTELLI et al., 2008). Untersuchungen zum Vorkommen von PEDV bei Hausschweinen zeigen, dass die Seroprävalenz niedrig ist (MARTELLI et al., 2008). Auch in anderen europäischen Ländern wie den Niederlanden (PIJPERS et al., 1993), Italien (MARTELLI et al., 2008; ALBORALI et al., 2014), Ungarn (NAGY et al., 1996) und Tschechien (SMID et al., 1993; RODÁK et al., 2005) wird von sporadischen Ausbrüchen berichtet.

## **2.2. Asien**

In Asien tritt PED 1982 erstmals in Japan auf (TAKAHASHI et al., 1983). Die Ausbrüche zeichnen sich durch eine Mortalitätsrate von 20 % bei Saugferkeln sowie Diarrhoe und Vomitus bei Tieren aller Altersklassen aus (TAKAHASHI et al., 1983). Die Genesung von Tieren ab dem Absetzalter tritt innerhalb von zwei bis fünf Tagen ein (TAKAHASHI et al., 1983). Auch in den 1990ern bleibt PED in Asien präsent (SAIF et al., 2012). In den Jahren 2007 und 2008 wird von PED in Thailand berichtet (PURANAVEJA et al., 2009). Im Unterschied zu den Ausbrüchen in Thailand, wo Tiere jeden Alters Diarrhoe und Anorexie zeigen (PURANAVEJA et al., 2009), sind bei Ausbrüchen in China (2010) nur wenige adulte Tiere betroffen (SUN et al., 2012). Die Mortalität der Saugferkel liegt bei bis 80 - 100 % (PURANAVEJA et al., 2009; SUN et al., 2012). Derzeit wird vom Auftreten von PED in China (WANG et al., 2013a), Südkorea (LEE & LEE, 2014; CHUNG et al., 2015) und Taiwan (LIN et al., 2014) berichtet. Auffällig ist, dass seit 2010 die Inzidenz akuter PED-Ausbrüche in China auch in Impfbetrieben massiv zunimmt (WANG et al., 2013b). Es zeigt sich, dass sich nach 2010 aufgetretene PEDV-Stämme deutlich von zuvor in China existierenden Stämmen unterscheiden (WANG et al., 2013b).

### **2.3. Nordamerika**

Im April und Mai 2013 tritt PED erstmals in den USA in vier voneinander unabhängigen Ferkelerzeugerbetrieben nahezu zeitgleich auf (STEVENSON et al., 2013). Innerhalb von ein bis zwei Tagen kommt es zu einer explosionsartigen Verbreitung im gesamten Bestand, wobei die Klinik bei unterschiedlichen Altersgruppen beginnt (STEVENSON et al., 2013). Es folgen zahlreiche weitere Fälle in insgesamt 31 US-amerikanischen Staaten (CIMA, 2013). Das National Animal Health Laboratory Network (USDA, 2014) sowie SONG et al. (2015) berichten von einer massiv zunehmenden Anzahl an positiven PEDV-Nachweisen ab April 2013. Es kommt zu schwerwiegenden ökonomischen Verlusten (CHEN et al., 2014). Auch in Kanada ist PED nachweisbar (OMAFRA, 2014). Die PROVINCE OF MANITOBA (2017) bestätigt 2014 vier, 2015 einen und 2016 fünf Fälle von PED. Im Jahre 2017 werden plötzlich zahlreiche Ausbrüche erfasst (TER BEEK, 2017). Von Mai bis November 2017 können 80 Verdachtsfälle in Manitoba bestätigt werden (PROVINCE OF MANITOBA, 2017; TER BEEK, 2017).

### **2.4. Europa ab 2014**

Seit 2014 tritt PED in Europa wieder auf (STADLER et al., 2015). Ein erster Nachweis kann in einem deutschen Mastbestand geliefert werden, wo das Virus mittels RT-PCR (Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion) detektiert wird (HENNINGER & SCHWARZ, 2014). Außerdem werden weitere Ausbrüche in Deutschland bekannt (HANKE et al., 2015; STADLER et al., 2015; STIEBRITZ, 2017). In den betroffenen Mast- und Zuchtbeständen (HANKE et al., 2015; STADLER et al., 2015) werden wässrige, gelb-gräuliche Diarrhoe mit unverdaulichem Futter und gelegentlichem Erbrechen, sowie Anorexie und Lethargie bei Tieren aller Altersgruppen beschrieben. Die Erkrankung breitet sich innerhalb weniger Tage im gesamten Bestand aus und hält mindestens eine Woche an (HANKE et al., 2015). Die Morbidität schwankt bei Saug- und Aufzuchtferkeln sowie Mastschweinen zwischen 0 % und 100 %, liegt im Mittel bei entsprechend 80,5 %, 62,3 % und 77,4 % (STIEBRITZ, 2017). Sauen zeigen eine mittlere Morbidität von 61,9 %, wobei diese zwischen 8,0 % und 100 % variiert (STIEBRITZ, 2017). Die Mortalität liegt bei Masttieren zwischen 1,4 % und 4,5 % und zwischen 5,5 % und 67,7 % bei Ferkeln (STADLER et al., 2015). Dies weist auf eine große Variabilität der klinischen

Ausprägung hin (STADLER et al., 2015). Auch aus anderen europäischen Ländern wie Belgien (THEUNS et al., 2015) Frankreich (GRASLAND et al., 2015), Portugal (MESQUITA et al., 2015), Österreich (STEINRIGL et al., 2015), Italien (ALBORALI et al., 2014), Rumänien (HANKE et al., 2017) und aus der Ukraine (DASTJERDI et al., 2015) wird vermehrt von bestätigten Verdachtsfällen berichtet.

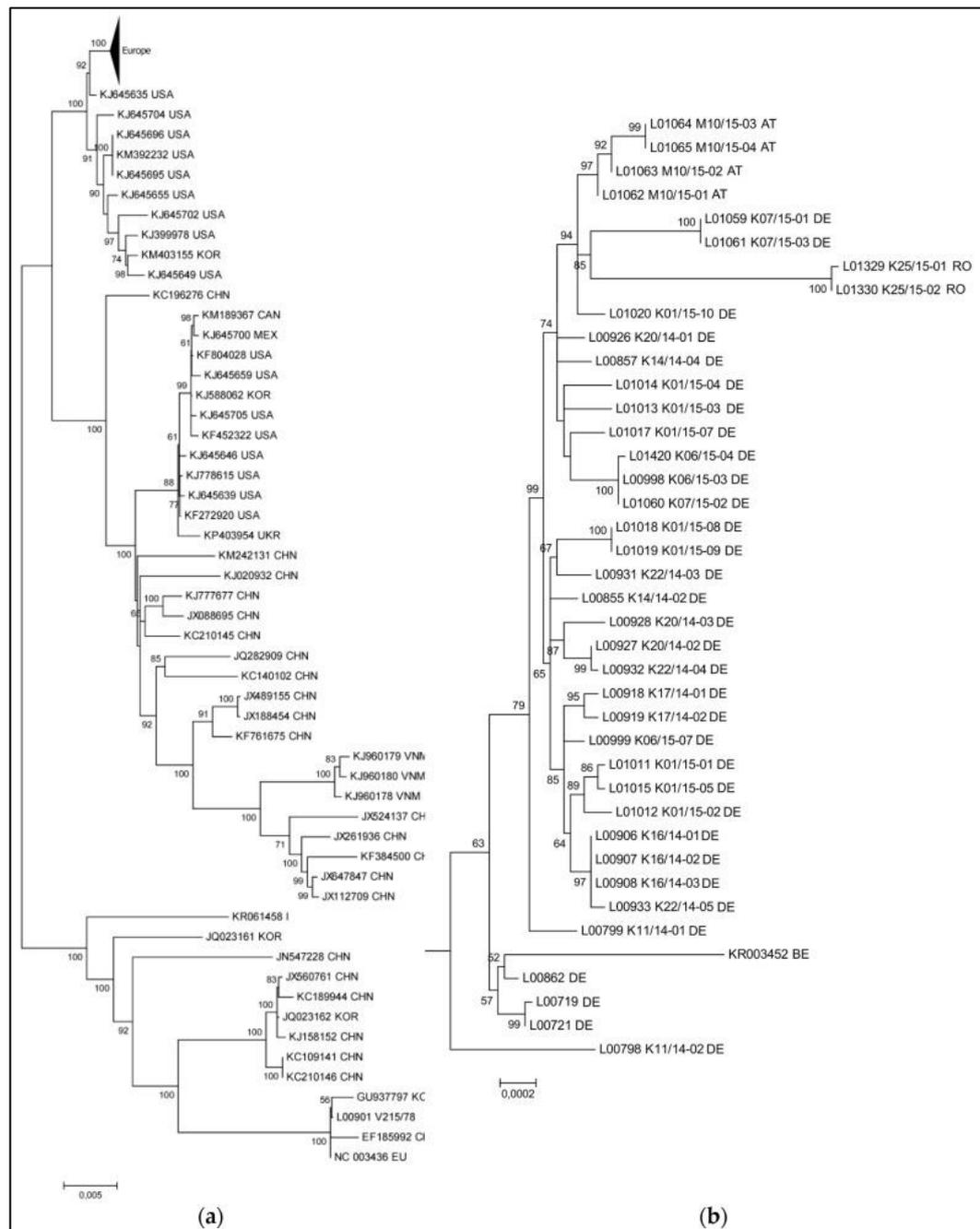
### 3. Genotypen

CHEN et al. (2014) finden heraus, dass sich sowohl das komplette Spike-Gen als auch die S1-Untereinheit des Spikeproteins sehr gut dazu eignet, die phylogenetische Verwandtschaft einzelner PEDV-Stämme zu bestimmen. Hierbei stellt sich heraus, dass die in den USA kursierenden PEDV-Stämme eine Nukleotid-Übereinstimmung von 99,7 % und mehr aufweisen (CHEN et al., 2014). Auch die Sequenzierung des Vollängengenoms ermöglicht eine Einordnung in einen Stammbaum, wobei sich zwei Genogruppen (G1 und G2) mit jeweils drei (G1a - G1c) bzw. zwei (G2a, G2b) Clustern ergeben (HUANG et al., 2013). Bei genauerer Analyse ergeben sich zwei neue Cluster innerhalb der Genogruppe G2a – die beiden US-Prototypen (VLASOVA et al., 2014).

Seit 2010 kursieren in China G1b-Varianten und G2-Stämme, die sich genetisch vom Prototyp CV777 (AF353511 bzw. NC003436) (G1a) und auch von den vor 2010 kursierenden Stämmen (G2a und G2b) unterscheiden (WANG et al., 2013b). Einer der neuen chinesischen G2a-Stämme (AH2012; KC210145) ist genetisch eng verwandt mit den US-Prototypen (G2a) (HUANG et al., 2013; STEVENSON et al., 2013; CHEN et al., 2014; SUN et al., 2014a; VLASOVA et al., 2014). PED-Viren, die dem Cluster G2a angehören, sind in den USA für schwerwiegende klinische Symptomatik und hohe Tierverluste verantwortlich (STEVENSON et al., 2013). Die Sequenzhomologie des Stammes AH2012 aus China mit den US-Prototypen sowie die ähnliche klinische Erscheinung gilt als Indiz, dass AH2012 ein möglicher Ursprung der Ausbrüche in den USA sein könnte (HUANG et al., 2013). In Korea wird 2015 ein Stamm detektiert, der ebenfalls eine hohe Sequenzhomologie von 99 - 100 % zu den US-Prototypen aus 2013 aufweist, was auch auf einen möglichen Eintrag aus Korea in die USA hinweisen könnte (KIM et al., 2015).

Im Januar 2014 erscheint in den USA eine neue PED-Variante (OH851;

KJ399978), die mit deutlich milderer Klinik assoziiert ist (WANG et al., 2014a). In der Sequenzierung zeigen sich im Bereich der S1-Untereinheit des Spike-Proteins zahlreiche Insertionen und Deletionen, weshalb der Stamm S-INDEL genannt wird (VLASOVA et al., 2014). Der neue S-INDEL-Stamm OH851 zeigt eine Sequenzhomologie von 96,4 - 98,4 % im Gesamtgenom mit den US-Prototypen (WANG et al., 2016b) und wird von WANG et al. (2016a) auch in China nachgewiesen. In Europa sind, mit Ausnahme der Ukraine (DASTJERDI et al., 2015), bisher nur S-INDEL-Stämme bekannt (PENSAERT & MARTELLI, 2016). Die 2014/2015 in Deutschland, Österreich und Rumänien nachgewiesenen Stämme zeigen untereinander eine Sequenzhomologie von >99,8 %, zählen zu den S-INDEL-Stämmen und sind mit dem US-Prototypen USA/Indiana12.83/2013 (KJ645635) am engsten verwandt, was auf einen gleichzeitigen Eintrag nach Zentraleuropa hindeuten kann (HANKE et al., 2017). Bei genauerer Betrachtung lassen sich die von HANKE et al. (2017) detektierten S-INDEL-Stämme in drei Cluster einteilen, wobei keine Korrelationen zwischen den Clustern und geographischen Regionen, dem jeweiligen Produktionssystem oder der Symptomatik und dem Schweregrad der Erkrankung bestehen. Daneben existieren Berichte über einen PEDV-Stamm aus der Ukraine der mit den pathogeneren Stämmen der Genogruppe G2a aus den USA verwandt ist (DASTJERDI et al., 2015).



**Abbildung 1: Phylogram generated from 91 PEDV sequences using the Maximum Likelihood algorithm in Mega 6.06 (TAMURA et al., 2013). With General Time Reversible model with Gamma distribution. The phylogram was tested by 1000 bootstrap replicates, branch lengths are measured in the number of substitutions per site (see scale bars). (a) European samples in the worldwide context. (b) Clustering of European samples. Enlargement of the European cluster (triangle in figure part (a)) (HANKE et al., 2017)**

## **4. Tenazität**

### **4.1. Allgemein**

Das PED-Virus ist stabil bei 4 °C und einem pH von 5,0 - 9,0 sowie bei 37 °C und einem pH von 6,5 - 7,5 (POSPISCHIL et al., 2002). Je höher die Temperatur, desto geringer wird der pH-Toleranzbereich (POSPISCHIL et al., 2002). Unabhängig von der Temperatur verlieren PED-Viren bei pH-Werten <5 und >9 ihre Infektiosität (HOFMANN & WYLER, 1989). Bei Behandlung mit lipophilen Lösungsmitteln (HOFMANN & WYLER, 1989) oder Erhitzung über 60 °C für 30 Minuten verliert das PED-Virus seine Infektiosität, bei 50 °C ist es hingegen noch relativ stabil (POSPISCHIL et al., 2002). Mehrfaches Einfrieren und Auftauen beeinträchtigt die Infektiosität des Virus nicht (HOFMANN & WYLER, 1989). MORRISON und GOEDE (2014) zeigen, dass eine relative Luftfeuchtigkeit zwischen 30 % und 70 % keinen Einfluss auf die Überlebensrate des Virus nimmt.

### **4.2. Gülle**

In einem Infektionsversuch der University of Minnesota mit zehn Tage alten Ferkeln wird die Überlebensdauer infektiösen Virus unter verschiedenen Bedingungen getestet (GOYAL, 2014). Die Überlebensdauer infektiösen Virus beträgt in frischem Kot bei 40 - 60 °C und 30 - 70 % relativer Luftfeuchtigkeit bis zu sieben Tage, in frischer Gülle bei -20 °C und 4 °C mindestens 28 Tage und bei 20 °C 14 Tage (GOYAL, 2014). In Trinkwasser bei 25 °C bleibt PEDV sieben Tage infektiös, bei 25 °C kann eine Infektiosität in kontaminiertem Trockenfutter für mindestens sieben Tage aber weniger als 14 Tage, in kontaminiertem Nassfutter hingegen für mindestens 28 Tage nachgewiesen werden (GOYAL, 2014). MORRISON und GOEDE (2014) berichten, dass der Nachweis infektiöser Viren nach 28 Tagen in Gülle bei -20 °C, nach 14 bis 28 Tagen in Gülle bei Raumtemperatur und auch nach 28 Tagen in Gülle bei 40 °C und drei verschiedenen Luftfeuchtigkeitslevels gelingt. Die University of Manitoba untersucht in den Jahren 2013 und 2014 über einen Zeitraum von über neun Monaten (September 2013 bis Juli 2014) die Güllelagunen zweier Schweinebetriebe nach einem akuten PEDV-Ausbruch (AASV, 2016). Zu Beginn der Beprobungen ist in 99,5 % der Proben infektiöses Virus nachweisbar (FEEDSTUFFS, 2015). Gegen Ende der Studie zeigt sich, dass

nach neun Monaten immer noch 87,5 % der Proben PEDV-positiv getestet werden (FEEDSTUFFS, 2015), wobei in den mittleren und tiefen Schichten der Lagunen gehäuft infektiöses Virus auffindbar ist (zwischen 12 % und 30 %) (AASV, 2016). Die Proben aus den oberflächlichen Schichten enthalten nach neun Monaten kein infektiöses Virus mehr, im Durchschnitt aller untersuchten Proben aus verschiedenen Schichten sind allerdings bis zu 28 % der Proben infektiös (AASV, 2016). Es wird vermutet, dass die erhöhte Außentemperatur sowie UV-Strahlung gegen Ende der Beprobung im Sommer die Infektiosität der Viren in den oberflächlichen Schichten der Lagunen mindern (AASV, 2016).

## 5. Pathogenese

Nach einer aerogenen oder orofäkalen Übertragung (DE BOUCK et al., 1981; WILLIAMSON et al., 2013) und der Passage des Magens (WENDT et al., 2013) gelangt das Virus in den Dünndarm und es kommt zu einer lokalen Infektion (DE BOUCK et al., 1981) des Epithels der Villi und teilweise auch der Krypten (SUEYOSHI et al., 1995). Es folgt eine Schädigung oder gar Zerstörung von Zellen und dadurch eine Atrophie der Villi und die Abschilferung des Epithels ins Lumen (DE BOUCK et al., 1981). Konsequenz daraus ist eine malabsorptive Diarrhoe (CRUZ et al., 2008) aufgrund des Verlustes absorptiver Zellen und dadurch eine hochgradige Dehydratation der Saugferkel (DE BOUCK et al., 1981). Weiterhin ist der Eintritt der Diarrhoe klinisch zu beobachten, bevor eine Atrophie der Villi histologisch nachweisbar ist, was auf eine mögliche Fehlfunktion der infizierten Zellen zurückzuführen ist (DE BOUCK et al., 1981).

## 6. Klinik

### 6.1. Inkubationszeit

In experimentellen Untersuchungen berichten PENSAERT und DE BOUCK (1978) sowie DE BOUCK et al. (1981) von beginnender Klinik 22 bis 36 Stunden *post infectionem* (p.i.). Auch in Versuchen von MADSON et al. (2014) treten an Tag 2 p.i. beginnende Lethargie, Anorexie, Erbrechen und Diarrhoe auf, welche bis Tag 6 p.i. weiter zunimmt. JUNG et al. (2014) sprechen von einer Inkubationszeit von bis zu 48 Stunden, während WANG et al. (2013a) von längeren Inkubationszeiten von drei bis sechs Tagen berichten.

Auch in den USA kommt es zu variablen Inkubationszeiten von ein bis sieben Tagen bei Feldausbrüchen (STEVENSON et al., 2013). Weiterhin ist bereits 24 h p.i. Virus-Antigen im Kot nachweisbar (MADSON et al., 2014).

## **6.2. Saugferkel (Ferkel bis zum Absetzen)**

Saugferkel zeigen innerhalb der ersten 24 Stunden p.i. wässrige, gelbe, übelriechende Diarrhoe, die ausgeflockte, unverdaute Milch enthalten kann (STEVENSON et al., 2013). Bei der Auskultation des Abdomens ist der Darm tympanisch (HESS et al., 1980). Viele Saugferkel leiden außerdem unter Erbrechen (MADSON et al., 2014), Schwäche und weisen kotverschmierte Haut und eine gerötete Anal- und Perianalregion auf (HESS et al., 1980). Bei Saugferkeln kann die Mortalität bei 30 - 100 % liegen (SONG & PARK, 2012). Ursächlich hierfür ist die Dehydratation, die sich in Form von eingesunkenen Augen, fehlender Elastizität der Haut und klebrigem Unterhautgewebe äußert (STEVENSON et al., 2013). Es zeigt sich eine negative Korrelation zwischen dem Alter der Ferkel und der Mortalität (PENSAERT & DE BOUCK, 1978). Der in Europa kursierende Stamm ruft bei Saugferkeln deutlich mildere Symptome hervor als in den USA oder Asien: In Europa wird ebenfalls von einer Morbidität von bis zu 95 % (STADLER et al., 2015) bzw. bis zu 100 % (STEINRIGL et al., 2015) berichtet. Die Mortalität ist in der Regel niedriger als in den USA und liegt bei 0 % (MADSON et al., 2014; STEINRIGL et al., 2015) bis 35 % (GOEDE et al., 2015; GRASLAND et al., 2015; STADLER et al., 2015; BERTASIO et al., 2016; STIEBRITZ, 2017), kann allerdings auch Werte von 67,6 % (STADLER et al., 2015) bzw. 95 % erreichen (STIEBRITZ, 2017). In den meisten Fällen kommt es nach drei bis vier Tagen hochgradiger Diarrhoe (PENSAERT & DE BOUCK, 1978) zu einer Genesung bis Tag 10 p.i. (POSPISCHIL et al., 2002). Die Ausscheidung von Virus über den Kot beginnt bereits 24 h p.i, wobei sie an Tag 3 p.i. am höchsten ist (MADSON et al., 2014). Dies führt zu einer Verbreitung in allen Bereichen des Stalles innerhalb von einem bis drei Tagen, da die Klinik erst an Tag 6 p.i. bei der Mehrheit der Tiere deutlich sichtbar ist und somit vorher oft unentdeckt bleibt (HESS et al., 1980). Die Rekonvaleszenz tritt meist bis Tag 24 p.i. ein (MADSON et al., 2014). Nach der Rekonvaleszenz kümmern betroffene Tiere häufig und bleiben in ihrer Leistung über die komplette Mastperiode zurück (HESS et al., 1980; MADSON et al., 2014).

### **6.3. Aufzuchtferkel und Mastschweine**

Die Morbidität bei Aufzuchtferkeln und Mastschweinen variiert zwischen 0 % und 100 % (STIEBRITZ, 2017). Die Mortalität beträgt bei Aufzuchtferkeln 2 - 8,8 % und bei Mastschweinen bis zu 5,5 % (MARTELLI et al., 2008; HENNINGER & SCHWARZ, 2014; GRASLAND et al., 2015; STADLER et al., 2015). Wenige Tage nach Erregereintrag treten erste klinische Symptome auf und innerhalb von ein bis zwei Tagen findet eine komplette Durchseuchung des Stalls statt (HENNINGER & SCHWARZ, 2014). Die Schweine zeigen wässrige Diarrhoe und Vomitus (STADLER et al., 2015), ein deutlich gestörtes Allgemeinbefinden, temporäre Anorexie und eingefallene Flanken, außerdem einen aufgekrümmten Rücken und Tenesmus (HENNINGER & SCHWARZ, 2014). Die Erkrankungsdauer liegt bei Aufzuchtferkeln bei bis zu 21 Tagen (MARTELLI et al., 2008), in der Mast zwischen einer Woche und vierzehn Tagen (HENNINGER & SCHWARZ, 2014), danach kommt es zu spontaner Genesung (MARTELLI et al., 2008). Aufgrund wiederkehrender Neueinstellungen naiver Tiere in die Vormast kann hier häufig rezidivierende Diarrhoe auftreten (MARTELLI et al., 2008).

### **6.4. Sauen und Eber**

Bei Jungsauen zeigt sich PED mit deutlicherer Symptomatik als bei pluriparen Sauen (STEVENSON et al., 2013). Bei den Ausbrüchen in den USA 2013 sowie bei Epidemien früherer Jahre sind bis zu 90 % der Jungsauen in allen Produktionsphasen betroffen (MARTELLI et al., 2008; STEVENSON et al., 2013). Sie zeigen wässrige, gelbe, übelriechende Diarrhoe und Anorexie über fünf bis sieben Tage (MARTELLI et al., 2008), sowie zum Teil Erbrechen (STEVENSON et al., 2013). Bei den pluriparen Sauen liegt die Morbidität bei 15 % (STEVENSON et al., 2013). Tragende Sauen zeigen eine um 50 % reduzierte Futteraufnahme (MARTELLI et al., 2008). Weiterhin kommt es bei vielen Tieren zu Milchrückgang in der Säugezeit (SUEYOSHI et al., 1995). Auch Eber sind von wässriger Diarrhoe betroffen (STADLER et al., 2015).

## **7. Übertragung**

### **7.1. Ausscheidung und Inkorporation**

PEDV wird über alle Se- und Exkrete ausgeschieden (BJUSTROM-KRAFT et al., 2016). Die Übertragung erfolgt hauptsächlich fäkal-oral (WILLIAMSON et

al., 2013). Bei ausgeprägter Klinik sind Virusmengen von  $10^2$  -  $10^5$  Genomkopien pro Gramm Kot zu finden (KIM et al., 2007). Die Ausscheidung beginnt an Tag 1 - 3 p.i., dauert für gewöhnlich 4 - 14 Tage an und hat ihren Höhepunkt an Tag 1 - 5 p.i. (CARVAJAL et al., 1995; DE ARRIBA et al., 2002a; KIM et al., 2007; HESSE et al., 2014; MADSON et al., 2014; CRAWFORD et al., 2015; THOMAS et al., 2015a; POONSUK et al., 2016). Es wird weiterhin von Virusausscheidung bis Tag 21 p.i. (NIEDERWERDER et al., 2016), Tag 28 p.i. (THOMAS et al., 2015a) und in China sogar bis Tag 56 p.i. berichtet (SUN et al., 2014b). Auch in Europa kommt es bei Feldvirusinfektionen gelegentlich zu Virusnachweisen 15 Wochen, 69 Tage bzw. drei Monate nach dem Ausbruch und trotz Abklingen der Diarrhoe (STADLER et al., 2015; STEINRIGL et al., 2015; BJUSTOM-KRAFT et al., 2016). Darüber hinaus werden Reinfektionen beobachtet (MADSON et al., 2014; BERTASIO et al., 2016). Die infektiöse Dosis ist bei neugeborenen Tieren signifikant niedriger als bei Absetzferkeln (THOMAS et al., 2015a). Auch in Sperma (SUN et al., 2014b), Sauenmilch (LI et al., 2012; SUN et al., 2012) und Speichel lässt sich RNA nachweisen (BJUSTOM-KRAFT et al., 2016).

## **7.2. Vektoren**

Die Übertragung findet meist über Kontakt mit bereits infizierten Tieren statt (WILLIAMSON et al., 2013). Eine besonders große Gefahr hierfür besteht in Mastbetrieben, die infizierte Tiere im Inkubationszeitraum zukaufen (HANKE et al., 2015; STIEBRITZ, 2017). Der Kontakt mit Faeces dieser Tiere kann zu einer Übertragung führen (WILLIAMSON et al., 2013). Die Viren verbreiten sich daraufhin schnell im Stall (HESS et al., 1980; HENNINGER & SCHWARZ, 2014). Auch subklinisch infizierte Tiere wie beispielsweise zugekaufte Jungsauen können als Vektoren fungieren, weshalb Quarantänemaßnahmen unverzichtbar sind (PURANAVEJA et al., 2009; DEE et al., 2014). Sperma und Speichel (SUN et al., 2014b) können als horizontaler Vektor, Sauenmilch außerdem auch als vertikaler Vektor fungieren (SUN et al., 2012).

Als weitere Vektoren kommen Transportfahrzeuge (LOWE et al., 2014), deren Fahrer (HESS et al., 1980), Stallkleidung sowie andere durch Faeces verunreinigte Gegenstände infrage (EFSA, 2014). Auch Hunde, Katzen und Vögel (STIEBRITZ, 2017) sowie andere Tiere wie Schadnager können mechanische Vektoren für Magen-Darm-Erkrankungen darstellen

(SCHWEINEGESUNDHEITSDIENSTE, 2014). Die Ente gilt, im Unterschied zu anderen Vögeln, auch als biologischer Vektor für PEDV (KHATRI, 2015).

Der Stellenwert von Futtermitteln als Überträger von PEDV ist bisher nicht eindeutig geklärt: Fertigfuttermittel können als Vektor fungieren, wenn es nach der Herstellung zu einer Kontamination gekommen ist (DEE et al., 2014). BOWMAN et al. (2015a) weisen PEDV in verschlossenen Futtersäcken nach, wobei es sich nicht um infektiöses Virus handelt. Auch sprühgetrocknetes Plasma (OPRIESSNIG et al., 2014; PASICK et al., 2014) als Vektor wird kontrovers diskutiert, wobei PUJOLS und SEGALÉS (2014) sowie GERBER et al. (2014b) die Sprühtrocknung aufgrund der Hitzeeinwirkung als effiziente Methode zur Zerstörung des Virus bewerten. Aufgrund derselben Kontaminationsmechanismen wie bei Viehtransportern können Futtermitteltransporter einen Vektor für PED-Viren darstellen (SASAKI et al., 2016).

Der Nachweis von PEDV in Stallluft (SUN et al., 2014b) stellt auch diese als potenziellen Vektoren zur Diskussion. HESSE et al. (2014) sowie ALONSO et al. (2014) untersuchen die Möglichkeit, dass PED durch Aerosolbildung auf andere Tiere übertragen werden könnte. Während HESSE et al. (2014) keine Übertragung über die Luft nachweisen können, gelingt es ALONSO et al. (2014), naive Tiere über die Stallluft zu infizieren. Gleichzeitig werden auch Abluftproben von PED-positiven Beständen untersucht, in denen zwar bis zu zehn Meilen vom Betrieb entfernt RNA-Partikel detektiert werden können, jedoch ist in keiner der Proben infektiöses Virus nachweisbar (ALONSO et al., 2014). Auch BJUSTOM-KRAFT et al. (2016) können kein PEDV in der Luft nachweisen und bezeichnen die Umwelt nicht grundsätzlich als Reservoir.

Weder die Eintragsquelle von PED in die USA 2013 noch nach Deutschland und Zentraleuropa 2014 ist bisher genau bekannt (WILLIAMSON et al., 2013; HANKE et al., 2017).

## **8. Pathologie**

### **8.1. Makroskopische Veränderungen**

Die pathologisch-anatomische Untersuchung an PED erkrankter Tiere zeigt, dass es sich um eine lokale Infektion des Verdauungstraktes handelt, die sich

nur auf diesen Bereich begrenzt (DE BOUCK et al., 1981). Der Magen erkrankter Tiere kann sich entweder leer, was durch den Vomitus zu erklären ist (STEVENSON et al., 2013), oder stark ausgedehnt mit dünner Magenwand darstellen (SUEYOSHI et al., 1995). Dies ist möglicherweise auf eine verringerte Peristaltik im Krankheitsverlauf zurückzuführen (JUNG et al., 2014). Dünn- und Dickdarm sind meist von flüssigem, gelbem und schaumigem Inhalt sowie Flocken unverdauter Milch ausgedehnt und die Dünndarmwand ist dünn und transparent (SUEYOSHI et al., 1995; STEVENSON et al., 2013). Gelegentlich sind die Därme in der pathologisch-anatomischen Untersuchung auch komplett leer (STADLER et al., 2015). In einigen Fällen sind die Mesenteriallymphknoten vergrößert (SUEYOSHI et al., 1995).

## 8.2. Histopathologische Veränderungen

In der histopathologischen Untersuchung zeigt sich vor allem im Jejunum und Ileum, gelegentlich auch im Duodenum (SUEYOSHI et al., 1995) das Bild einer atrophischen Enteritis mit Verkürzung, Abrasion und Fusion der Darmzotten (STEVENSON et al., 2013). Gelegentlich sind auch Vakuolisierungen in Form einer variablen Schwellung der Zellen mit granulärem eosinophilem Zytoplasma und proteinhaltigen Vakuolen (STEVENSON et al., 2013) sowie Abschilferungen der Enterozyten nachweisbar (STADLER et al., 2015). Viele Enterozyten haben eine kubische oder abgeflachte Form (SUEYOSHI et al., 1995). Die auffälligsten Läsionen finden sich an den lateralen Flächen und den Spitzen der Villi (STEVENSON et al., 2013). Zäkum und Kolon zeigen nur einzelne Vakuolisierungen oberflächlicher Epithelzellen (SUEYOSHI et al., 1995). An der *Lamina propria mucosae* in Dünn- und Dickdarm kommt es gelegentlich zu Ödematisierung und geringgradiger Infiltration mit Histozyten, Granulozyten und Plasmazellen (HESS et al., 1980; SUEYOSHI et al., 1995). Die Zottenlänge im Dünndarm ist im Vergleich zu gesunden Tieren halbiert bis geviertelt (JUNG et al., 2014), was in einem Zotten-Krypten-Verhältnis von 1,0 - 3,0 im Vergleich zu 6,3 - 8,0 bei gesunden Tieren resultiert (DE BOUCK et al., 1981; SUEYOSHI et al., 1995; JUNG et al., 2014). Mittels Elektronenmikroskopie (SUEYOSHI et al., 1995) und In-situ-Hybridisierung können Viruspartikel im Lumen der Enterozyten, zwischen den Mikrovilli sowie gelegentlich auch in den Krypten des Dünndarms nachgewiesen werden

(STADLER et al., 2015), wobei die regenerative Kapazität des Kryptenepithels erhalten bleibt (DE BOUCK et al., 1981). HESS et al. (1980) nutzen Immunfluoreszenz um Virusantigen (AG) in den Epithelien apikal und lateral der Villi sichtbar zu machen. Auch im Kryptenepithel des Dünndarms, im Bereich der *Lamina propria mucosae* und der Peyer-Platten gelingt der Nachweis (SUEYOSHI et al., 1995). In Kolon und Rektum sind keine Viruspartikel nachweisbar (DE BOUCK et al., 1981). Wenn untersuchte Tiere schon seit mindestens sechs Stunden akute Diarrhoe aufweisen, ist auch in den Mesenteriallymphknoten ein Virus-Nachweis möglich, in Pylorus, Tonsillen, Lunge, Milz, Leber oder Nieren gelingt dies nicht (DE BOUCK et al., 1981).

## 9. Bekämpfung

### 9.1. Immunreaktion und Vakzination

Eine Regeneration an PED erkrankter Schweine kann bei unkomplizierten Verläufen innerhalb von sieben bis zehn Tagen eintreten (MADSON et al., 2014). Sowohl modifizierte Lebendvakzinen, die oral oder intranasal eingesetzt werden, als auch eine Feldvirusinfektion induzieren bei betroffenen Tieren neben der Bildung von Serumantikörpern eine aktive Schleimhautimmunität mittels IgA (SAIF, 1993; SONG et al., 2007; GOEDE et al., 2015).

Die orale Impfung tragender Sauen mit einem attenuierten Virus zwei und vier Wochen vor dem Geburtstermin führt zu einem signifikanten Rückgang der Mortalität der Saugferkel im Vergleich zur parenteralen Impfung und zu Kontrolltieren ohne Impfung (SONG et al., 2007). Die orale Impfung führt zu signifikant höherer IgA-Bildung und damit besserer passiver Immunität für die Saugferkel als eine parenterale Impfung (SONG et al., 2007). Mutterschutzvakzinen dienen außerdem der Reduktion der Klinik und der Virusausscheidung bei erkrankten Ferkeln (DE ARRIBA et al., 2002b; POONSUK et al., 2016). Einen noch höheren Schutz vor Infektion bietet eine Vakzination mit einer kleinen Dosis virulenten Virus (DE ARRIBA et al., 2002b). Die Konzentration von IgA im Serum der Muttertiere korreliert mit der Immunität gegen eine Infektion bei den Ferkeln, die Konzentration von IgG allerdings nicht (HA et al., 2010). In China wird seit 1997 bis heute eine Lebendvakzine basierend auf dem Prototypen CV777 routinemäßig eingesetzt (WANG et al., 2013b). In Europa war der ökonomische Schaden bisher nicht groß genug, um einen eigenen Impfstoff zu entwickeln oder eine Zulassung für Europa zu erwirken (SAIF et al., 2012). Die Verabreichung einer Kontaktsuppe, sprich das Feedback-Verfahren, ist in Deutschland verboten (TIERNEBG, 2004). Außerhalb Deutschlands wird diese Methode genutzt, um die Mortalität und Morbidität bei Saugferkeln durch eine kolostrale und laktogene Immunität der Mütter zu verringern (PURANAVEJA et al., 2009; SONG et al., 2015; CLEMENT et al., 2016).

## 9.2. Kolostrale und laktogene Immunität

Die Vakzination oder Infektion tragender Sauen führt zu kolostraler und später laktogener passiver Immunität bei den Saugferkeln während der Säugephase (SAIF, 1993). Dies ermöglicht es, die Infektion der Ferkel auf einen späteren Zeitpunkt zu verschieben, zu welchem die Klinik und damit die Mortalität geringer ausfällt (SAIF et al., 2012). Bei neugeborenen Ferkeln ist die kolostrale Immunität für einen Schutz vor Infektion entscheidend (SAIF, 2015). Während der kolostralen Phase (bis 24 h post partum), in der ein Übertritt von Immunglobulinen und Immunzellen über die Darmbarriere möglich ist, besteht eine hohe Konzentration an IgA, IgG und Lymphozyten im Kolostrum (BANDRICK et al., 2014). Durch maternale Immunglobuline besteht ein Schutz der Saugferkel für die Dauer von 4 bis 13 Tagen, abhängig von der Konzentration im maternalen Serum (DE ARRIBA et al., 1995). Die Qualität der Immunität ist aber nur im Falle von IgA proportional zur Quantität der Immunglobuline im maternalen Serum (HA et al., 2010). 24 h post partum sinkt die Konzentration aller Immunglobuline stark ab, in der Milch überwiegt anschließend der Anteil von IgA mit 50 - 60 % (CURTIS & BOURNE, 1971). IgA dienen durch passive Immunität dem Schutz des Magen-Darm-Traktes der Neugeborenen, bis deren eigenes Sekretionssystem voll ausgeprägt ist (CURTIS & BOURNE, 1971) und scheinen eine wichtigere Rolle für die Immunität der Saugferkel zu spielen als IgG, da sie widerstandsfähiger gegen die Proteolyse im Verdauungstrakt sind (OFFIT & CLARK, 1985).

## 9.3. Infektionskettenunterbrechung

Um eine Infektionskettenunterbrechung zu gewährleisten, müssen Maßnahmen der internen Biosicherheit implementiert werden (MADEC & WADDILOVE, 2002; FARZAN et al., 2006). Diese bestehen unter anderem aus einer strikten Verfolgung des Rein-Raus-Verfahrens, welches das Vorkommen von Infektionen im Allgemeinen reduziert (FARZAN et al., 2006). Weiterhin dürfen Tiere verschiedener Herkünfte, Altersgruppen und optimalerweise Würfe nicht gemischt werden und innerbetriebliche Tierbewegungen sollten an die Infektionsdynamik angepasst werden („good pig flow“) (WILLIAMSON et al., 2013). Eine gründliche Reinigung und Desinfektion besonders zwischen Abferkelgruppen sowie eine forcierte Hygiene in Kontaktbereichen zwischen Schwarz- und Weißbereichen ist unerlässlich (DEE et al., 2014; BOWMAN et

al., 2015b) und ist in der modernen Schweinehaltung mit großen Tierzahlen nicht wegzudenken (BÖHM, 2002). Vorgaben zur Reinigung und Desinfektion für Be- und Entladebereiche finden sich in der Viehverkehrsverordnung (VVVO, 2010). Zur sicheren Inaktivierung des Virus können lipidlösende und oberflächenaktive Substanzen eingesetzt werden (SCHLIESSER, 1981). BOWMAN et al. (2015b) testen erfolgreich oxidierende Agenzien, quaternäre Ammoniumverbindungen, Phenole, Natriumhypochlorit und eine Kombination aus quaternären Ammoniumverbindungen und Glutaraldehyd. Hierbei ist auf eine adäquate Einwirkzeit zu achten (SASAKI et al., 2016). Wirksam sind weiterhin unter anderem Kresole, Natriumhydroxid, Formaldehyd, Natriumcarbonat, starke Iodophore und Chloroform (POSPISCHIL et al., 2002). Verschmutzung auf den zu desinfizierenden Flächen führt zu abnehmender Wirkung der Desinfektionsverfahren, weshalb eine gründliche Reinigung und Trocknung im Vorfeld unabdingbar ist (SCHLIESSER, 1981; BÖHM, 2002). Weiterhin ist die Dosierung des Desinfektionsmittels der Temperatur anzupassen (BÖHM, 2002; SPINDLER & HARTUNG, 2013). Die Trocknung frisch desinfizierter Oberflächen trägt zum Dekontaminationserfolg bei (DEE et al., 2005). THOMAS et al. (2015b) weisen nach, dass Trocknung über zehn Minuten bei mindestens 71 °C zu einer sicheren Inaktivierung des Virus führt, zehn Minuten bei 63 °C hierfür jedoch nicht ausreichen.

#### **9.4. Therapie**

Im Falle einer Infektion ist der freie Zugang zu frischem Trinkwasser für erkrankte Tiere besonders wichtig, um einer Dehydratation entgegenzuwirken (SAIF et al., 2012). In Deutschland ist der ständige freie Zugang zu ausreichend Wasser guter Qualität grundsätzlich für die Haltung von Schweinen vorgeschrieben (TIERSCHNUTZTV, 2006). Unterstützend können die Tiere mit Elektrolyten sowie zusätzlicher Energie supplementiert werden (WILLIAMSON et al., 2013). Die Umgebung sollte trocken und sauber sein, das jeweilige Temperaturoptimum eingehalten werden und die Abteile frei von Zugluft sein, sodass eine Verschlimmerung der Symptomatik durch Faktoren, die Sekundärinfektionen begünstigen, vermieden werden kann (WILLIAMSON et al., 2013).

## 10. Diagnostik

Differenzialdiagnostisch kommen bei Durchfallerkrankungen verschiedene Ätiologien infrage (SAIF et al., 2012). Da weder klinisches Erscheinungsbild noch histopathologische Befunde eine eindeutige Diagnosestellung ermöglichen (WANG et al., 2016b), ist der Nachweis von PED-Viren, Viruspartikeln oder Antikörpern zu führen (KIM et al., 2007).

### 10.1. Direkter Nachweis

Die Ausscheidung von Viruspartikeln, genomischer RNA oder virusspezifischen Proteinen beginnt bereits an Tag 1 p.i. (DE ARRIBA et al., 2002a; KIM et al., 2007). PCR-basierende Nachweismethoden sind aufgrund ihrer hohen Sensitivität und Spezifität von Vorteil (GOU et al., 2015) und können bereits während eines akuten Infektionsgeschehens einen Erregernachweis liefern (BEER & HAAS, 2015). Weiterhin besteht die Möglichkeit, Viruspartikel, virale RNA oder spezifische Proteine mittels Immunfluoreszenz (IF) (DE BOUCK et al., 1981), Immunhistochemie (IHC) (GUSCETTI et al., 1998) und In-situ-Hybridisierung (ISH) (KIM & CHAE, 2000) nachzuweisen. CALLEBAUT et al. (1982) sowie CARVAJAL et al. (1995) berichten in den 1980er- und 1990er-Jahren von PEDV-Nachweisen mithilfe eines Sandwich-ELISAs. Die Elektronenmikroskopie ermöglicht keine sichere Differenzierung zwischen unterschiedlichen Coronaviren (OKANIWA et al., 1968). Als zu verwendendes Probenmaterial kommen Kot (PENSAERT & DE BOUCK, 1978), Darmgewebe (DE BOUCK et al., 1981), Sauenmilch (SUN et al., 2012), Speichel (BJUSTROM-KRAFT et al., 2016), Sperma (SUN et al., 2014b), Futterproben (GERBER et al., 2014b; PASICK et al., 2014) sowie Stallluft (ALONSO et al., 2014) infrage.

Zum Nachweis viraler RNA mittels (real-time) RT-PCR gilt es zuerst, das vorhandene Genmaterial in-vitro zu vervielfältigen (MULLIS et al., 1992). Zuvor muss die isolierte RNA mithilfe einer Reversen Transkriptase (RT) in cDNA (complementaryDNA) umcodiert werden, welche dann als Basis für die folgende Amplifikation fungiert (MONTENARH, 2006). Mithilfe einer Agarosegelelektrophorese erfolgt bei der Endpunkt-PCR eine elektropherographische Auftrennung der Amplifikate (BEER & HAAS, 2015). Um in Echtzeit die Quantität der Genomkopien festhalten zu können, werden

bei der real-time RT-PCR (qRT-PCR) die eingesetzten Sonden mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert und können im Falle einer erfolgreichen Amplifikation der Test-DNA im entsprechenden Amplifikationszyklus detektiert werden (MACKAY et al., 2002). Der Ct-Wert (cycle threshold) gibt an, ab dem wievielten Amplifikationszyklus der Detektionsschwellenwert überschritten wird, d.h. je kleiner der Ct-Wert, desto größer war die Anzahl an Genomkopien zu Beginn (BEER & HAAS, 2015). Da der Nachweis virusspezifischer RNA-Fragmente schnell und sicher erfolgt (ISHIKAWA et al., 1997) und die Nachweisfrequenz bei direktem Nachweis von PEDV höher ist als bei IHC oder ISH, gilt die PCR als Goldstandard für den Antigennachweis (KIM & CHAE, 2002; KIM et al., 2007; WANG et al., 2014b; ZHAO et al., 2016). Um eine schnelle Differenzierung zwischen PED und TGE zu ermöglichen, entwickeln KIM et al. (2007) eine multiplex qRT-PCR mit Primern und Sonden, die komplementär zu Sequenzregionen des N-Gen sind, welches hochkonserviert ist. Auch bei großen Probenanzahlen erzielt die PCR sichere Ergebnisse (DIEL et al., 2016). Die Infektiosität einer Probe kann allerdings mittels PCR grundsätzlich nicht festgestellt werden (PUJOLS & SEGALÉS, 2014; CRAWFORD et al., 2015; THOMAS et al., 2015b; DIEL et al., 2016).

## 10.2. Indirekter Nachweis

Mittels indirekter Nachweismethoden lassen sich IgA und IgG aus Kot (GERBER & OPRIESSNIG, 2015), Serum (HOU et al., 2007; GERBER et al., 2016b; STRANDBYGAARD et al., 2016), Sauenmilch und Kolostrum (DE ARRIBA et al., 1995; GERBER et al., 2014a; CLEMENT et al., 2016) sowie Speichel (BJUSTROM-KRAFT et al., 2016) nachweisen. Der Nachweis von PEDV-spezifischen Antikörpern wird aufgrund der hohen Sensitivität und Spezifität meist per ELISA geführt (CARVAJAL et al., 1995; HOU et al., 2007; GERBER et al., 2014a; GOU et al., 2015). Auch IFA (MADSON et al., 2014), Virusneutralisationstests (VN), fluorescent focus neutralisation (FFN) oder fluorescent microsphere immunoassay (FMIA) (OKDA et al., 2015) können verwendet werden. Der ELISA wird von HOFMANN und WYLER (1990) erstmals beschrieben. Sowohl der indirekte ELISA (HOU et al., 2007; GERBER et al., 2014a; FAN et al., 2015; OKDA et al., 2015) als auch der kompetitive ELISA (CARVAJAL et al., 1995) stellen effektive Nachweismethoden für PEDV-Antikörper im Serum dar, da sie Sensitivitäten von 97,9 % bzw. 97,6 % und

Spezifitäten von 98,2 % bzw. 98,9 % aufweisen (OKDA et al., 2015). Bezüglich des Auftretens von Kreuzreaktivitäten zu anderen Coronaviren gibt es divergierende Angaben in der Literatur: Während OKDA et al. (2015) und GERBER et al. (2014a) keine Kreuzreaktivität nachweisen können, wird in einer neueren Untersuchung von GERBER et al. (2016b) bei einem Vollvirus-basierten ELISA eine Kreuzreaktion mit einer TGEV-positiven Serumprobe sowie bei einem N-Protein-basierten ELISA eine Kreuzreaktion mit PRCV- und TGEV-positiven Serumproben nachgewiesen. Aktuelle indirekte ELISAs basieren auf dem rekombinanten N-Protein des PEDV-Virus. Derzeit sind in Europa nur zwei N-Gen-basierte ELISAs kommerziell erhältlich (STADLER et al., 2018).

Der Nachweis von PEDV-spezifischen Antikörpern, wie IgA und IgG, kann nach experimenteller Infektion bei erkrankten Tieren mittels IFA erstmals 14 Tage p.i. erfolgen (MADSON et al., 2014). Weiterhin berichten MADSON et al. (2014) von einer Nachweisbarkeit der IgG bis mindestens 35 Tage p.i.. THOMAS et al. (2015a) weisen im Virusneutralisationstest eine Serokonversion an Tag 14 p.i. nach. OKDA et al. (2015) datieren die mittels ELISA detektierbare Serokonversion auf Tag 6 - 9 p.i. und berichten von IgG-Nachweisen bis Tag 43 p.i. bei zum Zeitpunkt der Infektion vier Wochen alten Ferkeln. Bei Mastschweinen ist der Nachweis von IgG mittels ELISA zuverlässig 7 - 28 Tage nach einem Krankheitsausbruch möglich, bei ausreichend großer Stichprobenzahl sogar bis zu 63 Tage (STADLER et al., 2018). Da Saugferkel aber nicht immer detektierbare Serumantikörper entwickeln und dies auch erst ab Tag 10 nach Krankheitsausbruch der Fall ist, erfordert der Nachweis bei Saugferkeln eine erhöhte Stichprobenzahl (STADLER et al., 2018). Die höchsten Antikörper-Konzentrationen sind in einer Studie von OKDA et al. (2015) an Tag 21 p.i. messbar, danach kommt es zu einem Absinken der Titer. Bei Sauen sinken der IgG- und IgA-Spiegel im Laufe von sechs Monaten kontinuierlich ab (OUYANG et al., 2015). Serum-IgA kann ab Tag 13 p.i. nachgewiesen werden (BJUSTROM-KRAFT et al., 2016). BJUSTROM-KRAFT et al. (2016) postulieren, dass auch der PEDV-Antikörpernachweis aus Speichel mithilfe von Kaustrieken eine effektive Methode zur Herdendiagnostik darstellt, da im Speichel IgG und IgA ab Tag 13 p.i. nachweisbar sind. Die IgA-Konzentration im Speichel nimmt bis Tag 96

p.i. kontinuierlich zu und erst ab Tag 111 p.i. langsam ab (BJUSTROM-KRAFT et al., 2016).

## **11. Wildschweine**

Die stammesgeschichtliche Entwicklung der Schweine beginnt vor etwa drei Millionen Jahren, wohingegen es erst seit 6000 - 8000 Jahren zur Domestikation des heutigen Hausschweins kam (MEYNHARDT, 1989a). Daraus ergeben sich viele Gemeinsamkeiten zwischen Haus- und Wildschwein (MEYNHARDT, 1989a).

### **11.1. Population**

Wildschweine sind auf dem europäischen Festland weit verbreitet und leben ursprünglich in Wäldern und an Waldrändern (MEYNHARDT, 1989a). Inzwischen haben sie auch neue Habitate wie Agrarland (FRACKOWIAK et al., 2013; KEULING et al., 2016) und dicht bewohnte Stadtgebiete besiedelt (CAHILL & LLIMONA, 2004). Sie stellen heute eine der häufigsten Wildarten in europäischen Wäldern dar (GORTAZÁR et al., 2006) und ihre Populationsdichte hat eine bisher nicht bekannte Tragweite erreicht (GEISSER & REYER, 2004). Die Zunahme der Populationsdichte ist unter anderem auf verbesserte Lebensbedingungen zurückzuführen (DEUTSCHER JAGDVERBAND, 2014). Aufgrund erhöhter Reproduktionszahlen, welche im Zuge von Veränderungen der Landschaftsnutzung mit vermehrtem Anbau ertragreicher Feldfrüchte und somit größerem Nahrungsangebot einhergeht, und dem Klimawandel, der häufigere Mastjahre und eine geringere Wintersterblichkeit mit sich bringt, nehmen die Tierzahlen stetig zu (VETTER et al., 2015; KEULING et al., 2016). Bei günstigen Nahrungs- und Witterungsverhältnissen kann es aufgrund von Trächtigkeitsraten von bis zu 100 % bei Tieren im Alter von >12 Monaten und 60 - 70 % bei Frischlingen (GETHÖFFER et al., 2007) zu einem Populationszuwachs von bis zu 300 % pro Jahr kommen (POHLMAYER, 2007; DEUTSCHER JAGDVERBAND, 2014). Dies zeigt sich indirekt in der Zunahme der jährlichen Jagdstrecke, die sich exemplarisch in Baden-Württemberg seit Mitte der 1980er-Jahre verzehnfacht hat (LAZBW, 2017a). Im Jagdjahr 2012/2013 haben die Jäger in Deutschland 644.233 Wildschweine erlegt, was der zweitgrößten jemals in Deutschland erzielten Strecke entspricht (DEUTSCHER JAGDVERBAND, 2014;

DEUTSCHER JAGDVERBAND, 2017). Einzig die verstärkte Jagd mit Abschuss von bis zu 80 % der Frischlinge ermöglicht eine effektive Eingrenzung der Populationszunahme (GEISSER & REYER, 2004; POHLMAYER, 2007), wobei die Freizeitjagd bei Weitem nicht ausreicht, um das Populationswachstum einzudämmen oder die Population gar zu reduzieren (KEULING et al., 2016). Neben den entstehenden Schäden in der Landwirtschaft hat die Überpopulation auch Auswirkungen auf die Tiere selbst, wie das gesteigerte Vorkommen von Krankheiten (GORTAZÁR et al., 2006).

### **11.2. Ernährung**

Wildschweine sind Allesfresser und ernähren sich zu 12 % von tierischer und zu 88 % von pflanzlicher Nahrung (MEYNHARDT, 1989a). Dazu gehören neben Kräutern und Gräsern, Laub- und Nadelholz und anderen grünen Pflanzenteilen auch Getreide, Kartoffeln, Mais und andere Feldfrüchte, sodass es die Tiere besonders während und kurz nach der Erntezeit auf die bewirtschafteten Felder zieht (MEYNHARDT, 1989a).

### **11.3. Lebensraum/Ausbreitung**

Aufgrund des Einflusses des Menschen durch direkte (Kirrungen) und indirekte (Agrarlandschaft) Fütterung und die daraus entstehende Populationszunahme kommt es zu einer Ausbreitung der Tiere in landwirtschaftlich genutzte Flächen (CELLINA, 2008; KEULING et al., 2016). Nach wie vor fehlen Informationen zu Bewegungsmustern, Lebensraum, Verbreitungsmechanismen, Populationsgrößen und der Nutzung des Habitats (KEULING et al., 2016). KEULING et al. (2008) stellen fest, dass Wildschweine ohne Bejagung meist tag- bzw. dämmerungsaktiv sind und ihren Bewegungsradius kaum ändern. Werden sie aber bejagt, werden sie vermehrt nachtaktiv und vergrößern ihren Bewegungsradius, ohne aber gänzlich abzuwandern (KEULING et al., 2008). MEYNHARDT (1989a) bezeichnet Wildschweine als unstetes Wild, das pro Nacht eine Strecke von 30 - 40 km zurücklegt, dessen Habitat einen Radius von 2 - 6 km aufweist und deren männliche Vertreter im zweiten Lebensjahr bis zu 250 km aus ihrem Geburtsgebiet abwandern. Die Wildforschungsstelle Aulendorf (2017b) beziffert die täglich zurückgelegte Strecke sogar auf Strecken von 60 km und mehr. Laut KEULING (2015) sind Wildschweine jedoch eher ein standorttreues

und kleinräumiges Wild. So wird die Habitatgröße bisweilen auch mit einem Radius von 0,5 - 1,3 km (KEULING et al., 2008) bzw. 0,6 - 0,9 km (PODGÓRSKI et al., 2013) angegeben. Bezüglich des Bewegungsradius, der Standorttreue und den zurückgelegten Wegstrecken bestehen divergierende Angaben in der Literatur.

#### **11.4. Krankheiten**

Aufgrund der erhöhten Kontaktrate zwischen einzelnen Tieren und Rotten wird die Verbreitung von Krankheiten vorangetrieben (GORTAZÁR et al., 2006), wie Studien von ALBINA et al. (2000), LADDOMADA (2000) und GORTAZÁR et al. (2006) anhand von Klassischer Schweinepest (KSP), Aujeszky'scher Krankheit (SHV1) und Infektionen mit dem Porzinen Circovirus Typ 2 (PCV2) sowie *Mycobacterium tuberculosis* zeigen. Auch andere Krankheitserreger wie beispielsweise das Porzine Reproductive und Respiratorische Syndrom Virus (PRRSV) (REINER et al., 2009) und das Schweineinfluenza-Virus (SIV) können in Wildschweinbeständen nachgewiesen werden (GROISMAIER, 2011). Seit 2014 tritt außerdem die Afrikanische Schweinepest wieder gehäuft auf und rückt nach und nach von Osteuropa Richtung Westen vor (BOSCH et al., 2017). Wildschweine leben grundsätzlich zurückgezogen und sind eher scheu, weshalb vorhandene klinische Symptome und Todesfälle meist unbemerkt bleiben (HAMMER, 2012). Aufgrund der Ähnlichkeiten zwischen Haus- und Wildschweinen und der großen Populationsdichte besteht ein hohes Risiko der Übertragung unterschiedlicher Keime auch auf Hausschweine (GORTAZÁR et al., 2006). Das PED-Virus ist ein Erreger, der sowohl bei Hausschweinen (PENSAERT & DE BOUCK, 1978; TAKAHASHI et al., 1983; STEVENSON et al., 2013) als auch bei Wildschweinen vorkommt (LEE et al., 2016).

Um die Eintragsquelle von PED in die USA 2013 zu finden, werden 368 Serumproben von Wildschweinen aus den Jahren 2011 bis 2013 mittels eines Vollvirus-ELISAs auf PEDV untersucht (USDA, 2015). Alle vom US Department of Agriculture (USDA) (2015) getesteten Proben stellen sich als negativ heraus. Demnach erscheint ein Eintrag von PED in Wildschweinbestände der USA vor den Ausbrüchen bei Hausschweinen im April 2013 wenig wahrscheinlich (USDA, 2015). In Südkorea werden in den Jahren 2010 und 2011 287 Kotproben von Wildschweinen gesammelt, welche 2016 mittels PCR auf PEDV untersucht werden (LEE et al., 2016). Bei 9,75 %

der Proben können PED-Viren nachgewiesen werden (LEE et al., 2016). Bei den PEDV-positiven Proben besteht trotz großer geographischer Entfernung der Fundorte eine Sequenzhomologie von 96,5 - 100 % (LEE et al., 2016). Die PEDV-Stämme gehören zur Genogruppe G1b und sind eng verwandt mit chinesischen Isolaten (LEE et al., 2016). PEDV-Stämme aus Hausschweinebeständen Südkoreas gehören nicht zur Genogruppe G1b, was darauf hindeutet, dass kein Austausch zwischen Haus- und Wildschweinen stattgefunden hat (LEE et al., 2016). Aufgrund der moderaten Prävalenz von PEDV bei Wildschweinen ist davon auszugehen, dass PED relativ geringe Auswirkungen auf Wildschweine hat (LEE et al., 2016). In Tschechien werden im Jagdjahr 2014/2015 im Rahmen einer Studie zur Ermittlung der Prävalenz verschiedener viraler Enteritiserreger in Wildschweinbeständen Kot- oder Darm-Proben von Wildschweinen gesammelt und mittels RT-PCR unter anderem auf die Anwesenheit von PEDV untersucht (MOUTELÍKOVÁ et al., 2016). Keine der vorliegenden Proben weist PEDV-spezifische RNA auf (MOUTELÍKOVÁ et al., 2016).

### III. MATERIAL UND METHODEN

#### 1. Ziel der Arbeit

LEE et al. (2016) zufolge können Wildschweine als Träger und Ausscheider von PED-Viren fungieren. Aufgrund des gehäufteten Auftretens von PED in deutschen Hausschweinebeständen seit dem Jahr 2014 (HANKE et al., 2015; STADLER et al., 2015; STIEBRITZ, 2017) sollte die vorliegende Studie einerseits das Vorkommen von PED bei Wildschweinen in Süddeutschland beleuchten und andererseits mögliche Eintragsquellen und Übertragungswege zwischen Hausschweinebeständen und Wildschweinpopulationen betrachten. Der Fokus lag hierbei auf der Gülle, da sie ein naheliegendes Übertragungsmedium darstellt. Durch die Ausbringung von Faeces an PED erkrankter Hausschweine auf umliegende Felder gelangt potenziell infektiöse, PEDV-positive Gülle in die Umwelt. Auf Basis dieser Überlegungen konnten zwei Hypothesen formuliert werden, die der vorliegenden Arbeit zugrunde gelegt wurden:

Hypothese 1: Die Wildschweinpopulation in Süddeutschland kann Träger des PED-Virus sein und somit auch eine Rolle in der Infektionsdynamik der PED-Ausbrüche in süddeutschen Hausschweinebeständen im Jahr 2014 spielen.

Hypothese 2: Durch die Ausbringung PEDV-positiver Gülle auf Grünflächen und Äcker kann es zur Übertragung des PED-Virus auf in der Umgebung lebende Wildschweinpopulationen kommen.

Im Rahmen dieser Studie sollten die genannten Hypothesen mittels einer breitflächig angelegten Beprobung von Wildschweinen in Süddeutschland auf PEDV untersucht werden. Hierfür wurde auch die Beprobung und Untersuchung der Gülle eines PEDV-positiven Betriebs in die Studie integriert.

## **2. Studienaufbau**

Zur Überprüfung der genannten Hypothesen wurde die Studie in zwei Teile untergliedert.

Im ersten Studienteil wurden zur Untersuchung des Vorkommens von PEDV bei Wildschweinen in Süddeutschland im Zeitraum von drei aufeinander folgenden Winterhalbjahren (2014/2015, 2015/2016 und 2016/2017) Wildschweine in Bayern und Baden-Württemberg beprobt.

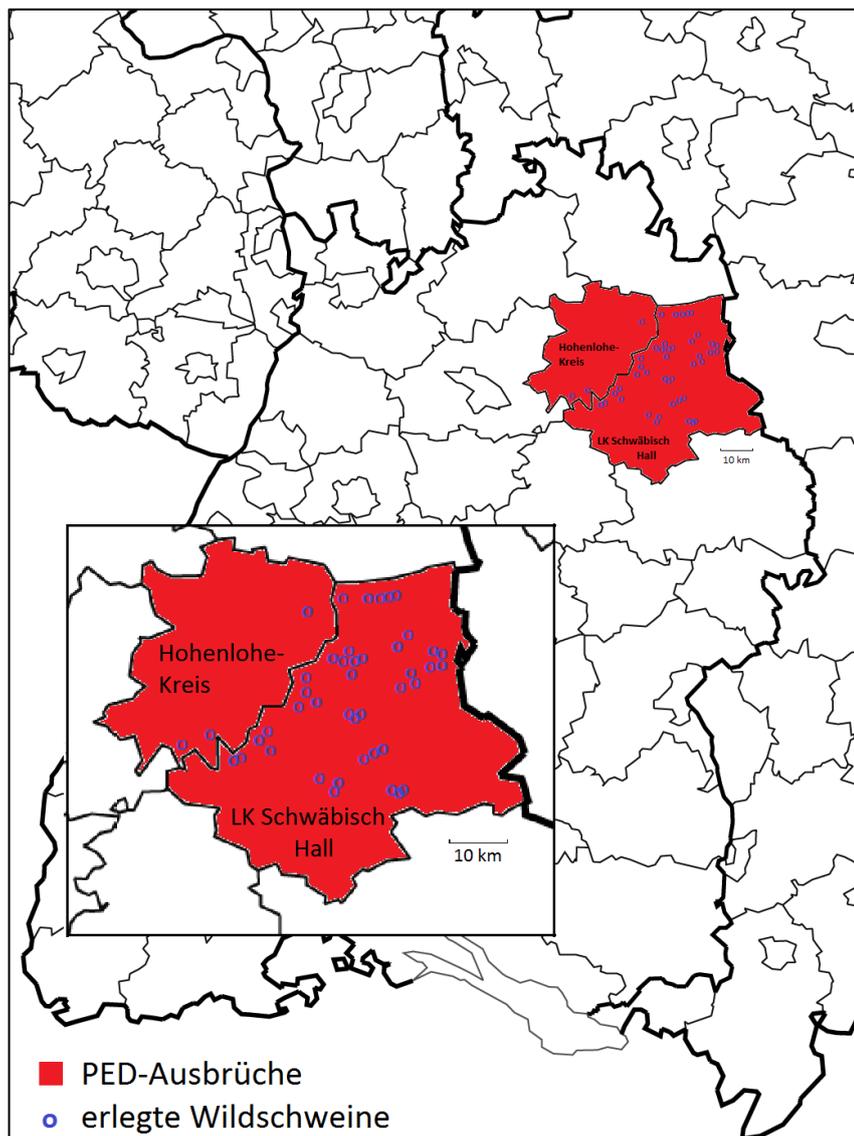
In einem zweiten Studienteil wurde für die Gülleuntersuchung ein PEDV-positiver Betrieb nach akuter Durchseuchung herangezogen. Mittels kontinuierlicher Beprobung der Gülle des Betriebs über elf Wochen sollte untersucht werden, wie lange das Virus in der gelagerten Gülle nachweisbar ist.

In Jagdgebieten, die im Umkreis von 15 km um den oben genannten Betrieb liegen, wurden darüber hinaus anschließend im Winterhalbjahr 2016/2017 Wildschweine beprobt. Die Tiere wurden im Rahmen von Treibjagden und bei Ansitzjagden erlegt. Ziel der Untersuchung war es wiederum, ein möglicherweise gehäuftes Vorkommen von PED bei Wildschweinen in der Umgebung des PEDV-positiven Betriebs und in der Region der Gülleausbringung nachzuweisen.

## **3. Auswahl der Beprobungsgebiete und des Versuchsbetriebs**

Im ersten Studienteil wurden im Dezember 2014 infolge der PED-Ausbrüche ab Mai 2014 in Süddeutschland Probenkits zur Sammlung von Blut- und Kotproben von erlegten Wildschweinen an Jäger in Bayern und Baden-Württemberg verteilt. Die Probenkits enthielten ein Probengefäß aus Plastik mit Schraubverschluss für die Entnahme einer Kotprobe, ein Serumröhrchen (Primavetten®, Sarstedt, Nürmbrecht, Deutschland) für die Blutentnahme, ein Paar Handschuhe sowie eine Anleitung zur Entnahme der Blutprobe und ein Begleitschreiben für weitere Informationen zum erlegten Tier (vgl. XI.). Die Jäger wurden im Rahmen von Informationsveranstaltungen für die Mithilfe bei der Studie akquiriert. Von allen eingesandten Kotproben wurde ein direkter Antigennachweis mittels qRT-PCR auf PEDV-RNA

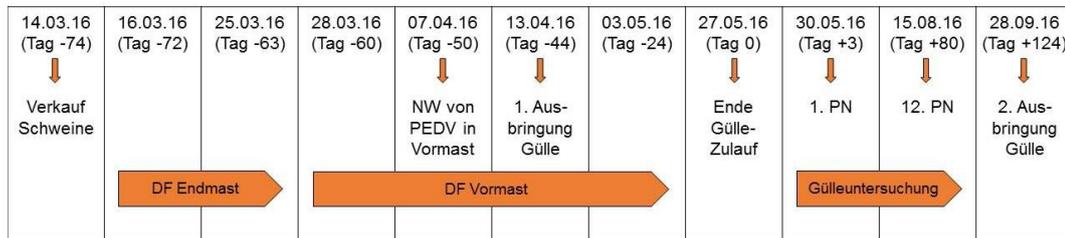
durchgeführt. Für einen indirekten Erregernachweis wurden die Proben ausgewählt, welche aus einem Umkreis von zehn Kilometern um einen PEDV-positiven Hausschweinebestand stammten. Hierbei stellte sich heraus, dass alle infrage kommenden Proben aus dem Hohenlohekreis und dem Landkreis Schwäbisch Hall in Baden-Württemberg stammten (Abbildung 2). Diese Serumproben wurden mittels ELISA auf Serumantikörper untersucht.



**Abbildung 2: Lagebeziehung zwischen Regionen mit PED-Ausbrüchen und den Erlegungsorten der im ersten Studienteil mittels ELISA untersuchten Proben von Wildschweinen**

Für den zweiten Teil der Untersuchung wurde ein Schweinebestand ausgewählt, bei dem im Frühjahr 2016 ein akuter PEDV-Ausbruch mittels PCR und ELISA diagnostiziert worden war. Der Betrieb arbeitete im geschlossenen System und die Infektion des Bestandes war mit großer Wahrscheinlichkeit durch den Kontakt mit einem Viehtransporter beim Verkauf von Endmastschweinen erfolgt. Zuerst kam es zur Infektion der Tiere in der Endmast. Anschließend infizierten sich Tiere in der Vormast, wo sich die Erkrankung durch wiederholte Neueinstellung naiver Tiere über mehrere Wochen manifestierte. Die kontinuierliche Virusausscheidung erkrankter Tiere wurde mittels regelmäßiger Verlaufskontrollen über Kotproben verifiziert. Tiere in der Mitte der Mast, Saugferkel, Aufzuchtferkel und Sauen waren nicht betroffen. Vier Wochen nach Beginn des Krankheitsgeschehens in der Endmast wurde die Gülle der erkrankten Tiere auf die umliegenden Felder ausgebracht. In der darauffolgenden Woche lagen die Temperaturen zwischen minimal 2,5 °C in der Nacht und maximal 16 °C am Tag. Die täglichen Sonnenstunden variierten zwischen 0,5 und 7,5 Stunden. Die Niederschlagsmengen lagen zwischen null und maximal 14 Litern pro Quadratmeter und Tag. Die nachfolgend anfallende Gülle erkrankter Tiere wurde anschließend über 44 Tage in einem unterirdischen Güllesilo gesammelt. Nach diesen 44 Tagen wurde der Abfluss aus dem Güllekeller im Stall in das unterirdische Güllesilo unterbrochen. So konnte gewährleistet werden, dass die nachweislich zum Zeitpunkt der Sammlung PEDV-positive Gülle keiner Sonneneinstrahlung oder nachträglichen Verdünnung durch später zugeführte, möglicherweise PEDV-negative Gülle ausgesetzt war. Das Güllesilo lag unterhalb einer Beton-Bodenplatte und war nur durch einen Metalldeckel von oben zugänglich. Die Gülle wurde während des Untersuchungszeitraumes weder gerührt noch auf andere Weise bearbeitet. Die Untersuchung der Gülle auf PEDV begann drei Tage nach Ende des Güllezulaufs aus dem Güllekeller im Stall. Über elf Wochen hinweg wurde die Gülle anschließend untersucht, um festzustellen, wie lange das Virus in der gelagerten Gülle nachweisbar ist. Die in der Studie untersuchte Gülle wurde im Herbst 2016, 44 Tage nach dem letzten Beprobungstermin, auf die umliegenden Felder ausgebracht. In der auf die Ausbringung folgenden Woche lagen die Temperaturen zwischen minimal 6 °C bei Nacht und maximal 24 °C am Tag. Die täglichen Sonnenstunden variierten zwischen 2 und 12,5

Stunden. Die Niederschlagsmengen lagen bei maximal zwei Litern pro Quadratmeter und Tag. In Abbildung 3 ist der zeitliche Ablauf der Gülleuntersuchung dargestellt.

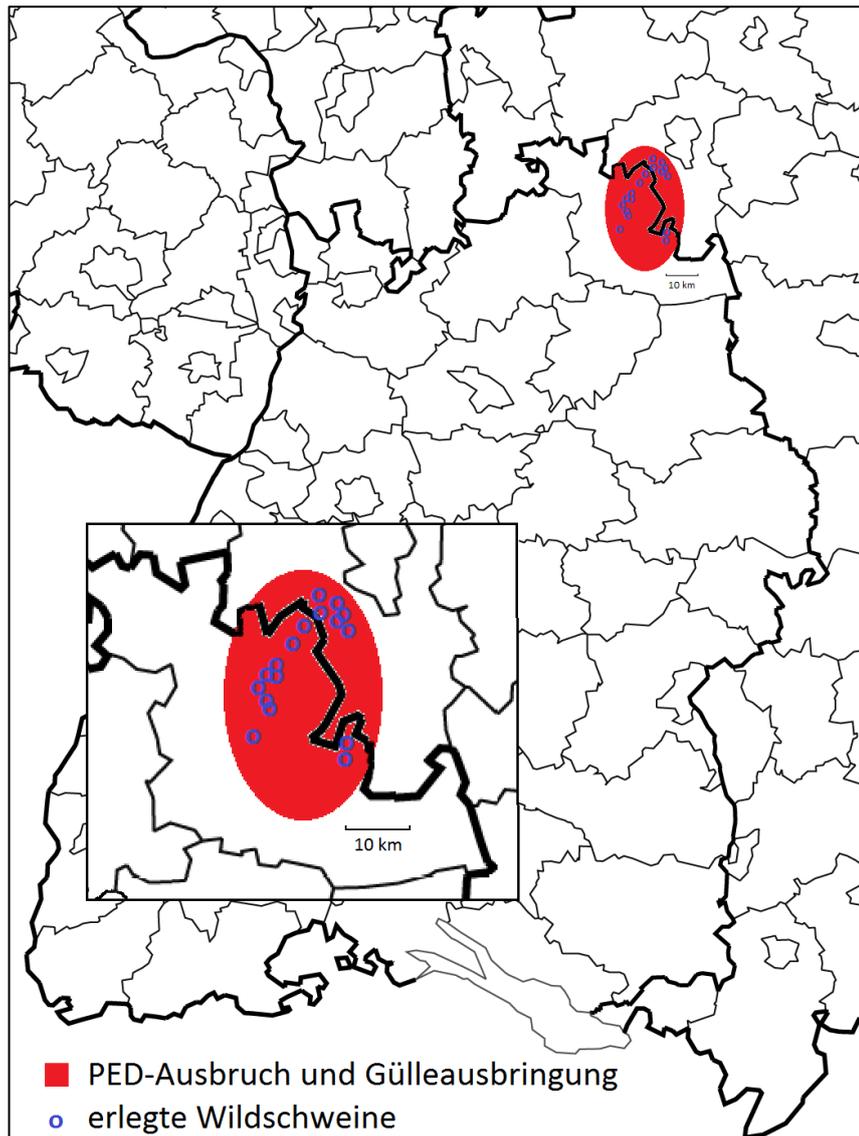


DF = Durchfall; PN = Probennahme; NW = Nachweis

**Abbildung 3: Zeitlicher Ablauf der Gülleuntersuchung**

Aufgrund der Annahme, dass es über die ausgebrachte Gülle zu einer Übertragung von PEDV auf Wildschweine kommen könnte, wurde im Frühjahr 2016 die Beprobung von erlegten Wildschweinen in der Umgebung des PEDV-positiven Betriebs veranlasst. Der in die Untersuchungen eingeschlossene Bezirk hat einen Radius von 15 km um den betroffenen Betrieb. Es wurde mit den Verantwortlichen der Hegeringe dieses Bezirks Kontakt aufgenommen, sodass im Rahmen von Informationsveranstaltungen die Jäger dieser Hegeringe für die Mitarbeit an der Studie akquiriert werden konnten. Das Jagdgebiet ist in Abbildung 4 ersichtlich.

Im Zuge von Treibjagden und einzelnen Ansitzjagden wurden erlegte Wildschweine in diesem Bezirk post mortem beprobt, die Kotproben anschließend mittels qRT-PCR auf PEDV-RNA und die Serumproben mittels ELISA auf PEDV-spezifische Serumantikörper untersucht.



**Abbildung 4: Lagebeziehung zwischen einem PED-Ausbruch in einem geschlossenen Schweinebetrieb, der darauffolgenden Gülleausbringung und den Erlegungsorten der im zweiten Studienteil untersuchten Proben von Wildschweinen**

## **4. Probenmaterial**

### **4.1. Kot**

Beim Aufbrechen erlegter Wildschweine wurden Kotproben nach Möglichkeit aus dem Dickdarm, teilweise auch aus dem Dünndarm oder dem Rektum der Tiere entnommen und in Plastikgefäßen mit Schraubverschluss aufbewahrt. Die Probengefäße wurden mit einem wasserfesten Stift individuell beschriftet und bis zur weiteren Diagnostik im Tiefkühlschrank bei -80 °C gelagert.

### **4.2. Blut**

Die Blutprobenentnahme erfolgte mithilfe von Serumröhrchen (Primavetten®, Sarstedt, Nürmbrecht, Deutschland) aus der Pleurahöhle. Aus dem Herzen oder größeren Gefäßen konnte in der Regel kein Blut mehr gewonnen werden, da die Tiere bereits seit Minuten bis Stunden tot waren. Die Serumproben wurden im Anschluss bei 2000 g über zehn Minuten abzentrifugiert (Rotanta 460R Zentrifuge, Andreas Hettrich® GmbH & Co.KG, Tuttlingen, Deutschland) und der Überstand in zwei Eppendorf-Gefäße (Eppendorf® Safe-Lock Tubes 2,0 ml, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) abpipettiert, welche einzeln beschriftet und bis zur Weiterverarbeitung im Tiefkühlschrank bei -80 °C gelagert wurden. In einzelnen Fällen mussten Proben aus organisatorischen Gründen auch eingefroren werden, bevor sie abzentrifugiert werden konnten.

### **4.3. Gülle**

Über einen Zeitraum von elf Wochen fanden insgesamt zwölf Beprobungen der Gülle im Abstand von jeweils einer Woche statt. Die Probenentnahme an jedem Beprobungstermin erfolgte an unterschiedlichen Lokalisationen und Schichten im Güllesilo. Es wurden pro Untersuchung fünf Einzelproben entnommen, aus denen im Anschluss eine Poolprobe hergestellt wurde. Diese wurde anschließend in einem individuell beschrifteten Plastikgefäß mit Schraubverschluss bei -80 °C asserviert.

#### **4.4. Weitere statistische Erhebungen**

Zu jeder Kot- und Blutprobe aus 4.1. und 4.2. wurden weitere Daten zum untersuchten Tier erhoben. Hierbei wurden folgende Informationen zum Tier dokumentiert: Geschlecht, geschätztes Alter und geschätztes Gewicht des Tieres sowie Jagdjahr und Region, in der es erlegt wurde.

### **5. Labordiagnostische Untersuchungen**

#### **5.1. Direkter Nachweis von PEDV**

##### **5.1.1. Probenvorbereitung**

Die molekularbiologischen Untersuchungen fanden am Institut für Infektionsmedizin und Zoonosen der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München statt. Als Vorbereitung auf die molekularbiologische Diagnostik wurden 0,5 ml der aufgetauten Kotprobe je nach Konsistenz mit 0,5 - 1,5 ml phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) versetzt, die Suspension dann mittels Vortexmischer homogenisiert und anschließend bei 6000 g für zwei Minuten zentrifugiert. 500 µl des Überstandes wurden zur weiteren Diagnostik in ein Eppendorf-Gefäß überführt.

##### **5.1.2. RNA-Extraktion**

Die Extraktion der enthaltenen viralen RNA erfolgte aus 100 µl des gewonnenen Überstandes mithilfe eines Microlab<sup>®</sup> STARLet Pipettierautomaten (Hamilton Robotics GmbH, Martinsried, Deutschland) sowie eines kommerziellen RNA Extraktions-Kits (NucleoSpin<sup>®</sup> Virus Core Kit, Macherey-Nagel GmbH Co. KG, Düren, Deutschland), welches nach Herstellerangaben verwendet wurde.

##### **5.1.3. PCR**

Zur Detektion von PEDV-RNA wurde eine TaqMan-PCR nach KIM et al. (2007) durchgeführt, die durch einen zweiten modifizierten Vorwärtsprimer (Primer F2) ergänzt wurde. Die Nukleotidsequenzen der verwendeten Primer- und SONDENSEQUENZEN sind in Tabelle 1 dargestellt. Sie basieren auf den Nukleotidsequenzen des ORFs des N-Gens.

**Tabelle 1: Auflistung der verwendeten Primer- und Sondensequenzen für die modifizierte PCR nach KIM et al. (2007), die Modifikation ist „fett“ gedruckt**

Name	Nukleotidsequenz	Konzentration im PCR-Ansatz
F1 Primer	5'-CGC AAA GAC TGA ACC CAC TAA TTT-3'	500 nM
F2 Primer	5'-CGC AAA GAC TGA ACC CAC TAA <b>CCT</b> -3'	500 nM
R Primer	5'-TTG CCT CTG TTG TTA CTT GGA GAT-3'	800 nM
Sonde	5'- FAM TGT TGC CAT TGC CAC GAC TCC TGC-BHQ1-3'	300 nM

Diese qRT-PCR wurde mithilfe eines kommerziellen PCR-Kits (QuantiTect Probe RT-PCR Kit, Qiagen, Hilden, Germany) gemäß den Herstellerangaben durchgeführt. Zur Amplifizierung und Messung der Fluoreszenz wurde ein Stratagene MX3005P-Cycler (Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland) genutzt. Das angewandte Temperaturprotokoll und die einzelnen Reaktionschritte sind in Tabelle 2 dargestellt.

**Tabelle 2: Temperaturprotokoll der PEDV-PCR**

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

Im ersten Schritt wurde die Reverse Transkription und die Polymeraseaktivierung durchgeführt. Im zweiten Schritt erfolgten 42 Quantifikationszyklen, die jeweils aus Denaturierung, Annealing/Extension und Messung der Fluoreszenz bestanden. Wurden Ct-Werte >40 gemessen, wurden die Proben als negativ gewertet, zwischen 30 und 40 galten sie als schwach positiv und <30 als positiv. In jedem PCR-Lauf wurden Positiv- und Negativkontrollen mitgeführt.

## 5.2. Indirekter Nachweis von Antikörpern

Die Serumproben wurden am Institut für Infektionsmedizin und Zoonosen der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München mit dem Swinecheck® PED indirect ELISA (Biovet Inc., St-Hyacinthe, Kanada) entsprechend den Herstellerangaben untersucht.

Der ELISA weist spezifische IgG nach, die komplementär zu einem Antigen auf Basis eines rekombinanten N-Proteins des Virus sind. Die optische Dichte (OD) aller Proben inklusive Positiv- und Negativkontrolle wird bei 450 nm gemessen. Zur Auswertung der ELISA-Ergebnisse wurde die S/P Ratio (sample to positive ratio) errechnet. Diese ergibt sich aus dem Verhältnis der OD-Werte der Probe ( $OD_S$ ) abzüglich des Mittelwerts der Negativkontrollen ( $M OD_N$ ) zum Mittelwert der Positivkontrollen ( $M OD_P$ ) abzüglich des Mittelwerts der Negativkontrollen ( $M OD_N$ ).

$$\frac{OD_S - M OD_N}{M OD_P - M OD_N} = S/P \text{ Ratio}$$

Laut Herstellerangaben wird der Cut-off-Wert bei einer S/P Ratio von 0,40 festgelegt. Dementsprechend wird eine S/P Ratio  $< 0,40$  als negativ,  $\geq 0,40$  als positiv gewertet. Im Rahmen dieser Studie wurde eine weitere Interpretationsstufe eingebaut, indem eine S/P Ratio  $> 0,4$  und  $< 0,6$  als schwach positiv interpretiert wurde.

## 6. Statistische Auswertung

Die Erfassung aller während der Studie gesammelten Daten sowie die Ergebnisse der PCR und des indirekten Erregernachweises erfolgte in tabellarischer Form. Weiterhin wurden alle erfassten Daten nach Versuchsteilen sortiert. Eine deskriptive Auswertung der Daten sowie die Erstellung von Diagrammen erfolgte mithilfe von Microsoft Excel®, Office 2010 (Fa. Microsoft, Redmond, USA). Für die statistische Auswertung wurde die Statistiksoftware IBM SPSS Statistics 23.0 (IBM® SPSS Inc., Chicago, IL, USA) genutzt. Werte von  $p < 0,05$  galten als signifikant.

Zur Analyse möglicher Zusammenhänge zwischen dem Antikörpernachweis und den Parametern Geschlecht, Alter und Jagdjahr wurde der Exakte Test nach Fisher herangezogen. Zur Berechnung wurden positive und schwach positive Ergebnisse zusammengefasst, die Kategorie „keine Angabe“ wurde für die Analyse ausgeschlossen. Zur Evaluation, ob es signifikante Unterschiede zwischen dem Körpergewicht PEDV-positiver und PEDV-negativer Tiere gibt, wurden die Daten innerhalb der entsprechenden Altersgruppe mittels eines zweiseitigen Mann-Whitney-Tests untersucht.

## **IV. ERGEBNISSE**

In der vorliegenden Studie wurden insgesamt 161 Wildschweine auf das Vorkommen von PEDV untersucht. Davon wurden 99 Tiere im ersten Teil der Studie und 62 Tiere im zweiten Teil der Studie beprobt. Weiterhin wurden im zweiten Studienteil 12 Gülleproben aus einem PEDV-positiven Bestand untersucht.

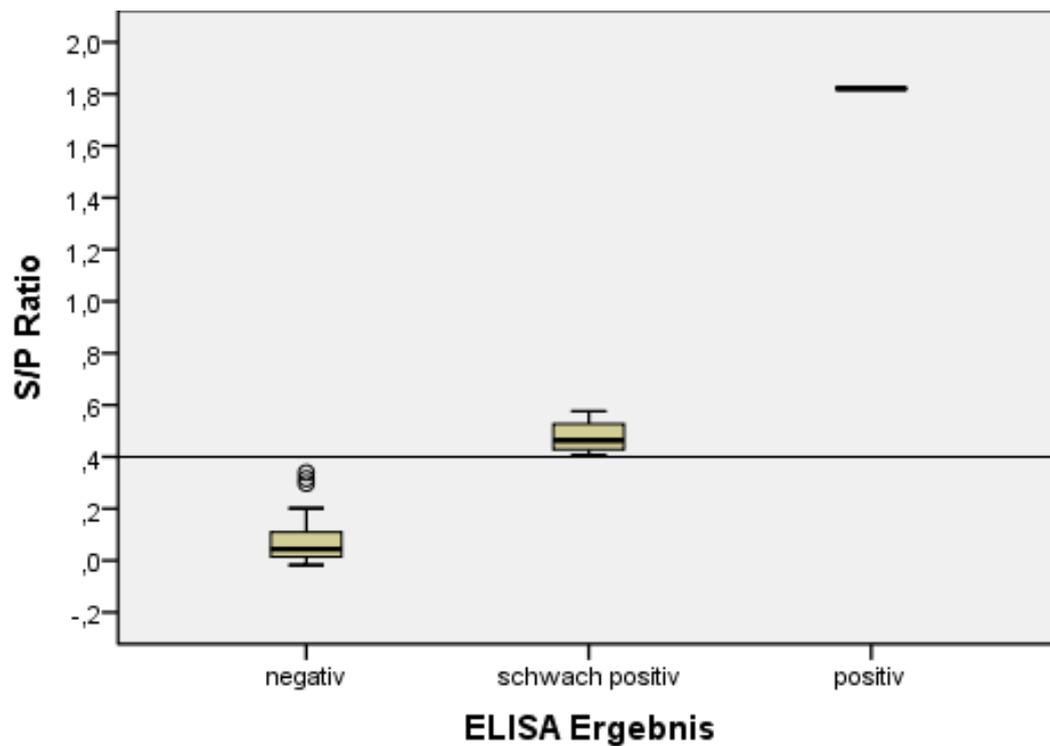
### **1. Studienteil 1: Vorkommen von PEDV bei Wildschweinen in Süddeutschland**

#### **1.1. PCR**

Um das Vorkommen von PEDV bei Wildschweinen in Süddeutschland zu untersuchen, wurden im ersten Studienteil 99 erlegte Wildschweine beprobt. Von 97 der 99 beprobten Tiere konnte eine Kotprobe gewonnen werden. Diese Kotproben wurden mittels qRT-PCR auf PEDV-RNA untersucht. Insgesamt konnte bei keiner der 97 untersuchten Kotproben PEDV-spezifische RNA mittels qRT-PCR nachgewiesen werden.

#### **1.2. ELISA**

Für die Untersuchung der gewonnenen Serumproben auf PEDV-spezifische Antikörper wurden Proben von Tieren ausgewählt, deren Erlegungsort im Umkreis von 15 km um PEDV-Ausbrüche bei Hausschweinebeständen lag. Hierbei konnten 65 Tiere in die Untersuchung einbezogen werden. Die Serumproben dieser Tiere wurden mittels ELISA auf PEDV-spezifische Antikörper untersucht. Bei 7,7 % der Tiere (5/65) konnten PEDV-spezifische Antikörper nachgewiesen werden. 1,5 % der Proben (1/65) war als positiv zu werten mit einer S/P Ratio von 1,821. Bei 6,2 % der Wildschweine (4/65) ergab sich eine S/P Ratio von  $>0,4$  und  $<0,6$ , was als schwach positiv interpretiert wurde. Alle anderen Proben (92,3 %, 60/65) hatten eine S/P Ratio  $<0,4$  und wurden als negativ gewertet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 5 ersichtlich.



**Abbildung 5: PEDV-Antikörper gemessen in Serumproben aus Studienteil 1 mittels ELISA (Swinecheck® PED indirect, Biovet). Cut-off = 0,4, n = 65**

Von den fünf im ersten Studienteil positiv getesteten Proben stammten zwei positive Proben aus dem Jagdjahr 2015/2016 und drei positive Proben aus dem Jagdjahr 2016/2017. Im Jagdjahr 2014/2015 konnten hingegen bei keiner der untersuchten Proben PEDV-spezifische Antikörper nachgewiesen werden.

Bezüglich der Altersverteilung der in Studienteil 1 mittels ELISA positiv getesteten Tiere ist festzustellen, dass zum Zeitpunkt der Erlegung drei Tiere <12 Monate alt waren, ein Tier 1 - 2 Jahre und ein Tier >2 Jahre.

## **2. Studienteil 2: Übertragung von PEDV über Gülle**

### **2.1. Gülleuntersuchung mittels PCR**

Um nachzuweisen, wie lange PEDV in Gülle nachweisbar ist, wurde während eines Zeitraumes von 11 Wochen die Gülle eines im Frühjahr 2016 positiv auf PEDV getesteten Betriebs im Abstand von jeweils einer Woche insgesamt zwölfmal untersucht. Die gewonnenen Proben wurden anschließend mittels PEDV real-time RT-PCR auf PEDV-RNA untersucht.

Alle zwölf untersuchten Gülleproben waren PEDV-positiv. Der niedrigste gemessene Ct-Wert lag bei 26,0 (Tag 21) und der höchste betrug 32,0 (Tag 7).

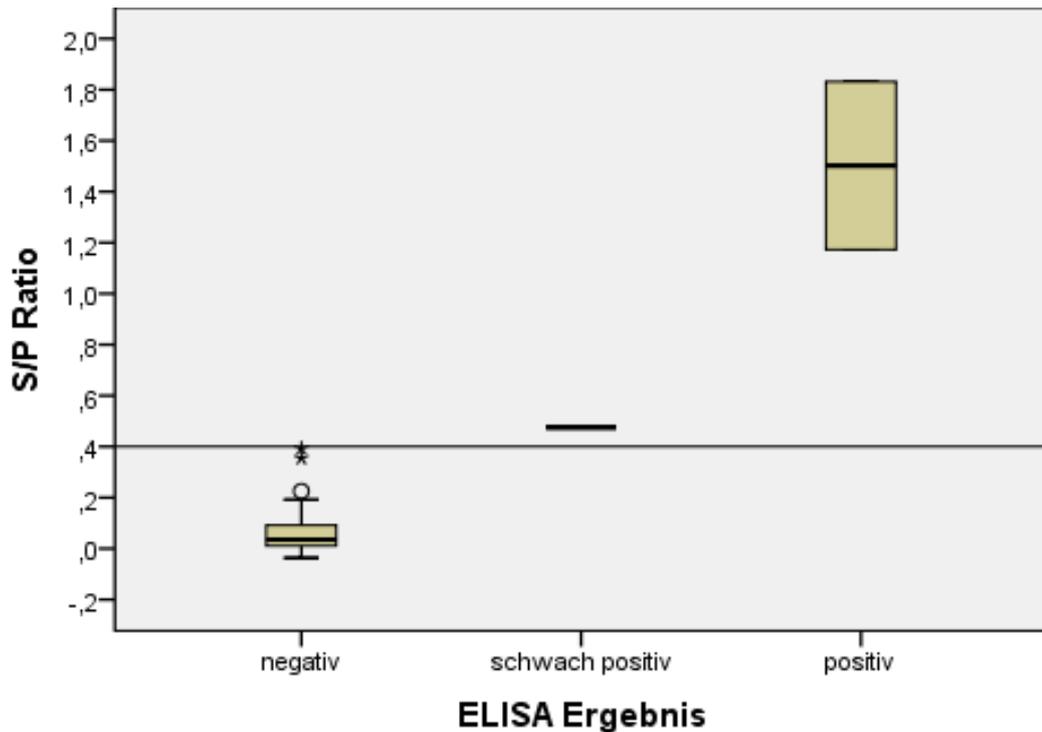
### **2.2. Treib- und Ansitzjagden**

#### **2.2.1. PCR**

Im zweiten Studienteil konnten im Rahmen von Treibjagden und gezielter Ansitzjagd 62 Tiere in einem Bezirk von 15 km Radius um den betroffenen Betrieb beprobt werden. Die Proben des zweiten Studienteils stammen ausschließlich aus dem Jagdjahr 2016/2017. Von allen 62 Tieren konnten Kotproben gewonnen werden. Diese Kotproben wurden mittels qRT-PCR auf PEDV-RNA untersucht. Bei keiner der 62 untersuchten Kotproben konnte PEDV-RNA nachgewiesen werden.

#### **2.2.2. ELISA**

Von 61 der 62 im zweiten Studienteil beprobten Wildschweine konnten Blutproben gewonnen werden. Diese wurden mittels ELISA untersucht. Insgesamt konnten im zweiten Studienteil bei 4,9 % der Proben (3/61) PEDV-spezifische Antikörper nachgewiesen werden. Alle positiven Tiere waren <12 Monate alt. 2 der 61 Proben (3,3 %) wiesen eine S/P Ratio von 1,832 bzw. von 1,173 auf und waren als positiv zu werten. Bei einer 1,6 % der Proben (1/61) wurde ein schwach positives Ergebnis mit einer S/P Ratio von 0,475 gemessen. Alle anderen Proben (95,1 %, 58/61) hatten eine S/P Ratio <0,4 und wurden als negativ gewertet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 6 ersichtlich.



**Abbildung 6: PEDV-Antikörper gemessen in Serumproben aus Studienteil 2 mittels ELISA (Swinecheck® PED indirect, Biovet). Cut-off = 0,4, n = 61**

Der zeitliche Abstand zwischen der Ausbringung PEDV-haltiger Gülle (Frühjahr 2016) bzw. potenziell PEDV-haltiger Gülle (Herbst 2016) und dem Abschuss der im ELISA positiv getesteten Tiere wurde in Tabelle 3 dargestellt.

**Tabelle 3: Zeitlicher Abstand zwischen Gülleausbringung und Nachweis von PEDV-Antikörpern bei Wildschweinen**

Probenbezeichnung	Erlegungsdatum	Zeitlicher Abstand zur letzten Gülleausbringung	ELISA-Ergebnis
WS 102	05.05.2016	22d	Positiv
WS 307	26.11.2016	59d	Positiv
WS 341	03.12.2016	66d	Schwach positiv

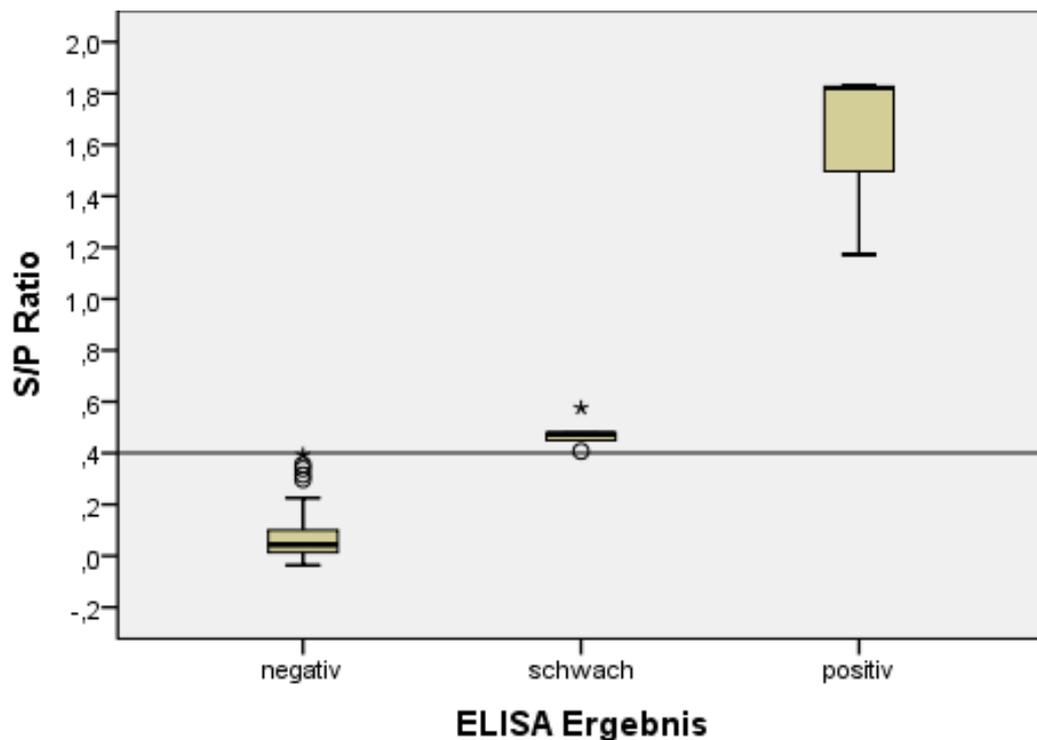
### **3. Zusammenfassung der Untersuchungsergebnisse aus beiden Studienteilen**

#### **3.1. PCR**

Während des Zeitraumes von drei Jagdjahren wurde in beiden Studienteilen insgesamt 161 Wildschweine beprobt. Von 159 Tieren konnte jeweils eine Kotprobe gewonnen werden. Mittels der durchgeführten qRT-PCR konnte in keiner der Kotproben PEDV-spezifische RNA nachgewiesen werden.

#### **3.2. ELISA**

In der vorliegenden Studie wurden insgesamt 126 Serumproben auf PEDV-spezifische Antikörper untersucht. Bei 6,3 % der Proben (8/126) waren PEDV-spezifische Antikörper nachweisbar. 4,0 % der Proben (5/126) erreichten eine S/P Ratio von  $>0,4$  und  $<0,6$ , sodass diese als schwach positiv galten, bei 2,4 % der Proben (3/126) lag die S/P Ratio bei Werten zwischen 1,173 und 1,832, sodass diese Ergebnisse als positiv zu werten waren. Bei 93,7 % der Proben (118/126) konnten keine PEDV-spezifischen Antikörper nachgewiesen werden. Die gemessene S/P Ratio aller in Studienteil 1 und 2 untersuchten Proben ist in Abbildung 7 dargestellt.



**Abbildung 7: PEDV-Antikörper gemessen in Serumproben aus beiden Studienteilen mittels ELISA (Swinecheck® PED indirect, Biovet) Cut-off = 0,4, n = 126**

#### 4. Auswertung des Fragebogens

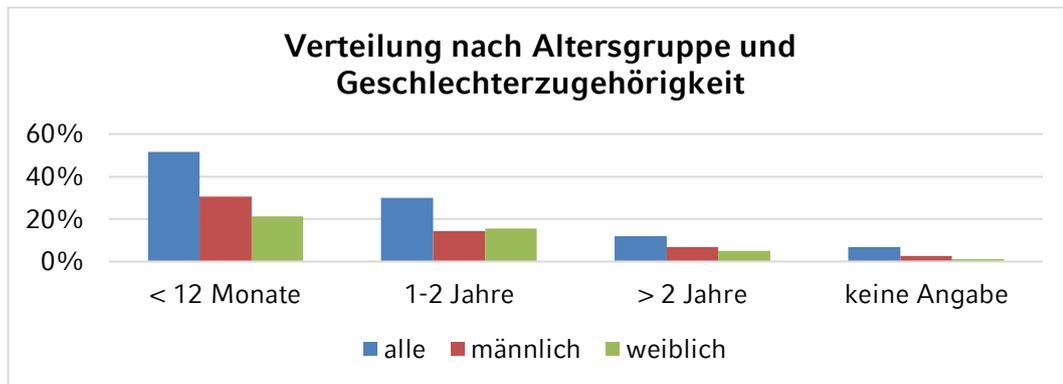
Mithilfe eines Fragebogens, der als Probenbegleitschreiben den versendeten Probenkits beigelegt war, beziehungsweise bei den Treibjagden persönlich ausgefüllt wurde, konnten Angaben zum Geschlecht, Alter und Gewicht der erlegten Wildschweine sowie zum Jagdjahr und der Region, in der sie erlegt wurden, erhoben werden. Im Verlauf der vorliegenden Studie konnten Daten von insgesamt 161 Wildschweinen erhoben werden.

##### 4.1. Geschlecht und Alter

Von den 161 beprobten Wildschweinen waren 87 Tiere männlich und 69 Tiere weiblich. Bei fünf Tieren war das Geschlecht nicht angegeben.

Die folgende Abbildung 8 zeigt die Verteilung aller beprobten Tiere nach Altersgruppe und Geschlechterzugehörigkeit. Die <12 Monate alten Tiere stellten die größte Altersgruppe mit 51,6 % dar. Bei den <12 Monate alten Tieren handelte es sich um 30,4 % männliche und 21,1 % weibliche Tiere. In der Altersgruppe 1 - 2 Jahre (29,8 %) waren es 14,3 % männliche und 15,5 %

weibliche Tiere. Zur quantitativ kleinsten Altersgruppe mit >2 Jahren (11,8 %) gehörten 6,8 % männliche und 5,0 % weibliche Tiere. Von 6,8 % der untersuchten Tiere gab es keine Altersangabe, davon waren 2,5 % männlich und 1,2 % weiblich. Bei insgesamt 3,1 % aller beprobten Tiere lagen weder Informationen zum Geschlecht noch zum Alter vor.



**Abbildung 8: Häufigkeit des Geschlechts aller erlegten Wildschweine, n = 161**

Von den acht Tieren, bei denen PEDV-spezifische Antikörper mittels ELISA nachgewiesen werden konnten, waren sechs Tiere männlich und zwei Tiere weiblich. Mittels Exakten Tests nach Fisher konnte kein statistisch signifikanter Zusammenhang ( $p = 0,273$ ) zwischen dem Geschlecht der Tiere und dem Antikörpernachweis im ELISA festgestellt werden.

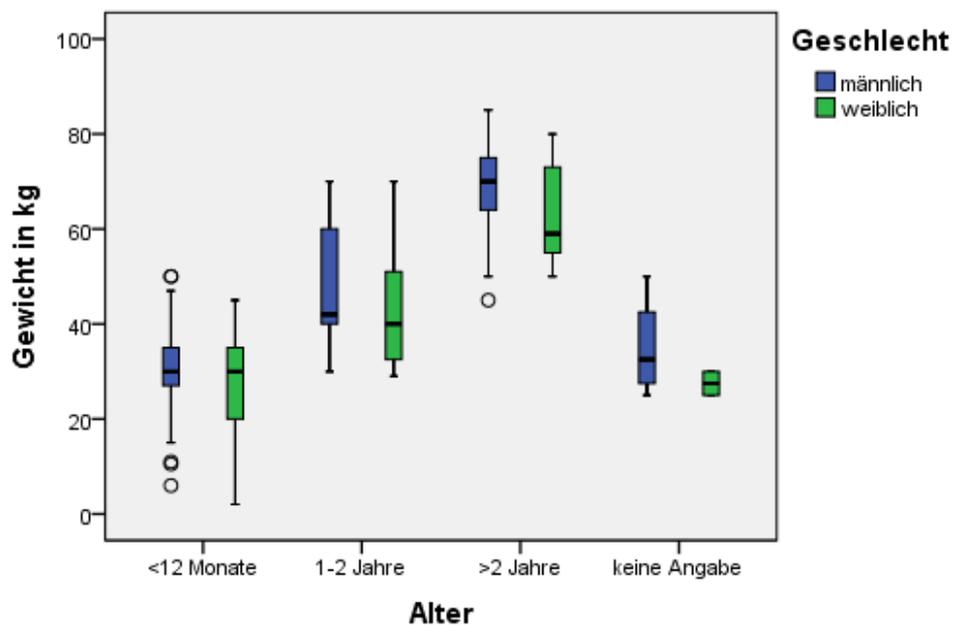
Sechs der acht PEDV-positiven Proben stammten von <12 Monate alten Tieren, jeweils ein Tier war 1 - 2 Jahre bzw. >2 Jahre alt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 dargestellt. Es konnte festgestellt werden, dass der Nachweis von Antikörpern mittels ELISA nicht signifikant mit dem Alter der Tiere assoziiert ist ( $p = 0,585$ ).

**Tabelle 4: Ergebnis des PEDV-Antikörper-Nachweises mittels ELISA in den jeweiligen Altersgruppen, n = 126**

	Negativ	Schwach positiv	Positiv	Gesamt
<12 Monate	65	3	3	71
1-2 Jahre	37	1	0	38
>2 Jahre	15	1	0	16
Keine Angabe	1	0	0	1
Gesamt	118	5	3	126

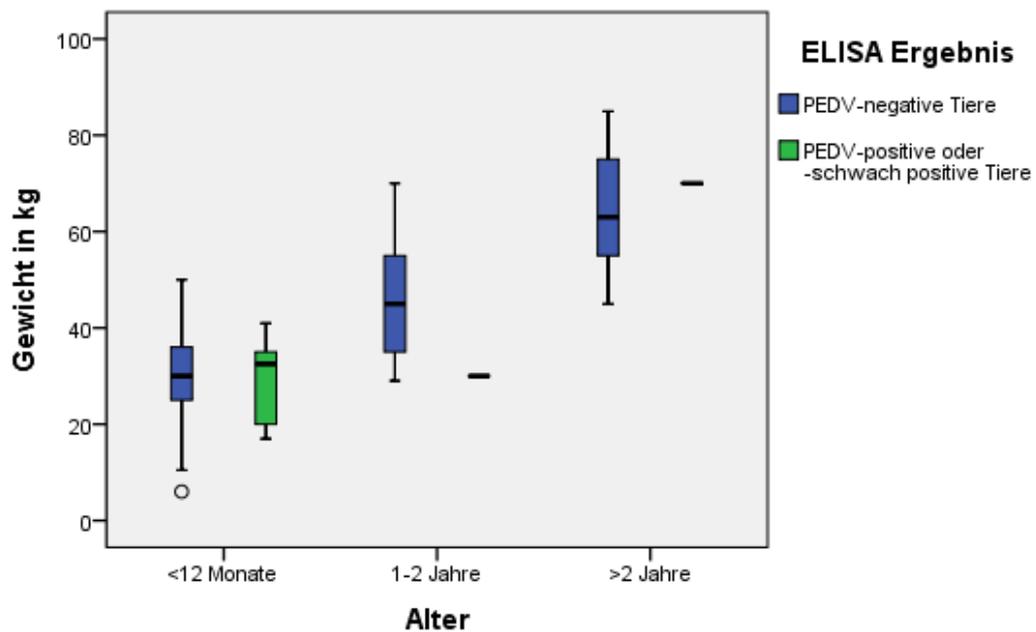
#### 4.2. Gewicht

Das durchschnittliche Gewicht aller beprobten Wildschweine betrug 39,1 kg. Männliche Tiere wogen im Mittel 40,2 kg, weibliche Tiere 37,8 kg. Die durchschnittliche Gewichtsverteilung der untersuchten Tiere nach Altersgruppen (<12 Monate, 1 - 2 Jahre, >2 Jahre) ist in Abbildung 9 ersichtlich.



**Abbildung 9: Darstellung des Gewichts aller in beiden Studienteilen untersuchten Tiere, n = 161**

Das Körpergewicht der im ELISA positiv getesteten Tiere liegt in allen drei Altersgruppen innerhalb der Gewichtsspanne der negativ getesteten Tiere. Für die Altersgruppe <12 Monate wurde ein Mann-Whitney-Test durchgeführt, in dem sich kein signifikanter Unterschied in der zentralen Tendenz des Gewichts zwischen den Gruppen von Tieren mit negativem und positivem Antikörpernachweis im ELISA zeigt ( $p = 0,905$ ). In den Altersgruppen 1 - 2 Jahre und >2 Jahre wurde aufgrund jeweils nur einer positiven Beobachtung auf einen statistischen Test verzichtet (Abbildung 10).



**Abbildung 10: Darstellung des Gewichts der in beiden Studienteilen untersuchten Tiere, n = 161**

### 4.3. Jagdjahr

Von den in beiden Studienteilen mittels ELISA untersuchten PEDV-positiven Proben fiel keine (0/2) auf das Jagdjahr 2014/2015. Im darauffolgenden Jagdjahr 2015/2016 konnten in 11,8 % der Proben (2/17) PEDV-spezifische Antikörper detektiert werden, während im Jagdjahr 2016/2017 5,6 % der untersuchten Serumproben (6/107) positiv getestet wurden (Tabelle 5). Insgesamt waren demnach 6,3 % aller untersuchten Proben positiv im ELISA, was einen Anteil von 93,7 % (118/126) negativer Proben ergibt. Es besteht kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen dem Jagdjahr und dem Nachweis von Antikörpern im ELISA ( $p = 0,364$ ).

**Tabelle 5: Ergebnis des PEDV-Antikörper-Nachweises mittels ELISA in den jeweiligen Jagdjahren, n = 126**

	<b>Negativ</b>	<b>Schwach positiv</b>	<b>Positiv</b>	<b>Gesamt</b>
2014/2015	2	0	0	2
2015/2016	15	2	0	17
2016/2017	101	3	3	107
Gesamt	118	5	3	126

## V. DISKUSSION

### 1. Nachweis PEDV-spezifischer RNA mittels PCR

Im Rahmen der vorliegenden Studie sollten die akquirierten Proben mittels qRT-PCR auf PEDV-spezifische RNA untersucht werden. Die qRT-PCR ist eine sehr sensitive Methode zum Nachweis PEDV-spezifischer RNA (KIM et al., 2007). In der vorliegenden Studie wurden insgesamt 159 Einzelkotproben von Wildschweinen mittels PEDV qRT-PCR untersucht, wobei in keiner der Proben PEDV-spezifische RNA nachgewiesen werden konnte. Dies stimmt mit Beobachtungen aus Tschechien überein. Dort fiel im Jahre 2015 in einer Studie von MOUTELÍKOVÁ et al. (2016) der Nachweis von PEDV-spezifischer RNA aus 203 Kot- und Darmproben von Wildschweinen mittels RT-PCR negativ aus. Im Gegensatz zu oben genannten Befunden konnte in Südkorea in 9,8 % der untersuchten Kotproben (28/287) mittels RT-PCR PEDV-spezifische RNA nachgewiesen werden (LEE et al., 2016). Bei den von LEE et al. (2016) untersuchten Proben handelte es sich allerdings, im Unterschied zu oben genannten Untersuchungen, nicht um Einzelkotproben, sondern um Sammelkotproben aus den Wäldern, sodass nicht sichergestellt ist, dass nicht mehrere Proben von einem Tier stammen. Dies könnte die Aussagekraft der Nachweisrate vor dem Hintergrund der vermehrten Kotabsatzfrequenz im Krankheitsfall bei Hausschweinen möglicherweise relativieren. Als diskutablen Grund für fehlende RNA-Nachweise in der PCR in dieser Studie kann möglicherweise die bei einer PEDV-Infektion sehr diverse Ausscheidungsdynamik genannt werden, wie sie beim Hausschwein beobachtet werden kann. Aus Feldbeobachtungen und experimentellen Studien an Hausschweinen ist eine Ausscheidung des PED-Virus über den Kot über einen Zeitraum von 1 bis 16 Tagen p.i. bekannt (CARVAJAL et al., 1995; DE ARRIBA et al., 2002a; KIM et al., 2007; MADSON et al., 2014; CRAWFORD et al., 2015; POONSUK et al., 2016). Darüber hinaus konnten NIEDERWERDER et al. (2016) sowie THOMAS et al. (2015a) bis 21 Tage bzw. 28 Tage p.i. positive Virusnachweise aus Kotproben führen. In China wurde von positiven Kotproben bis Tag 56 p.i. berichtet (SUN et al., 2014b). BJUSTROM-KRAFT et al. (2016) wiesen 69 Tage p.i. PEDV in individuellen Kotproben nach und

STADLER et al. (2015) gelang der Nachweis intermittierend bis zu fünfzehn Wochen nach Krankheitsausbruch in Sammelkotproben, wobei keine Einzeltierverfolgung stattgefunden hat. Eine intermittierende Ausscheidung oder eine verlängerte Ausscheidungsdauer könnte durch individuelles Management und stallbauliche Gegebenheiten sowie durch Koinfektionen begründet sein (STADLER et al., 2015). STADLER et al. (2018) wiesen neben kontinuierlicher auch eine intermittierende Virusausscheidung während der ersten 14 Tage nach Erkrankungsbeginn bei Mastschweinen nach. CRAWFORD et al. (2015) berichteten ebenfalls von diskontinuierlicher Ausscheidung, allerdings erst zwischen 14 und 43 Tagen p.i.. Die intermittierende Ausscheidung könnte laut CRAWFORD et al. (2015) ein Grund für die verlängerte Ausscheidungsdauer darstellen. Laut SUN et al. (2014b) könnte die fäkale Ausscheidung von PEDV über längere Zeit durch eine kontinuierliche Reinfektion über kontaminierte Stallluft begründet sein. Die effektive Infektionsdosis ist abhängig vom Alter der betroffenen Tiere (THOMAS et al., 2015a). Je jünger die Tiere, desto geringer ist die für eine erfolgreiche Infektion nötige Viruslast, wobei die Infektionsdosis selbst bei erfolgreicher Infektion keinen Einfluss auf den Verlauf der Erkrankung, oder die nachfolgend ausgeschiedene Virusmenge hat (THOMAS et al., 2015a). Sofern es zum Kontakt mit einer adäquaten Virusmenge gekommen ist, ist davon auszugehen, dass es bei naiven Tieren auch zu Virusausscheidung kommt. Möglicherweise befanden sich alle untersuchten Wildschweine außerhalb der beschriebenen Zeitfenster, sodass ein Nachweis zwar grundsätzlich möglich gewesen wäre, aber nicht zum richtigen Zeitpunkt stattgefunden hat. Weiterhin ist über die Ausscheidungsdynamik von PEDV speziell bei Wildschweinen nichts bekannt, weshalb nicht sicher ist, ob die für Hausschweine beschriebenen Temporalparameter auf Wildschweine zutreffen.

## 2. Nachweis PEDV-spezifischer Antikörper mittels ELISA

Im Falle einer PEDV-Infektion können bei Hausschweinen verschiedene Antikörper-Isotypen nachgewiesen werden (CARVAJAL et al., 1995; GERBER et al., 2014a; OKDA et al., 2015). Es gibt sowohl ältere ELISAs auf Basis des kompletten Virus (HOFMANN & WYLER, 1990; OH et al., 2005) als auch neuere ELISAs auf Basis einzelner Proteine wie des N-Proteins (HOU et al., 2007; FAN et al., 2015; OKDA et al., 2015), S-Proteins (LI et al., 2015) oder der S1-Untereinheit (GERBER et al., 2014a; GERBER & OPRIESSNIG, 2015). Auf dem S-Protein bzw. auf der S1-Untereinheit basierende ELISAs weisen eine sehr hohe Sensitivität (100 %) und Spezifität (94 %) auf und erzeugen reproduzierbare Ergebnisse (GERBER et al., 2014a; LI et al., 2015). In Europa sind im Moment allerdings nur N-Protein-basierende ELISAs kommerziell erhältlich. Stadler et al. (2018) verglichen die beiden in Europa verfügbaren ELISAs miteinander: den in dieser Studie verwendeten ELISA (Swinecheck<sup>®</sup> PED indirect ELISA von Biovet Inc., St-Hyacinthe, Kanada) mit einem weiteren N-Protein-basierten ELISA (ID Screen<sup>®</sup> PEDV indirect ELISA von ID Vet Genetics, Grabels, Frankreich), wobei beide Tests eine starke Übereinstimmung ( $\kappa = 0,771$ .  $\kappa$  = Kappa-Koeffizient nach Cohen) aufwiesen. Von Kreuzreaktivitäten zu anderen Coronaviren, die die Spezifität der Tests beeinflussen könnten, wird zwar grundsätzlich berichtet, wobei bezüglich der diagnostischen Spezifität des hier verwendeten ELISAs Werte zwischen 97,5 % und 98,7 % angegeben werden (HOU et al., 2007; OKDA et al., 2015; GERBER et al., 2016b). Die Sensitivität des in dieser Studie genutzten Tests liegt zwischen 68,2 % und 98 % (HOU et al., 2007; OKDA et al., 2015; GERBER et al., 2016b). In der vorliegenden Studie fielen insgesamt 6,3 % der Proben (8/126) positiv aus. Die in dieser Studie positiv getesteten Proben wurden wiederholt und ergaben ein reproduzierbares Ergebnis, sodass falsch positive Ergebnisse aufgrund zufälliger Kontamination während des Untersuchungsvorganges als eher unwahrscheinlich einzustufen sind. Daraus ist zu schlussfolgern, dass sich die in der vorliegenden Studie untersuchten, im ELISA positiv getesteten Tiere im Laufe ihres Lebens mit PEDV infiziert haben.

Ein Nachweis von PEDV-spezifischen Antikörpern ist mittels ELISA im Serum von Hausschweinen etwa eine Woche nach dem Auftreten erster klinischer

Symptome möglich (OKDA et al., 2015; BERTASIO et al., 2016; STADLER et al., 2018). OKDA et al. (2015) berichteten ab Tag 6 - 9 p.i. von einer Serokonversion und einem Nachweis von PEDV-spezifischem IgG bei zum Zeitpunkt der Infektion vier Wochen alten Tieren. In der Studie von STADLER et al. (2018) konnte IgG bei Mastschweinen zuverlässig ab dem siebten Krankheitstag, bei Saugferkeln erst ab dem zehnten Tag nach Beginn klinischer Symptome erfolgen. Darüber hinaus gelang STADLER et al. (2018) der Nachweis von IgG nicht bei allen erkrankten Saugferkeln. OKDA et al. (2015) konnten nach Infektion vier Wochen alter Ferkel bis Tag 43 p.i. Immunglobuline der Klasse G im Blut der Tiere detektieren, BERTASIO et al. (2016) führen auch am 61. - 97. Lebenstag unmittelbar postnatal klinisch erkrankter Ferkel einen positiven Antikörpernachweis mittels In-House-Vollvirus-ELISA. STADLER et al. (2018) wiesen in ihrer Studie bei Saugferkeln auch 105 Tage nach Krankheitsbeginn noch Antikörper im Serum nach, während bei Mastschweinen die Messung am 63. Tag nach Untersuchungsbeginn endete, wobei auch hier noch bei bis zu 54,3 % der untersuchten Tiere der Antikörpernachweis aus dem Serum gelang. STADLER et al. (2018) begründeten die geringere Serokonversionsrate bei Saugferkeln (52,9 %) im Vergleich zu Mastschweinen (100 %) mit dem möglicherweise noch unausgereiften Immunsystem der Saugferkel. GERBER et al. (2016a) wiesen nach, dass das Immunsystem acht Wochen alter Ferkel deutlich leistungsfähiger ist als das zehn Tage alter Saugferkel.

In der vorliegenden Studie waren 51,6 % der erlegten Tiere <12 Monate alt, 29,8 % 1 - 2 Jahre und 11,8 % waren >2 Jahre alt. Von 6,8 % der Tiere ist das Alter nicht bekannt. Diese Altersverteilung korreliert mit der natürlichen Alterspyramide sowie den jagdlichen Vorgaben zur Bejagung von Schwarzwild (MEYNHARDT, 1989a; POHLMAYER, 2007). Das junge Alter der Mehrzahl der erlegten Tiere könnte also aufgrund der geringeren Immunkompetenz von Jungtieren und der daraus möglicherweise resultierenden geringeren Serokonversionsrate (GERBER et al., 2016a; STADLER et al., 2018) eine Ursache für die relativ niedrige Nachweisrate in dieser Altersgruppe darstellen. Lediglich drei positive und fünf schwach positive Ergebnisse entfallen auf insgesamt 126 untersuchte Proben. Betrachtet man jedoch das mittlere Gewicht aller Tiere der Altersgruppe <12 Monate (30,3 kg), ist davon

auszugehen, dass der Großteil dieser Tiere bereits >8 Wochen alt war und es somit zu einer mittels ELISA detektierbaren Immunantwort kommen konnte. Gegen diese Argumentation sprechen allerdings Studienergebnisse aus Italien, die von einer Serokonversion bei allen in der Studie mit PEDV exponierten Saugferkeln berichten (BERTASIO et al., 2016). In der Studie von BERTASIO et al. (2016) wurde aber ein In-House-Vollvirus-ELISA verwendet, was eine annehmbare Erklärung für abweichende Ergebnisse darstellen könnte. Ein möglicher Zusammenhang zwischen dem Geschlecht der Tiere und der Suszeptibilität für eine PEDV-Infektion wurde in der vorliegenden Studie zwar untersucht, aufgrund der geringen Stichprobenzahl war aber kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen Geschlecht und PEDV-Antikörpernachweis im ELISA festzustellen.

In der Literatur ist beschrieben, dass es bei Hausschweinen, die eine PEDV-Infektion überstehen, zu Kümmerern kommt (HESS et al., 1980; MADSON et al., 2014). Dies konnte in der vorliegenden Studie nicht bestätigt werden. Die Gewichte der im ELISA positiv auf PEDV-Antikörper getesteten Wildschweine lagen im selben Bereich wie das der im ELISA negativ getesteten Tiere der jeweiligen Altersgruppe. Da die Gewichtsspannen sowie die zugehörigen Altersgruppen allerdings sehr variabel sind und die Gewichts- und Altersangaben zu den einzelnen Tieren zudem Schätzwerte sind, ist nicht auszuschließen, dass ein geringeres Gewicht erkrankter Tiere in der vorliegenden Studie nicht korrekt erfasst werden konnte.

### 3. Gülleuntersuchung

In Deutschland ist in der Schweinehaltungshygieneverordnung (SCHHALTHYGV, 2014) vorgeschrieben, dass Dung mindestens drei sowie flüssige Abgänge mindestens acht Wochen gelagert werden müssen, bevor sie den Betrieb verlassen; entsprechend große Lagerkapazitäten müssen vorhanden sein. Für die bodennahe Ausbringung auf landwirtschaftlich genutzten Flächen sind keine Lagerungsfristen vorgegeben (SCHHALTHYGV, 2014). Weiterhin ist gesetzlich vorgeschrieben, dass Dung, Einstreu und Futter vor Wildschweinen gesichert gelagert werden müssen (SCHHALTHYGV, 2014).

In der vorliegenden Studie konnte PEDV-spezifische RNA über 80 Tage hinweg mittels qRT-PCR in der Gülle nachgewiesen werden. Die Interpretation der Ct-Werte erfolgte analog zur Interpretation der Ct-Werte aus den Kotproben-Untersuchungen mittels PCR in den Studienteilen 1 und 2. Die semiquantitativ bestimmte Viruslast unterliegt während dieser 80 Tage Schwankungen. Die Ct-Werte liegen zwischen 26,0 und 32,0. Dies führt bei Ct-Werten  $<30$  zu einer Interpretation als positiv und bei Ct-Werten  $\geq 30$  zu einer Interpretation als schwach positiv. Eine Aussage über die Infektiosität der Gülle kann allerdings nicht getroffen werden, da im Rahmen der Studie kein Infektionsversuch durchgeführt wurde. Von der University of Manitoba konnte in Lagunen auch nach neun Monaten noch infektiöses Virus nachgewiesen werden (AASV, 2016). TUN et al. (2016) berichteten sogar von einer Zunahme der Viruslast während einer Untersuchung von Güllelagunen über neun Monate, wobei jedoch die Infektiosität stetig abnahm. Es wird von einer Replikation in einem noch unbekanntem Wirt ausgegangen, in dessen Körper es zu einer Weiterentwicklung mit gleichzeitiger Abschwächung des Virus gekommen sein muss (TUN et al., 2016). KHATRI (2015) wies eine Replikation von PEDV in den Darmepithelzellen von Enten nach, die deshalb als biologische Vektoren fungieren können, bisher aber noch nicht als Reservoir gelten (TUN et al., 2016).

Kombiniert man diese Erkenntnisse mit den Ergebnissen der vorliegenden Studie, ist davon auszugehen, dass auch hier potenziell infektiöse Gülle auf die Felder gelangt ist, selbst wenn die vorgeschriebene Mindestlagerkapazität von acht Wochen (SCHHALTHYGV, 2014) eingehalten wurde. UV-Licht und

Wärmeeinstrahlung mindern die Infektiosität des Virus (AASV, 2016; TUN et al., 2016), weshalb häufiges Rühren der Gülle eine potenzielle Strategie zur Reduktion der Viruslast und der Infektiosität darstellen könnte (TUN et al., 2016). ALONSO et al. (2014) wiesen bereits Aerosolbildung und die Infektion naiver Hausschweine mittels infektiöser Stallluft nach. Geht man von einer Aerosolbildung bei der Ausbringung von infektiöser Gülle aus, wie es von der Universität Gent (UGENT, 2016) bereits als mögliches Risiko benannt wurde, ist eine Verbreitung infektiöser Viren auch außerhalb der mit Gülle gedüngten Bereiche möglich.

#### **4. Übertragung von PEDV**

Im Jahre 2014 kam es deutschlandweit zu einem gehäuften Auftreten von PEDV-Ausbrüchen in Hausschweinebeständen (HANKE et al., 2015; STADLER et al., 2015). Die Eintragsquelle ist, wie auch in den USA 2013 (WILLIAMSON et al., 2013), bisher nicht bekannt (HANKE et al., 2015). Bezüglich möglicher Übertragungswege zwischen Hausschweinebeständen wurden in vorausgegangenen Studien verschiedene potenzielle Vektoren diskutiert:

Grundsätzlich ist die fäkale Ausscheidung und orale Aufnahme des Virus für eine Übertragung und Infektion ausschlaggebend (EFSA, 2014). Als Eintragsquellen sind einerseits der Zukauf latent infizierter oder sich in der Inkubationsphase befindender Tiere zu nennen (WENDT et al., 2013; HENNINGER & SCHWARZ, 2014; STEINRIGL et al., 2015; STIEBRITZ, 2017). Darüber hinaus ist für einen Viruseintrag das Einstellen neuer, infizierter Tiere nicht zwingend notwendig. Die Übertragung über mechanische Vektoren kann durch verschmutzte Fahrzeuge, kontaminierte, betriebsfremde Stallkleidung oder einzelne Personen, die mehrere Betriebe betreten, erfolgen (WENDT et al., 2013; LOWE et al., 2014). Auch Schädner, Hunde, Katzen und Vögel kommen als mechanische Vektoren infrage (SCHWEINEGESUNDHEITSDIENSTE, 2014; STIEBRITZ, 2017). Die Rolle von Futtermitteln (DEE et al., 2014; BOWMAN et al., 2015a) und sprühgetrocknetem Plasma (GERBER et al., 2014b; OPRIESSNIG et al., 2014; PASICK et al., 2014; PUJOLS & SEGALÉS, 2014) als Vektoren für PEDV konnte bisher nicht eindeutig geklärt werden. Die Übertragung über die Luft durch Aerosolbildung bei der Ausbringung infektiöser Gülle (UGENT, 2016) kann

nicht gänzlich ausgeschlossen werden (ALONSO et al., 2014; HESSE et al., 2014).

In der vorliegenden Studie lag der Fokus auf der Untersuchung des Vorkommens von PEDV bei Wildschweinen und der Übertragung zwischen Hausschweinen und Wildschweinen. Im ersten Studienteil sollte die Übertragung vom Wildschwein auf das Hausschwein beleuchtet werden, im zweiten Studienteil der Eintrag von PEDV über Gülle in die Wildschweinepopulation.

#### **4.1. Hypothese 1**

*Die Wildschweinpopulation in Süddeutschland kann Träger des PED-Virus sein und somit auch eine Rolle in der Infektionsdynamik der PED-Ausbrüche in süddeutschen Hausschweinebeständen im Jahr 2014 spielen.*

Für eine Übertragung von PEDV von Wildschweinpopulationen auf Hausschweinebestände bedarf es eines direkten Kontaktes zwischen einem infizierten Wildschwein oder dessen Fäzes sowie einem empfänglichen Hausschwein. Ein direkter Kontakt zwischen beiden Spezies ist nur im Falle von Auslaufhaltung der Hausschweine und wenn gleichzeitig die gesetzlichen Vorgaben (SCHHALTHYGV, 2014), die eine doppelte Umzäunung solcher Ausläufe vorschreiben, nicht eingehalten werden, möglich. In einer Studie der USDA (2015) wurden Serumproben von Wildschweinen mittels ELISA untersucht, da die Wildschweinpopulation als mögliche Eintragsquelle in die USA angesehen wurde. In keiner der 368 Serumproben konnten PEDV-spezifische Antikörper nachgewiesen werden (USDA, 2015). Das Habitat der auf dem europäischen Festland lebenden Wildschweine beschränkt sich nicht mehr nur, wie von MEYNHARDT (1989a) beschrieben, auf Wälder und Waldränder, sondern hat sich in den letzten Jahren auch auf Agrarland (FRACKOWIAK et al., 2013; KEULING et al., 2016) und dicht besiedelte Stadtgebiete (CAHILL & LLIMONA, 2004) ausgeweitet. Bezüglich des Bewegungsradius von Wildschweinen divergieren Expertenmeinungen sehr stark. Die beschriebenen Radien der Habitate werden mit 0,5 km bis 6 km (MEYNHARDT, 1989b; KEULING et al., 2008; PODGÓRSKI et al., 2013) beziffert. Gleichzeitig wurde aber auch von Abwanderung aus dem Geburtsgebiet über eine Strecke von bis zu 250 km berichtet (MEYNHARDT,

1989b). Abhängig vom räumlichen Abstand eines schweinehaltenden Betriebs zum Habitat einer mit PEDV infizierten Wildschweinrotte, steigt das Risiko des direkten Kontakts zwischen Wildschwein und Hausschwein und einer anschließenden Übertragung von PEDV.

Auch ohne einen direkten Kontakt zwischen Wildschwein und Hausschwein ist eine Übertragung mittels mechanischer Vektoren möglich. Das Befahren oder Betreten eines Hofes durch Fahrzeuge oder Fußgänger kann zu einer Kontamination mit infektiösem Wildschweinkot führen (LOWE et al., 2014). Mangelnde Hygiene oder die Nichteinhaltung der Biosicherheitsmaßnahmen in den Übergängen zwischen Schwarz- und Weißbereichen können dann zu einer Übertragung auf im Stall befindliche Hausschweine führen (STIEBRITZ, 2017). Auch Schädner, Katzen, Hunde und Vögel können als mechanische Vektoren fungieren, weshalb diesen Spezies der Zutritt zu den Stallungen verwehrt werden sollte (STIEBRITZ, 2017).

Im ersten Studienteil der vorliegenden Studie wurden Wildschweine in Baden-Württemberg und Bayern über drei Jagdjahre hinweg beprobt und die gewonnenen Serum- und Kotproben anschließend mittels PCR und ELISA untersucht.

Wie bereits in Kapitel V.1. diskutiert, konnte in keinem der drei Jagdjahre ein positiver Erregernachweis aus den Kotproben erfolgen. Die Gefahr einer Übertragung besteht nur, wenn infizierte Tiere infektiöses Virus über den Kot ausscheiden (EFSA, 2014). Demnach ist zu schlussfolgern, dass zum Zeitpunkt der Beprobung die in der Studie untersuchten Wildschweine keine Gefahr für umliegende Hausschweinebestände darstellten. Da das Zeitfenster, in welchem eine Virusausscheidung stattfindet, beim Hausschwein für gewöhnlich nur 1 - 16 Tage beträgt (CARVAJAL et al., 1995; DE ARRIBA et al., 2002a; KIM et al., 2007; MADSON et al., 2014; CRAWFORD et al., 2015; POONSUK et al., 2016), ist es allerdings nicht auszuschließen, dass diese Tiere vormals Ausscheider waren. Um diese Möglichkeit zu untersuchen, wurden zudem Serumproben der Wildschweine mittels ELISA untersucht. Im ersten Jagdjahr konnten keine positiven Proben im ELISA detektiert werden, was möglicherweise auch an der geringen Probenanzahl von nur zwei untersuchten Proben gelegen haben könnte. In den beiden darauffolgenden Jagdjahren konnten bei insgesamt 6,5 % der Tiere (8/124) PEDV-spezifische

Antikörper nachgewiesen werden. Dies bedeutet, dass die entsprechenden Tiere im Laufe ihres Lebens Kontakt mit PEDV gehabt haben müssen. Im zweiten Jagdjahr belief sich der Anteil positiver Proben auf 11,8 % (2/17), im dritten Jagdjahr auf 5,6 % der untersuchten Serumproben (6/107). Es wäre anzunehmen, dass es im Falle einer merklichen Verbreitung von PED in Wildschweinpopulationen zu einem deutlichen Anstieg der Nachweisrate im dritten Jahr gekommen wäre. Gleichzeitig wurden im ersten Jagdjahr (2014/2015), das direkt nach den ersten PED-Ausbrüchen im Jahre 2014 in Deutschland begann, bei keinem der untersuchten Tiere PEDV-spezifische RNA oder PEDV-spezifische Antikörper nachgewiesen. Auch wenn es aufgrund teilweise geringer Probenzahlen nicht gänzlich ausgeschlossen werden kann, ist es aufgrund dieser Feststellung als eher unwahrscheinlich anzusehen, dass die Wildschweinpopulation Süddeutschlands die ursächliche Eintragsquelle für PEDV-Infektionen in Hausschweinebestände darstellt.

Basierend auf den vorliegenden Ergebnissen kann Hypothese 1 weder bestätigt noch eindeutig widerlegt werden. Die mikrobiologischen Ergebnisse aus dem ersten Studienteil deuten eher auf eine Infektion der Wildschweine nach den Ausbrüchen in den Hausschweinpopulationen hin, was einen Widerspruch zur Hypothese darstellt.

## 4.2. Hypothese 2

*Durch die Ausbringung PEDV-positiver Gülle auf Grünflächen und Äcker kann es zur Übertragung des PED-Virus auf in der Umgebung lebende Wildschweinpopulationen kommen.*

Eine Übertragung von PEDV von Hausschweinebeständen auf Wildschweine ist theoretisch auf mehreren Wegen möglich. Wie bereits in V.4.1. beschrieben, kann ein direkter Kontakt zwischen Haus- und Wildschweinen dann entstehen, wenn Hausschweine in Auslaufhaltung leben und eine doppelte Umzäunung, wie in der Schweinehaltungshygieneverordnung (2014) vorgeschrieben, nicht vorhanden ist. Des Weiteren ist ein Transport der Viren über mechanische Vektoren wie Fahrzeuge und Personen möglich, wenn die Biosicherheitsvorkehrungen niedrig sind (LOWE et al., 2014), sodass mit PEDViren kontaminierter Kot aus dem Stall in die Umgebung gelangt. Infolge der oralen Aufnahme des Kotes (EFSA, 2014) durch umherstreifende Wildschweine kann es zu einer Infektion kommen. Auch Schadnager und andere Tiere können als Vektoren fungieren (STIEBRITZ, 2017).

Die Übertragung über die Luft wird kontrovers diskutiert. SUN et al. (2014b) wiesen PEDV in der Stallluft nach. ALVAREZ et al. (2016) halten eine Übertragung über die Luft durch Aerosolbildung für möglich. ALONSO et al. (2014) und BJUSTOM-KRAFT et al. (2016) untersuchten die Luft als Trägermedium für PEDV. Eine Übertragung auf naive Tiere über die Luft gelang nur ALONSO et al. (2014), was jedoch darauf hinweist, dass eine Übertragung auch auf Wildschweine nicht grundsätzlich auszuschließen ist. Bei der gleichzeitigen Untersuchung von Abluftproben PEDV-positiver Bestände konnte zwar bis zu zehn Meilen vom Betrieb entfernt PEDV-spezifische RNA nachgewiesen werden, jedoch wiesen die Proben keine Infektiosität auf (ALONSO et al., 2014).

Eine Verbreitung von PEDV in der Umwelt ist über die Gülle grundsätzlich möglich – zum einen über die direkte Ausbringung von Gülle auf die den Hof umgebenden Ackerflächen, zum anderen auch über Aerosolbildung. Eine Übertragung auf Wildschweine kann erfolgen, indem die Wildschweine das Virus oral aufnehmen (EFSA, 2014). Im Zuge nächtlicher Streifzüge über Felder oder teilweise auch über Höfe von Landwirten können Wildschweine mit dem Virus in Kontakt kommen.

In frischer Gülle bleibt das Virus bei Temperaturen zwischen -20 °C und +4 °C für mindestens 28 Tage (GOYAL, 2014) und bei Raumtemperatur bis +40 °C bis zu 28 Tage infektiös (MORRISON & GOEDE, 2014). In einer Studie von THOMAS et al. (2015b) wurde infektiöser Kot auf Aluminiumblechen getrocknet. Im Anschluss konnte nachgewiesen werden, dass es nach siebentägiger Trocknung des Kotes bei Raumtemperatur nicht mehr zur Infektion der anschließend mit dem Kot inokulierten naiven Versuchstiere kam (THOMAS et al., 2015b). Berücksichtigt man außerdem den viruziden Einfluss von UV-Strahlung (TUN et al., 2016), ist davon auszugehen, dass bei sonnigem Wetter zum Zeitpunkt der Ausbringung infektiöse Gülle nach einer Woche auf freiem Feld seine Infektiosität verloren haben sollte (THOMAS et al., 2015b; TUN et al., 2016). Ist das Wetter allerdings regnerisch, fehlt der Trocknungseffekt durch die Wärme der Sonne und die UV-Strahlung ist stark reduziert, sodass es durch das Fehlen bzw. die Abschwächung dieser viruziden Einflüsse (TUN et al., 2016) bei einem Kontakt zwischen Wildschwein und Gülle zu einer Infektion des Wildschweines kommen kann. Bei der Ausbringung der in dieser Studie untersuchten Gülle im Frühjahr war das Wetter eher kühl und wechselhaft und die Sonneneinstrahlung war der Jahreszeit entsprechend relativ gering. Im Herbst hingegen war das Wetter trocken mit vielen Sonnenstunden und warmen Temperaturen am Tag. Bei der Ausbringung im Frühjahr war die Gülle nachweislich PEDV-positiv. Über eine mögliche Infektiosität konnte keine Aussage gemacht werden. Im Herbst lag bereits ein zeitlicher Abstand von 44 Tagen zwischen der letzten Beprobung mit Virusnachweis und der Ausbringung. Insgesamt war diese Gülle also 124 Tage gelagert worden. Berücksichtigt man die Studienergebnisse der University of Manitoba (AASV, 2016) und von TUN et al. (2016) (siehe Kapitel V.3.), ist davon auszugehen, dass die ausgebrachte Gülle auch im Herbst noch infektiös war. Betrachtet man weiterhin die beschriebenen Wetterverhältnisse, ist daraus abzuleiten, dass die Infektiosität der ausgebrachten Gülle, falls sie zu diesem Zeitpunkt gegeben war, im Frühjahr potenziell länger bestanden haben könnte als im Herbst.

Wie auch im ersten Studienteil konnte auch im zweiten Studienteil kein Nachweis von PEDV-spezifischer RNA im Kot von Wildschweinen geführt werden. Im zweiten Studienteil wurden nur Wildschweine beprobt, die im

Umkreis von 15 km um den betroffenen Betrieb erlegt wurden. Im ELISA erwiesen sich 4,9 % der zweiten Studienteil untersuchten Proben (3/61) positiv und 95,1 % der Proben (58/61) negativ. Alle Tiere mit positivem Ergebnis waren <12 Monate alt, was aufgrund fehlender statistischer Signifikanz am ehesten mit der bereits in V.2. beschriebenen Altersaufteilung aller erlegten Tiere zusammenhängt.

Auch hier scheint es zu einem vorausgegangenen Erregerkontakt gekommen zu sein. Dieser lag vermutlich außerhalb des nachweisbaren Zeitfensters für den direkten Erregernachweis. Gleichzeitig ist die Nachweisrate für Serumantikörper relativ gering, weshalb nicht ausgeschlossen werden kann, dass ein Großteil der beprobten Tiere keinen Erregerkontakt hatte und deshalb mikrobiologisch keine Anzeichen für eine Infektion zu finden sind.

Auch bezüglich Hypothese 2 ist es abschließend nicht möglich, diese eindeutig zu bestätigen oder zu widerlegen. Eine Kontamination der Umgebung mit infektiösem Virus ausgehend von der Gülle ist sehr wahrscheinlich. Die Persistenz einer Infektiosität der Viren ist jedoch stark abhängig von Wettereinflüssen. Darüber hinaus sind das Verhalten und die Bewegungsmuster der in der Umgebung lebenden Wildschweine schwer vorherzusehen, sodass nicht zweifelsfrei festgestellt werden kann, ob es zu einer Übertragung von PED auf Wildschweine durch PEDV-haltige Gülle kam.

## VI. ZUSAMMENFASSUNG

Aufgrund des vermehrten Auftretens der Porzinen Epizootischen Diarrhoe in Deutschland im Jahre 2014 sollte die vorliegende Studie das Vorkommen von PED in süddeutschen Wildschweinpopulationen untersuchen und mögliche Übertragungswege zwischen Hausschweinebeständen und Wildschweinpopulationen evaluieren. Hierzu wurde die Studie in zwei Teile gegliedert.

Im ersten Studienteil wurde im Zeitraum von drei aufeinanderfolgenden Jagdjahren das Vorkommen von PED bei Wildschweinen in Süddeutschland mittels PCR aus 97 Kotproben von erlegten Wildschweinen untersucht. Anschließend wurden alle Wildschweine ausgewählt, die in einem Umkreis von zehn Kilometern um einen PEDV-positiven Hausschweinebestand erlegt worden waren. Die Serumproben dieser 65 Tiere wurden mittels ELISA auf PEDV-spezifische Antikörper untersucht.

Im zweiten Studienteil wurde die Gülle eines PEDV-positiven Hausschweinebestandes über den Zeitraum von elf Wochen einmal wöchentlich mittels PCR untersucht, um die Dauer der Nachweisbarkeit von PEDV in Gülle festzustellen. Nachdem zuvor bereits PEDV-positive Gülle dieses Betriebs auf die umliegenden Felder ausgebracht worden war, wurde zeitgleich zur Gülleuntersuchung auch mit einer Beprobung der im Umkreis von 15 Kilometern um den oben genannten Betrieb erlegten Wildschweine begonnen. 62 Kot- und 61 Serumproben dieser Wildschweine wurden anschließend mittels PCR und ELISA auf PEDV-spezifische RNA und PEDV-spezifische Antikörper untersucht.

Mittels qRT-PCR konnte in keiner der 159 in beiden Studienteilen untersuchten Kotproben PEDV-spezifische RNA nachgewiesen werden. Der Nachweis von PEDV-spezifischen Antikörpern gelang in Studienteil 1 bei 7,7 % der Tiere (5/65), in Studienteil 2 bei 4,9 % der Proben (3/61). Insgesamt konnten in 6,3 % der Proben (8/126) PEDV-spezifische Antikörper nachgewiesen werden.

Während eines Zeitraums von insgesamt 80 Tagen nach Ende des Güllezulaufes konnte bei jeder Untersuchung mittels qRT-PCR

PEDV-spezifische RNA detektiert werden.

Ein ursächlicher Eintrag von PEDV in Hausschweinebestände aus der Wildschweinpopulation scheint aufgrund der geringen Nachweisraten bei Wildschweinen eher unwahrscheinlich.

Über die Infektiosität der im zweiten Studienteil untersuchten PEDV-positiven Gülle kann keine Aussage getroffen werden, jedoch kann bei Betrachtung anderer Studienergebnisse von einer bestehenden Infektiosität ausgegangen werden. Die Ausbringung potenziell infektiöser Gülle sowie die Aerosolbildung und die damit verbundene Verbreitung des Virus ermöglicht grundsätzlich eine Infektion der in der Umgebung lebenden Wildschweine. Es kann jedoch nicht zweifelsfrei festgestellt werden, ob die Infektion der in der vorliegenden Studie PEDV-Antikörper-positiven Tiere auf eine Übertragung durch PEDV-haltige Gülle zurückzuführen ist.

## VII. SUMMARY

Since there has been an increased occurrence of PED in Germany in 2014, the present study's aim was to examine the incidence of PED in wild boar populations in southern Germany and to evaluate possible paths of transmission between domestic pig populations and wild boar populations. The study has been divided in two parts.

In the first part of the study, for the duration of three consecutive hunting years, the incidence of PED in wild boars in southern Germany was examined by means of PCR from 97 faeces samples of bagged wild boars. Afterwards, the wild boars were selected, that had been bagged in a vicinity of ten kilometres around a reportedly PEDV-positive domestic pig population. The serum samples of those 65 animals were analysed for PEDV-specific antibodies by ELISA.

In the second part of the study, manure from a PEDV-positive domestic pig population was sampled and examined for the presence of PEDV-specific RNA by PCR once a week during a period of eleven weeks to determine the duration of traceability of PEDV in manure. As this farm's PEDV-positive manure had already been extended on surrounding fields beforehand, sampling of bagged wild boars in the vicinity of 15 kilometres around the aforementioned farm was initiated contemporaneously to the examination of the farm's manure. Subsequently, 62 faeces samples and 61 serum samples of these wild boars were examined by means of PCR and ELISA to check for PEDV-specific RNA and PEDV-specific antibodies respectively.

Using qRT-PCR, PEDV-specific RNA could not be detected in any of the 159 faeces samples examined in both parts of the study. The presence of PEDV-specific antibodies was positively identified in 7.7 % of the animals (5/65) in the first part of the study and in 4.9 % of the samples (3/61) in the second part. In total, 6.3 % of the samples (8/126) were positive for PEDV-specific antibodies.

During a period of 80 days after stopping the flow of fresh manure into the manure reservoir, PEDV-specific RNA could be detected in every examination by means of qRT-PCR.

An introduction of PEDV into domestic pig populations from wild boar populations seems unlikely due to low detection rates in wild boars.

Regarding the infectivity of the manure tested in the second part of the study, a statement cannot be made, but taking other study results into account, persistent infectivity can be assumed. The extension of potentially infectious manure, aerosolisation and associated viral spread make an infection of wild boars living in the surroundings possible. However, it cannot be ascertained beyond doubt if the infection of this study's PEDV-positive animals has to be traced back to PEDV-positive manure.

## VIII. LITERATURVERZEICHNIS

AASV (American Association of Swine Veterinarians). PED survives long periods in stored manure but infectivity dissipates. 2016; <https://www.aasv.org/news/story.php?id=8709>. Zugriff am 26.10.2017.

Albina E, Mesplede A, Chenut G, Le Potier MF, Bourbao G, Le Gal S, Leforban Y. A serological survey on classical swine fever (CSF), Aujeszky's disease (AD) and porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus infections in French wild boars from 1991 to 1998. *Vet Microbiol* 2000; 77: 43-57.

Alborali LG, Boniotti B, Lavazza A. Surveillance and control of PED coronavirus in pig in Italy. International conference on swine enteric coronavirus diseases, 23. - 24. September 2014, Chicago, USA. 2014.

Almeida JD, Berry DM, Cunningham CH, Hamre D, Hofstad MS, Mallucci L, McIntosh K, Tyrrell DAJ. Coronaviruses. *Nature* 1968; 220: 650.

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

Alvarez J, Goede D, Morrison R, Perez A. Spatial and temporal epidemiology of porcine epidemic diarrhea (PED) in the Midwest and Southeast regions of the United States. *Prev Vet Med* 2016; 123: 155-160.

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

Beer M, Haas L. Direkter Erregernachweis bei Virusinfektionen. In:

Tiermedizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre, 10 edn. Selbitz H-J, Truyen U, Valentin-Weigand P, eds. Stuttgart: Enke Verlag 2015: 75-90.

Bertasio C, Giacomini E, Lazzaro M, Perulli S, Papetti A, Lavazza A, Lelli D, Alborali G, Boniotti MB. Porcine epidemic diarrhea virus shedding and antibody response in swine farms: A longitudinal study. *Front Microbiol* 2016; 7: 1-9.

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

Böhm R. Reinigung und Desinfektion in der Haltung von Wiederkäuern und Schweinen. In: *Reinigung und Desinfektion in der Nutztierhaltung und Veredelungswirtschaft*. Strauch D, Böhm R, eds. Stuttgart: Enke Verlag 2002: 65-122.

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

Bosch J, Rodriguez A, Iglesias I, Munoz MJ, Jurado C, Sanchez-Vizcaino JM, de la Torre A. Update on the risk of introduction of African swine fever by wild boar into disease-free European Union countries. *Transbound Emerg Dis* 2017; 64: 1424-1432.

Bowman AS, Krogwold RA, Price T, Davis M, Moeller SJ. Investigating the introduction of porcine epidemic diarrhea virus into an Ohio swine operation. *BMC Vet Res* 2015a; 11: 38.

Bowman AS, Nolting JM, Nelson SW, Bliss N, Stull JW, Wang Q, Premanandan C. Effects of disinfection on the molecular detection of porcine epidemic diarrhea virus. *Vet Microbiol* 2015b; 179: 213-218.

Cahill S, Llimona F. Demographics of a wild boar *Sus scrofa* Linnaeus, 1758 population in a metropolitan park in Barcelona. *Galemys* 2004; 16: 37-52.

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

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

Cellina S. Effects of supplemental feeding on the body condition and reproductive state of wild boar *Sus scrofa* in Luxembourg. PhD. 2008. University of Sussex.

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

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

Chung H-C, Nguyen VG, Moon H-J, Lee J-H, Park S-J, Lee G-E, Kim H-K, Noh Y-S, Lee C-H, Goede D, Park BK. Isolation of porcine epidemic diarrhea virus during outbreaks in South Korea, 2013–2014. *Emerg Infect Dis* 2015; 21: 2238-2240.

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

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

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

Cruz DJ, Kim CJ, Shin HJ. The GPRLQPY motif located at the carboxy-terminal of the spike protein induces antibodies that neutralize porcine epidemic diarrhea virus. *Virus Res* 2008; 132: 192-196.

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

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

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

De Arriba ML, Carvajal A, Pozo J, Rubio P. Isotype-specific antibody-secreting cells in systemic and mucosal associated lymphoid tissues and antibody responses in serum of conventional pigs inoculated with PEDV. *Vet Immunol Immunopathol* 2002a; 84: 1-16.

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

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

Dee S, Torremorell M, Thompson B, Deen J, Pijoan C. An evaluation of thermo-assisted drying and decontamination for the elimination of porcine reproductive and respiratory syndrome virus from contaminated livestock transport vehicles. *Can J Vet Res* 2005; 69: 58-63.

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

Deutscher Jagdverband. Jäger haben Hausaufgaben gemacht - Pressemitteilungen 19. Juni 2014. 2014; <https://www.jagdverband.de/content/j%C3%A4ger-haben-hausaufgaben-gemacht-0>. Zugriff am 24.10.2017.

Deutscher Jagdverband. Jahresstrecke Schwarzwild (Wildschweine) bis 2016/2017. 2017; <https://www.jagdverband.de/sites/default/files/2018-01%20Jahresstrecke%20Schwarzwild.jpg>. Zugriff am 27.02.2018.

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

Duarte M, Laude H. Sequence of the spike protein of the porcine epidemic

diarrhoea virus. *J Gen Virol* 1994; 75: 1195-1200.

EFSA (European Food Safety Authority). Scientific opinion on porcine epidemic diarrhoea and emerging porcine deltacoronavirus. *EFSA Journal* 2014; 12: 3877.

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

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

Feedstuffs. Research examines PEDv survivability, infectivity in lagoons - Daily News, Informa USA Inc. 2015; <http://www.feedstuffs.com/story-research-examines-pedv-survivability-infectivity-lagoons-45-129812>. Zugriff am 18.10.2017.

Frackowiak W, Gorczyca S, Merta D, Wojciuch-Ploskonka M. Factors affecting the level of damage by wild boar in farmland in north-eastern Poland. *Pest Manag Sci* 2013; 69: 362-366.

Geisser H, Reyer HU. Efficacy of hunting, feeding, and fencing to reduce crop damage by wild boars. *J Wildl Manage* 2004; 68: 939-946.

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

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

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

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

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

Gethöffer F, Sodeikat G, Pohlmeier K. Reproductive parameters of wild boar (*Sus scrofa*) in three different parts of Germany. *Eur J Wildl Res* 2007; 53: 287-297.

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

Gortazár C, Acevedo P, Ruiz-Fons F, Vicente J. Disease risks and overabundance of game species. *Eur J Wildl Res* 2006; 52: 81-87.

Gou H, Deng J, Wang J, Pei J, Liu W, Zhao M, Chen J. Rapid and sensitive detection of porcine epidemic diarrhea virus by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification combined with a vertical flow visualization strip. *Mol Cell Probes* 2015; 29: 48-53.

Goyal SM. Environmental stability of PEDV (porcine epidemic diarrhea virus). University of Minnesota. USA. 2014; <https://www.pork.org/research/environmental-stability-of-pedv-porcine-epidemic-diarrhea-virus/>. Zugriff am 26.10.2017.

Grasland B, Bigault L, Bernard C, Quenault H, Toulouse O, Fablet C, Rose N, Touzain F, Blanchard Y. Complete genome sequence of a porcine epidemic diarrhea s gene indel strain isolated in france in december 2014. *Genome Announc* 2015; 3: e00535-00515.

Groismaier A. Seroprävalenz von PRRSV, PCV2 und SIV in niederösterreichischen Wildschweinen. Diplomarbeit. 2011. Vet. Med. Univ. Wien.

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

Ha GW, Kang BK, Park SJ, Lee CS, Oh JS, Chai YG, Moon HJ, Park BK, Song DS. The colostral IgA level, but not the serum neutralization titer induced by immunization against porcine epidemic diarrhea virus is correlated with protection of new born piglets against virulent PEDV challenge. *Korean J Vet Public Health* 2010; 34: 53-58.

Hammer R. Untersuchung zum Vorkommen des Porzinen Reproduktiven und Respiratorischen Syndrom Virus und des Porzinen Circovirus Typ 2 bei Wildschweinen in Baden-Württemberg. Diss. Med. Vet. 2012. Vet. Med. Univ. Wien.

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

Hanke D, Pohlmann A, Sauter-Louis C, Hoper D, Stadler J, Ritzmann M, Steinrigl A, Schwarz BA, Akimkin V, Fux R, Blome S, Beer M. Porcine epidemic diarrhea in Europe: In-detail analyses of disease dynamics and molecular epidemiology. *Viruses* 2017; 9: 177.

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

Hess RG, Bollwahn W, Pospischil A, Heinritzi K, Bachmann PA. Neue Aspekte der Virusätiologie bei Durchfallerkrankungen des Schweines: Vorkommen von Infektionen mit dem Epizootischen Virusdiarrhoe- (EVD-) Virus. *Berl Münch Tierärztl Wochenschr* 1980; 93: 445-449.

Hesse D, Suddith A, Breazeale B, Fuller A, Concannon C, Anderson J, Nietfeld J, Bai J, An B, Peddireddi L, Oberst R, Kerrigan M, Niederwerder M, Chand R, Rowland B, Fang Y, Ransburgh R, Zhu L. Oral/nasal inoculation of four-week-old pigs with PEDV: tissue tropism, shedding, carriage, antibody response, and aerosol transmission. 23rd International Pig Veterinary Society Congress, Cancun, Mexico. 2014; 251.

Hofmann M, Wyler R. Propagation of the virus of porcine epidemic diarrhea in cell culture. *J Clin Microbiol* 1988; 26: 2235-2239.

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

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

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

Huang YW, Dickerman AW, Pineyro P, Li L, Fang L, Kiehne R, Opriessnig T, Meng XJ. Origin, evolution, and genotyping of emergent porcine epidemic diarrhea virus strains in the United States. *MBio* 2013; 4: e00737-00713.

ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses). The classification and nomenclature of viruses; Summary of results of meetings of the ICTV in Madrid, September 1975. *J Gen Virol* 1975; 31: 463-470.

ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses). Virus taxonomy: Classification and nomenclature of viruses. Ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier Academic Press. 2008; 36-37.

ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses). Virus taxonomy: 2016 release. 2016; <http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>. Zugriff am 23.01.2017.

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

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

Keuling O, Stier N, Roth M. How does hunting influence activity and spatial usage in wild boar *Sus scrofa* L.?. *Eur J Wildl Res* 2008; 54: 729-737.

Keuling O. Schwarzwildbejagung an Kirtungen: Mittel zum Zweck. *Niedersächsischer Jäger* 2015; 2015: 44-47.

Keuling O, Strauss E, Siebert U. Regulating wild boar populations is "somebody else's problem"! - Human dimension in wild boar management. *Sci Total Environ* 2016; 554-555: 311-319.

Khatri M. Porcine epidemic diarrhea virus replication in duck intestinal cell line. *Emerg Infect Dis* 2015; 21: 549-550.

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

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

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

Kim SH, Lee JM, Jung J, Kim IJ, Hyun BH, Kim HI, Park CK, Oem JK, Kim YH, Lee MH, Lee KK. Genetic characterization of porcine epidemic diarrhea virus in Korea from 1998 to 2013. *Arch Virol* 2015; 160: 1055-1064.

König M, Thiel H-J. Familie Coronaviridae. In: *Tiermedizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre*, 9 edn. Selbitz H-J, Truyen U, Valentin-Weigand P, eds. Stuttgart: Enke 2011: 580-598.

Laddomada A. Incidence and control of CSF in wild boar in Europe. *Vet Microbiol* 2000; 73: 121-130.

LAZBW (Landwirtschaftliches Zentrum Baden-Württemberg) - Wildforschungsstelle Aulendorf. Jagdstrecken Baden-Württemberg - Tabellarische Auflistung der Jagdstrecke der Wildarten in Baden-Württemberg ab 1954/55. 2017a; [www.lazbw.de/pb/,Lde/Startseite/Wildforschungsstelle/Jagdstatistik](http://www.lazbw.de/pb/,Lde/Startseite/Wildforschungsstelle/Jagdstatistik). Zugriff am 26.10.2017.

LAZBW (Landwirtschaftliches Zentrum Baden-Württemberg) - Wildforschungsstelle Aulendorf. Jagdbericht Baden-Württemberg für das Jagdjahr 2015/2016. 2017b; 22-25.

Lee C. Porcine epidemic diarrhea virus: An emerging and re-emerging epizootic swine virus. *Virol J* 2015; 12: 193.

Lee DU, Kwon T, Je SH, Yoo SJ, Seo SW, Sunwoo SY, Lyoo YS. Wild boars harboring porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) may play an important role as a PEDV reservoir. *Vet Microbiol* 2016; 192: 90-94.

Lee S, Lee C. Outbreak-related porcine epidemic diarrhea virus strains similar to US strains, South Korea, 2013. *Emerg Infect Dis* 2014; 20: 1223-1236.

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

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

Lin CN, Chung WB, Chang SW, Wen CC, Liu H, Chien CH, Chiou MT. US-like

strain of porcine epidemic diarrhea virus outbreaks in Taiwan, 2013-2014. *J Vet Med Sci* 2014; 76: 1297-1299.

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

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

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

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

Madson DM, Arruda PH, Magstadt DR, Burrough ER, Hoang H, Sun D, Bower LP, Bhandari M, Gauger PC, Stevenson GW, Wilberts BL, Wang C, Zhang J, Yoon KJ. Characterization of porcine epidemic diarrhea virus isolate US/Iowa/18984/2013 infection in 1-day-old cesarean-derived colostrum-deprived piglets. *Vet Pathol* 2016; 53: 44-52.

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

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

Meynhardt H. Schwarzwild-Bibliothek, Bd. 2, Das Revier. 1. edn. Neumann-Neudamm, Melsungen. 1989a; 3-57.

Meynhardt H. Schwarzwild-Bibliothek, Bd. 1, Biologie und Verhalten. 1. edn. Neumann-Neudamm, Melsungen. 1989b; 4-75.

Montenarh M. Replikation und Gentechnik. In: Biochemie und Pathobiochemie, eds. Berlin: Springer 2006: 219-253.

Morrison B, Goede D. Epidemiology and economic impact of PED. American Association of Swine Veterinarians (AASV), 45th Annual Meeting, Dallas, TX, USA. 2014; 605-612.

Moutelíková R, Dufková L, Kamler J, Drimaj J, Plhal R, Prodělalová J. Epidemiological survey of enteric viruses in wild boars in the Czech Republic: First evidence of close relationship between wild boar and human rotavirus A strains. *Vet Microbiol* 2016; 193: 28-35.

Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. 1982. *Biotechnology* 1992; 24: 17-27.

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

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

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

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

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

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

OMAFRA (Ontario Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs). OMAFRA News Release - porcine epidemic diarrhea investigation, 23 January 2014. 2014; <https://news.ontario.ca/omafra/en/2014/01/porcine-epidemic-diarrhea-investigation-in-ontario.html>. Zugriff am 02.05.2016.

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

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

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

Pensaert MB, de Bouck P. A new coronavirus-like particle associated with diarrhoea in swine. *Arch Virol* 1978; 58: 243-247.

Pensaert MB, Martelli P. Porcine epidemic diarrhoea: A retrospect from Europe and matters of debate. *Virus Res* 2016; 226: 1-6.

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

Podgórski T, Bas G, Jedrzejewska B, Sönnichsen L, Sniezko S, Jedrzejewski W, Okarma H. Spatiotemporal behavioral plasticity of wild boar (*Sus scrofa*) under contrasting conditions of human pressure: primeval forest and metropolitan area. *J Mammal* 2013; 94: 109-119.

Pohlmeyer K. Wildkunde (Haarwild/Federwild). In: Vor und nach der Jägerprüfung, 56 edn. Hespeler B, eds. München: BLV Buchverlag GmbH & Co. KG 2007: 126-137.

Poonsuk K, Gimenez-Lirola LG, Zhang J, Arruda P, Chen Q, Correa da Silva Carrion L, Magtoto R, Pineyro P, Sarmiento L, Wang C, Sun Y, Madson D, Johnson J, Yoon KJ, Zimmerman J, Main R. Does circulating antibody play a role in the protection of piglets against porcine epidemic diarrhoea virus? *PLoS One* 2016; 11: e0153041.

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

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

Province of Manitoba. Porcine Epidemic Diarrhea (PED) Virus. 2017; [www.gov.mb.ca/agriculture/animals/animal-health/porcine-epidemic-diarrhea.html](http://www.gov.mb.ca/agriculture/animals/animal-health/porcine-epidemic-diarrhea.html). Zugriff am 20.02.2018.

Pujols J, Segalés J. Survivability of porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) in bovine plasma submitted to spray drying processing and held at different time by temperature storage conditions. *Vet Microbiol* 2014; 174: 427-432.

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

Reiner G, Fresen C, Bronnert S, Willems H. Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) infection in wild boars. *Vet Microbiol* 2009; 136: 250-258.

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

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

Saif LJ, Pensaert MB, Sestak K, Yeo S-G, Jung K. Coronaviruses. In: *Diseases of Swine*, 10. edn. Zimmerman JJ, Karriker LA, Ramirez A, Schwartz KJ, Stevenson GW, eds. Chichester, West Sussex: Wiley-Blackwell 2012: 501-524.

Saif LJ. Passive immunity and vaccines for porcine epidemic diarrhea virus (PEDV): Lessons from the TGEV vaccines. *International Symposium on Emerging and Re-emerging Pig Diseases*, Kyoto, Japan. 2015; 10.

Sasaki Y, Alvarez J, Sekiguchi S, Sueyoshi M, Otake S, Perez A. Epidemiological factors associated to spread of porcine epidemic diarrhea in Japan. *Prev Vet Med* 2016; 123: 161-167.

SchHaltHygV. Verordnung über hygienische Anforderungen beim Halten von Schweinen (Schweinehaltungshygieneverordnung) in der Fassung der Bekanntmachung vom 2. April 2014, 2014. BGBl I S 326.

Schliesser T. Grundlagen der Desinfektion. In: Desinfektion in Tierhaltung, Fleisch- und Milchwirtschaft, 1. edn. Schliesser T, Strauch D, eds. Stuttgart: Enke Verlag 1981: 2-69.

Schweinegesundheitsdienste, AG Salmonellen. Salmonellen Leitfaden, Salmonellen beim Schwein - Beratungsempfehlungen der Schweinegesundheitsdienste (4. Auflage). 2014; <http://www.schweinegesundheitsdienste.de/sgd-arbeitsgruppen/ag-salmonellen.html>. Zugriff am 10.01.2018.

Smid B, Valicek L, Rodak L, Kudrna J, Musilova J. Detection of porcine epidemic diarrhea virus using electron microscopy in the Czech Republic. *Vet Med (Czech)* 1993; 38: 333-341.

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

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

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

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

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

Spindler B, Hartung J. Reinigung und Desinfektion. In: Diagnostik und Gesundheitsmanagement im Schweinebestand. Große Beilage E, Wendt M, eds. Stuttgart: Verlag Eugen Ulmer 2013: 53-74.

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

Stadler J, Moser L, Numberger J, Rieger A, Strutzberg-Minder K, Stellberger T, Ladinig A, Ritzmann M, Fux R. Investigation of three outbreaks of porcine epidemic diarrhea in Germany in 2016 demonstrates age dependent differences in the development of humoral immune response. *Prev Vet Med* 2018; 150: 93-100.

Stadler K, Maignani V, Eickmann M, Becker S, Abrignani S, Klenk HD, Rappuoli R. SARS - beginning to understand a new virus. *Nat Rev Microbiol* 2003; 1: 209-218.

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

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

Stiebritz C. Charakterisierung und klinische Verlaufsuntersuchung aktueller PEDV-Feldinfektionen in deutschen Schweinebeständen unter Berücksichtigung betriebsspezifischer Managementfaktoren. Diss. Med. Vet. 2017. LMU München.

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

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

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

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

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

Takahashi K, Okada K, Ohshima K. An outbreak of swine diarrhea of a new-type associated with coronavirus-like particles in Japan. *Jpn J Vet Sci* 1983; 45: 829-832.

Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipowski A, Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Mol Biol Evol* 2013; 30: 2725-2729.

Ter Beek V. New PED wave hits 56 places in Manitoba – and counting Pig Progress. 2017; [www.pigprogress.net/Health/Articles/2017/7/New-PED-wave-hits-56-places-in-Manitoba--and-counting-160559E/](http://www.pigprogress.net/Health/Articles/2017/7/New-PED-wave-hits-56-places-in-Manitoba--and-counting-160559E/). Zugriff am 25.10.2017.

Theuns S, Conceição-Neto N, Christiaens I, Zeller M, Desmarests LM, Roukaerts ID, Acar DD, Heylen E, Matthijnsens J, Nauwynck HJ. Complete genome sequence of a porcine epidemic diarrhea virus from a novel outbreak in Belgium, January 2015. *Genome Announc* 2015; 3: e00506-00515.

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

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

TierNebG. Tierische Nebenprodukte Beseitigungsgesetz vom 25. Januar 2004, 2004. BGBl I S 1966.

TierSchNutzV. Verordnung zum Schutz landwirtschaftlicher Nutztiere und anderer zur Erzeugung tierischer Produkte gehaltener Tiere bei ihrer Haltung, in der Fassung der Bekanntmachung vom 22. August 2006 (BGBl. I S. 2043), zuletzt geändert durch Artikel 3 Absatz 2 des Gesetzes vom 30. Juni 2017 (BGBl. I S. 2147), 2006. BGBl I S 2043.

Tun HM, Cai Z, Khafipour E. Monitoring survivability and infectivity of porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) in the infected on-farm earthen manure storages (EMS). *Front Microbiol* 2016; 7: 265.

UGENT (Universiteit Gent - Faculty of Veterinary Medicine). Biocheck Ugent Pig. 2016; <http://www.biocheck.ugent.be/v4/about/pig/>. Zugriff am: 05.09.2016.

USDA (United States Department of Agriculture). Swine Enteric Coronavirus Disease Testing Summary Report. 2014; [http://www.aphis.usda.gov/animal\\_health/animal\\_dis\\_spec/swine/downloads/swine\\_report\\_7\\_24\\_14.pdf](http://www.aphis.usda.gov/animal_health/animal_dis_spec/swine/downloads/swine_report_7_24_14.pdf). Zugriff am 21.09.2015.

USDA (United States Department of Agriculture). Swine Enteric Coronavirus Introduction to the United States: Root Cause Investigation Report. Animal and Plant Health Inspection Service Veterinary Services. 2015; [www.aphis.usda.gov/animal\\_health/animal\\_dis\\_spec/swine/downloads/secd\\_final\\_report.pdf](http://www.aphis.usda.gov/animal_health/animal_dis_spec/swine/downloads/secd_final_report.pdf). 37-43. Zugriff am 20.04.2017.

Vetter S, Ruf T, Bieber C, Arnold W. What Is a Mild Winter? Regional Differences in Within-Species Responses to Climate Change. *PLoS One* 2015; 10: e0132178.

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

VVVO. Verordnung zum Schutz gegen die Verschleppung von Tierseuchen im Viehverkehr (Viehverkehrsverordnung) in der Fassung der Bekanntmachung vom 3. März 2010, 2010. BGBl I S 1057.

Wang D, Fang L, Xiao S. Porcine epidemic diarrhea in China. *Virus Res* 2016a; 226: 7-13.

Wang H, Xia X, Liu Z, Liu Y, Wang S, Qi Z, Liu S, Wang H, Niu X, Liu S. Outbreak of porcine epidemic diarrhea in piglets in Gansu province. *Acta Sci Vet* 2013a: 1140.

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

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

Wang L, Hayes J, Byrum B, Zhang Y. US variant porcine epidemic diarrhea virus: histological lesions and genetic characterization. *Virus Genes* 2016b; 4: 578-581.

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

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

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

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

## IX. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Phylogram generated from 91 PEDV sequences .....	9
Abbildung 2: Lagebeziehung zwischen Regionen mit PED-Ausbrüchen und den Erlegungsorten der im ersten Studienteil mittels ELISA untersuchten Proben von Wildschweinen .....	30
Abbildung 3: Zeitlicher Ablauf der Gülleuntersuchung .....	32
Abbildung 4: Lagebeziehung zwischen einem PED-Ausbruch in einem geschlossenen Schweinebetrieb, der darauffolgenden Gülleausbringung und den Erlegungsorten der im zweiten Studienteil untersuchten Proben von Wildschweinen .....	33
Abbildung 5: PEDV-Antikörper gemessen in Serumproben aus Studienteil 1 mittels ELISA (Swinecheck® PED indirect, Biovet). Cut-off = 0,4, n = 65.....	40
Abbildung 6: PEDV-Antikörper gemessen in Serumproben aus Studienteil 2 mittels ELISA (Swinecheck® PED indirect, Biovet). Cut-off = 0,4, n = 61.....	42
Abbildung 7: PEDV-Antikörper gemessen in Serumproben aus beiden Studienteilen mittels ELISA (Swinecheck® PED indirect, Biovet) Cut-off = 0,4, n = 126 .....	44
Abbildung 8: Häufigkeit des Geschlechts aller erlegten Wildschweine, n = 161 .....	45
Abbildung 9: Darstellung des Gewichts aller in beiden Studienteilen untersuchten Tiere, n = 161.....	46
Abbildung 10: Darstellung des Gewichts der in beiden Studienteilen untersuchten Tiere, n = 161.....	47

## **X. TABELLENVERZEICHNIS**

Tabelle 1: Auflistung der verwendeten Primer- und Sondensequenzen für die modifizierte PCR nach KIM et al. (2007) .....	36
Tabelle 2: Temperaturprotokoll der PEDV-PCR .....	36
Tabelle 3: Zeitlicher Abstand zwischen Gülleausbringung und Nachweis von PEDV-Antikörpern bei Wildschweinen .....	42
Tabelle 4: Ergebnis des PEDV-Antikörper-Nachweises mittels ELISA in den jeweiligen Altersgruppen, n = 126.....	46
Tabelle 5: Ergebnis des PEDV-Antikörper-Nachweises mittels ELISA in den jeweiligen Jagdjahren, n = 126 .....	48

## XI. ANHANG

Probenbegleitschreiben, das den Probenkits beigelegt war.

### Wildschweinproben

Proben bitte bei -20°C einfrieren (werden gesammelt abgeholt)  
oder per Post senden an: (Portokosten werden übernommen)

#### Kontakt:

Annalena Scheffler  
Klinik für Schweine der LMU München  
Sonnenstraße 16  
85764 Oberschleißheim

Bei Fragen: 0xxx-xxxx xxx

### Probenentnahmeschein

Wildschwein Nr. \_\_\_\_\_

- Blutprobe
- Kotprobe

Geschätztes Alter des Tieres:

- <12 Monate
- 1-2 Jahre
- > 2 Jahre

Geschätztes Gewicht (aufgebrochen) in kg: \_\_\_\_\_

Geschlecht: \_\_\_\_\_

Revier: PLZ \_\_\_\_\_

Gemeinde \_\_\_\_\_

Probenentnahme am (Datum): \_\_\_\_\_

Von (Name): \_\_\_\_\_

Tel-Nr. für Rückfragen: \_\_\_\_\_

## **XII. DANKSAGUNG**

An erster Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr. Mathias Ritzmann für die Überlassung dieses interessanten und vielseitigen Themas, die fortwährende Unterstützung während der vergangenen drei Jahre und das stets offene Ohr bedanken.

Ein besonderer Dank gilt außerdem meinen beiden Betreuerinnen Dr. Jasmin Numberger und Dr. Julia Stadler für die tolle Betreuung, die inspirierenden Ideen, die konstruktiven Korrekturen und die unendliche Geduld. Danke, dass Ihr mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite standet.

Weiterhin möchte ich mich auch herzlich bei Herrn Dr. Robert Fux und dem Team der Virologie bedanken, ohne deren Hilfe und Unterstützung die Durchführung dieser Arbeit sehr schwierig gewesen wäre.

Dem gesamten Team der Klinik für Schweine gilt ein weiteres großes Dankeschön! Eure Unterstützung bei der Durchführung der Studie sowie die tollen Gespräche, aber auch die freundschaftliche Atmosphäre und die unvergesslichen Stunden und Tage waren und sind einfach Gold wert.

Auch Frau Dr. Anna Rieger möchte ich herzlich danken für die Unterstützung bei den statistischen Fragestellungen.

Ich danke auch Herrn Dr. Ralf Hammer, der den ursprünglichen Anstoß zum Thema dieser Arbeit gab.

Ein großer Dank geht auch an alle beteiligten Tierärzte, insbesondere an die Mitarbeiter des Schweinegesundheitsdienstes Baden-Württemberg, die mir bei der Recherche und der praktischen Durchführung dieser Studie essentielle Hilfestellung gaben. Darüber hinaus möchte ich dem Landwirt meines Studienbetriebs recht herzlich für seine Mithilfe und den reibungslosen Ablauf der Studie danken. Ihr Engagement und der von Ihnen betriebene Zeitaufwand sind nicht selbstverständlich.

Herzlich bedanken möchte ich mich außerdem bei allen beteiligten Jägern, die Proben gesammelt und eingesandt oder mir und meinen Helfern die Anwesenheit und Teilnahme an Treibjagden ermöglicht haben. Dies war nicht nur die Grundlage für das Gelingen meiner Studie, sondern auch für mich

persönlich ein unvergessliches und einzigartiges Erlebnis.

Zu guter Letzt gilt mein größter Dank meiner Familie für die uneingeschränkte Unterstützung während Schul-, Studiums- und Promotionszeiten. Danke Euch und auch Dir, David, für das mir entgegengebrachte Vertrauen, dass Ihr mir immer und gerade in der Endphase der Promotion den Rücken freigehalten habt und ich mich jederzeit auf Euch verlassen kann!