

Epidemiologische und molekulare Studien zu PCV bei Wildschweinen deutscher Reviere

S. Knell, H. Willems, G. Reiner
Professur für Schweinekrankheiten
JLU Gießen

Circoviren

Taxonomie

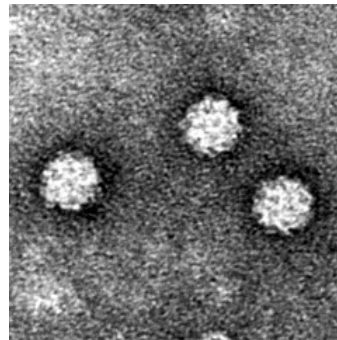
Familie: Circoviridae

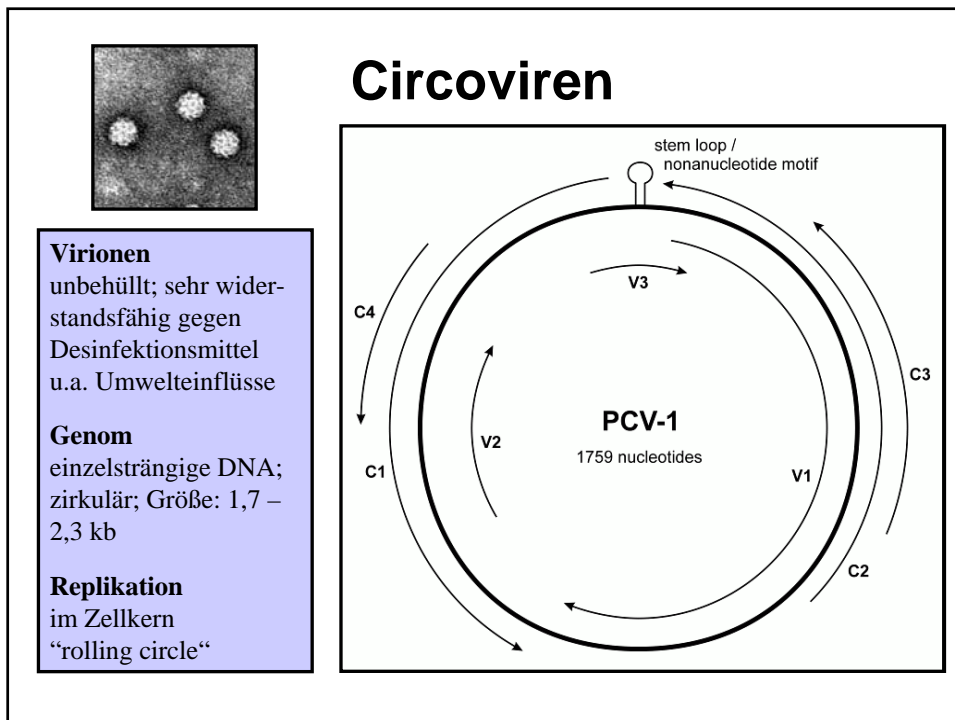
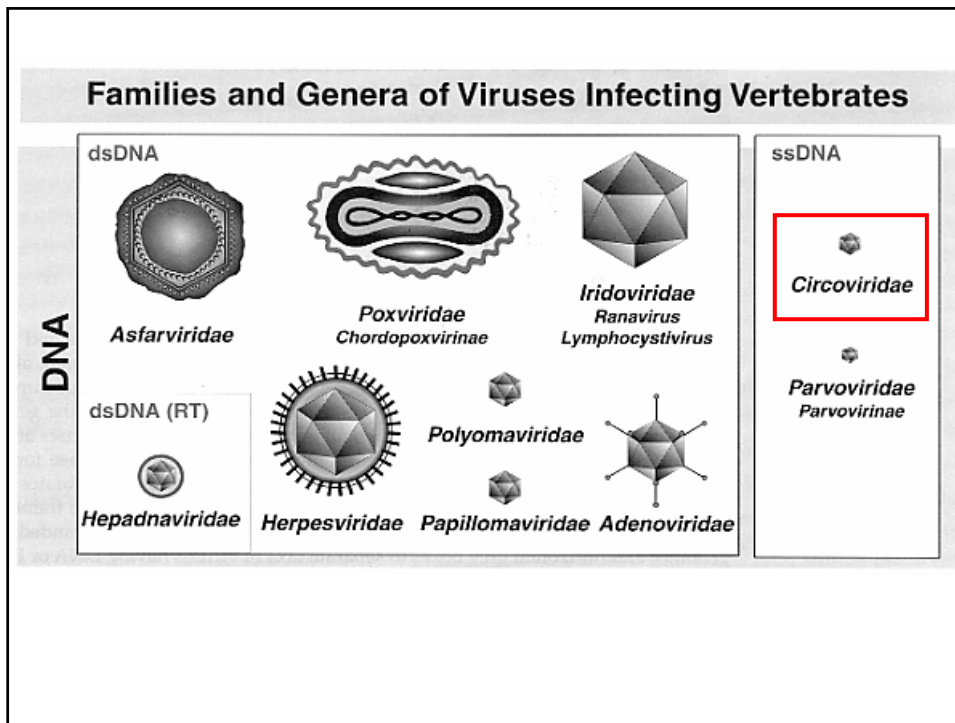
Genus: Circovirus

Spezies: Porzines Circovirus-1	Schwein
Beak and Feather Disease Virus	Papagei
Pigeon Circovirus (tentativ)	Taube
Porzines Circovirus-2	Schwein

Genus: Gyrovirus

Spezies: Chicken Anaemia Virus	Huhn
---------------------------------------	------





Circoviren

Porzine Circoviren

PCV-1

apathogen

häufige Kontaminante in Kulturzellen vom Schwein; in Schweinepopulation weit verbreitet; Seroprevalenz in Deutschland: >75 %

PCV-2

Erreger von

1. PMWS
2. PDNS
3. IP
4. Reproduktionsstörungen



Verbreitung

• PCV-2 Prävalenzen

– Hausschwein: 50 bis 100 %

– Wildschwein:

- Tischer 1986: Serologie, Deutschland, Einzeltiere
- Sanchez 2001: Serologie, Belgien, 35,6 %
- Segales 2002: Serologie, Spanien, 34,6 %
- Vicente 2004: Serologie, Spanien, 47,9 %
- Ellis 2003: Immunhistochemie, Einzeltiere
- Schulze 2003: PCR, Deutschland, Einzeltier
- Segales 2003: PCR, Deutschland, Spanien, Einzeltiere
- Exel 2004: PCR, Österreich, 46,4 %

• Vergleichende Sequenzinformationen

– liegen für Wildschwein-Isolate bislang nicht vor

Zielsetzung

- Untersuchung der Prävalenzen für PCV bei Wildschweinen deutscher Reviere
- Charakterisierung von Sequenzabschnitten für den Vergleich mit bereits bekannten Isolaten von Hausschweinen

Material und Methode

Herkunft der Probanden



Methodik

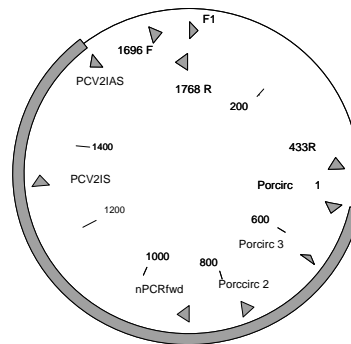
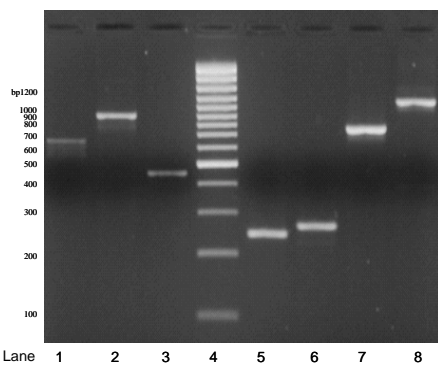
- Prävalenzstudie:
 - 238 Wildschweine aus 10 Revieren
 - Milzproben
 - Nukleinsäurenachweis: PCV-1 und PCV-2
- Vergleichende Sequenzierung (PCV-2)
 - Eine Komplettssequenz
 - 742 bp-Fragment aus ORF2 (Nukleokapsid) von 16 Isolaten

Die verwendeten Oligonukleotidprimer

Primer	Primer sequence 5' 3'	Application ^a	Position and orientation ^b
F1 ^a	ACC AGC GCA CTT CGG CAG	PCR, sequencing	1-18, f
433R ^a	TCC AGC AAG GTA CTC A	PCR, sequencing	418-433, r
Porcirc 1	GCT GAA CTT TTG AAA GTG AGC	PCR, sequencing	501-521, f
Porcirc 3	GTA TGT GGT TTC CGG GTC	PCR, sequencing	615-632, r
Porcirc 2	CACACAGTCTCAGTAGATCATCC	PCR, sequencing	719-741, r
nPCRfwd	CAA CTG CTG TCC CAG CTG TAG	PCR, sequencing, comp. sequencing	844-864, f
PCV2 IS ^c	TAG GTT AGG GCT GTG GCC TT	PCR, sequencing	1322-1341, f
PCV2IAS ^c	CCG CAC CTT CGG ATA TAC TG	PCR, cloning, sequencing, comp sequencing	1566-1585, r
1696F ^d	GGT GTC TTC GTC TTC GGT AAC G	Sequencing	1695-1716, f
1768R ^d	AAT ACT TAC AGC GCA CTT CTT TCG	PCR, sequencing	1744-1767, r
M13 fwd	ACGACGTTGTAAAACGACGGCCAG	Sequencing	f
M13 rev	TTCACACAGGAAACAGCTATGACC	Sequencing	r

a: Oligonucleotides used for PCR, sequencing, comparative sequencing and/or cloning. b: Relative positions of the oligonucleotides as indicated in Fig. 1. f: forward; r: reverse c: Laroche et al., 2000; d: Kim and Lyoo, 2002.

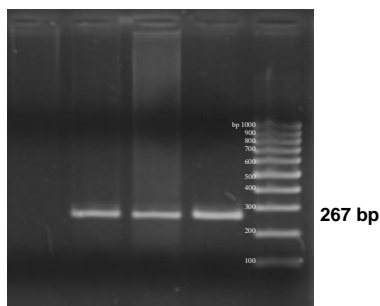
Sequenzierungsstrategie



PCR amplification of fragments representing the PCV-2 genome of sample #214 for complete sequencing.
 Lane 1: 632 bp-product (bases 1-632; primers F1/Porcirc3); lane 2: 879 bp-product (bases 1322-433; primers PCV2IS/433r);
 lane 3: 446 bp-product (bases 1322-1767; primers PCV2IS/1768r); lane 4: 100 bp DNA-ladder;
 lane 5: 241 bp-product (bases 501-741; primers Porcirc1/Porcirc2); lane 6: 264 bp-product (bases 1322-1585; primers PCV2IS/PCV2IAS);
 lane 7: 742 bp-product (bases 844-1585; primers PCV2IAS/nPCRfwd); lane 8: 1085 bp-product (bases 501-1585; primers Porcirc1/PCV2IAS).

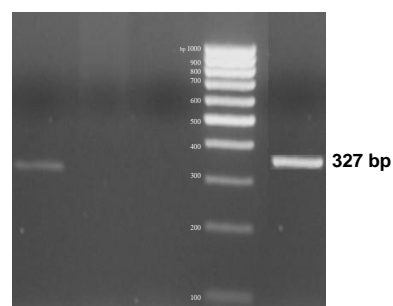
Ergebnisse

PCV-Nachweis



Lane 1 2 3 4 5

Typisches Bandenmuster der **PCV-2-PCR**. Bahn 1: Negativkontrolle; Bahn 2: Positivkontrolle; Bahnen 3 und 4: positive Proben; Bahn 5: Größenstandard.



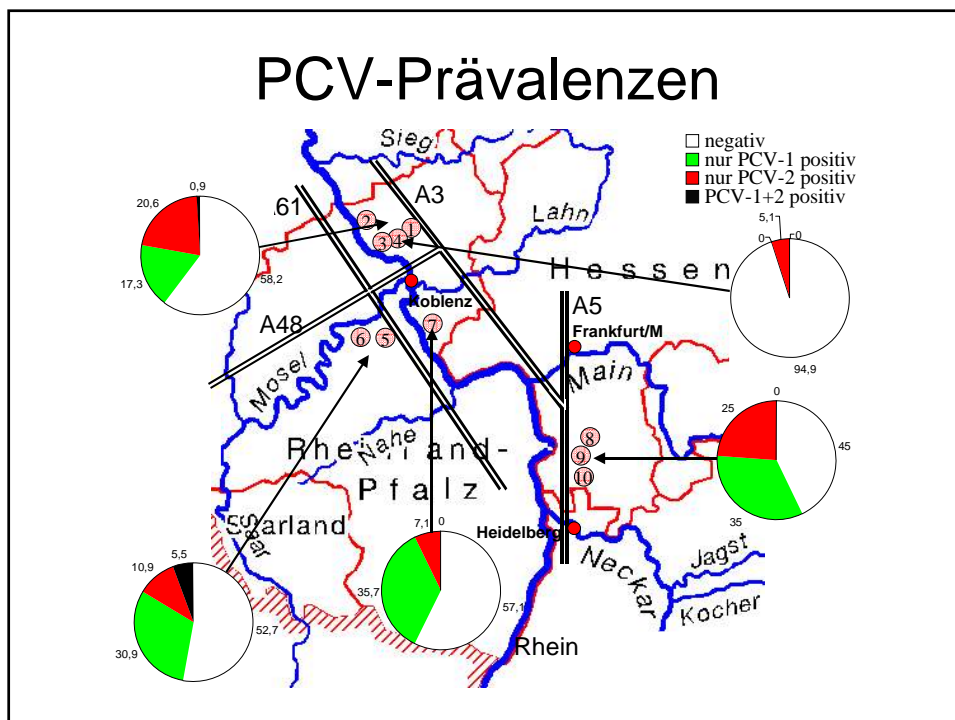
Lane 1 2 3 4 5

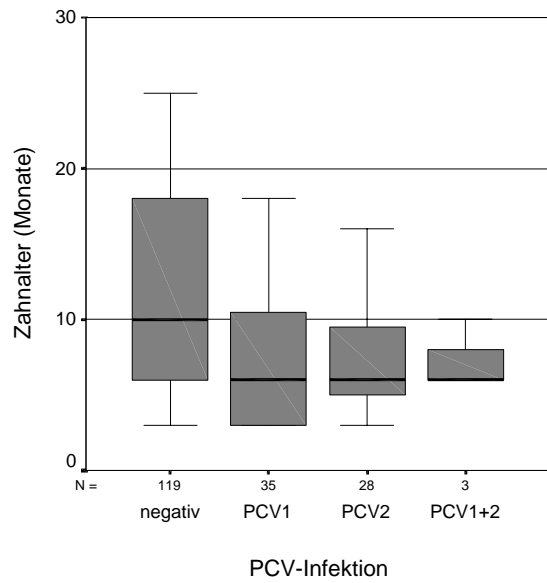
Typisches Bandenmuster der **PCV-1-PCR**. Bahn1: positive Probe; Bahn2: negative Probe; Bahn 3: Negativkontrolle; Bahn 4: Größenstandard; Bahn 5: Positivkontrolle.

PCV-Prävalenzen

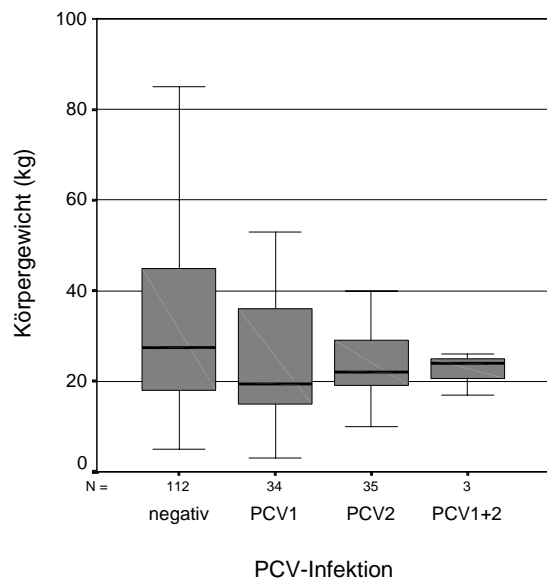
- Weder PCV-1 noch PCV-2: n=147 (61,8 %)
- Nur PCV-1 positiv: n=48 (20,2 %)
- Nur PCV-2 positiv: n=39 (16,4 %)
- PCV-1 und PCV-2 positiv: n=4 (1,7 %)

- PCV-1 positiv insgesamt: n=52 (21,9 %)
- PCV-2 positiv insgesamt: n=43 (18,1 %)

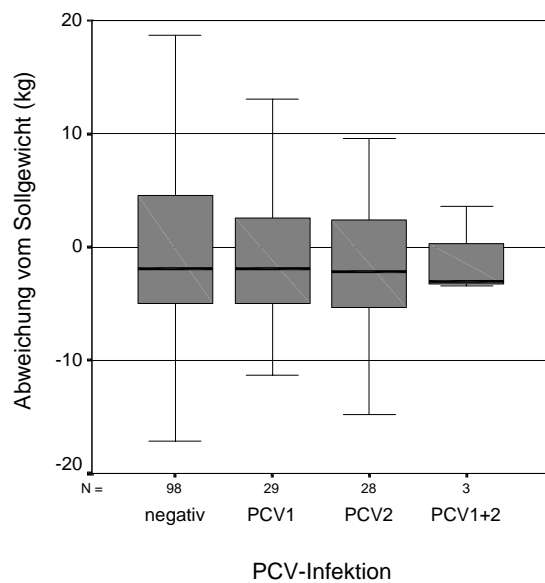




Zusammenhang zwischen PCV-Infektion und Zahnalter (Kruskal-Wallis-Test, $p=0.008$).



Zusammenhang zwischen PCV-Infektion und Körpergewicht (Kruskal-Wallis-Test, $p=.053$).



Zusammenhang zwischen PCV-Infektion und Abweichung vom altersabhängigen "Sollgewicht" (Kruskal-Wallis-Test, $p=0.962$).

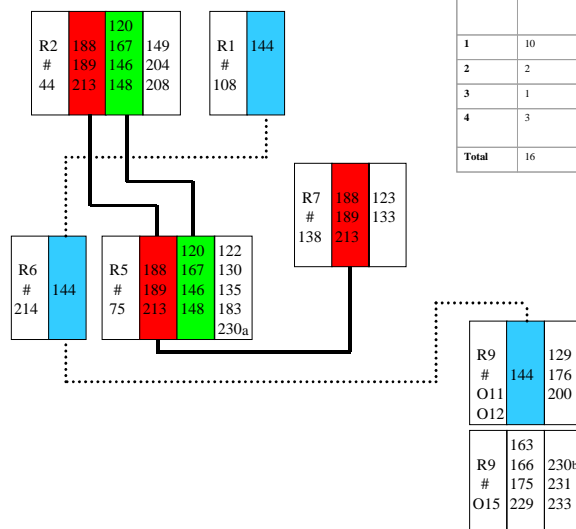
PCV-Prävalenz und Zahnalter

Alter (Monate)	Tierzahl (n)	negativ (%)	PCV-1 (%)	PCV-2 (%)	PCV-1 + 2 (%)
bis 5	38	44,7	31,6	23,7	0,0
6 - 7	55	65,5	20,0	18,1	3,6
8 - 12	36	61,1	16,7	19,4	2,8
über 12	56	78,6	14,3	7,1	0,0

Gruppenzugehörigkeit (ORF2)

Region	Samples	Group "China"			Group "France"	Group "Ger/Aut"
		Consensus	Minor deviations	Major deviations		
1	10	8 ^a	1 (#108)		1 (#44)	
2	2		1 (#214)			1 (#75)
3	1			1 (#138)		
4	3		3 ^b (#O11, #O12, #O15)			
Total	16	8	5	1	1	1

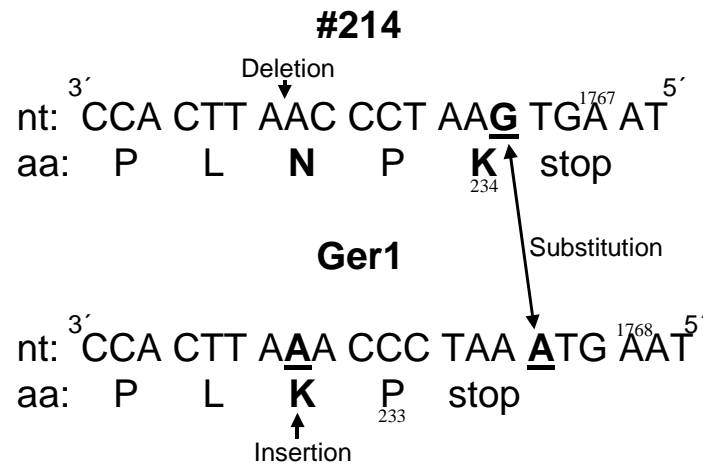
Haplotypen



Gruppenzugehörigkeit (ORF2)

Region	Samples	Group "China"			Group "France"	Group "Ger/Aut"
		Consensus	Minor deviations	Major deviations		
1	10	8 ^a	1 (#108)		1 (#44)	
2	2		1 (#214)			1 (#75)
3	1			1 (#138)		
4	3		3 ^b (#O11, #O12, #O15)			
Total	16	8	5	1	1	1

ORF2-Terminus



Zusammenfassung - Prävalenzen

- 61,8 % der untersuchten Wildschweine frei von PCV.
- 21,9 % positiv für PCV-1.
- 18,1 % positiv für PCV-2.
- Prävalenzen: signifikante Differenzen zwischen Revieren und Regionen.
- In anderen Ländern: Prävalenzen für PCV-1 niedriger, für PCV-2 höher.
- Jüngere Tiere stärker betroffen als ältere.
- Kein Einfluss auf die Entwicklung der Tiere.

Zusammenfassung - Vergleichende Sequenzierung

- Homologie auf nt-Ebene: 98,9 - 100 %.
- Homologie auf aa-Ebene: 93,6 - 100 %.
- Mindestens 2 verwandte Subtypen.
- Consensus (n=14): Homologie mit chinesischen Isolaten.
 - Verschiebung im Leseraster: -1nt, +1as
- zwei Isolate mit Homologie zu europäischen Isolaten.

Schlussfolgerung

- Weite Verbreitung porciner Circoviren bei Wildschweinen in Deutschland.
- Unterscheidbare Subtypen.
- Austausch zwischen Subtypen?
- Einordnung des Consensus-Typs unklar.
- Mögliche Bedeutung als Erregerreservoir.
- Einbeziehung von Hausschwein-Isolaten notwendig.