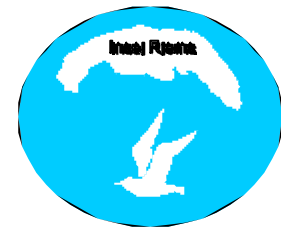


PCV 2 - Antigen-, -Genom- und Antikörpernachweis: Diagnostische Möglichkeiten und Interpretationsspielraum

Horst Schirrmeier und Egbert Mundt

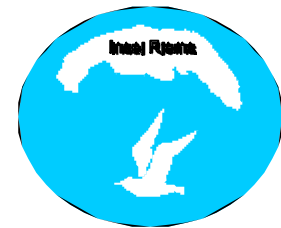
BFAV Insel Riems



AHO Aktuell (26.11.2001)

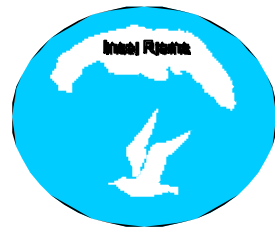
OIE: wird die PMWS anzeigepflichtig ??

„ Das OIE in Paris prüft einen Plan, das durch Circoviren und bestimmte Stressoren bei Schweinen ausgelöste „Post-weaning Multi-systemic Wasting Syndrome -PMWS- anzeigepflichtig zu machen. Die 158 Mitgliedstaaten müßten dann Krankheitsausbrüche beim OIE melden, was wiederum Handels- und Verkehrsbeschränkungen zur Folge hätte. Sollte sich die OIE zu diesem Schritt entschließen, könnte das PMWS frühestens im Mai 2002 zur Liste der anzeigepflichtigen Tierseuchen hinzugefügt werden.“



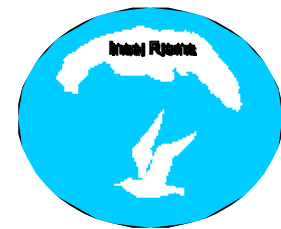
AHO Aktuell (26.11.2001)

„In einigen Ländern ist die Situation mittlerweile dramatisch - in Großbritannien wurde PMWS in etwa 40% der Betriebe festgestellt. Ebenso sind Irland, Spanien, Deutschland, Frankreich, Belgien, Italien und die Niederlande betroffen. Erst kürzlich hatte die FAO in Rom die Befürchtung geäußert, dass sich das PMWS auch nach Asien und Südamerika verbreitet.“



Reuters Online (15.11.2001)

„Almost 250 000 pigs were slaughtered so far to combat CSF and FMD, and experts say another 300 000 could die from the new disease - PMWS“



Taxonomie

Genus Circovirus

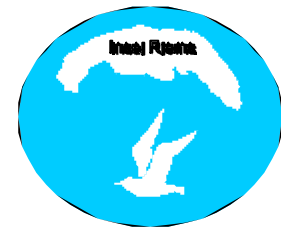
1. **Beak and feather disease virus**
2. **Bovine circovirus**
3. **Canary circovirus**
4. **Chicken anemia virus**
5. **Columbid circovirus**
6. **Goose circovirus**
7. **Porcine circovirus**

Porcine circovirus type 1

Porcine circovirus type 2

8. **unclassified Circoviridae**

TTV; TTV-like mini virus



Taxonomie

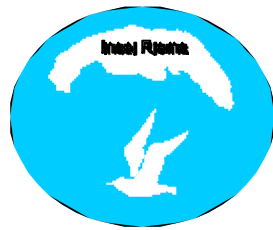
ICTV Sydney 1999

The remaining taxonomic proposals concerned the family **Circoviridae**.

(1) The formation of a second genus, **Gyrovirus**, was approved in order to accommodate the species **Chicken anemia virus (CAV)**, which previously had been designated as the type species of the genus **Circovirus**.

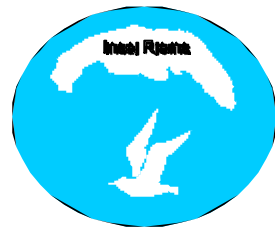
(2) The genus **Circovirus** now comprises **Porcine circovirus (PCV)** and **Beak and feather disease virus (BFDV)**.

This was the preferred option of the Study Group, despite the unusual device of reassigning a type species to another genus.



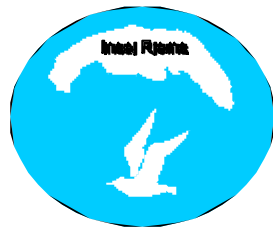
Porcine Circovirus 1:

- **erstmalig 1974 beschrieben**
- **PK15 Kontaminant (nur ATCC-Linie)**
- **Antikörper weit verbreitet (?)**
- **apathogen, nur einmal Nachweis bei klinischer Erkrankung (congenital tremor)**



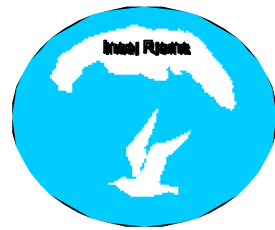
Porcines Circovirus 2:

- **1991 erstmals beschrieben in W-Canada in SPF-Herde**
- **Erreger der Post-weaning Multisystemic Wasting Syndromes (PMWS) und des Porcine Dermatitis and Nephropathy Syndromes (PDNS), weitere Erkrankungen ???**
- **weit verbreitet - für Auslösung einer Erkrankung sind Kofaktoren notwendig (PPV, PRRSV, Aktivierung des Immunsystem)**



Eigenschaften:

- **ss DNA-Virus mit zirkulärem Genom,
1,7 - ,9, kB**
- **kleinstes bekanntes Virus**
- **sehr resistent in der Außenwelt**
- **schlechte *in vitro* Vermehrbarkeit**
- **Homologie zwischen PCV1 und 2 86% (ORF1-rep)
und 56 % (ORF2-capsid?)**



Diagnostik:

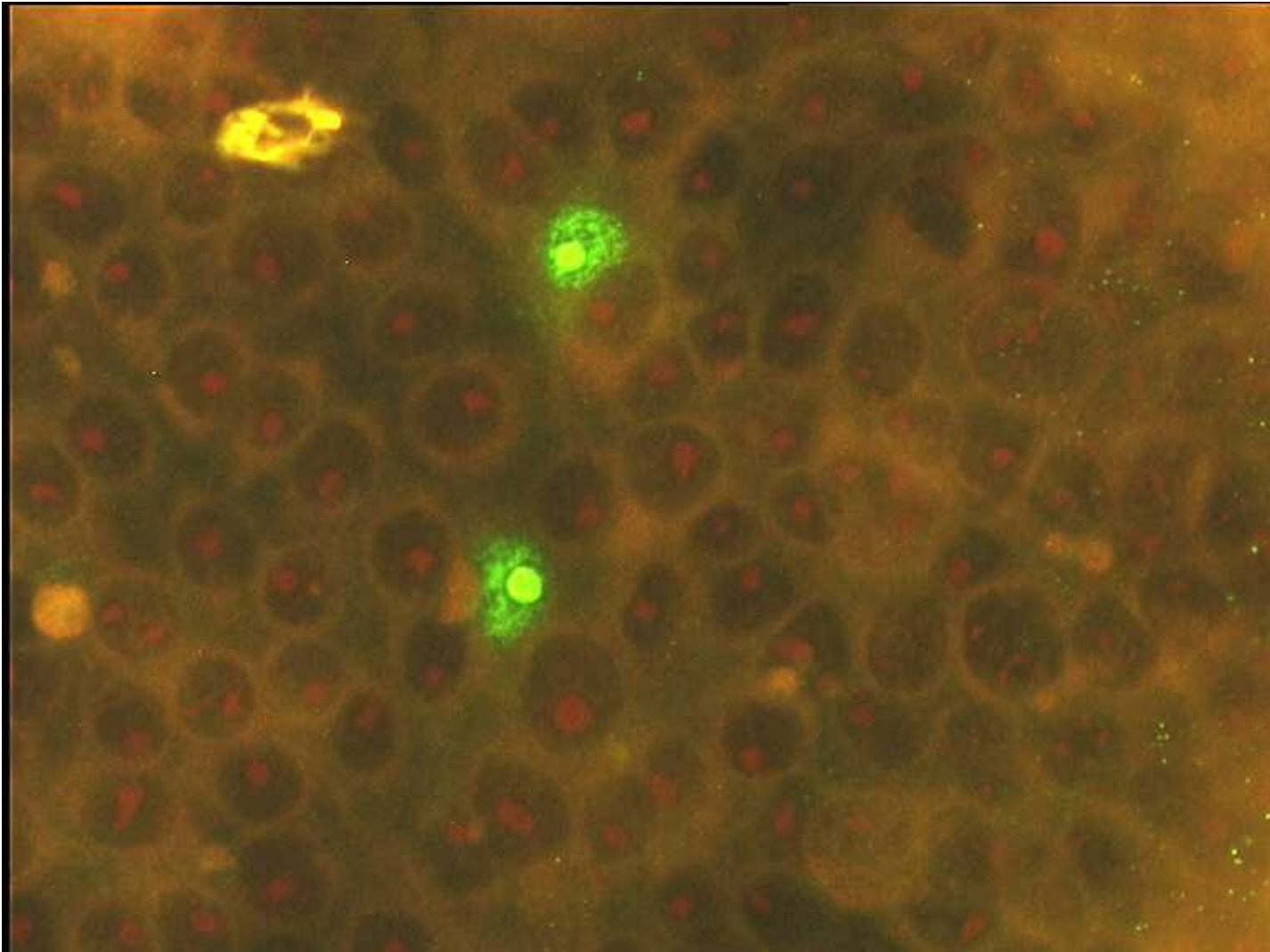
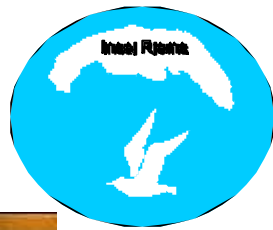
1. Antigennachweis:

- **IFT/PLA in Pathomaterial (geeignete Antikörper)**
- **Virusanzüchtung (PK15 u.a.; 300mM D-Glucosamin)**
Detektion durch markierte Antikörper oder indirekt
 - **keine stabile *in vitro* Vermehrung**

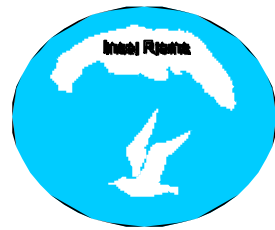
2. Genomnachweis

- **PCR an Pathomaterial und Blut (Serum)**
 - **Problem: Diagnostischer Wert des positiven Ergebnisses**

PCV-2 in PK15-Zellkultur



PCR-Protokoll



1. DNA-Isolierung (QIAmp DNA Mini Kit)

•Material: 10-20 mg Organmaterial homogenisieren

oder

Zellsediment von ca 10^5 Zellen einer Zellkultur (TC 12,5)

oder

Ultrasediment (40 000 rpm, 20 min)

oder

200 μ l Serum

•Aufarbeitung entsprechend Testanweisung im Kit

2. PCR (100 μ l)

10 μ l DNA+ 90 μ l PCR-Mix (Promega)

PCR-Mix: 10 μ l Taq Puffer

0,8 μ l DNTP mix

5 μ l $MgCl_2$

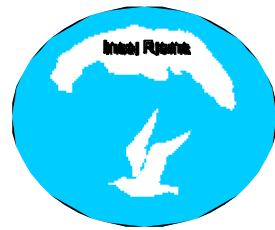
3 μ l 3'Primer (~ 50 ng/ μ l)

3 μ l 5' Primer (~50 ng/ μ l)

67,2 μ l SDW

0,3 μ l Taq-Polymerase

PCR-Protokoll



- 29 Zyklen
 - 4 min 91 °C
 - 1 min 91 °C
 - 1 min 54 °C
 - 1 min 72 °C
 - anschließend 10 min 72 °C
 - abkühlen auf 4 °C

3. Elektrophorese:

1,5 % iges Agarosegel in 0,5xTBE, Laufzeit 1 h ,60 V

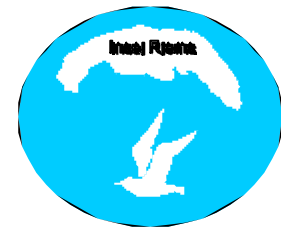
Primer: (n. Larochelle et al., J. Virol. Methods 80, 69, 1999) es werden 349 bp aus dem ORF2 des CV-2 bzw. 263 bp aus dem ORF1 des CV-1 amplifiziert.

PCV 1:

Upper 5' to 3': TTG CTG AGC CTA GCG ACA CC
Reverse 5' to 3': TCC ACT GCT TCA AAT CGG CC

PCV 2

Upper 5' to 3': TAG GTT AGG GCT GTG GCC TT
Reverse 5' to 3': CCG CAC CTT CGG ATA TAC TG



CV1 (263 bp)



CV2 (349 bp)



.D14/0, ysw 160, PCV1-pr.

.D14/0, ysw 156, PCV1-pr.

.D1/00 Mes.Ln (neg Org Ko), PCV1 pr.

.D1/00 To (+Ko PCV1), PCV1, PCV1 pr.

.L180 (+Ko PCV1), PCV1 pr

.DNA aus L180 (+ Ko PCV1), PCV1 pr

.SDW, PCV1 pr

.D14/0, ysw 160, PCV2-pr.

.D14/0, ysw 156, PCV2-pr.

.D1/00 Mes.Ln (neg Org Ko), PCV2 pr.

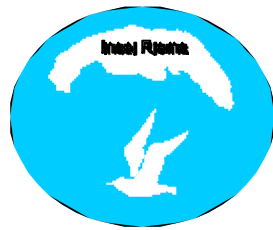
.D1/00 To (+Ko PCV1), PCV1, PCV2 pr.

.L180 (+ Ko PCV1), PCV2 pr

.D11/00 ysw20 Ln (+ KoPCV2), PCV2 pr

.SDW, PCV2 pr

.Marker



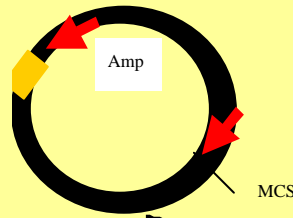
3. Antiköpernachweis

- **Indirekte IFT/PLA an infizierten/transfizierten Zellkulturen (Kreuzreaktivität !!)**
- **Indirekte IFT an mit RBV, die Teile des PCV exprimieren, infizierten Zellkulturen**
- **ELISA mit rekombinanten Antigenen bzw. Peptiden**



PCV2-ORF2-amp

+

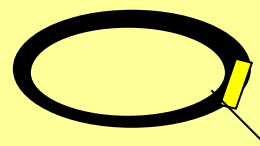


MCS

+

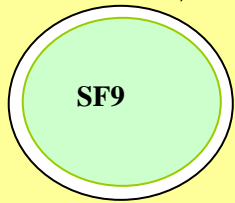


Lin. Baculovirus-DNA



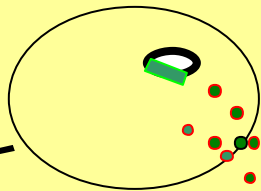
Rek. Vector

Kotransfektion

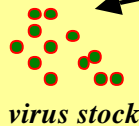


SF9

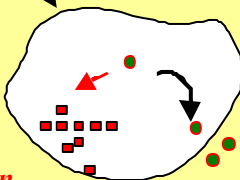
Homologe
Rekombination



RBV-PCV2-ORF2



virus stock



SF9

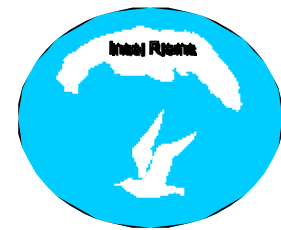
PCV-ORF2-Protein

Generierung von rekombinanter Bakulovirus

• Indirekter IFT

• Indirekter ELISA

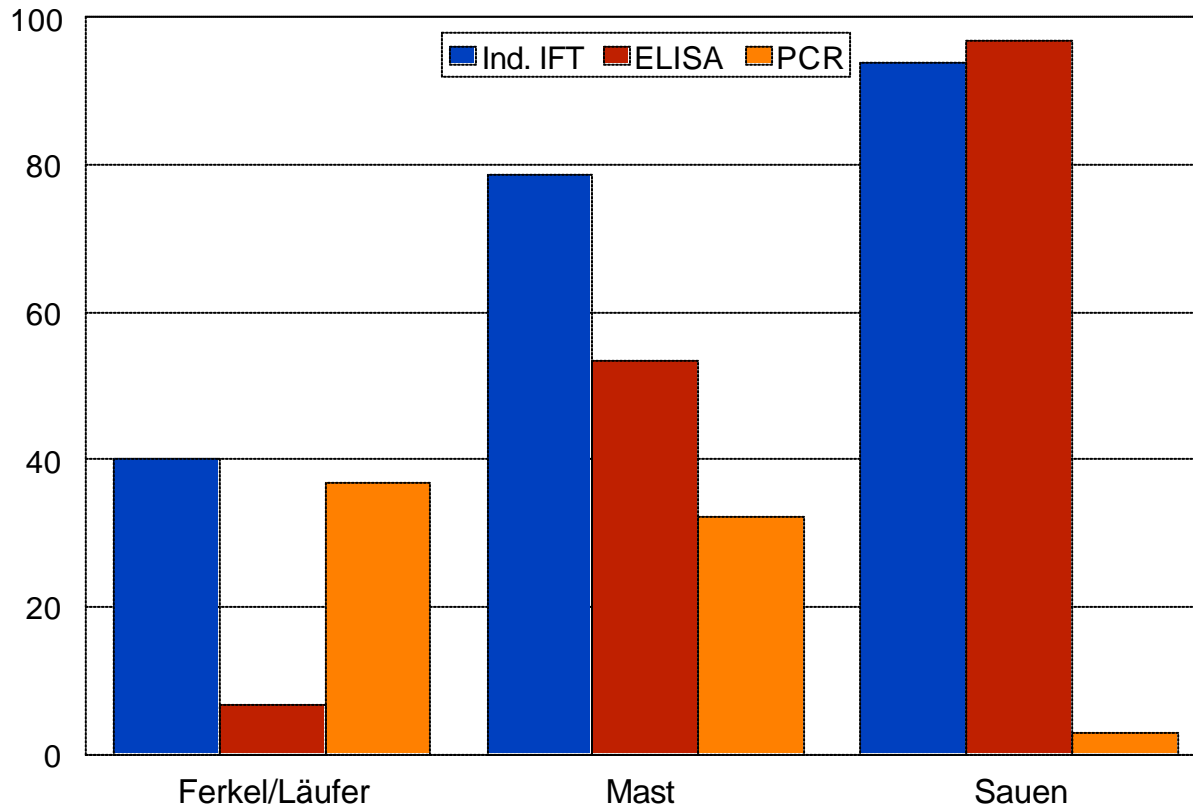
Diagn. Untersuchung in 11 Beständen

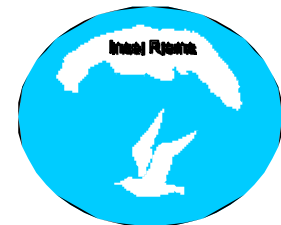


Betrieb	Altersgruppe	Anzahl	Ind IFT	ELISA 1)	PCR
A	Sau	10	10	10	0
B	Läufer	10	4	0	8
C	Mast	18	12	7	9
D	JS/AS	10	9	10	0
E	JS/AS	10	8	9	0
F	Ferkel (55 LT)	5	0	0	0
	JS	5	5	5	2
G	JS	6	6	6	0
H	Läufer	10	6	1	0
	Mast	10	10	8	0
I	Sau	10	10	10	0
J	Sau	10	10	10	0
K	JS	5	4	4	0
	Läufer (70.LT)	5	2	1	3
Gesamt	Ferkel/Läufer	30	12 (40 %)	2 (6,6 %)	11 (36,7 %)
	Mast	28	22 (78,6 %)	15 (53,6 %)	9 (32,1 %)
	Sau	66	62 (93,9 %)	64 (96,7 %)	2 (3,0 %)
Tiere gesamt		124	96 (77,4 %)	81 (65,3 %)	22 (17,7 %)

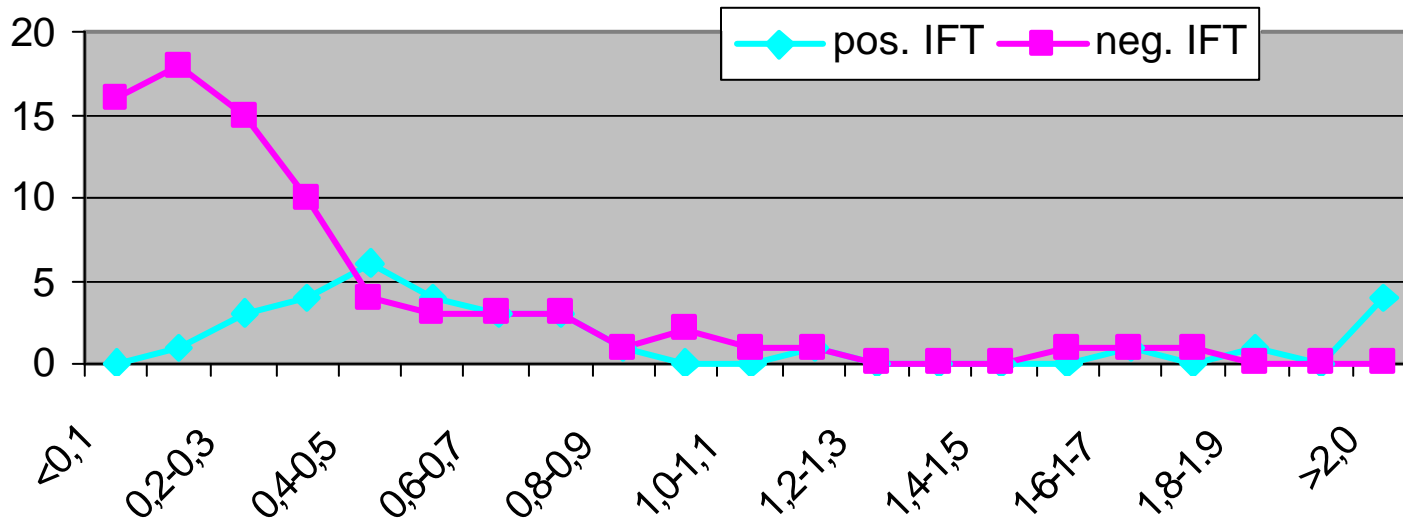


Antikörper- und Genomnachweis in Altersgruppen





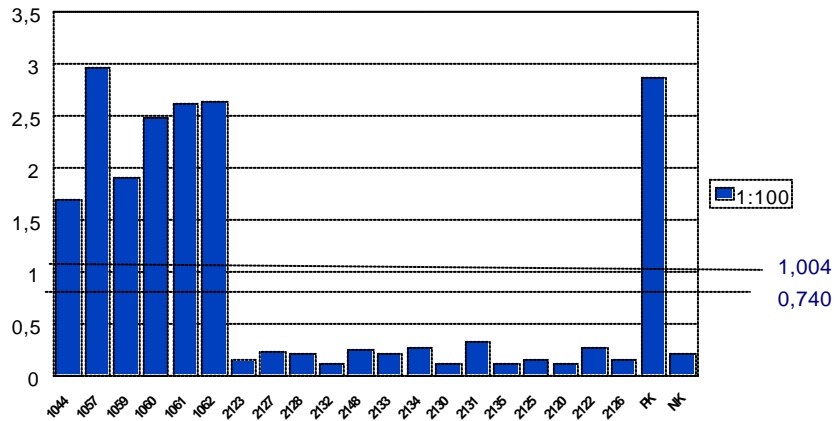
Verteilung IFT-neg. und pos Seren im ELISA n=112



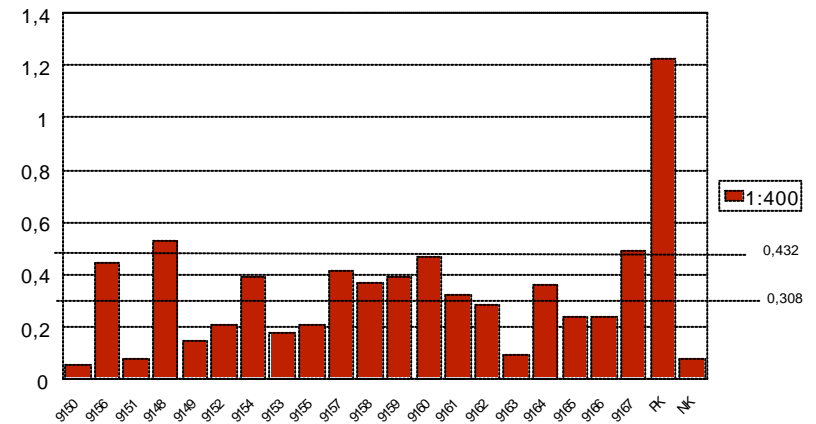


PCV2-ELISA - gutes und schlechtes Beispiel

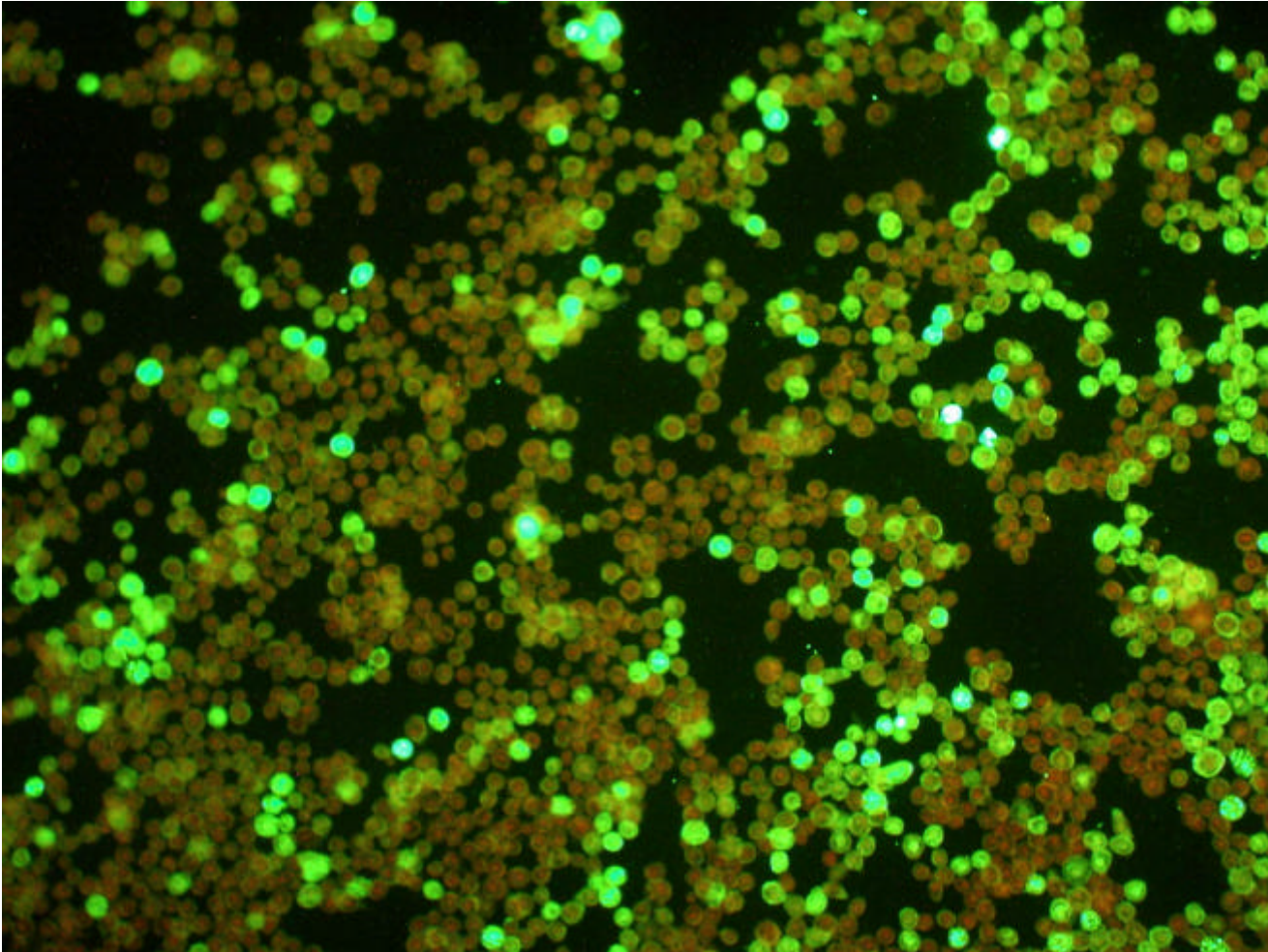
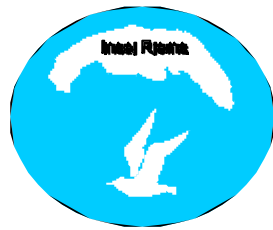
PCV-2-ELISA, Läuferseren Schwasdorf, 1997 und 2001

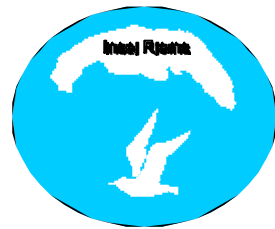


PCV-2 ELISA, Sauenseren Garlitz



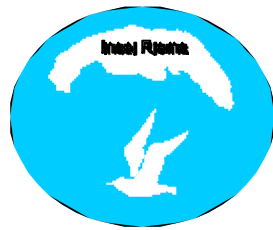
RBV-PCV2-ORF2 in SF9 Zellen





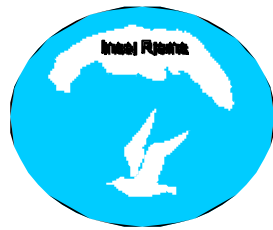
Diagnostika

- **Porcine Circovirus (PCrV) FITC Conjugate (VMRD)**
 - **Porcine Circovirus (PCrV) 10-well FA Slide (VMRD)**
 - **Porcine Circovirus (PCrV) 2 well FA Control Slide (VMRD)**
 - **Porcine Circovirus (PCrV) FA Negative Control (VMRD)**
 - **Porcine Circovirus (PCrV) FA Positive Control (VMRD)**
-
- **VMO-Gamakon !!!!!!! (KSPV-Kontrollantikörper verwenden)**



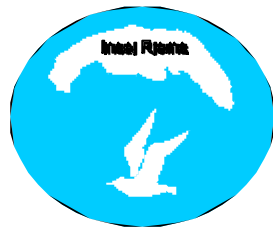
Welches ist die Zielrichtung der Diagnostik bei einer ubiquitär verbreiteten Virusinfektion





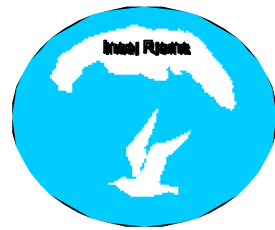
Welches ist die Zielrichtung der Diagnostik bei einer ubiquitär verbreiteten Virusinfektion

Der Nachweis von Virus/Genom ?



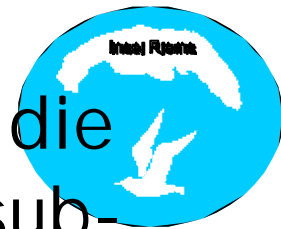
Welches ist die Zielrichtung der Diagnostik bei einer ubiquitär verbreiteten Virusinfektion

Der Nachweis von Antikörpern ?



Welches ist die Zielrichtung der Diagnostik bei einer ubiquitär verbreiteten Virusinfektion

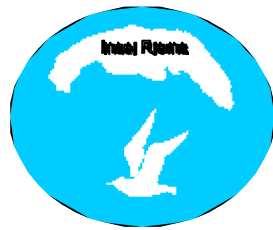
Die Unterscheidung von subklinischen und klinischen Infektionen ?



Wert diagnostischer Verfahren für die Differenzierung von klinischen und sub-klinischen PCV2 Infektionen

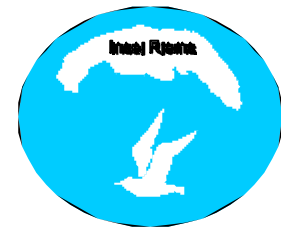
PCR	gering
Pathohistologie + Ag-Nachweis (IFT/Histochemie)	hoch
Serologie (Screening)	gering
Serologie (Serumpaare; 8. LW-16. LW)	mäßig bis hoch
Virusanzüchtung	gering bis mäßig
(Quantitativer Virusnachweis)	hoch

In Verbindung mit klinischen Erscheinungen und pathologischen Veränderungen deutlich höhere Aussagekraft



"es möge auch niemand vergessen, dass die Ätiologie nur eine Vorstufe der Pathologie ist und dass die Aufgabe der letzteren erst dann gelöst ist, wenn der Gesamtprozess, also der Gesamtablauf der gestörten Lebenstätigkeiten klargelegt ist"

R. Virchow



Zusammenfassung (1)

Porcine Circoviren (PCV) bilden gemeinsam mit dem ‘beak and feather disease virus’ der Psittaziden, dem ‘chicken anemia virus’ sowie eigenständigen Spezies bei Rind, Taube und Gans das Genus *Circovirus* innerhalb der *Circoviridae*. Es handelt sich dabei um unbehüllte Viren mit einem Durchmesser von ca. 17 nm, die ein zirkuläres, einzelsträngiges DNA-Genom von etwa 1,7 -1,9 kB besitzen. Neben dem 1974 als Kontamination einer PK15-Zelllinie beschriebenen, apathogenen porcinen Circovirus (PCV)-1 werden seit einigen Jahren weltweit Krankheitsbilder beim Schwein beschrieben, die durch ein serologisch vom PCV 1 unterscheidbares porcines Circovirus (PCV 2) verursacht bzw. befördert werden sollen. Dazu gehören das PMWS (“postweaning multisystemic wasting syndrome”) und das PDNS (“porcine dermatitis and nephropathie syndrome”). Eine Beteiligung an Reproduktionsstörungen (atypische PRRS) und an ZNS-Erkrankungen (“congenital tremor”) wird diskutiert. Eine ätiologische Bedeutung der Circoviren für die Entstehung von ”wasting cattles” (“downer cow syndrome”) wird nicht ausgeschlossen.

Antigennachweis:

Die Anzüchtung und stabile Vermehrung von PCV 2 in Zellkulturen ist problematisch, empfohlene Zellkulturbehandlungen mit D-Glucosamin haben nach unseren bisherigen Erfahrungen nur einen geringen Effekt. Nach Inokulation von PCV 2 positivem Organmaterial auf verschiedene Zelllinien vom Schwein kommt es jedoch zu einer Infektion von Einzelzellen und Zellherden, die mit Hilfe einer direkten bzw. indirekten Immunfluoreszenz/-peroxydase sichtbar gemacht werden kann. Mit gleicher Technik gelingt prinzipiell auch der direkte Nachweis in Pathomaterial (vorzugsweise Lymphknoten).

Zusammenfassung (2)



Genomnachweis:

Methode der Wahl ist die Polymerase Kettenreaktion, die in der diagnostischen Routine inzwischen breite Anwendung in verschiedenen Protokollen gefunden hat. Über Erfahrungen beim Nachweis insbesondere in Seren wird berichtet. Problematisch ist der Interpretation der Ergebnisse im Hinblick auf ätiologische Aussagen.

Antikörpernachweis:

In einigen Ländern sporadisch durchgeführte serologische Untersuchungen zeigen eine weite Verbreitung von PCV-2 (Spanien 97,8 %; Canada 55-100 %, Frankreich 100 %). Die Mehrzahl der eingesetzten Tests basieren auf der Verwendung von Vollvirus (i.d.R. IPMA oder ind. IFT an virusinfizierten Zellkulturen), so dass Kreuzreaktionen mit dem PCV 1 in die Ergebnisse einfließen können.

Wir haben ein rekombinantes Bakulovirus generiert, das ein durch den ORF2 des PCV 2 codiertes, ca. 28-30 kD großes Protein exprimiert. Dieses wird nach entsprechender Aufreinigung als Antigen für einen indirekten ELISA verwendet. Mit dem rekombinanten Virus infizierte Zellkulturen von Insekten dienen außerdem als Matrix für die Durchführung eines indirekten serologischen Nachweisverfahrens. Erste Ergebnisse vergleichender Untersuchungen mit beiden Testen in mehreren Betrieben werden dargestellt.

Generelles Problem der Circovirusdiagnostik ist die weite Verbreitung der Virus und die Tatsache, dass die Anwesenheit des Virus allein in der Regel nicht zur Ausprägung einer Erkrankung führt. Das führt zwangsläufig zu einer Einschränkung der diagnostischen Aussagekraft der Labormethoden, insbesondere solcher mit einer hohen Sensitivität (PCR). Positive Laborbefunde sind daher stets im Zusammenhang mit dem entsprechenden, insbesondere auch klinischen und pathomorphologischen Gesamtbefund und unter Berücksichtigung der Pathogenese zu interpretieren.