

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

**Porzine epidemische Diarrhoe in Zentraleuropa –
Aktuelle Situation und Stammcharakterisierung**

von Simone Leidenberger
aus Lauf a.d. Pegnitz

München 2018

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Lehrstuhl für Virologie

Arbeit angefertigt unter der Leitung von Univ.-Prof. Dr. Gerd Sutter

Angefertigt am Institut für Virusdiagnostik des Friedrich-Loeffler-Instituts,
Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit, Insel Riems
Mentor: Prof. Dr. Martin Beer

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.
Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Gerd Sutter
Korreferent/en: Priv.-Doz. Dr. Roswitha Dorsch

Tag der Promotion: 10. Februar 2018

"Our greatest weakness lies in giving up.

The most certain way to succeed is always to try just one more time."

Thomas A. Edison

Die vorliegende Arbeit wurde gemäß § 6 Abs. 2 der Promotionsordnung für die Tierärztliche Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München in kumulativer Form verfasst.

Folgende wissenschaftliche Arbeiten sind in dieser Dissertationsschrift enthalten:

Simone Leidenberger und Sandra Blome. **Porzine epidemische Diarrhoe. Der Praktische Tierarzt** 2017; 98 (11) . Im Druck. doi: 10.2376/0032-681X-17-57

Simone Leidenberger, Charlotte Schröder, Laura Zani, Arne Auste, Mathieu Pinette, Aruna Ambagala, Veljko Nikolin, Hans de Smit, Martin Beer und Sandra Blome. **Virulence of current German PEDV strains in suckling pigs and investigation of protective effects of maternally derived antibodies.** Erschienen in *Scientific Reports* 2017; 7. doi: 10.1038/s41598-017-11160-w

Weitere Arbeiten, die, nicht in der Dissertationsschrift enthalten sind:

Charlotte Schröder, Carolin Dräger, Andrea Aebischer, Lisa Dähnert, Christiane Breidenstein, Svenja Mamerow, Simone Leidenberger, Martin Beer und Sandra Blome. **Kinetics of maternally derived antibodies upon intramuscular vaccination against classical swine fever with Suvaxyn(®) CSF Marker (CP7_E2alf).** Erschienen in *Veterinary Microbiology* 2016; 196:14-17.
doi: 10.1016/j.vetmic.2016.10.004.

Inhalt

1	Einleitung	1
2	Zielsetzungen	5
3	Literaturübersicht	7
	3.1 Zusammenfassung und Auswertung der verfügbaren Daten zur PED, insbesondere in Zentraleuropa – Übersichtsartikel zur Porzinen epidemischen Diarrhoe, <i>Der Praktische Tierarzt</i>	8
	3.2 Immunreaktion des Wirtes auf PEDV	33
	3.3 Laktogene Immunität	34
	3.4 Übersicht über aktuelle Impfkonzepete gegen PEDV	36
4	Ergebnisse - Virulenzcharakterisierung aktueller deutscher PEDV Stämme und Untersuchung der Schutzeffekte maternal übertragener Antikörper, <i>Scientific Reports</i>	39
5	Diskussion und Ausblick	75
	5.1 Charakterisierung aktueller PEDV Stämme in vivo und Untersuchung der Schutzeffekte maternal vermittelter Immunität als Voraussetzung für ein Muttertierschutzimpfkonzepet	75
	5.1.1 Charakterisierung der Virulenz aktueller deutscher PEDV Stämme <i>in vivo</i>	75
	5.1.2 Schutzeffekt maternaler Antikörper und Vakzinen	79
	5.2 Schlussfolgerungen und Ausblick	83
6	Zusammenfassung	85
7	Summary	87
8	Literaturverzeichnis	89
9	Abkürzungsverzeichnis	97
10	Danksagung	99

1 Einleitung

Die porcine epidemische Diarrhoe (PED) ist eine hochkontagiöse Darmerkrankung des Schweines. Ausgelöst wird die Erkrankung durch das gleichnamige Porcine epidemische Diarrhoe Virus (PEDV), ein Alphacoronavirus aus der Familie der *Coronaviridae*, welches eng mit dem Virus der Transmissiblen Gastroenteritis (TGEV) verwandt ist. Betroffen sind alle Schweineartigen, wobei schwere klinische Verläufe vor allem bei jungen Hausschweinen, insbesondere bei Saugferkeln, vorkommen. Die Erkrankung ist durch wässrigen Durchfall und Erbrechen, begleitet von Fieber, Dehydratation, Anorexie und Apathie gekennzeichnet. Die Morbiditätsraten sind in der Regel sehr hoch (bis 100%), während die Mortalitätsraten vom Alter, der allgemeinen Konstitution der betroffenen Tiere und dem beteiligten Virusstamm abhängen. Im Saugferkelbereich können sie bis 100% betragen.

In Europa wurde PEDV erstmals 1971 beschrieben und verursachte im Folgenden vor allem Ausbrüche bei Mastschweinen während der Siebziger- und Achtzigerjahre des letzten Jahrhunderts in Europa und Asien. In den Folgejahren gingen die Meldungen über PED-Ausbrüche in Europa aufgrund nicht näher bekannter Ursachen stark zurück, während das Virus in Asien endemisch wurde und seither regelmäßig Ausbrüche aus asiatischen Ländern berichtet werden.

Im Frühjahr 2013 wurde überraschend ein hochvirulenter PEDV-Stamm in den Vereinigten Staaten von Amerika (USA) diagnostiziert, der Ursache für verheerende Ausbrüche und daraus resultierende massive wirtschaftliche Einbußen war. Das Virus verbreitete sich in kürzester Zeit über insgesamt 29 amerikanische Staaten. Schätzungen wirtschaftlicher Schäden belaufen sich auf 900 Millionen bis 1,8 Milliarden US Dollar. Genomanalysen bestätigten, dass dieser amerikanische Stamm eng verwandt mit aktuellen ebenfalls hochvirulenten chinesischen Isolaten ist. Diese hochvirulenten PEDV-Stämme werden gemeinhin als NON-INDEL Stämme bezeichnet und Beobachtungen im Feld geben Anlass zu der Annahme, dass diese Stämme Ursache schwerster Krankheitsverläufe sind. Die Bezeichnung NON-INDEL leitet sich daraus ab, dass diese Stämme keine Insertionen bzw. Deletionen im für das Spike-Protein kodierenden Genomabschnitt aufweisen. Das Spike-Protein ist eines der vier Strukturproteine und das Hauptantigen für das Immunsystem des Wirtes. Neben den NON-INDEL Virusstämmen wurden ab Januar 2014 auch

Varianten mit Insertionen und Deletionen gefunden (sogenannte S-INDEL Stämme). Diese waren vor allem mit mildereren Verläufen in Mastschweinen assoziiert. Ein Prototyp dieser Varianten ist der Stamm OH851.

Aufgrund der drohenden Gefahr einer Einschleppung wurden Diagnostik und Überwachung in Europa forciert, um Informationen über den aktuellen Status der Schweinepopulation bezüglich PEDV zu erhalten. Bestätigte Ausbrüche wurden ab Mitte 2014 unter anderem aus Deutschland, der Ukraine, Frankreich und Österreich mit unterschiedlichen Morbiditäts- und Mortalitätsraten gemeldet. Mit Ausnahme der ukrainischen Ausbrüche, wurden in Europa mittels Genomanalysen ausschließlich S-INDEL Varianten nachgewiesen. In Deutschland war das klinische Bild trotz sehr hoher genetischer Identität der verursachenden Virusstämme sehr variabel und konnte nicht direkt mit bekannten Wirts- oder Virusfaktoren assoziiert werden.

Die einzige Präventions- beziehungsweise Bekämpfungsmaßnahme gegen die PED ist bislang ein gutes veterinärhygienisches Konzept. Darüber hinaus sind im asiatischen Raum einige Impfstoffe kommerziell erhältlich. Diese weisen einen wechselhaften Impferfolg im Feld und eine fragliche Vermittlung von Kreuzprotektion zwischen den Stämmen auf. Aufgrund der Tatsache, dass das Saugferkel den empfänglichsten Wirt darstellt, kann allerdings nur ein Muttertierschutzimpfkonzept einen verlässlichen Schutz in den ersten Lebenstagen vermitteln und damit den wirtschaftlichen Einfluss der Erkrankung auf die Schweineindustrie reduzieren. In den USA befindet sich eine Vakzine zur Muttertierschutzimpfung in der vorläufigen Zulassung, aber es fehlt bisher an Informationen über die Effektivität im Feld. Eine Voraussetzung für die Entwicklung eines Muttertierschutzimpfkonzeptes ist die Bestätigung des Schutzeffektes maternal vermittelter Immunität zumindest gegen eine homologe Belastungsinfektion der Saugferkel. Dies bezieht sich insbesondere auf die Verringerung der klinischen Symptomatik und eine Reduktion der Virusausscheidung zur Vermeidung von Verlusten und zur Eindämmung der Verbreitung des Virus im Bestand.

Vor dem Hintergrund der skizzierten Situation umfasste die vorliegende Arbeit eine Literaturrecherche, die in einem Übersichtsartikel für Praktiker resultierte, und eine *in vivo* Charakterisierung aktueller Virusstämme aus Deutschland im Saugferkelmodell. Dieses Modell wurde mit zwei repräsentativen PEDV-Stämmen etabliert und dazu

herangezogen, die Virulenz der Stämme und die protektive Wirkung maternaler Antikörper zu untersuchen.

Zur Vermeidung von Dopplungen ist der erwähnte Übersichtsartikel der Arbeit der Promotionsschrift als Literaturteil vorangestellt. Er wurde zusätzlich um je ein Kapitel zu relevanten PEDV-Impfstoffen, zur Immunreaktion des Wirtes und zur laktogenvermittelten Immunität ergänzt, um die Literaturübersicht für diese Arbeit zu komplettieren.

2 Zielsetzungen

Zusammenfassung und Auswertung der verfügbaren Daten zur PED, insbesondere in Zentraleuropa

PED hat großen wirtschaftlichen Einfluss auf die Schweineindustrie in Asien und seit 2013 auch in den USA. Um vergleichbar verheerende Ausbrüche in Europa und besonders in Deutschland zu vermeiden, sind umfassende Kenntnis des Erregers und ein verlässliches Impfkonzept essentiell. Um die aktuelle Situation in Europa zu analysieren und tiefere Informationen über PEDV im Allgemeinen zu erhalten, wurde eine praxisorientierte Literaturstudie durchgeführt und für praktizierende Tierärzte in kompakter Form zugänglich gemacht.

Charakterisierung aktueller PEDV Stämme in vivo und Untersuchung der Schutzeffekte maternal vermittelter Immunität als Voraussetzung für ein Muttertierschutzimpfkonzept

Mit der Bedrohung durch PED-Ausbrüche in den USA wurde die Diagnostik und Überwachung von PEDV in Europa verstärkt. In Deutschland wurden erste PED-Ausbrüche im Mai 2014 vor allem in Südwestdeutschland festgestellt. Aufgrund der Tatsache, dass trotz genetisch eng verwandter Virusstämme unterschiedliche Krankheitsverläufe beobachtet wurden, wurde die Virulenz aktueller deutscher Stämme *in vivo* untersucht und der protektive Effekt maternal vermittelter Immunität gegen eine homologe Belastungsinfektion der Saugferkel evaluiert. Die Belastbarkeit dieser maternalen Immunität im Hinblick auf die Ausprägung der klinischen Anzeichen und eine verringerte Virusausscheidung sind die Voraussetzung für ein verlässliches Muttertierschutzimpfkonzept und die Vermeidung hoher wirtschaftlicher Verluste in der Schweineindustrie.

3 Literaturübersicht

Die Literaturverzeichnisse der Publikationen in der Literaturübersicht und im Ergebnisteil werden in dem Zitierstil des jeweiligen Journals ausgegeben. Die Nummerierung von Abbildungen und Tabellen bezieht sich auf die publizierte Form des jeweiligen Manuskripts. Die in den Manuskripten enthaltene Literatur ist nicht im Literaturverzeichnis am Ende der Dissertationsschrift enthalten.

3.1 Zusammenfassung und Auswertung der verfügbaren Daten zur PED, insbesondere in Zentraleuropa – Übersichtsartikel zur Porzinen epidemischen Diarrhoe, Der Praktische Tierarzt

Porzine epidemische Diarrhoe

Simone Leidenberger, Sandra Blome

Der Praktische Tierarzt. Im Druck

Friedrich-Loeffler-Institut, Institut für Virusdiagnostik, Greifswald-Insel Riems

Der Praktische Tierarzt 98 (11)

Im Druck

doi: 10.2376/0032-681X-17-57

Porzine epidemische Diarrhoe

Zusammenfassung: Die porzine epidemische Diarrhoe (PED) ist eine akute, hochkontagiöse Darmerkrankung des Schweines, die eine hochgradige Enteritis, Diarrhoe, Erbrechen und Dehydratation bedingt. Die Mortalität kann vor allem in Saugferkeln sehr ausgeprägt sein. Das Porzine Epidemische Diarrhoe Virus (PEDV) ist ein behülltes, einzelsträngiges RNA-Virus positiver Polarität aus der Familie der *Coronaviridae*, Genus *Alphacoronavirus*.

Nach der erstmaligen Beschreibung in den 70er Jahren in Europa war die Erkrankung vor allem in Asien verantwortlich für nennenswerte wirtschaftliche Verluste. Dort ist die Erkrankung bis heute endemisch. In Europa erloschen die Ausbrüche rasch. In den letzten dreißig Jahren traten nur sehr sporadisch PED-Fälle in Europa auf. Nach Berichten aus Asien, dass eine neue PEDV-Variante zu erheblichen Verlusten führte, wurde im Mai 2013 auch eine hochvirulente PEDV-Variante in den Vereinigten Staaten von Amerika (USA) nachgewiesen. Betroffen waren alle Altersklassen von Schweinen mit Mortalitätsraten von bis zu 95% bei Saugferkeln. Seit Mai 2014 traten auch in Süd- und Westdeutschland Fälle der PED auf. In den meisten Fällen waren Mastbetriebe betroffen mit hoher Morbidität, aber vernachlässigbarer Mortalität. In betroffenen Zuchtbetrieben wurde von Mortalitätsraten von bis zu 85% berichtet. Ähnliche Krankheitsgeschehen wurden nachfolgend auch aus anderen zentraleuropäischen Ländern, wie Frankreich, den Niederlanden, Belgien, Italien und Österreich berichtet. Die Charakterisierung der beteiligten Virusstämme ergab, dass es sich in Zentraleuropa um sogenannte S-INDEL Varianten des Virus handelte, die, im Gegensatz zu den hochvirulenten NON-INDEL Stämmen aus Asien und den USA, Deletionen und Insertionen im Spike-Protein kodierenden Genabschnitt aufweisen. Diese Varianten werden mit mildereren PED-Verläufen assoziiert.

Zur Vermeidung der Einschleppung in den Bestand sind strikte Hygienemaßnahmen essentiell. PEDV ist nicht sehr umweltstabil und durch eine Vielzahl von Desinfektionsmitteln zu inaktivieren, allerdings ist die infektiöse Dosis – vor allem für Saugferkel – sehr gering und das Virus wird in hohen Mengen ausgeschieden. Derzeit sind keine Impfstoffe gegen die Erkrankung in Europa zugelassen.

Porcine epidemic diarrhea

Summary: Porcine epidemic diarrhea (PED) is an acute and highly contagious enteric disease of swine that results in severe enteritis, diarrhea, vomiting, and dehydration. Especially in suckling pigs, mortality can be very high. The causative agent, Porcine epidemic diarrhea virus (PEDV), is an enveloped positive single-stranded RNA virus that belongs to the family *Coronaviridae*, genus *Alphacoronavirus*.

After its first recognition in the 1970s in Europe, the disease caused considerable economic losses especially in Asia, where the disease remained endemic. In Europe, the disease disappeared rather quickly, and from most countries only very sporadic cases were reported over the last three decades. After reports from Asia, that a new PEDV variant caused considerable losses, a highly virulent PEDV variant emerged also in the United States (US), with swine farms experiencing explosive epidemics affecting all age classes of animals, with up to 95% mortality in suckling pigs.

Since May 2014, several cases of PED were also reported from the southern and western part of Germany. In most cases, fattening pigs were affected showing high morbidity with almost non-existent mortality. However, some breeding herds reported high mortality rates with up to 85% losses in suckling piglets. Similar outbreaks were observed in several other Central European countries including France, The Netherlands, Italy, Belgium, and Austria.

The characterization of the involved virus strains revealed that S-INDEL variants of the virus were involved in central Europe, which, in contrast to the highly virulent NON-INDEL strains from Asia and the USA, possess deletions and insertions in the spike protein encoding gene segment. These variants are associated with milder PED courses.

To avoid PEDV introduction in a herd, a strict hygiene management is mandatory. PEDV is not very stable and can be inactivated easily. However, the infectious dose is very low, especially for suckling pigs. Moreover, virus is shed in high amounts. Up to now, no vaccine is available in Europe.

Krankheitsbild und Epidemiologie

Die epizootische Virusdiarrhoe des Schweines (engl. *porcine epidemic diarrhea*; PED) wird durch ein Coronavirus verursacht, das u. a. mit dem Virus der Transmissiblen Gastroenteritis (TGEV) verwandt und klinisch kaum davon zu unterscheiden ist. Das Virus befällt ausschließlich Mitglieder der Familie *Suidae*. Die hoch ansteckende Erkrankung ist durch eine schwere Darmentzündung, wässrig-gelben Durchfall (siehe Abb. 1), Erbrechen und Dehydratation gekennzeichnet. Während alle Altersklassen von Schweinen erkranken können, sinkt die Sterblichkeit mit zunehmendem Alter. In betroffenen Beständen, insbesondere in der Ferkelaufzucht, kann die Infektion mit dem Virus der PED (PEDV) zu hohen Verlusten (bis 100%) führen. Mit zunehmendem Alter steigt die notwendige Infektionsdosis und die Erkrankung verläuft in der Regel milder mit geringeren Verlusten (Gerber et al. 2016b; Jung et al. 2015; Oldham 1972).



Abb. 1: An PED erkranktes Ferkel mit gelblichem Durchfall.

© Friedrich-Loeffler-Institut

Die Erkrankung trat erstmals 1971 in Europa auf und verursachte in den darauffolgenden Jahren große wirtschaftliche Verluste, insbesondere in Asien, wo sich die Infektion in der Schweinepopulation rasant ausbreitete (Oldham 1972) und bis heute endemisch ist. Im Jahre 2011 häuften sich die Berichte, dass eine neue, besonders aggressive Virusvariante auf dem Vormarsch sei, die Millionen von Ferkeln das Leben kostete (Li et al. 2012; Wang et al. 2013). Seit Mai 2013 sorgte dann eine ebenfalls besonders schwere Form der PED in den USA für Aufsehen. Sie

führte in vielen Schweinebetrieben zu explosionsartigen Epidemien, die alle Altersklassen von Schweinen betrafen. Bei Saugferkeln wurde eine bis zu 95%ige Mortalität beobachtet und ganze Ferkelpartien fielen aus. Die Sequenzierung der beteiligten Virusisolate zeigte eine hohe Verwandtschaft zu aktuellen asiatischen Stämmen. Dennoch sind geringgradige Abweichungen auf Gesamtenombasis zu finden (unterschiedliche Sequenzmuster, insbesondere im Spike-Protein) (Chen et al. 2014; Stevenson et al. 2013). Kürzlich wurde auch von sehr verlustreichen Ausbrüchen in ukrainischen Schweinebetrieben berichtet. Diese gingen mit 100 Prozent Verlusten im Saugferkelbereich, schweren Symptomen bei älteren Tieren und Aborten bei bis zu 30 Prozent der tragenden Sauen einher. Das nachgewiesene Virus ist sehr eng mit den hoch-virulenten US-amerikanischen Stämmen verwandt (Dastjerdi et al. 2015). In Europa wurden bestätigte Fälle ab 2014 aus Portugal (Mesquita et al. 2015), Spanien (Carvajal et al. 1995), Österreich (Steinrigl et al. 2015, Steinrigl et al. 2016), Deutschland (Stadler et al. 2015), Frankreich (Grasland et al. 2015), Slowenien (Toplak et al. 2016), Belgien (Theuns et al. 2015) und Italien (Martelli et al. 2008) gemeldet. Die aktuellen europäischen Stämme sind unten näher beschrieben (EFSA 2016).

Erreger

Es handelt sich bei PEDV um ein behülltes, 95-190 nm großes RNA-Virus aus der Familie der *Coronaviridae* im Genus *Alphacoronavirus* aus der Ordnung *Nidovirales*. Coronaviren enthalten das größte bekannte RNA-Genom, das im Fall von PEDV 28 Kilobasen umfasst und sich in mindestens 7 offene Leserahmen untergliedern lässt. Diese codieren sowohl für Nicht-Strukturproteine, beispielsweise für die zur Replikation notwendige Replikase, als auch für vier Strukturproteine. Hierbei handelt es sich um das Membran-Protein, das Hüllprotein, das Nukleokapsidprotein und das Spike-Protein, das dem Virus sein charakteristisches, elektronenmikroskopisches „kronenähnliches“ Aussehen verleiht (siehe Abbildung 2).

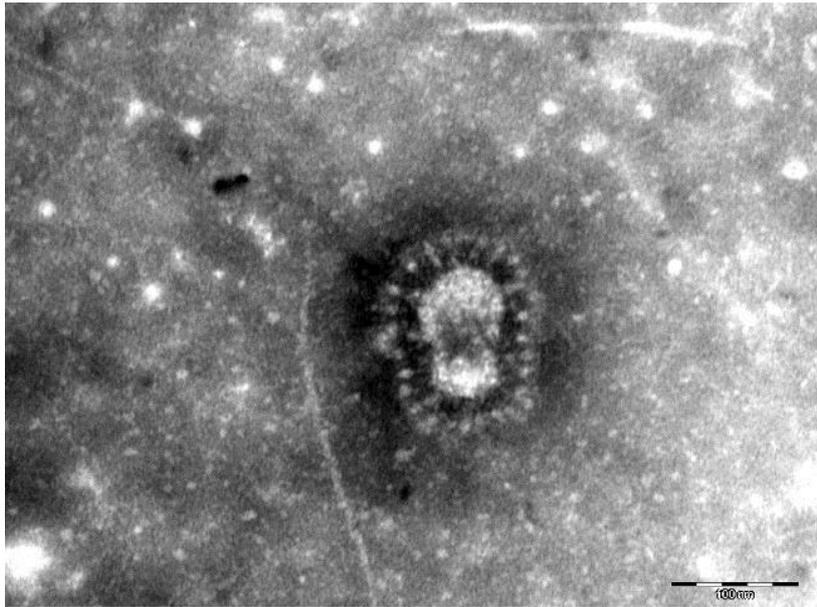


Abb. 2: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Corona-Virus-Partikels (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von V. Akimkin, CVUA Fellbach)

Das Spike-Protein ist verantwortlich für die Virus-Zellrezeptor-Interaktion und stellt das Hauptantigen dar, d.h. das Immunsystem reagiert vor allem mit Bildung von Antikörpern, die gegen das Spike-Protein gerichtet sind (Li et al. 2017; Oh et al. 2014). Damit ist das Spike-Protein neben dem Nukleokapsid- und Membranprotein ein geeigneter Kandidat für Totvakzinen und serologische Testverfahren wie Enzym-Linked-Immunosorbent-Assays (ELISA) (Makadiya et al. 2016; Paudel et al. 2014). Die verschiedenen Virusstämme weisen eine hohe Diversität in dem für das Spike-Protein kodierenden Genabschnitt und damit auch im Spike-Protein selbst auf (Lee et al. 2010).

Aufgrund der Unterschiede in dem für das Spike-Protein kodierenden Genomabschnitt werden PEDV-Stämme in zwei Gruppen mit jeweils zwei Untergruppen unterteilt:

Genogruppe 1 (G1, klassisch) mit den Untergruppen 1a und 1b

Genogruppe 2 (G2, epidemisch oder pandemisch) mit den Untergruppen
2a und 2b (Lee 2015)

Der PEDV-Stamm CV777, sowie verschiedene zellkulturadaptierte Stämme und Impfviren werden in Untergruppe 1a eingruppiert. Untergruppe 1b steht für Virusstämme, die in China, Südkorea und seit kurzem auch in den USA und Europa auftreten und sich genetisch von der Genogruppe 2 unterscheiden. Die Genogruppe G2 besteht aus Feldisolaten, die verantwortlich sind für frühere Ausbrüche in Asien und die vor kurzem aufgetretenen Fälle mit schwerer Klinik in Nordamerika und Asien.

Genetische Analysen haben gezeigt, dass die Stämme der Untergruppe 1b sehr wahrscheinlich durch eine Rekombination von Viren der Genogruppe 1a und 2 entstanden sind. Der geographische Ursprung dieser Untergruppe liegt vermutlich in China (Lee 2015).

Basierend auf Besonderheiten der für das Spike-Protein kodierenden Gensequenzen unterscheidet man sogenannte NON-INDEL (Stämme ohne Insertions- und Deletionsmutationen im Genabschnitt des Spike-Proteins) und S-INDEL Stämme (Stämme mit den genannten Mutationen). Das US-amerikanische PEDV und hochvirulente asiatische Stämme gehören zu den NON-INDEL Stämmen, die aktuellen zentraleuropäischen Stämme sind S-INDEL-Varianten (Chen et al. 2014; Lee 2015).

Berichte aus der Praxis in Verbindung mit Vollängensequenzierungen des Virusgenoms (Next-generation Sequencing, NGS) lassen vermuten, dass S-INDEL-Stämme einen milderen Krankheitsverlauf auslösen und NON-INDEL-Stämme sich durch höhere Virulenz auszeichnen. Aber es gibt auch Fallberichte von S-INDEL-Varianten, die zu schweren klinischen Symptomen mit hohen Letalitätsraten führten, so dass davon ausgegangen werden kann, dass noch weitere Faktoren Einfluss auf das Krankheitsgeschehen haben (Lee 2015).

Situation in Deutschland

Auch in Deutschland sind seit Mai 2014 PED-Fälle aufgetreten, mit steigenden Fallzahlen im Winter. In den meisten Fällen stehen sehr hohe Erkrankungsraten geringen Verlustraten gegenüber. Mittlerweile sind viele Bundesländer betroffen.

Einige Betriebe berichten jedoch auch von hohen Verlustraten in jungen Saugferkeln (>80 Prozent Saugferkelverluste). Es wurde vermutet, dass in diesen Fällen Sekundärinfektionen und Management eine größere Rolle im Krankheitsgeschehen spielen.

Weiterführende Untersuchungen zu Koinfektionen, die im Rahmen der Detailanalysen durchgeführt wurden, zeigten keine klare Korrelation zwischen schwerer PED-Symptomatik und anderen spezifischen Pathogenen (Hanke et al. 2017).

Zur Beantwortung der Frage, ob es sich bei den in Deutschland vorkommenden Virusstämmen um Stämme handelt, die den US-amerikanischen ähneln, wurden inzwischen über 40 PEDV-Vollängensequenzen mittels NGS erstellt und vergleichenden Analysen unterzogen (Hanke et al. 2015). Basierend auf diesen Daten kann man folgende Aussagen treffen:

- a) die bisher charakterisierten PEDV-Stämme aus Deutschland sind eng miteinander verwandt und bilden eine Gruppe mit wenigen Clustern, die sich von den historischen PEDV- Stämmen deutlich unterscheidet,
- b) ähnliche Viren wurden u.a. in Italien, Frankreich, Österreich und den Niederlanden charakterisiert,
- c) es existiert eine deutliche Abgrenzung zu den hochvirulenten US-amerikanischen und asiatischen Stämmen,
- d) eine hohe Ähnlichkeit besteht jedoch mit einem Stamm, der ebenfalls in den USA bei Fällen mit milderer Klinik beschrieben wurde. Letzterer ist ebenfalls eine S-INDEL-Variante.

Weiterführenden Untersuchungen sind angezeigt um diese Befunde besser einordnen zu können. Derzeit werden weitere Metagenomanalysen durchgeführt (Hanke et al. 2015; Henniger und Schwarz 2014; Stadler et al. 2015).

Pathogenese, klinische Symptomatik und Immunitätsentwicklung

Das Wirtstier Schwein infiziert sich fäkal-oral, d.h. über den Kontakt zu virushaltigen Fäces. Coronaviren zeigen einen strengen Zelltropismus für epitheliale Zellen entweder des Respirations- (PRCV) oder des Verdauungstraktes (PEDV, TGEV, delta-Corona-Virus) und sie infizieren sehr effizient Makrophagen. Die Zielzellen des PED-Virus sind Zottenzellen des Jejunalepithels, aber auch im Bereich des Kolons finden sich infizierte Zottenzellen. Nach dem Eintritt in die Wirtszelle über den Zellrezeptor „porcine Aminopeptidase“ vermehrt sich das Virus im Zytoplasma und wird nach Absterben und Lyse der Wirtszelle wieder freigesetzt (Liu et al. 2015). In Zellkultur ist ein deutlicher zytopathischer Effekt zu erkennen. Es bilden sich

Synzytien, mehrkernige Riesenzellen und die Zellen lösen sich von ihrer Unterlage ab (Hofmann und Wyler 1988). Histologisch zeigen sich stark verkürzte und verschmolzene Darmzotten bis hin zu völlig fehlenden Zotten (siehe Abbildung 3). Ebenso ist eine Vakuolisierung der Zottenepithelzellen zu beobachten.

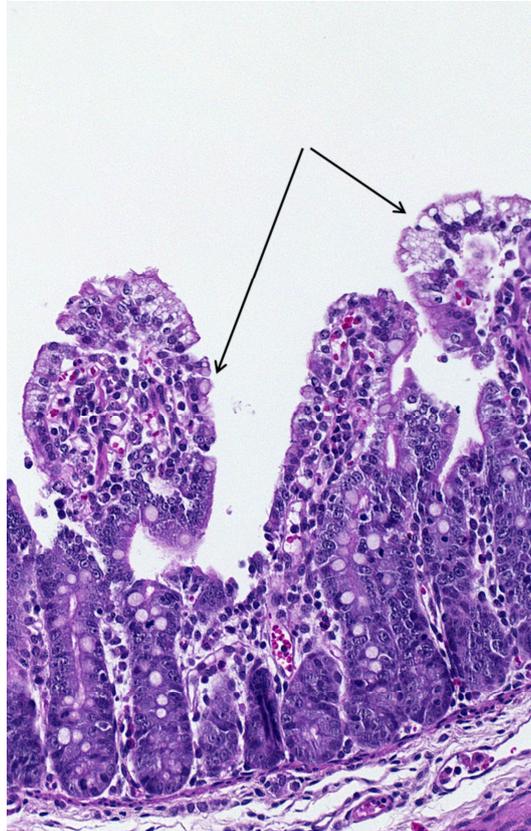


Abb. 3: Histopathologische Aufnahme der Zotten und Krypten eines mit PEDV infizierten Ferkels in der klinischen Phase der Erkrankung: verkürzte Darmzotten und Vakuolisierung der Epithelzellen (Pfeile). © Friedrich-Loeffler-Institut

Die Schädigung der Zottenzellen führt zu einer hochgradigen katarrhalischen Enteritis mit wässrigem Durchfall verbunden mit Dehydratation unterschiedlichen Schweregrades (Jung et al. 2014).

Die ersten klinischen Symptome treten abhängig vom Alter der Tiere und vom jeweiligen Virusstamm 22 – 36 h nach der Infektion auf. In Ausnahmefällen kann die Inkubationszeit auf 12 h verkürzt sein. Im Anfangsstadium der Erkrankung zeigen die Tiere zunächst Erbrechen, welches zumeist nur in den ersten 1-3 Tagen nach Erkrankungsbeginn zu beobachten ist. Etwa 12 h nach Beginn der Erkrankung zeigen die Tiere Durchfall in unterschiedlichen Schweregraden. Häufig erscheint der Ferkelkörper trommelförmig, bedingt durch hochgradig aufgegaste Jejunalschlingen (Rolle und Mayr 2011; Stevenson et al. 2013).

Wie Abbildung 4 zeigt, sind die Tiere – in der Regel vor allem Saugferkel – in schweren Fällen bereits nach wenigen Stunden nicht mehr stehfähig, apathisch, hochgradig dehydriert oder bereits infolge akuten Kreislaufversagens verendet.



Abb. 4: PEDV-infiziertes Saugferkel in desolatem Zustand: Das Tier ist hochgradig dehydriert und nicht mehr stehfähig. © Friedrich-Loeffler-Institut

Bei überlebenden Tieren persistiert der Durchfall über mehrere Tage und ist selbstlimitierend. Betroffene Tiere, die die klinische Erkrankung überstehen, erholen sich in der Regel vollständig. Die Morbiditätsrate kann 100% erreichen, während die Letalitätsraten stark schwanken können. Diese Unterschiede sind unter anderem auf das Alter der Tiere zum Zeitpunkt der Infektion, den Virusstamm, mögliche Begleitinfektionen (siehe oben) und das generelle Hygienemanagement zurückzuführen.

Bei laktierenden Sauen wird unter Umständen ein Sistieren der Milchproduktion aufgrund von Inappetenz und Durchfall beobachtet, was die Situation für die betroffenen Ferkel verkompliziert (Leidenberger et al., Manuskript zur Veröffentlichung eingereicht). Postmortale und makroskopisch sichtbare Veränderungen bei verendeten oder euthanasierten Tieren sind auffällig dilatierte, aufgegaste Jejunumschlingen (Stadler et al. 2015) und vergrößerte Mesenteriallymphknoten. Bisweilen sind auch die Peyerschen Platten aufgrund reaktiver Größenzunahme gut sichtbar. Teilweise kann ein Ödem des Mesokolons beobachtet werden (Abb. 5; eigene, bislang unveröffentlichte Studien).

Dies macht die differentialdiagnostische Abklärung von Ödemkrankheit und Intoxikationen durch *Clostridium difficile* notwendig.



Abb. 5: Makroskopische pathologische Befunde; erhoben postmortal an einem Tier mit PED; links: aufgegaste, dilatierte Jejunalschlingen, rechts: ausgeprägtes Mesokolonödem. © Friedrich-Loeffler-Institut

Bei Tieren, die die akute Phase der Erkrankung überleben, ist ein serologischer Nachweis zum Teil bereits sieben Tage nach der Infektion möglich und die Antikörper bleiben nach natürlicher Infektion laut bisheriger Studien teilweise bis zu sechs Monate im Blut nachweisbar, wobei nach vier Monaten noch 60% der Tiere als serologisch positiv detektiert wurden (Bjuström-Kraft et al. 2016; Ouyang et al. 2015).

Maternale Antikörper sind in der Lage, Saugferkel vor einer klinisch manifesten Infektion zu schützen, wobei insbesondere dem Immunglobulin A (IgA) eine schützende Rolle zukommt (Langel et al. 2016). Die Höhe der maternalen Antikörperspiegel im Serum der Ferkel variiert individuell zwischen den Würfen (Song et al. 2016) und zeigt 25 – 27 Tage nach der Geburt eine sinkende Tendenz. Bei der Diskussion zukünftiger Immunisierungskonzepte ist zu bedenken, dass die Immunität der Sau eher kurzlebig ist und daher vor jeder Abferkelung geboostert werden müsste. Die laktogene Immunität hat eine große Bedeutung, da lokal im Darm wirkende Immunglobuline für den protektiven Effekt verantwortlich sind. Wenn Sauen oral mit lebendem Virusmaterial inokuliert werden, sind die Ferkel zu einem Großteil geschützt, da vermutlich über die maternal Achse „Darm-Gesäuge“ hohe Spiegel sekretorischen IgA in Kolostrum und Milch als Folge der Wanderung spezifischer Plasmazellen ins Gesäuge erreicht werden (Langel et al. 2016, Song et al. 2015, 2016).

Diagnostische Möglichkeiten

Der Nachweis von PEDV kann in einigen kommerziellen Laboren, den veterinärmedizinischen Untersuchungseinrichtungen in den Bundesländern und bestätigend auch am Friedrich-Loeffler-Institut erfolgen.

Es besteht die Möglichkeit, das Genom der Viren mittels real-time Polymerasekettenreaktion nachzuweisen. Auf diese Weise kann auch eine Differenzierung zwischen PEDV und TGEV erfolgen (es wurden multiplex RT-PCRs zugelassen, siehe Zulassungsstelle des FLI). Als Probenmaterial eignen sich Einzel- oder Sammelkotproben sowie Jejenumproben betroffener Tiere.

Es besteht generell die Möglichkeit, Kotproben elektronenmikroskopisch auf Coronaviren zu untersuchen. Darüber hinaus kann eine Anzucht auf empfänglichen Zellen (Vero-Zellen) versucht werden, diese gelingt jedoch nur selten. Am wahrscheinlichsten ist eine Isolierung des Virus aus Darmproben infizierter Tiere. Allerdings gelingt die Anzucht nach bisherigen Erfahrungen auch dann nur in weniger als 10% der Fälle (Chen et al. 2014; Oka et al. 2014).

Für den serologischen Nachweis sind kommerzielle ELISAs verfügbar, die jedoch eine sehr variable Sensitivität und Spezifität besitzen (Strandbygaard et al. 2016). Momentan gilt die Antikörperdiagnostik über indirekte Immunfluoreszenzfärbungen als Goldstandard. Hierbei wird eine mit PEDV Antigen-beschichtete Platte mit den zu testenden Serumproben inkubiert und anschließend mittels eines Fluoreszenzfarbstoff-markierten, speziesspezifischen Sekundäantikörpers gefärbt (siehe Abb. 6). Verlässliche Neutralisationstests konnten noch nicht etabliert werden. Als Probenmaterial für die Antikörperdiagnostik eignet sich vor allem Serum, aber auch in Milch oder Kolostrumproben sowie aus Speichelproben lassen sich mit geeigneten Testverfahren Antikörper nachweisen (Diel et al. 2016; Gerber et al. 2016a).

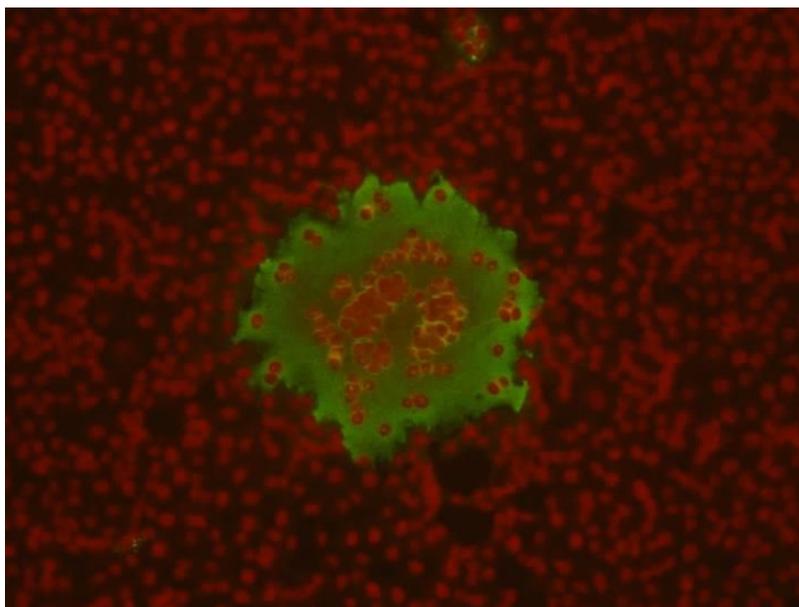


Abb. 6: Immunfluoreszenzfärbung infizierter Vero-Zellen (Nierenzellen der grünen Meerkatze); Grün: virushaltiges Zytoplasma, rot: Zellkerne.

© Friedrich-Loeffler-Institut

Differentialdiagnosen

Durchfallerkrankungen im Bestand können unterschiedlicher Genese sein. Differentialdiagnostisch ist im Hinblick auf die PED vor allem die Abklärung der meldepflichtigen Transmissiblen Gastroenteritis (TGE) notwendig. Die TGE, die von einem eng verwandten Coronavirus verursacht wird, ist klinisch nicht von PED zu unterscheiden, so dass eine labordiagnostische Differenzierung mittels RT-PCR notwendig ist.

Klinisch ebenfalls schwer abzugrenzen, sind Infektionen mit den neuartigen porcinen delta-Coronaviren, die in Europa bisher nicht nachgewiesen wurden (EFSA 2014).

In der Altersklasse der Saugferkel können porcine Rotaviren (Rotavirus A) eine Rolle spielen, wobei die Symptome in der Regel bei Tieren im Alter bis zu sechs Wochen beobachtet werden, und die Diarrhoe bei milden Verläufen bereits nach 24-28 Stunden selbstlimitierend ist. Die PED betrifft im Bestand ggf. auch ältere Tiere, wenn auch mit deutlich schwächerer Symptomatik (siehe oben). Sowohl Infektionen mit delta-Coronaviren (PDCoV) als auch mit porcinem Rotavirus A können mittels spezifischer Erregernachweise in der RT-PCR von PEDV abgegrenzt werden. Desweiteren kommen bakterielle Ursachen wie *E.coli* (sowohl als häufigste Ursache von Saugferkeldurchfällen, als auch kurz nach dem Absetzen auftretend) und *Clostridium difficile* oder *Clostridium perfringens* Typ A und C in Betracht, wobei hier

Clostridium perfringens Typ C mit hämorrhagisch-nekrotisierenden Enteritiden in den ersten Lebenstagen im Vordergrund steht. Sind vorrangig Absetzer und Tiere bis 60 kg Körpergewicht klinisch betroffen, müssen auch Infektionen mit *Salmonella* Choleraesuis, *S. Typhisuis* und hauptsächlich *S. Typhimurium* in die Differentialdiagnostik mit einbezogen werden. Durch Salmonellen verursachte Durchfälle sind bei Saugferkeln eher die Ausnahme. Diese Tiere stellen im Betrieb in der Regel ein latentes Keimreservoir dar, ebenso wie ältere Mastschweine und Zuchttiere (Rolle und Mayr 2011). Desweiteren sind Parasiten wie Kryptosporidien (5-8 Wochen alte Ferkel, Infektion verläuft oft symptomlos, kann aber auch v.a. bei Koinfektionen mit beispielsweise Rotaviren zu Durchfall und Erbrechen führen) und Kokzidien (*Isospora suis*) weit verbreitet. Kokzidien verursachen Durchfallerkrankungen bei zwei bis drei Wochen alten Tieren (Boch 2006).

Maßnahmen

Aufgrund der viralen Genese ist eine kausale Therapie nicht möglich. Es kann lediglich versucht werden, die Saugferkelverluste durch eine unterstützende symptomatische Therapie zu minimieren. Ein gutes Management der betroffenen Tiere, wie das Sicherstellen der ausreichenden Aufnahme einer Elektrolytlösung und ggf. von Milchaustauscher für den Fall des Sistierens der Milchproduktion der betroffenen Sau, ist sicherzustellen. Ebenso ist zusätzliche Wärme notwendig, um einem Auskühlen der meist feuchten Ferkel entgegenzuwirken. Aus ähnlichem Grund ist ein Trocknen der Ferkel hilfreich (Carvajal et al. 2015).

Das Virus wird im Ausbruchsfall in hohen Dosen ausgeschieden und die infektiöse Dosis ist v.a. für Saugferkel sehr gering. PEDV ist nicht sehr umweltstabil, kann jedoch bei Temperaturen von 4° bis 50° Celsius und pH-Werten zwischen 4 und 9 replikationsfähig bleiben (Hofmann und Wyler 1989). Das Virus kann grundsätzlich durch eine Vielzahl von sauren oder basischen Desinfektionsmitteln inaktiviert werden. Einfache Desinfektions- und Hygienemaßnahmen, wie Duschen und Kleiderwechsel, können die Verschleppung verhindern (Carvajal et al. 2015; Lee 2015).

Um Infektionsketten im Bestand zu unterbrechen, wird häufig eine „Feedback“-Infektion der Sauen im Bestand mit Kot- oder Dünndarmmaterial infizierter Ferkel durchgeführt. Diese Maßnahme ist in Ermangelung einer geeigneten Vakzine eine Möglichkeit, die Immunitätslage der Sauen zu stabilisieren. Es wird eine Immunität

des nächsten Wurfs über maternale Antikörper induziert. Dieses Verfahren wurde in den USA während der verheerenden Ausbrüche mit sehr unterschiedlichen Erfolgen angewandt (Schwartz et al. 2014).

Wichtige Eckpunkte für ein funktionierendes „Feedback“-Protokoll sind folgende: Der Bestand sollte geschlossen werden, d.h. alle Jungsauen, die zur Remontierung in den nächsten vier bis sechs Monaten benötigt werden, sollten sich im Bestand befinden. Nach der labordiagnostischen Bestätigung von PEDV im Bestand sollten alle Sauen gleichzeitig mit virushaltigem Kot- oder Darmmaterial klinisch kranker Tiere oral infiziert werden, wobei eine wiederholte Exposition die Immunreaktion stimuliert und in höheren Antikörperspiegeln in Serum und Kolostrum resultiert (Clement et al. 2016). In der Folge sind alle Sauen auf klinische Symptome hin zu untersuchen und Sauen, die einige Tage nach der Infektion keine Klinik gezeigt haben, sollten re-exponiert werden. Nach einer Beobachtungszeit von 30 Tagen sollten seronegative Sentinel-Tiere zugestellt werden und diese ebenfalls 30 Tage auf klinische Symptome und Antikörper untersucht werden (Carvajal et al. 2015; Geiger und Connor 2013; Schwartz et al. 2014). Im Schnitt werden für die Sanierung 12 Wochen benötigt (Goede und Morrison 2016).

Diese Maßnahme einer „Feedback“-Infektion der Sauen ist nicht gesetzeskonform und auch aus Gründen der Biosicherheit und Hygiene und im Hinblick auf Tierseuchenbekämpfung und –prophylaxe nicht zu empfehlen.

Prävention

Zur Vermeidung des Eintrags von PEDV in den Bestand sind strikte Hygienemaßnahmen einzuhalten. Darunter fallen unter anderem Kleidungswechsel, Duschen und Desinfektion von Transportfahrzeugen zwischen Betrieben sowie strikte Einschränkung des Personenkreises, der Zutritt zu den Stallungen hat (Carvajal et al. 2015).

Bisher ist in Europa kein Impfstoff gegen die PED zugelassen. Eine Vielzahl an Lebend- und Totimpfstoffen (siehe Tabelle 1, (Iowa State University of Science and Technology 2004)) von unterschiedlichen Herstellern sind in Asien, vor allem Südkorea, aber auch China und Japan, verfügbar. Es handelt sich teilweise um Kombinationsimpfstoffe, die parallel TGEV und Rotaviren mit erfassen. Die Wirksamkeit der bisher auf dem Markt verfügbaren Vakzinen wird kontrovers diskutiert. Die Impfstoffe induzieren einen partiellen Schutz, durch den zwar eine

schwerwiegende klinische Symptomatik meist verhindert werden kann, die Virusausscheidung jedoch nicht verringert oder gar verhindert werden kann. Auch in geimpften Beständen werden im asiatischen Raum immer wieder Ausbruchsfälle gemeldet (Gerdtts und Zakhartchouk 2016; Song et al. 2015; Song und Park 2012).

In den USA sind ebenfalls zwei Vakzinen zugelassen, von denen sich eine noch in der vorläufigen Zulassungsphase befindet (Schwartz und Rademacher 2016). Beide sollen als Muttertierschutzimpfung eingesetzt werden. Aber auch hier gibt es Untersuchungen, dass vor allem Sauen, die vollständig naiv sind (d.h. nicht vorinfiziert und erstmalig geimpft), nur einen unzureichenden laktogenen Schutz an die Ferkel vermitteln (Schwartz und Rademacher 2016)

Tabelle 1: Übersicht über weltweit verfügbare Vakzinen

Hersteller	Impfstoffname	Typ	Stamm/Subtyp	Adjuvans	zugelassen in
CAVAC (ChoongAng Vaccine Laboratories Co., Ltd.)	SuiShot® PT-100 (Porcine Epidemic Diarrhea, Transmissible Gastroenteritis)	Totvakzine	keine Information	Aluminiumhydroxid	Südkorea
	SuiShot® PED	Lebendvakzine	keine Information	keine Information	Südkorea
	SuiShot® PED-K	Totvakzine	keine Information	keine Information	Südkorea
	SuiShot® PED-SM	Lebendvakzine	61P	kein Adjuvans	Südkorea
	SuiShot® TR	Lebendvakzine	keine Information	kein Adjuvans	Südkorea
Green Cross Veterinary Products Co. Ltd.	G.C. PT-Vac	keine Information	keine Information	keine Information	Südkorea
	PED ORAL Vaccine	Lebendvakzine	DR13	keine Information	Südkorea
Harrisvaccines, Inc.	Porcine Epidemic Diarrhea Vaccine, RNA	RNA	keine Information	keine Information	USA
Komipharm International Co., Ltd.	PRO-VAC® PED-Fc	Totvakzine	Fc	IMS-1313	Südkorea
	PRO-VAC® TRP	Lebendvakzine	SM98P (PED), 175L (TGE), A1, 10 (Rota Virus)	kein Adjuvans	Südkorea
	PRO-VAC® PED	Lebendvakzine	SM98P	kein Adjuvans	Südkorea
	PRO-VAC® PED-K	Totvakzine	SM98P	Montanide IMS-1313 NPR	Südkorea
	PRO-VAC® TP	Totvakzine	SM98P (PED), 175L (TGE)	Montanide IMS-1313 NPR	Südkorea

Tabelle 1: Übersicht über weltweit verfügbare Vakzinen (Fortsetzung)

Nisseiken Co., Ltd.	Nisseiken PED Live Vaccine	Lebendvakzine	P-5V	kein Adjuvans	Japan
	Nisseiken TGE/PED Vaccine (Porcine Transmissible Gastroenteritis, Porcine Epidemic Diarrhea)	Lebendvakzine	P-5V (PED), H-5 (TGE)	kein Adjuvans	Japan
Qilu Animal Health Products Factory	Porcine Transmissible Gastroenteritis/Porcine Epidemic Diarrhea Vaccine	Totvakzine	keine Information	keine Information	China
Zoetis Animal Health US	Porcine Epidemic Diarrhea Vaccine	Totvakzine	keine Information	keine Information	USA (vorläufige Zulassung)

Generell ist zu bedenken, dass eine Immunität nicht lang anhaltend ist. Studien lassen vermuten, dass ein effizienter Schutz durch Antikörper sechs Monate nach erfolgter Infektion nicht mehr gewährleistet ist, insbesondere im Hinblick auf maternalen Schutz der Saugferkel (Srijangwad et al. 2017). Dies erklärt, warum es selten zu einer soliden Herdenimmunität kommt und selbst Mastschweine, die als Saugferkel eine PED durchgemacht haben, erneut erkranken können.

Die PED unterliegt weder der Anzeige- noch der Meldepflicht, so dass es keine offizielle Statistik der Fälle und Untersuchungen gibt. Nichtsdestotrotz lässt sich sagen, dass die PED eindeutig eine „emerging disease“ ist, deren Einfluss im Hinblick auf die Schweineindustrie in Deutschland insgesamt bisher überschaubar bleibt. Dennoch hat die Erkrankung für betroffene Betriebe wirtschaftliche Einbußen zur Folge und die Betriebssanierung gestaltet sich schwierig. Zur Bekämpfung stehen nur veterinärhygienische Maßnahmen zur Verfügung, da bislang keine Impfstoffe in Europa zugelassen sind.

Conflict of interest

Die Autoren erklären, dass keine geschützten, finanziellen, beruflichen oder anderweitigen Interessen an einem Produkt oder einer Firma bestehen, welche die in dieser Veröffentlichung genannten Inhalte oder Meinungen beeinflussen können.

Literatur

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 (2016): Porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) detection and antibody response in commercial growing pigs. *BMC Vet Res*. doi: 10.1186/s12917-016-0725-5.

Boch J, Supperer, R (2006): Befall mit Apicomplexa. In: Schnieder T (Hrsg.), *Veterinärmedizinische Parasitologie*. Parey, Singhofen, 360-363.

Carvajal A, Argüello H, Martínez-Lobo F J, Costillas S, Miranda R, de Nova P J G, Rubio P (2015): Porcine epidemic diarrhoea: new insights into an old disease. *Porcine Health Manag*. doi: 10.1186/s40813-015-0007-9.

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

Chen Q, Li G, Stasko J, Thomas J T, Stensland W R, Pillatzki A E, Gauger P C, Schwartz K J, Madson D, Yoon K J, Stevenson G W, Burrough E R, Harmon K M, Main R G, Zhang J (2014): Isolation and characterization of porcine epidemic diarrhea viruses associated with the 2013 disease outbreak among swine in the United States. *J Clin Microbiol* 52(1): 234-243.

Clement T, Singrey A, Lawson S, Okda F, Nelson J, Diel D, Nelson E A, Christopher-Hennings J (2016): Measurement of neutralizing antibodies against porcine epidemic diarrhea virus in sow serum, colostrum, and milk and in piglet serum samples after feedback. *J Swine Health Prod* 24(3): 147-153.

Dastjerdi A, Carr J, Ellis R J, Steinbach F, Williamson S (2015): Porcine Epidemic Diarrhea Virus among Farmed Pigs, Ukraine. *Emerg Infect Dis* 21(12): 2235-2237.

Diel D G, Lawson S, Okda F, Singrey A, Clement T, Fernandes M H, Christopher-Hennings J, Nelson E A (2016): Porcine epidemic diarrhea virus: An overview of current virological and serological diagnostic methods. *Virus Res* 226: 60-70.

EFSA (2014): Scientific Opinion on porcine epidemic diarrhoea and emerging porcine deltacoronavirus. abgerufen: März 2017, <https://www.efsa.europa.eu/de/efsajournal/pub/3877>.

EFSA (2016): Collection and review of updated scientific epidemiological data on porcine epidemic diarrhoea. abgerufen: Mai 2017, <https://www.efsa.europa.eu/de/efsajournal/pub/4375>.

Geiger J O, Connor J F (2013): Porcine Epidemic Diarrhea, Diagnosis, and Elimination. abgerufen: Juni 2017, <https://www.aasv.org/aasv%20website/Resources/Diseases/PED/13-05-29PEDWhitePaper.pdf>.

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

Gerber P F, Xiao C-T, Lager K, Crawford K, Kulshreshtha V, Cao D, Meng X-J, Opriessnig T (2016): Increased frequency of porcine epidemic diarrhoea virus shedding and lesions in suckling pigs compared to nursery pigs and protective immunity in nursery pigs after homologous re-challenge. *Vet Res*. doi: 10.1186/s13567-016-0402-5.

Gerdts V, Zakhartchouk A (2016): Vaccines for porcine epidemic diarrhoea virus and other swine coronaviruses. *Vet Microbiol* 206: 45-51.

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

Grasland B, Bigault L, Bernard C, Quenault H, Toulouse O, Fablet C, Rose N, Touzain F, Blanchard Y (2015): Complete genome sequence of a porcine epidemic diarrhoea s gene indel strain isolated in france in december 2014. *Genome Announc*. doi: 10.1128/genomeA.00535-15.

Hanke D, Jenckel M, Petrov A, Ritzmann M, Stadler J, Akimkin V, Blome S, Pohlmann A, Schirrmeier H, Beer M, Hoper D (2015): Comparison of porcine epidemic diarrhoea viruses from Germany and the United States, 2014. *Emerg Infect Dis* 21(3): 493-496.

Hanke D, Pohlmann A, Sauter-Louis C, Hoper D, Stadler J, Ritzmann M, Steinrigl A, Schwarz B A, Akimkin V, Fux R, Blome S, Beer M (2017): Porcine Epidemic Diarrhea in Europe: In-Detail Analyses of Disease Dynamics and Molecular Epidemiology. *Viruses*. doi: 10.3390/v9070177.

Henniger T, Schwarz B A (2014): Porcine epidemic diarrhea (PED) - Neuausbrüche in deutschen Mastschweinebeständen. *Tierärztl. Umschau* 69: 394-398.

Hofmann M, Wyler R (1988): Propagation of the virus of porcine epidemic diarrhea in cell culture. *J Clin Microbiol* 26(11): 2235-2239.

Hofmann M, Wyler R (1989): Quantitation, biological and physicochemical properties of cell culture-adapted porcine epidemic diarrhea coronavirus (PEDV). *Vet Microbiol* 20(2): 131-142.

Iowa State University of Science and Technology (2004): Vaccines : Porcine Epidemic Diarrhea. abgerufen: April 2017, http://www.cfsph.iastate.edu/Vaccines/disease_list.php?disease=porcine-epidemic-diarrhea&lang=en.

Jung K, Annamalai T, Lu Z, Saif L J (2015): Comparative pathogenesis of US porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) strain PC21A in conventional 9-day-old nursing piglets vs. 26-day-old weaned pigs. *Vet Microbiol* 178(1-2): 31-40.

Jung K, Wang Q, Scheuer K A, Lu Z, Zhang Y, Saif L J (2014): Pathology of US porcine epidemic diarrhea virus strain PC21A in gnotobiotic pigs. *Emerg Infect Dis* 20(4): 662-665.

Langel S N, Paim F C, Lager K M, Vlasova A N, Saif L J (2016): Lactogenic Immunity and Vaccines for Porcine Epidemic Diarrhea Virus (PEDV): Historical And Current Concepts. *Virus Res* 226: 93-107.

Lee C (2015): Porcine epidemic diarrhea virus: An emerging and re-emerging epizootic swine virus. *Virol J*. doi: 10.1186/s12985-015-0421-2.

Lee D K, Park C K, Kim S H, Lee C (2010): Heterogeneity in spike protein genes of porcine epidemic diarrhea viruses isolated in Korea. *Virus Res* 149(2): 175-182.

Li C, Li W, Lucio de Esesarte E, Guo H, van den Elzen P, Aarts E, van den Born E, Rottier P J, Bosch B J (2017): Cell attachment domains of the PEDV spike protein are key targets of neutralizing antibodies. *J Virol*. doi: 10.1128/jvi.00273-17.

Li W, Li H, Liu Y, Pan Y, Deng F, Song Y, Tang X, He Q (2012): New variants of porcine epidemic diarrhea virus, China, 2011. *Emerg Infect Dis* 18(8): 1350-1353.

Liu C, Tang J, Ma Y, Liang X, Yang Y, Peng G, Qi Q, Jiang S, Li J, Du L, Li F (2015): Receptor usage and cell entry of porcine epidemic diarrhea coronavirus. *J Virol* 89(11): 6121-6125.

Makadiya N, Brownlie R, van den Hurk J, Berube N, Allan B, Gerdtts V, Zakhartchouk A (2016): S1 domain of the porcine epidemic diarrhea virus spike protein as a vaccine antigen. *Virol J.* doi: 10.1186/s12985-016-0512-8.

Martelli P, Lavazza A, Nigrelli A D, Meriardi G, Alborali L G, Pensaert M B (2008): Epidemic of diarrhoea caused by porcine epidemic diarrhoea virus in Italy. *Vet Rec* 162(10): 307-310.

Mesquita J R, Hakze-van der Honing R, Almeida A, Lourenco M, van der Poel W H, Nascimento M S (2015): Outbreak of Porcine Epidemic Diarrhea Virus in Portugal, 2015. *Transbound Emerg Dis* 62(6): 586-588.

Oh J, Lee K W, Choi H W, Lee C (2014): Immunogenicity and protective efficacy of recombinant S1 domain of the porcine epidemic diarrhea virus spike protein. *Arch Virol* 159(11): 2977-2987.

Oka T, Saif L J, Marthaler D, Esseili M A, Meulia T, Lin C M, Vlasova A N, Jung K, Zhang Y, Wang Q (2014): Cell culture isolation and sequence analysis of genetically diverse US porcine epidemic diarrhea virus strains including a novel strain with a large deletion in the spike gene. *Vet Microbiol* 173(3-4): 258-269.

Oldham J (1972). Letter to the Editor. *Pig Farming.* 10: 72-73.

Ouyang K, Shyu D L, Dhakal S, Hiremath J, Binjawadagi B, Lakshmanappa Y S, Guo R, Ransburgh R, Bondra K M, Gauger P, Zhang J, Specht T, Gilbertie A, Minton W, Fang Y, Renukaradhya G J (2015): Evaluation of humoral immune status in porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) infected sows under field conditions. *Vet Res.* doi: 10.1186/s13567-015-0285-x.

Paudel S, Park J E, Jang H, Shin H J (2014): Comparison of serum neutralization and enzyme-linked immunosorbent assay on sera from porcine epidemic diarrhea virus vaccinated pigs. *Vet Q* 34(4): 218-223.

Rolle M, Mayr A (2011): Tiermedizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre. 9. Aufl. Enke, Stuttgart.

Schwartz K, Henry S, Tokach L, Potter M, Davidson D, Egnor C (2014): Exposing sows to PEDV to build herd immunity. National Hog Farmer. abgerufen: März 2017, <http://www.nationalhogfarmer.com/business/exposing-sows-pedv-build-herd-immunity>.

Schwartz T J, Rademacher C J (2016). Evaluation of the effects of PEDv vaccine on PEDv naïve and previously PEDv-exposed sows in a challenge model comparing immune response and preweaning mortality. Proceedings of the 47th AASV Annual Meeting, New Orleans Louisiana 2016, 36–40.

Song D, Moon H, Kang B (2015): Porcine epidemic diarrhea: a review of current epidemiology and available vaccines. Clin Exp Vaccine Res 4(2): 166-176.

Song D, Park B (2012): Porcine epidemic diarrhoea virus: a comprehensive review of molecular epidemiology, diagnosis, and vaccines. Virus Genes 44(2): 167-175.

Song Q, Stone S, Drebes D, Greiner L L, Dvorak C M T, Murtaugh M P (2016): Characterization of anti-porcine epidemic diarrhea virus neutralizing activity in mammary secretions. Virus Res 226: 85-92.

Srijangwad A, Stott C J, Temeeyasen G, Senasuthum R, Chongcharoen W, Tantituvanont A, Nilubol D (2017): Immune response of gilts to single and double infection with porcine epidemic diarrhea virus. Arch Virol 162(7): 2029-2034.

Stadler J, Zoels S, Fux R, Hanke D, Pohlmann A, Blome S, Weissenbock H, Weissenbacher-Lang C, Ritzmann M, Ladinig A (2015): Emergence of porcine epidemic diarrhea virus in southern Germany. BMC Vet Res. doi: 10.1186/s12917-015-0454-1.

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

Steinrigl A, Fernandez S R, Stoiber F, Pikalo J, Sattler T, Schmoll F (2016): Erratum to: First detection, clinical presentation and phylogenetic characterization of Porcine epidemic diarrhea virus in Austria. BMC Vet Res. doi: 10.1186/s12917-016-0647-2.

Stevenson G W, Hoang H, Schwartz K J, Burrough E R, Sun D, Madson D, Cooper V L, Pillatzki A, Gauger P, Schmitt B J, Koster L G, Killian M L, Yoon K J (2013): Emergence of Porcine epidemic diarrhea virus in the United States: clinical signs, lesions, and viral genomic sequences. *J Vet Diagn Invest* 25(5): 649-654.

Strandbygaard B, Lavazza A, Lelli D, Blanchard Y, Grasland B, Poder S L, Rose N, Steinbach F, van der Poel W H M, Widén F, Belsham G J, Bøtner A (2016): Inter-laboratory study to characterize the detection of serum antibodies against porcine epidemic diarrhoea virus. *Vet Microbiol* 197: 151-160.

Theuns S, Conceicao-Neto N, Christiaens I, Zeller M, Desmarets L M, Roukaerts I D, Acar D D, Heylen E, Matthijssens J, Nauwynck H J (2015): Complete genome sequence of a porcine epidemic diarrhea virus from a novel outbreak in Belgium, January 2015. *Genome Announc.* doi: 10.1128/genomeA.00506-15.

Toplak I, Ipavec M, Kuhar U, Kusar D, Papic B, Koren S, Toplak N (2016): Complete Genome Sequence of the Porcine Epidemic Diarrhea Virus Strain SLO/JH-11/2015. *Genome Announc.* doi: 10.1128/genomeA.01725-15.

Wang J, Zhao P, Guo L, Liu Y, Du Y, Ren S, Li J, Zhang Y, Fan Y, Huang B, Liu S, Wu J (2013): Porcine epidemic diarrhea virus variants with high pathogenicity, China. *Emerg Infect Dis* 19(12): 2048-2049

3.2 Immunreaktion des Wirtes auf PEDV

Enterale Infektionen mit Coronaviren stimulieren wie alle viralen Infektionen sowohl den angeborenen als auch den adaptativen Teil des Immunsystems des Wirtes.

Zytokine, Interferone und die Aktivierung dendritischer Zellen sowie Makrophagen und natürlicher Killerzellen (NK) sind ein wichtiger Bestandteil des angeborenen Immunsystems (Annamalai et al. 2015) und damit essentiell für die Abwehr viraler Infektionen sowie die Reaktion des erworbenen Teil des Immunsystems (Brandstadter und Yang 2011). Die angeborene Immunreaktion des Wirtes auf PEDV ist im Wesentlichen gekennzeichnet durch eine vermehrte Ausschüttung von Interferonen (Typ I Interferone α und $-\beta$, sowie Typ II Interferon γ) (Gerdtts und Zakhartchouk 2016; Zhang und Yoo 2016). Die Interferon-Ausschüttung versetzt infizierte Zellen sowie nicht-infizierte Nachbarzellen über verschiedene Signalkaskaden in einen antiviralen Zustand. Um diesen körpereigenen Abwehrmechanismen zu entgehen, weist PEDV verschiedene Strategien basierend auf Nichtstrukturproteinen (Nsp), insbesondere Nsp 1, und dem Nukleokapsidprotein auf, die antagonistisch auf die Interferon-Ausschüttung wirken und dem Virus trotz der Gegenmaßnahmen des Immunsystems einen effizienten Eintritt in die Wirtszellen und damit die Replikation zu ermöglichen (Ding et al. 2014; Zhang et al. 2016).

Betrachtet man die adaptative Seite der Immunabwehr naiver immunkompetenter Tiere, so ist eine vergleichsweise schnelle Reaktion zu beobachten. Infizierte Tiere reagieren mit Serokonversion bereits 7 Tage nach der Infektion (Crawford et al. 2015), allerdings vermittelt eine einmalige Infektion keinen lebenslangen Schutz. Die Antikörper sind von begrenzter Lebensdauer. Bisher ist nicht abschließend geklärt wie lange infizierte Tiere seropositiv bleiben und wie lange sie vor erneuter Erkrankung geschützt sind. Erste Untersuchungen haben ergeben, dass Antikörper bis sechs Monate nach Infektion nachweisbar sind (Ouyang et al. 2015). Andere Studien kommen zu dem Ergebnis, dass nach vier Monaten noch 60% der Tiere seropositiv sind und damit ein Teil des untersuchten Bestandes bereits wieder für eine Infektion empfänglich ist (Bjuström-Kraft et al. 2016).

3.3 Laktogene Immunität

Die beschriebenen wirtseigenen Abwehrmechanismen gelten im Wesentlichen für immunkompetente Tiere. Neonaten verfügen zwar bereits über ein – allerdings unreifes – Immunsystem, sind aber nicht in der Lage, mit derselben Effizienz auf eine Infektion mit PEDV zu reagieren. Studien zur Reaktion des Immunsystems auf PEDV in Schweinen verschiedener Altersklassen haben gezeigt, dass die angeborene Immunabwehr altersabhängig ist. Saugferkel weisen nach einer Infektion weniger Interferon γ produzierende NK-Zellen und andere Zytokinmuster auf als Absatzferkel (Annamalai et al. 2015). Diese Beobachtungen korrelieren mit einer unterschiedlich starken Ausprägung der PED-Symptomatik (Jung et al. 2015).

Ferkel werden aufgrund der für maternale Immunglobuline und Immunzellen undurchgängigen Plazenta agammaglobulinämisch geboren. Sie verfügen des Weiteren über ein immatures Immunsystem und weisen nach der Geburt keine T-Effektor- und T-Gedächtniszellen auf (Šinkora und Butler 2009). Daher ist es notwendig, dass sie über die Aufnahme von Kolostrum und Milch maternale zelluläre und humorale Immunkomponenten erhalten. Neben einer Vielzahl an Immunzellen (Sauenmilch enthält über 1×10^7 Zellen pro ml), ist die Aufnahme von Immunglobulinen, vor allem Ig G und sekretorisches Ig A von Bedeutung (Evans et al. 1982). Der Gehalt an maternalen Immunglobulinen ist abhängig von der Antikörperkonzentration im Serum der Sau und der Stimulation spezifischer Antikörper-Isotypen an der Eintrittspforte des Virus (im Fall von PEDV im Dünndarm) (Salmon et al. 2009). Die Zusammensetzung des Kolostrums und der Milch ist weiterhin hormonabhängig. Der höhere Gehalt an Ig G im Kolostrum ist durch Progesteron-abhängigen Transport von Ig G1 aus dem Serum in das Drüsenepithel der Milchdrüse begründet. Erhöhte Gehalte an Prolaktin und Kortikoide im Serum der Sau wiederum stimulieren Milchproduktion mit einem höheren Gehalt an Ig A (Chamley et al. 1973; Curtis und Bourne 1971; Hammer und Mossmann 1978; Killian et al. 1973; Schnulle und Hurley 2003; Watson 1980). Immunglobulin A ist säurestabiler als IgG und daher in der Lage eine solide Schutzwirkung im Darmbereich zu vermitteln (Curtis und Bourne 1971; Langel et al. 2016; Song und Park 2012).

Wie aus Studien zur TGE bereits bekannt ist, spielt die Art des Erregerkontaktes beziehungsweise die Applikationsform der Impfung eine Rolle in Bezug auf die Qualität der laktogenen Immunität. So führt die natürliche Infektion der Sau in der Trächtigkeit zu einem soliden Schutz der Saugferkel vor einer Erkrankung. Für den Schutz verantwortlich sind sowohl zelluläre ($\gamma\delta$ -T-Zellen) als auch humorale Komponenten (Immunglobuline G und A) (Bohl et al. 1972; Bohl et al. 1972; Song et al. 2007; Wesley und Lager 2003). Durch den oralen Kontakt der Sau mit dem Virus wird die Darm-Milchdrüsen-Achse stimuliert, es kommt zur Abwanderung von spezifischen Plasmazellen und es wird vor allem die Bildung von sekretorischem Ig A angeregt. Im Gegensatz dazu führt eine parenterale Immunisierung in der Regel zu erhöhten Ig G-Gehalten im Serum und Kolostrum des betreffenden Tieres, aber die Ig A Titer im Blut bleiben auf niedrigem Niveau und vermitteln keinen effektiven Schutz an die Ferkel (Schwartz und Rademacher 2016). Dadurch fällt der Schutz der Ferkel nach natürlicher oraler Infektion effektiver aus als nach parenteraler Immunisierung (Bohl et al. 1972; Park et al. 1998).

3.4 Übersicht über aktuelle Impfkonzeppte gegen PEDV

Man unterscheidet zwischen Vollvirusimpfstoffen und Impfstoffen, die lediglich Immunogene des Virus gegen das immunisiert werden soll enthalten. Vollvirusvakzinen können chemisch inaktivierte Virionen enthalten. Diese Art von Impfstoffen ist in der Herstellung simpel, benötigt aber in der Regel die Zugabe eines Adjuvans, um eine ausreichende Immunstimulation zu erzeugen. Eine andere Form der Vollvirusvakzine ist das lebend attenuierte Virus. Derartige Impfstoffe werden z.B. durch eine wiederholte Passagierung des Ausgangsvirus über Zellkulturen erzeugt und sind in der Regel in der Lage eine starke, belastbare Immunantwort im Impfkandidaten hervorzurufen. Allerdings bergen attenuierte Vakzinen das Risiko der Rückmutation zum virulenten Ausgangsvirus und besitzen oft eine gewisse Restvirulenz (Gerdtts und Zakhartchouk 2016).

Eine andere Impfstoffform stellen Subunit- oder Vektorvakzinen dar. Hier wird das Antigen, im Falle von PEDV in der Regel das Spike-Protein (Makadiya et al. 2016), von einem Trägervirus oder beispielsweise Hefe- oder Pflanzenzellen exprimiert und so eine Immunreaktion im geimpften Tier angeregt. Diese Art der Impfstoffherstellung ist teuer und der Schutz ist unter Umständen nicht vollständig gegeben. Ein weiteres Beispiel für ein Impfstoffkonzept sind DNA-Vakzinen. Bei dieser Form der Immunisierung werden rekombinante Plasmide erzeugt, die einen Genabschnitt eines Antigens des Impfvirus tragen. Diese Plasmide werden dem Impfling injiziert, das Antigen wird daraufhin von körpereigenen Zellen synthetisiert und das Immunsystem reagiert mit der Bildung von spezifischen Antikörpern (Gerdtts und Zakhartchouk 2016; Meng et al. 2013).

Diese Art Impfstoffe hat den Vorteil, dass eine durch die Immunisierung hervorgerufene klinische Ausprägung der Erkrankung unwahrscheinlich bis ausgeschlossen ist (Gerdtts und Zakhartchouk 2016).

Bei der Betrachtung von Impfkonzeppten ist generell zwischen der Immunisierung bereits immunkompetenter, reiferer Tiere und naiver Neonaten zu differenzieren. Aufgrund der Tatsache, dass Neonaten über ein größtenteils noch immatures Immunsystem verfügen, erzielt eine Immunisierung in den ersten Lebenstagen oft nicht den gewünschten Schutzeffekt (Chattha et al. 2015). Da PEDV insbesondere bei Saugferkeln schwere klinische Symptome zur Folge hat, verspricht lediglich ein

Muttertierschutzimpfkonzeppt ausreichenden Schutz dieser Altersklasse vor einer Erkrankung (Song et al. 2015).

Aktuell sind auf dem Markt sowohl lebend attenuierte als auch Totvakzinen gegen PEDV verfügbar (CFSPH 2004). Diese Impfstoffe erfassen häufig zusätzlich TGEV und/oder Rotaviren (bi- bzw. trivalente Vakzinen) und werden hauptsächlich in China und Südkorea eingesetzt (Gerdtts und Zakhartchouk 2016; Song et al. 2015). Die Impfstoffe sind zumeist wirksam, allerdings entwickeln nicht alle geimpften Sauen eine verlässliche laktogene Immunität (Song et al. 2015). Feldbeobachtungen zeigen, dass es auch in geimpften Herden immer wieder zu PED Ausbrüchen mit zum Teil schwerer klinischer Symptomatik kommt. Als Begründung wird oft eine mangelnde Induktion der mukosalen Immunabwehr aufgrund parenteraler Immunisierung angeführt, aber auch die Sequenzhomologie zwischen Impf- und Feldvirus ist von Bedeutung (Li et al. 2012; Sun et al. 2012).

Um verlässliche Impfkonzeppte gegen PEDV zu entwickeln, ist es notwendig genauere Kenntnisse über die Belastbarkeit der maternalen Immunität nach natürlicher Infektion und homologer Belastungsinfektion der Ferkel zu erhalten. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind im Folgenden dargestellt. Desweiteren wurden zwei aktuelle deutsche PEDV Stämme *in vivo* hinsichtlich ihrer Virulenz im Saugferkel charakterisiert, um ein den aktuellen epidemiologischen deutschen Verhältnissen angepasstes Belastungsinfektionsmodell zu etablieren.

4 Ergebnisse - Virulenzcharakterisierung aktueller deutscher PEDV Stämme und Untersuchung der Schutzeffekte maternal übertragener Antikörper, *Scientific Reports*

Virulence of current German PEDV strains in suckling pigs and investigation of protective effects of maternally derived antibodies

Leidenberger, S.¹; Schröder, Ch.¹; Zani, L.¹; Auste, A.¹; Pinette, M.², Ambagala, A.²; Nikolin, V.³; de Smit, H.³; Beer, M.¹ and Blome, S.^{1*}

¹ Institute of Diagnostic Virology, Friedrich-Loeffler-Institut, Suedufer 10, Greifswald - Insel Riems, 17493, Germany

² Canadian Food inspection Agency, National Centre for Foreign Animal Disease, Winnipeg, R3E 3M4, Canada

³ Boehringer Ingelheim Veterinary Research Center, Hannover, 30559, Germany

Scientific Reports 7

Article number: 10825 (2017)

doi:10.1038/s41598-017-11160-w

Virulence of current German PEDV strains in suckling pigs and investigation of protective effects of maternally derived antibodies

Abstract

Porcine epidemic diarrhea (PED) has caused tremendous losses to the United States pig industry since 2013. From 2014, outbreaks were also reported from Central Europe. To characterize the Central European PEDV strains regarding their virulence in suckling piglets, and to assess the protective effect of maternally derived antibodies (MDA), four trial groups were randomly assigned, each consisting of two pregnant sows and their litter. To induce MDA in a subset of piglets, two sows received a cell culture-adapted PEDV strain, and another two sows were inoculated with field material from German PED outbreaks. Four sows stayed naïve. Subsequently, all piglets were inoculated with the corresponding PEDV strains at an age of 3 to 6 days, and virus shedding, clinical signs and occurrence of specific antibodies were assessed.

Piglets without MDA showed a morbidity of 100% and low lethality, while almost all MDA-positive piglets stayed clinically healthy and showed considerably lower virus shedding.

Taken together, the Central European PEDV strains showed rather low virulence under experimental conditions, and pre-inoculation of sows led to a solid protection of their offspring. The latter is the prerequisite for a sow vaccination concept that could help to prevent PED induced losses in the piglet sector.

Keywords

Porcine epidemic diarrhea, PEDV, European strains, maternally derived antibodies, sow vaccination, virulence

Introduction

Porcine epidemic diarrhea (PED) is a highly contagious enteric disease of swine, affecting pigs of all ages. Severe clinical signs and high mortality rates are especially observed in suckling piglets and severity of disease decreases with age. However, strain virulence and management conditions also impact on the clinical disease and outcome ¹⁻³.

The disease is mainly characterized by watery diarrhea and vomiting which leads to dehydration and deteriorating constitution. The causative agent is PED virus (PEDV), an enveloped, single-stranded, positive-sense RNA virus of the genus *Alphacoronavirus* within the *Coronaviridae* virus family of the order *Nidovirales* ⁴.

Porcine epidemic diarrhea first emerged in 1971 in England termed Epidemic Diarrhea (ED) ^{5,6}. These early outbreaks were characterized by severe clinical signs and mortality rates of up to 100 % in young fattening pigs. In the beginning, no cases were reported from suckling pigs. Later on, pigs of all ages showed similar disease in different European countries, and over the following years, PED was reported from Belgium, the United Kingdom (UK), The Netherlands, Germany, Hungary, Bulgaria, France, Switzerland, and Spain ⁷⁻⁹. For unknown reasons, the occurrence of PED in Europe decreased markedly after the 1980's evidenced by lacking reports of further outbreaks and a very low seroprevalence in the nineties and the following years ^{10,11}. There were only sporadic outbreaks reported associated with low mortality, e.g. in The Netherlands, Hungary and the UK ¹²⁻¹⁴. In contrast, PEDV caused outbreaks of higher economic impact in Asia ^{15,16}. Still, endemic infections are reported from Asia, and the impact on the productivity of industrialized pig farms remains high ^{17,18}. Since 2005, PED cases were again sporadically reported from Europe, i.e. Italy, but without much leverage on the pig industry ¹⁹.

In 2011 and 2012, new, highly virulent PEDV variants were reported from China that caused tremendous losses, especially in the piglet sector ^{20,21}. In the following, starting in April 2013, PED occurred for the first time in the United States (US) and rapidly spread through nearly the whole country. High mortality rates of up to 95% were reported among suckling pigs, which led to unimaginable economic losses of whole piglet batches. The exact origin and introduction route of these highly virulent PEDV strains could not be finally elucidated ^{22,23}. Phylogenetic analyses showed that the causative strains cluster together with the above mentioned Chinese isolates

from 2011 and 2012²⁴⁻²⁶. With the disease threatening to spread, European farmers and veterinarians were alerted and asked for data on PED prevalence and possible impact. Consequently, surveillance in Europe was reinforced and PED cases were indeed reported from Central Europe i.e. Germany²⁷, the Ukraine²⁸, France²⁹, Austria³⁰, Portugal³¹ and Belgium³². In Germany, cases were reported starting from May 2014 especially in the South-Western and North-Western part^{25,27,33}. In general, the impact on the pig industry remained low. Retrospective analyses demonstrated that a considerable seroprevalence was present only in Italy³⁴. Thus, a recent re-introduction is most likely.

Based on partial and full-genome sequences, strains from recent US outbreaks are clearly distinct from the original European PEDV strains²⁵, and two different virus types were found. On the one hand there are so called “original US PEDV”, which are commonly referred to as NON-INDEL strains (meaning no insertions and deletions in the open reading frame (ORF) encoding for the spike protein), and on the other hand so called “S-INDEL” variants that show insertions and deletions in spike protein encoding region³⁵. The latter were supposed to cause milder disease course with low mortality. With exception of PEDV strains from Ukraine²⁸, the current European strains were identified as S-INDEL strains closely related to OH851 from the U.S.²⁵. However, field virulence and mortality rates differed between European countries with low overall impact^{25,28,29,33,36}. In Germany, mortality ranged from almost zero to more than 70% in suckling pigs with almost complete genetic identity of the causative PEDV strains^{25,33}. Here we report about our studies of both the virulence of recent S-INDEL PEDV strains from Central Europe under controlled laboratory conditions, and the protective effect of maternally derived antibodies (MDA). Up to now, PED control is mainly achieved by strict veterinary hygiene and biosecurity, and vaccination is not practiced outside of Asia and - more recently - America. However, taking into account the current threats, vaccination strategies are revisited. To protect the most susceptible host, the suckling pig, mainly a sow vaccination concept seems reasonable. A prerequisite would be a solid protection through maternally derived antibodies (MDA).

This aspect was investigated in our study for two Central European PEDV strains. The trial design involved four groups, each consisting of two pregnant sows and their litter. To induce MDA in a subset of piglets, two sows received a cell culture-adapted PEDV strain (A1), and another two sows were inoculated with field material from

German PED outbreaks (B1) four weeks before farrowing. Four sows stayed naïve (groups A2 and B2). Subsequently, all piglets were inoculated with the corresponding PEDV strains at an age of 3 to 6 days, and virus shedding, clinical signs and occurrence of specific antibodies were assessed. It was demonstrated that MDA have a strong protective effect and thus, further studies into vaccination concepts are warranted.

Results

Clinical and pathological observations

Clinical signs upon inoculation of sows

Two sows, which were inoculated with a cell culture-adapted PEDV strain (PEDV EU, group A1) showed slight depression over a period of four days, accompanied by reduced feed intake.

In contrast, the two sows of group B1 (inoculated with German field PEDV, DE) showed diarrhea and vomiting upon inoculation. Moreover, both sows were anorectic for one day. Thereafter, one of the sows (ear tag 6150) was still showing slight depression over four days whereas the other was free of clinical signs again.

All four sows of groups A2 and B2, which stayed naïve prior to farrowing, remained healthy during the pre-farrowing time.

Clinical signs upon inoculation of piglets

Sows which were naïve before farrowing and got infected via their inoculated piglets during the trial, showed more severe clinical signs according to our standardized score system for sows (table 1) than sows, which were directly inoculated four weeks before farrowing (see above). Almost complete anorexia, watery diarrhea, and decrease in milk production was observed from 60 h after the inoculation of the piglets in sows of groups A2 and B2 (see Supplementary Fig. F1 online). The lack of milk production led to a more severe situation for their unprotected infected piglets (malnutrition).

Table 1: Clinical score system for sows in PED infection studies. The humane endpoint was defined as a cumulative score >6. Moreover, euthanasia was carried out after abortion or other signs indicative for unacceptable suffering.

Score	General behavior	Feed intake/suckling	Gastrointestinal signs
0	No abnormalities	No abnormalities	Physiological feces
1	Mild depression, reluctance to move	Reduced interest in feed	Pasty feces
2	Reduced general condition, extended resting, indication of decreasing milk production	Hardly interested in feed without clear feed intake	Watery feces, reddened anal region, vomiting
3	Strong depression, almost entirely resting, decreased milk production, abortion	Total anorexia	Watery feces with blood or fibrin added, highly reddened anal region, vomiting

Sows, which were inoculated before farrowing (sows of groups A1 and B1), did not show any clinical signs indicative for PED upon challenge of their piglets. One sow of group A1 died from septicaemia two days after farrowing (necropsy revealed severe peritonitis after uterine rupture and intestinal invagination). The respective piglets (which had all taken colostrum) were reared by the remaining sow of group A1.

As can be seen in figure 1, none of the MDA-positive piglets showed any severe clinical signs indicative for PED upon challenge inoculation. Very mild signs were discontinuously observed in some animals (pasty feces). One litter (group B1, sow 4423) showed general weakness and remittent shivering leading to clinical scores prior to inoculation. A viral genesis could not be detected by routine PCRs (Porcine enteroviruses (PEV), Suid alphaherpesvirus-1, Classical and African swine fever virus, Atypical porcine pestivirus).

Piglets without MDA and inoculated with the cell culture-adapted virus (PEDV EU, group A2) started vomiting 24 hours post inoculation (hpi), and showed diarrhea from 36 hpi. The clinical signs remained over 6 to 7 days with diarrhea as the leading sign (see figure 1, upper graph). MDA-negative piglets challenged with the German field material (DE), started to show signs indicative of PED at 24 hpi, also beginning with vomiting followed by diarrhea. Clinical signs persisted over 10 to 11 days (figure 1, lower graph). As the respective sows showed an almost complete cessation of milk production, piglets showed signs of malnutrition. Two piglets had to be euthanized with an endpoint clinical score because of dehydration and general weakness. Necropsy of the euthanized piglets showed gas-filled intestines. All other piglets were without specific results indicative for PED at the time point of necropsy (end of the trial).

Clinical score values differed significantly between groups with and without MDA from 2 to 10 days post inoculation (dpi). In addition, a statistically significant difference was observed at 1 dpi between groups A1 and A2, and 12 to 14 dpi between groups B1 and B2. The above mentioned condition in one litter of group B1 led to a significant difference at the day of challenge that was however not PED related.

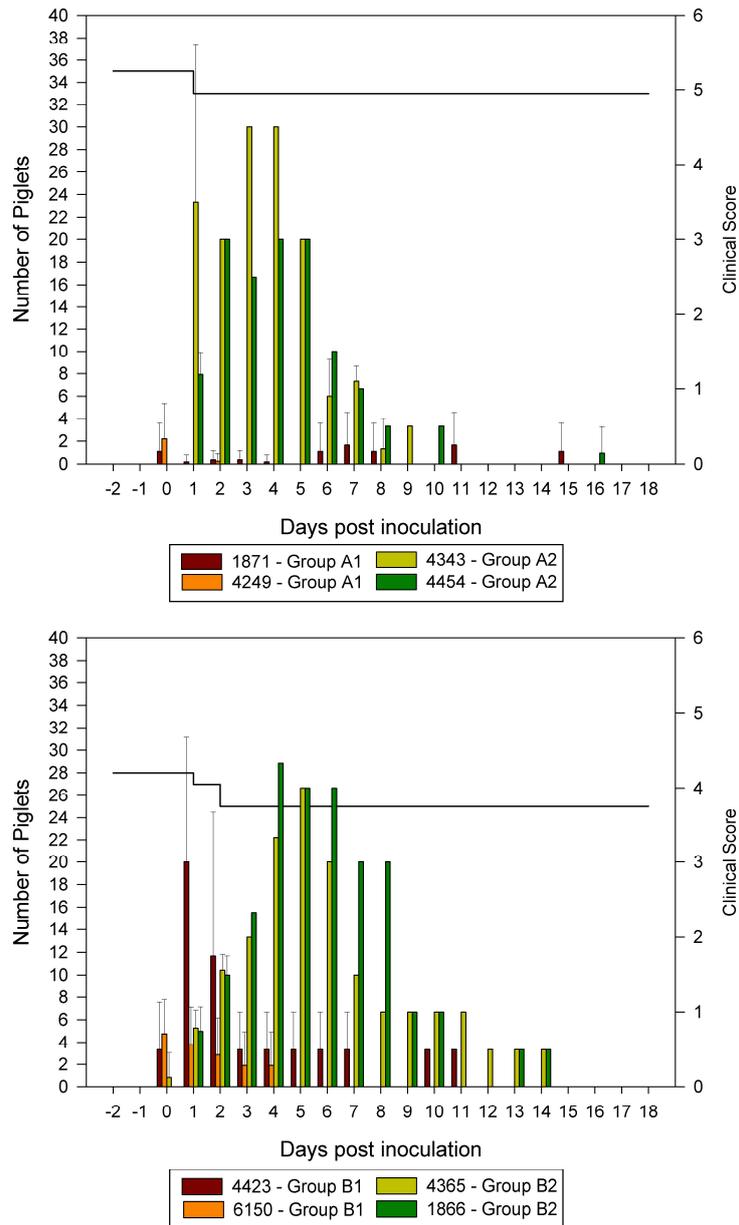


Fig. 1: Cumulative clinical scores and piglet survival shown per litter per sow:

The bars indicate the clinical scores of each litter per sow and the black line across the top of the graph represents the number of surviving piglets over time; upper chart: animals inoculated with cell culture adapted PEDV-strain (Group A1 (sows 1871 and 4249) and A2 (sows 4343 and 4454)), lower chart: animals inoculated with German field material (Group B1 (sows 4423 and 6150) and B2 (sows 4365 and 1866)), standard deviation is shown in error bars

Shedding of virus

PEDV shedding among sows

Sows infected with cell culture-adapted PEDV (group A1) shed virus from 4 or 5 days post inoculation (dpi) for 7 to 10 days, while the group inoculated with the field virus (B1) was PCR-positive from 4 dpi for 9 to 10 days. All naïve sows were negative prior to the inoculation of piglets.

PEDV shedding of piglets

Detection of PEDV genome occurred in all groups but to a much lesser extent in the MDA-positive animals (see figure 2, PEDV EU in the upper graph, field material DE in the lower). In general, the amount of detectable PEDV genome was influenced by the faecal load on the swab. However, as this phenomenon occurred in all groups, it was regarded as systematic error. All below mentioned genome copy numbers refer to 1 µl RNA extracted from 100 µl faecal suspension (all swabs were submerged in 1 ml medium, irrespective of their load).

Piglets of groups A1 and A2 showed viral RNA in rectal swabs beginning 1 dpi until 20 dpi, and the genome load was markedly lower in piglets of group A1 with MDA. Significant differences were found among groups A1 and A2 on 1, 2, 13, and 17 dpi with higher genome loads in the animals without MDA (A2). On the other days, the genome loads were still higher in group A2, but not significantly different. It was quite the same in group B. In this case, genome loads were significantly higher on 1 to 5 dpi and 13 to 18 dpi in piglets without MDA (B2).

In more detail, all animals of group A2 were found positive at 1 dpi with genome loads between 1100 and 147000 genome copies per µl, whereas only low virus shedding could be detected in group A1 with genome copy numbers ranging from 0.2 to 64 per µl (see figure 2, upper chart). At 2 dpi, a comparable picture was seen at lower level. However, single results varied considerably (genome copies ranging from 0 to 47000 in group A2 and 0 to 26 in group A1). Only low copy numbers were detected for all animals at 3 dpi (no significant differences). Up to 7 dpi, mainly low genome loads were detected with single animals showing considerable shedding (up to 213500 copies per µl for a MDA negative piglet at 5 dpi). At 7 dpi all but one piglets of group A2 still showed genome loads of 0.4 to 33000 genome copies per µl. Animals of group A1 showed generally lower genome loads with 0.2 to 850 genome copies per µl. Only one piglet of this groups shed higher genome loads with 9600

genome copies per μl . Thereafter, shedding decreased, with faster decline in the MDA positive groups (see figure 2, upper graph).

Compared to group A2, MDA negative animals of group B2 showed higher initial virus shedding (up to 18000000 copies per μl) at 1 and 2 dpi. Only a few animals of the MDA positive group were detected positive for a few days with genome loads ranging from 0.15 and 37 genome copies. From 3 dpi, virus shedding decreased gradually with scattered positive findings and high variability. From 17 dpi, all MDA positive animals (A1) were negative while shedding still occurred in MDA negative animals of group A2 (see figure 2, lower graph).

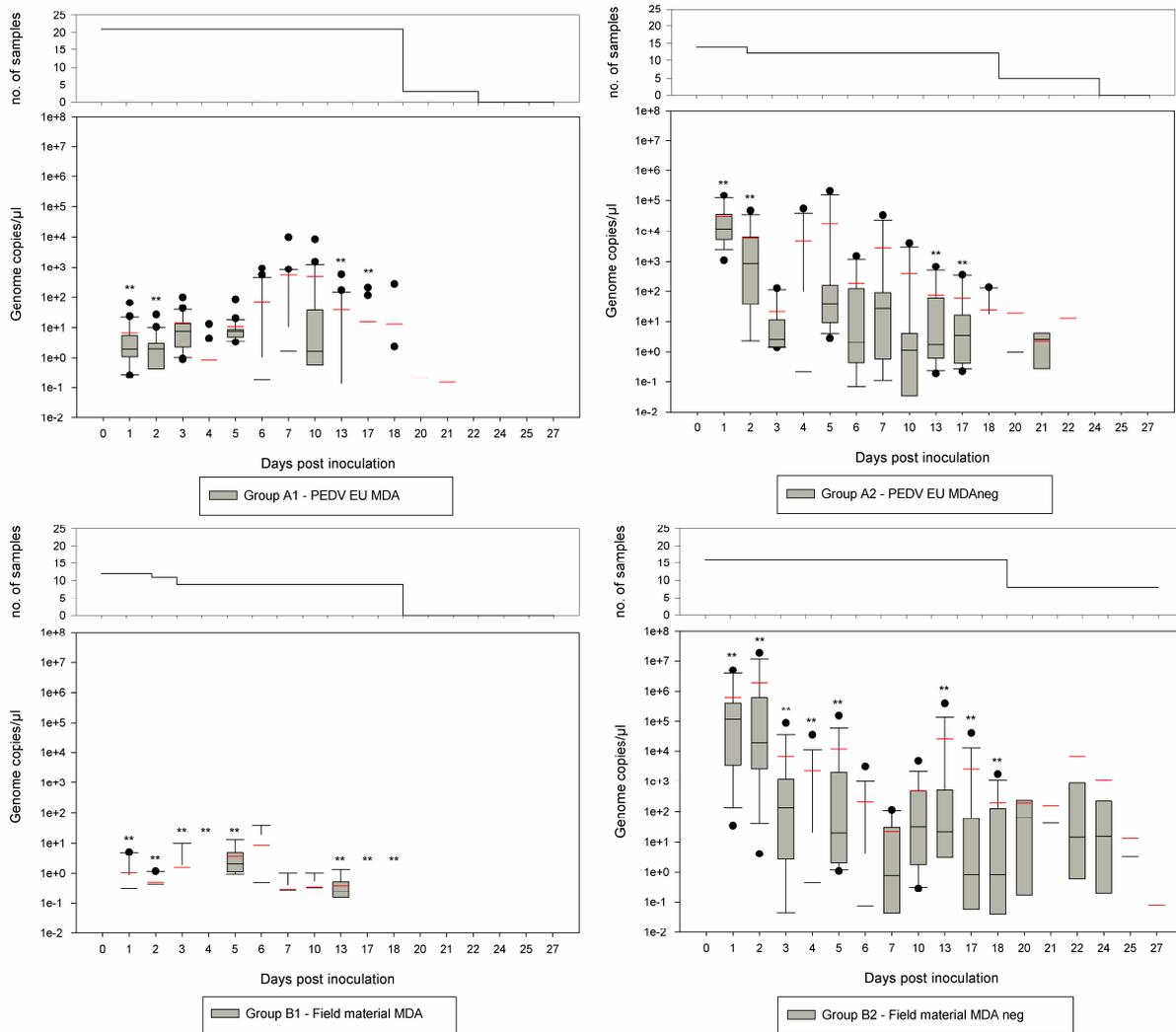


Fig. 2: PEDV-shedding detected via RT-qPCR:

The graph shows the amount of genome copies per group using a logarithmic scale with 1e+8 meaning 10^8 ; red lines mark the mean (average) of each box plot, black lines mark the median of each box plot; upper chart: Group A1 and A2 (cell culture isolate; PEDV EU), lower chart: B1 and B2 (German field material, DE); statistically significant differences between groups with and without maternal derived antibodies (compared by day) are marked with ** (p-values between 0.001 and 0.034).

To indicate the number of samples included in each boxplot, the survival curve is given above the respective figure part.

Detection of other relevant pathogens

The inoculum of the sows was tested negative for transmissible gastroenteritis virus and porcine delta coronavirus. Positive results were obtained for porcine circovirus 2, rotavirus A, and porcine enteroviruses. The piglet inoculum was tested positive for PEV genome (cq value: 30) and showed negative results for all other pathogens. However, no PEV-shedding could be detected in piglets, which showed signs that might have been indicative for PEV infection (group B2; litter of sows 4423 and 6150). The cell culture adapted virus (PEDV EU, groups A1 and A2) was free of all tested pathogens.

Antibody detection in serum and colostrum

Prior to the study, sows were tested for PEDV-specific antibodies by three commercial indirect IgG isotype antibody ELISA. All but one animal showed clear negative results. The serum sample of the remaining sow which had shown inconclusive results was retested by indirect immunofluorescence with clear negative results.

All sows, which were inoculated with PEDV prior to farrowing (groups A1 and B1), showed IgG isotype antibodies in blood and colostrum samples at the day of farrowing using the ELISA assays mentioned above.

In general, the used ELISA kits seemed to vary regarding specificity and sensitivity. Nevertheless, the overall tendency of antibody levels in the different groups was comparable (see Figure 3 a-c).

Colostrum samples were also tested positive for PEDV S protein specific IgA isotype antibodies using an in-house ELISA. In those pre-inoculated animals, antibody levels in blood decreased till the end of the trial. Sows in groups A2 and B2 had no detectable PEDV specific IgG isotype antibodies in blood or colostrum at the day of farrowing but developed rising levels till the end of the trial once they got exposed to PEDV from their offspring.

Blood samples of all but two piglets received from pre-inoculated sows (both in group A1) were shown to contain PEDV antibodies prior to inoculation (see figure 3 a-c, upper right chart for PEDV EU and lower right chart for DE). At the end of the trial 72.0 % (B1/B2) to 81.8 % (A1/A2) of the piglets and all of the sera from the sows were positive in the IgG-ELISA (see figure 3 a-c). All milk samples collected at the

day of slaughter or death were negative for PEDV-specific IgG, but showed varying amounts of IgA isotype antibodies. This was also found in samples of sows which were naïve prior to farrowing (groups A2 and B2) (see Supplementary Fig. F2 online). As can be seen in figure 3 a-c, a clear increase of serum antibodies was observed over the course of the trial in MDA negative piglets of groups A2 and B2, whereas antibody levels markedly decreased in the MDA positive groups A1 and B1.

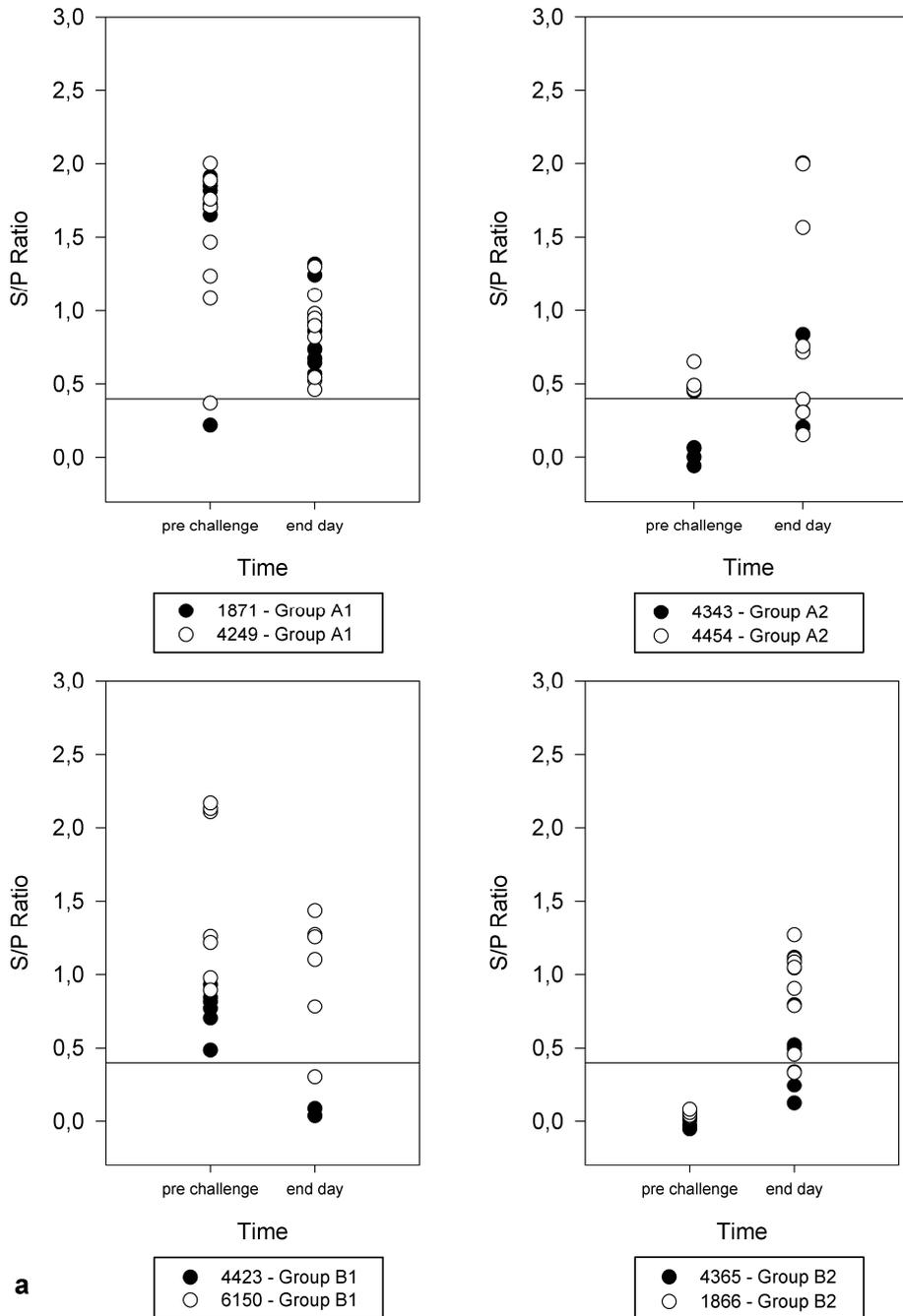


Fig. 3a: IgG detection in serum samples of piglets prior to challenge and at day of death using a commercial indirect ELISA:

Comparison of three commercial ELISA assays for PEDV specific IgG antibodies, results are shown as sample-to-positive ratio for each individual piglet, the horizontal line marks ELISA cut-off; BIOVET; upper graphs: PEDV cell culture isolate (PEDV EU): upper left: Group A1, upper right: Group A2; lower graphs: German field material (DE): lower left: Group B1, lower right: Group B2

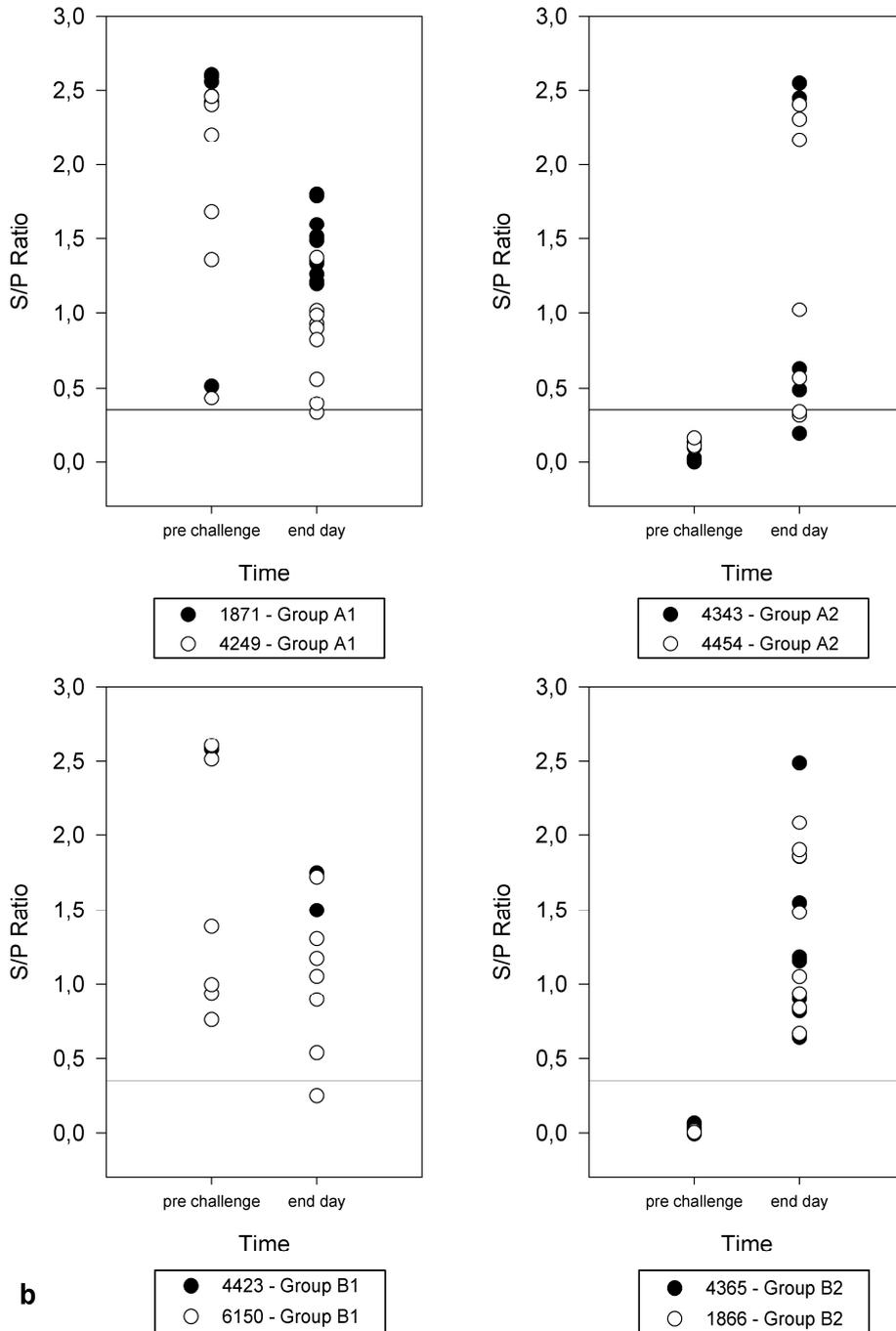


Fig. 3b: IgG detection in serum samples of piglets prior to challenge and at day of death using a commercial indirect ELISA:

Comparison of three commercial ELISA assays for PEDV specific IgG antibodies, results are shown as sample-to-positive ratio for each individual piglet, the horizontal line marks ELISA cut-off; INGENASA; upper graphs: PEDV cell culture isolate (PEDV EU): upper left: Group A1, upper right: Group A2; lower graphs: German field material (DE): lower left: Group B1, lower right: Group B2

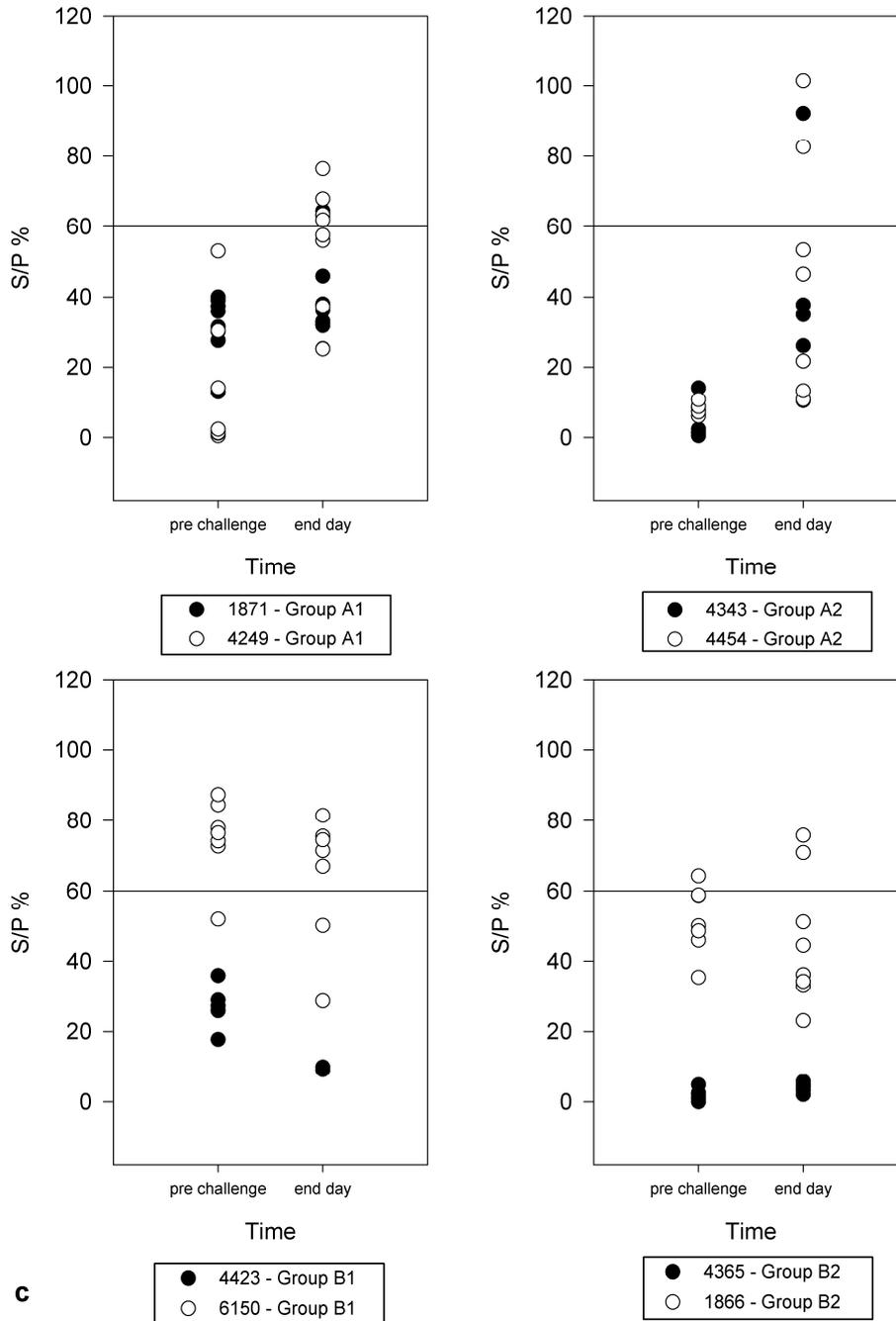


Fig. 3c: IgG detection in serum samples of piglets prior to challenge and at day of death using a commercial indirect ELISA:

Comparison of three commercial ELISA assays for PEDV specific IgG antibodies, results are shown as sample-to-positive ratio for each individual piglet, the horizontal line marks ELISA cut-off; IDVet; upper graphs: PEDV cell culture isolate (PEDV EU): upper left: Group A1, upper right: Group A2; lower graphs: German field material (DE): lower left: Group B1, lower right: Group B2

Bacteriology

The fecal swabs taken at 0 dpi and 2 dpi did not show any growths of pathogenic bacteria.

The bacterial flora was similar in the samples at 0 and 2 dpi.

Discussion

Following the disastrous PED outbreaks in the US, re-introduction was also confirmed in Central Europe ^{25,27,29-32,34}. With the exception of the highly virulent strains occurring in Ukraine ²⁸, all recent European PEDV strains were so-called S-INDEL variants with an expected lower virulence than the US-type NON-INDEL PEDV variants. Overall, the PED impact on pig industry seemed to be low, but sporadic cases with high mortality and long persistence of the disease in continuously producing enterprises was observed ³⁷.

Follow-up investigations showed that the reported virulence of the German PEDV strains varied considerably among breeding herds (suckling pigs) while only mild diarrhoea was observed in fatteners. Interestingly, the causative strains were highly identical, even on the full-genome level ³³. Detailed molecular analyses did not reveal any significant impact of viral and bacterial co-infections or viral variants ³⁸.

In order to assess strain-related virulence and disease dynamics among suckling pigs in the presence and absence of maternally derived antibodies, the presented study was carried out under controlled laboratory conditions. In a nutshell, the PEDV strains obtained from recent German outbreaks (both cell culture and field material) showed indeed a low virulence with only two MDA-negative piglets that had to be euthanized at the humane endpoint. All remaining piglets recovered completely and were able to compensate the weight loss by the weaning age. However, piglets with MDA were almost completely protected from clinical disease. In direct comparison, the field material induced more severe signs in naïve piglets than the cell culture isolate. Possible reasons include attenuation by cell culture adaptation but also differences in inoculation dose and secondary pathogens. Regarding the inoculation dose, it can be stated that the genome load was higher in the cell culture material than in the field material. Provided that this gives at least an indication for the virus titer, we can assume that the virus titer of the field material was at least not considerably higher than that of the cell culture material. Testing of the field materials for secondary pathogens showed low rotavirus A and enterovirus loads. The

secondary materials used for the inoculation of the piglets in groups B1 and B2 contained PEDV and low PEV genome loads. The latter was however not found in any of the piglets.

Despite the observed differences, 100 % morbidity and long-term shedding of viral RNA was still observed for both variants in MDA-negative piglets.

In contrast to the study with a cell culture adapted US-type PEDV, published by Poonsuk et al. in 2016 ³⁹, all sows that were naïve prior to farrowing showed diarrhea after challenge of their piglets. Disease progression in these sows was worse than the disease course in the sows following direct inoculation prior to farrowing (groups A1 and B1). Diarrhea and depression even led to a severe decrease of milk production and thus inadequate nutrition of piglets. This underlines the importance of the sow's health status for the fate of PED-diseased piglets. The increased severity could probably be explained by the more fragile immune system during the farrowing and lactating period, but also with the higher virus loads in the stable and ongoing contact to PEDV shed by the infected piglets ³⁹.

Shedding of viral RNA in both groups was detected over three weeks and beyond, which is in line with former studies ^{30,33,40} and field observations. The variability of individual results was probably due to the different content of fecal material on the swab. However, also the desquamation of intestinal cells and hereby the amount of virus at rectal swabs might vary. In order to gain individual samples, pooled faecal samples were not considered appropriate. The long-term shedding of virus could be a most important issue for disease control and elimination. With shedding over such a long time, it is possible that clinically healthy but still shedding piglets are sold and brought to another holding for subsequent production steps where they pose a risk for naïve stable/pen mates. The risk of disease transmission by those piglets would however need further investigation.

Most importantly, our study clearly shows that maternally derived immunity against PEDV is able to protect piglets in the most vulnerable phase after birth. This is prerequisite for a sow vaccination strategy which should be explored in light of the tremendous impact of PED in the US and also farms in the Ukraine. With neonatal piglets being born agammaglobulinemic and possessing limited, undeveloped lymphoid tissues and no effector and memory T-lymphocytes ⁴¹, it is absolutely necessary that they receive maternal cell-mediated and humoral immune

components through the ingestion of colostrum and milk ⁴². It is already shown for TGEV that natural oral infection of sows leads to a more effective maternal derived lactogenic protection for suckling pigs than systemic immunization ^{43,44}. This effect is mainly based on a larger amount of secretory IgA in colostrum and milk because of stimulation of the gut-mammary-axis of the sow. Systemic immunization usually induces high levels of IgG in both the blood and colostrum, but IgA titers in blood might stay on a low level offering no reliable lactogenic protection against infection of piglets ⁴⁵. This is in line with the results of the provided study, in which high amounts of IgG could be detected in colostrum but not in milk samples, whereas IgA could be found in both – colostrum of pre-infected sows and milk of all sows. Thus, also the sows that stayed naïve prior to farrowing seroconverted upon challenge of their piglets and low levels of IgA could be detected in milk samples at the end of the trial. When revisiting PED vaccination, this route-dependent issue should be kept in mind as it could explain the unsatisfactory protection against virus shedding and morbidity of piglets from sows that were only parenterally immunized using different types of vaccines ⁴⁶.

Therefore, a sow vaccination concept against PEDV should probably prefer oral or other mucosal immunization routes for proper protection of suckling pigs if possible ^{9,47,48}.

Regarding the duration of immunity in both sows and piglets, we could confirm that the antibodies are rather short-lived. Sows pre-exposed prior to farrowing showed already decreasing levels of IgG at the end of the trial (with ELISA results still being positive). With a high antibody titer in the blood being a requirement for solid and protective antibody titers – especially secretory IgA - in colostrum and milk, it seems that sows would have to be re-vaccinated/re-infected prior to each farrowing to ensure piglet protection. Moreover, immunization is needed close to the farrowing date. From literature it is known that antibody levels of IgG and IgA in serum of primiparous and multiparous sows can remain stable up to 6 months post field infection as measured by high titers in ELISA and virus neutralization assay ⁴⁹. The respective sows were obtained from commercial breeding farms that had reported previous PED outbreaks. Thus, booster/reinfection seems to play a role for the duration of immunity. With regard to piglets, field studies observed antibody levels in piglets that lasted up to 100 days ^{49,50}. For the piglets/young weaners, the source of antibodies clearly influences the duration of detection. While a decay of MDA is

visible already after a few weeks, antibodies induced by active immunization or infection might last much longer. In our study, MDA-positive animals had only low antibody levels by the end of the trial (at the age of weaning). In these animals, protection in later stages of pig production would have been questionable and this could explain field observations that showed reinfection of finishing pigs that had been exposed to PEDV as suckling pigs. These aspects also need consideration when designing a vaccination concept.

Another important fact is the reliability of commercial ELISA assays. In this study three commercial ELISA assays were compared and variations in specificity and sensitivity were found as already shown in other studies ⁵¹. Therefore, the combined use of different diagnostic tools to investigate the serological status of an animal should be taken into account.

In conclusion, the tested PEDV strains were of moderate to low virulence and natural infection of sows during gestation led to an effective lactogenic immunity in piglets. This is a promising outcome when vaccination concepts are discussed.

As a spin-off of our trial, a simple and standardized score system was implemented that worked well even with limited clinical signs. The presented score system (see table 2) is less detailed than others that were previously described ⁵². Nevertheless, it seems sufficiently reliable and will be used for subsequent immunization-challenge experiments.

Material and Methods

Study Design

In total, eight sows and their offspring were used in this study. The multiparous sows were purchased in late pregnancy from a commercial breeding farm with a high veterinary hygiene standard (Bundes Hybrid Zucht Programm, BHZP, Dahlenburg-Ellringen, Germany). They were transported to the high containment facilities at the Friedrich-Loeffler-Institute Greifswald, Insel Riems, Germany, five weeks before farrowing. According to EU legislation, the animals were kept in open pens in sets of two before they were moved to commercial farrowing pens one week before farrowing. Two farrowing pens were integrated in one stable room so that each experimental group could be kept together. All animals had access to water *ad libitum* and were fed with commercial feed for breeding sows and after farrowing for lactating sows. All applicable animal welfare regulations, including EU-Directive

2010/63/EC and institutional guidelines, were taken into consideration. The animal experiment was approved by the competent authority, Landesamt für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei Mecklenburg-Vorpommern (LALLF MV), under reference number LALLF 7221.3-1-059/16.

All animals were tested prior to arrival with negative PCR-results for PEDV and antibodies against PEDV. After arrival, the animals were randomly assigned to four treatment groups. Two sows (ear tags 1871 and 4249) were orally inoculated with cell culture adapted PEDV (PEDV EU) four weeks before farrowing to induce MDA-positive piglets (group A1). Another two sows (ear tags 4423 and 6150) were treated the same way orally with German field material (organ suspension and fecal homogenate; DE) containing PEDV to also obtain MDA-positive piglets (group B1). The remaining four sows stayed untreated to obtain MDA-negative piglets (group A2: ear tags 4343 and 4454; group B2: ear tags 1866 and 4365).

All piglets born alive were individually ear tagged prior to challenge inoculation. Piglets born to sows of groups A1 (9 piglets of sow 4249 and 12 piglets of sow 1871) and A2 (7 piglets of sow 4454 and 7 piglets of sow 4343) were orally challenged with PEDV EU at an age of three to six days whereas piglets born to sows of groups B1 (7 piglets of sow 6150 and 5 piglets of sow 4423) and B2 (8 piglets of sow 4365 and 8 piglets of sow 1866) received the German field material (DE).

During the whole trial, daily rectal swabs (COPAN plain cotton swabs without medium) were taken of all animals for real-time reverse transcription polymerase chain reaction (RT-qPCR) analyses. Samples of days 0 to 7 post inoculation (pi) as well as days 10 pi and 13 pi were tested. Moreover, samples were tested from day 21 pi till the end of the trial.

Additional rectal swabs were taken of four randomly chosen piglets of each sow prior to inoculation and two days afterwards for bacteriological examination. Moreover, clinical signs indicative for PED were recorded using a standardized score system (see table 2). Blood samples were taken at the day of inoculation and the day of slaughter or euthanasia. Additional blood and colostrum samples were collected from all sows during farrowing. Furthermore, milk samples were collected from all but two sows at the day of slaughter (samples missing from sow 4249 which died from septicemia, and sow 1871 which milk production had already ceased). At the end of the trial, all remaining piglets were euthanized and seven sows were slaughtered

4 Ergebnisse - Virulence of German PEDV strains and maternally derived antibodies

(electro-stunning and subsequent exsanguination). All animals were necropsied and samples of the small intestine were taken.

Table 2: Clinical score system for piglets in PED infection studies. The humane endpoint was defined as a cumulative score >6. Moreover, euthanasia was carried out if one of the following criteria occurred: body temperature <38.5°C, lateral recumbency, severe dehydration, complete suspension of feed intake.

Score	General behavior	Feed intake/suckling	Gastrointestinal signs
0	Agile, attentive, no abnormalities	Greedy suckling, good filled stomach, intake of piglet feed	Physiological feces
1	Mild depression	Slow suckling, hardly interested in piglet feed	Pasty feces, vomiting
2	Depression, isolation from group, vocalisation (moaning)	Reluctant feed intake, hardly interested in suckling/piglet feed, sunken flanks	Watery feces, reddened anal region, vomiting
3	Reluctance to stand, signs of severe dehydration, low body temperature	Total anorexia, decreasing of milk production of sow	Watery feces with blood or fibrin added, highly reddened anal region, vomiting

Viruses and field virus suspensions

For inoculation of animals of groups A1 and A2, cell culture adapted PEDV was provided by the Boehringer Ingelheim Veterinary Research Center (PEDV EU). This cell culture isolate was obtained from a PED outbreak in Northern Germany with high mortality rates in suckling piglets. It is sharing over 99 % nucleotide identity with the U.S. strain OH851 and recent Central European PEDV strains. The initial isolate was obtained using the following (standard) protocol: 5×10^5 Vero cells were seeded into 6-wells plates. After 24 h of incubation at 37°C, confluent monolayers were obtained and the cell culture medium was removed. All wells were washed three times with 3 ml phosphate-buffered saline (PBS). Thereafter, cells were inoculated with 200 µl of filtrated (0.22 µm) homogenate from piglet guts. After the addition of 2 ml of PEDV media containing 15 µg/ml trypsin, cultures were incubated for 24-48 h at 37°C. The cultures were checked daily for the presence of characteristic fusion formation, and positive materials were further passaged. For the purpose of our study, the titer was defined by end point titration and recorded as tissue culture infection dose₅₀ (TCID₅₀)/ml. The stock titer was 3.16×10^5 TCID₅₀/ml (RT-qPCR: cq value 15). Each sow of group A1 received 6 ml of this stock diluted with 14 ml PBS. The solution was orally fed using a 20 ml syringe. Piglets of groups A1 and A2 were also orally inoculated. In this case, each piglet received 2 ml of a 1:10 diluted viral stock (titer 3.16×10^4 TCID₅₀/ml) using 2 ml syringes.

To inoculate animals of groups B1 and B2, PEDV-PCR-positive field material (DE) from recent clinical cases in South-Western Germany was used. In these cases mainly fattening pigs were affected by rather mild clinical signs. The material was a pool of different fecal samples and intestines. To obtain the inoculum, intestines were homogenized with sterile sea sand using mortar and pestle. Faecal samples were mixed and also homogenized. Each sow of group B1 received 20 ml of the organ suspension (RT-qPCR: cq value 23) and 20 ml of the faecal homogenate (RT-qPCR: cq value 15) orally using 20 ml syringes. All piglets of groups B1 and B2 received a faecal homogenate obtained from the sows of group B1 at 5 dpi and 6 dpi (RT-qPCR: cq value 19). The piglets were inoculated orally with 2 ml of this faecal homogenate using 2 ml syringes.

Sample preparation and nucleic acid extraction

Rectal swabs were submerged in 1 ml Dulbecco's Modified Eagle Medium with standard antibiotics and antimycotics (Antibiotic-Antimycotic 100x, Gibco) and incubated for 1 hour at room temperature. Viral RNA was extracted using either the manual QIAmp ViralRNA Mini Kit (Qiagen) or the NucleoMagVet-Kit (Macherey-Nagel) in combination with the KingFisher extraction platform (Thermo Scientific). The RNA was stored at -20°C until further use.

Blood samples were centrifuged at 2000 x g for 20 minutes at room temperature to obtain serum. The resulting serum was aliquoted and stored at -20°C. Colostrum and milk samples were aliquoted and stored at -20°C until further use.

Virus detection

To detect PEDV genome in fecal swabs, a RT-qPCR system targeting the S-gene of PEDV was used as described previously³³. Cq values above 40 were considered negative and the amount of PEDV genome copies was calculated by using a standard curve.

In addition, the inoculum for sows and piglets was tested for porcine circovirus 2, porcine enteroviruses (including enteroviruses, teschoviruses, and sapeloviruses), rotavirus A, transmissible gastroenteritis virus, and porcine delta coronavirus using specific in-house RT-PCR assays (primer sequences and reaction conditions are available from the authors upon request).

Swabs of animals which showed central nervous signs that could have been indicative for infection with teschoviruses were also tested in the PEV PCR assay (concerns the litters of sows 4423 and 6150, group B1).

Plots and statistics

Creation of different plots and charts was performed using SigmaPlot for Windows version 11.0 (Systat Software). Shapiro-Wilk test was used for normality testing and a Mann-Whitney rank sum test was conducted as implemented in the software package. Statistical significance ($p \leq 0.05$ was considered significant) was tested using SigmaPlot software.

Veterinary treatments unrelated to PED

Six sows (all except animals 4249 and 1871) received cloprostenol (Estrumate, Intervet) to induce farrowing. Moreover, all sows were treated with antibiotics (Riketron N, aniMedica) and anti-inflammatory drugs (Metacam, Boehringer) for a mild Metritis-Mastitis-Agalactia-Syndrome over 3 days. Piglets of sow No. 6150 (group B1) received Baytril orally over 4 days because of mild enteritis prior to inoculation. Where needed, piglets received anti-inflammatory drugs (Metacam, Boehringer) for lameness (arthritis, panaritita).

Antibody detection

Three commercial indirect ELISA (Swinecheck PED indirect, BIOVET, GC Kerkrade, the Netherlands; INgezim PEDV, INGENASA, Madrid, Spain; ID Screen PEDV indirect, Grabels, France) were performed with all sera according to the producer's manual. Colostrum and milk samples were tested in the same manner after initial validation. While ELISA kits of BIOVET and IDVet are using recombinant nucleoprotein, the INGENASA ELISA plates are coated with recombinant spike protein.

In cases of ambiguous results, the respective samples were tested in indirect immunofluorescence assays using commercial PEDV FA Substrate Slides (VMRD, Pullman, Washington) following the manufacturer's instructions. The slides were screened for specific fluorescence with a standard fluorescence microscope (Zeiss Axio Vert.A1, Oberkochen, Germany).

In addition, colostrum and milk samples were tested for PEDV specific IgA antibodies using an in-house indirect ELISA (assay specifications are available from the authors upon request).

Data availability statement

The datasets generated and analysed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Acknowledgement

This research was supported by Boehringer Ingelheim. We thank our colleagues from Boehringer for sharing knowledge and discussion of research results. Our special thanks goes to Svenja Mamerow who helped us throughout the trial. We are also grateful to all of our colleagues in the laboratory and stable.

Author contributions

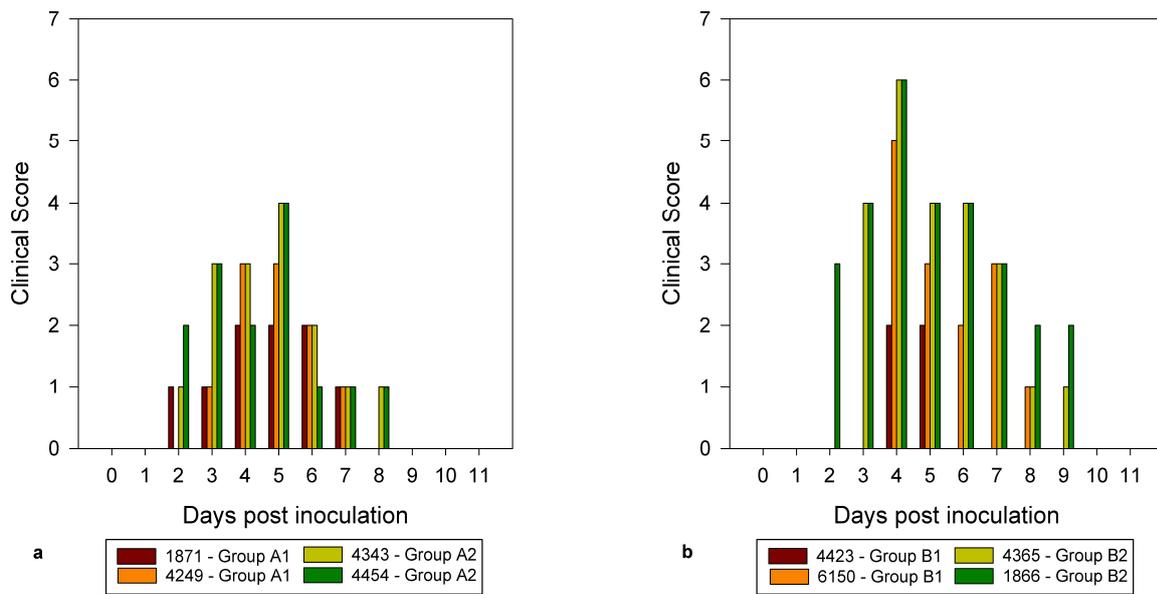
N.V., deS. H., B.M. and B.S. designed the experiment. L.S., S. Ch., Au.A., B.S., and Z.L. carried out the animal trial and collected clinical samples. Sample analyses were performed by L.S., Z.L., Au.A., L.S., M.P. and A.A. analysed data. The manuscript was written by L.S., B.S. and B.M.

All authors took part in discussion and interpretation of results. All authors read, advised and approved the final manuscript.

Competing financial interest statement

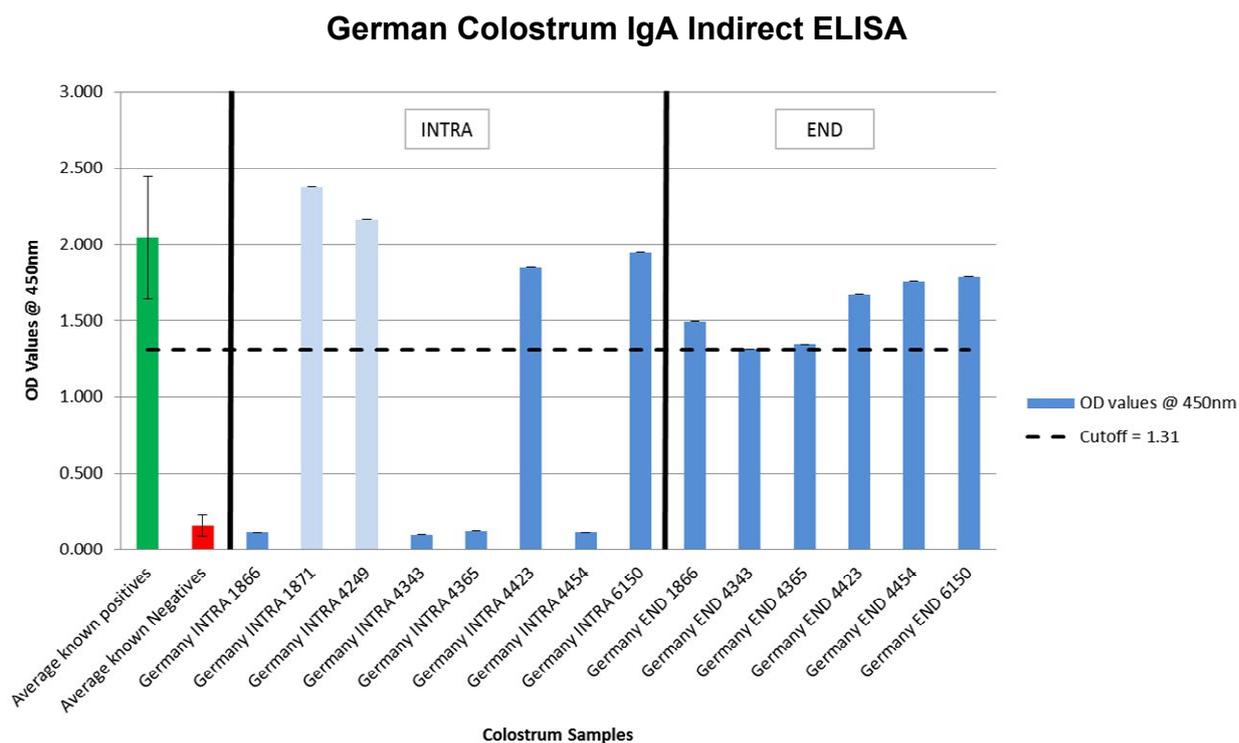
The authors were part of an industrial funded research project from Boehringer Ingelheim. The PEDV cell culture isolate was kindly provided by Boehringer Ingelheim. No other conflicts of interest exist.

Supplementary Figures



Supplementary Fig. F1:

Clinical Score values of sows: chart a: sows infected with cell culture strain of PEDV (PEDV-EU), chart b: sows infected with German field material containing PEDV; sows belonging to group A1 and B1 were orally infected prior to farrowing and sows belonging to group A2 and B2 got infected through PEDV shedding of their respective piglets.



Supplementary Figure 2:

IgA in colostrum and milk samples: Amount of IgA antibodies in colostrum taken intra partum and milk samples at the end of the study; sows 1871 and 4249 belong to group A1, sows 4343 and 4454 belong to group A2, sows 6150 and 4423 belong to group B1 and sows 1866 and 4365 belong to group B2

References

- 1 Shibata, I. *et al.* Isolation of porcine epidemic diarrhea virus in porcine cell cultures and experimental infection of pigs of different ages. *Veterinary microbiology* **72**, 173-182 (2000).
- 2 Thomas, J. T. *et al.* Effect of Porcine Epidemic Diarrhea Virus Infectious Doses on Infection Outcomes in Naive Conventional Neonatal and Weaned Pigs. *Plos One* **10**, 1-18, doi:10.1371/journal.pone.0139266 (2015).
- 3 Jung, K., Annamalai, T., Lu, Z. & Saif, L. J. Comparative pathogenesis of US porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) strain PC21A in conventional 9-day-old nursing piglets vs. 26-day-old weaned pigs. *Veterinary microbiology* **178**, 31-40, doi:10.1016/j.vetmic.2015.04.022 (2015).
- 4 Carstens, E. B. Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses (2009). *Archives of virology* **155**, 133-146, doi:10.1007/s00705-009-0547-x (2010).
- 5 Wood, E. N. An apparently new syndrome of porcine epidemic diarrhoea. *Vet Rec* **100**, 243-244 (1977).
- 6 Oldham, J. in *Pig Farming* Vol. 10 72-73 (1972).
- 7 Carvajal, A., Argüello, H., Martínez-Lobo, F. J., Costillas, S., Miranda, R., de Nova, P. J. G., Rubio, P. Porcine epidemic diarrhoea: new insights into an old disease. *Porcine Health Management* **1:12** (2015).
- 8 Pospischil, A., Stuedli, A., Kiupel, M. Update on porcine epidemic diarrhea. *J Swine Health Prod* **10**, 81-85 (2002).
- 9 Saif, L. J., Pensaert, M., Sestak, K., Yeo, S. G. & Jung, K. in *Diseases of Swine* (eds J. J. Zimmerman *et al.*) Ch. 35, 501-524 (Wiley-Blackwell, 2012).
- 10 Van Reeth, K. & Pensaert, M. Prevalence of infections with enzootic respiratory and enteric viruses in feeder pigs entering fattening herds. *Vet Rec* **135**, 594-597 (1994).

- 11 Carvajal, A., Lanza, I., Diego, R., Rubio, P. & Carmenes, P. Evaluation of a blocking ELISA using monoclonal antibodies for the detection of porcine epidemic diarrhea virus and its antibodies. *Journal of veterinary diagnostic investigation: official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc* **7**, 60-64, doi:10.1177/104063879500700109 (1995).
- 12 Pijpers, A., van Nieuwstadt, A. P., Terpstra, C. & Verheijden, J. H. Porcine epidemic diarrhoea virus as a cause of persistent diarrhoea in a herd of breeding and finishing pigs. *Veterinary Record* **132**, 129-131 (1993).
- 13 Nagy, B., Nagy, G., Meder, M. & Mocsári, E. Enterotoxigenic Escherichia coli, rotavirus, porcine epidemic diarrhoea virus, adenovirus and calici-like virus in porcine postweaning diarrhoea in Hungary. *Acta Veterinaria Hungarica* **44**, 9-19 (1996).
- 14 Pritchard, G. C., Paton, D. J., Wibberley, G. & Ibata, G. Transmissible gastroenteritis and porcine epidemic diarrhoea in Britain. *Veterinary Record* **144**, 616-618 (1999).
- 15 Kusanagi, K. *et al.* Isolation and serial propagation of porcine epidemic diarrhea virus in cell cultures and partial characterization of the isolate. *The Journal of veterinary medical science/the Japanese Society of Veterinary Science* **54**, 313-318 (1992).
- 16 Takahashi, K., Okada, K. & Ohshima, K. An outbreak of swine diarrhea of a new-type associated with coronavirus-like particles in Japan. *Nihon Juigaku Zasshi* **45**, 829-832 (1983).
- 17 Pensaert, M. B. & Martelli, P. Porcine epidemic diarrhea: A retrospect from Europe and matters of debate. *Virus research* **226**, 1-6, doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.virusres.2016.05.030 (2016).
- 18 Song, D., Moon, H. & Kang, B. Porcine epidemic diarrhea: a review of current epidemiology and available vaccines. *Clinical and experimental vaccine research* **4**, 166-176, doi:10.7774/cevr.2015.4.2.166 (2015).
- 19 Martelli, P. *et al.* Epidemic of diarrhoea caused by porcine epidemic diarrhoea virus in Italy. *Vet Rec* **162**, 307-310 (2008).

- 20 Li, W. *et al.* New variants of porcine epidemic diarrhea virus, China, 2011. *Emerg Infect Dis* **18**, 1350-1353, doi:10.3201/eid1808.120002 (2012).
- 21 Wang, J. *et al.* Porcine epidemic diarrhea virus variants with high pathogenicity, China. *Emerg Infect Dis* **19**, 2048-2049, doi:10.3201/eid1912.121088 (2013).
- 22 Stevenson, G. W. *et al.* Emergence of Porcine epidemic diarrhea virus in the United States: clinical signs, lesions, and viral genomic sequences. *J Vet Diagn Invest* **25**, 649-654, doi:10.1177/1040638713501675 (2013).
- 23 United States Department of Agriculture. *Swine Enteric Coronavirus Disease Testing Summary Report*, <https://www.aphis.usda.gov/animal_health/animal_dis_spec/swine/downloads/SECD_pre-fed_order_nahln_test_sum_rpt.pdf> (2014).
- 24 Chen, Q. *et al.* Isolation and characterization of porcine epidemic diarrhea viruses associated with the 2013 disease outbreak among swine in the United States. *Journal of clinical microbiology* **52**, 234-243, doi:10.1128/JCM.02820-13 (2014).
- 25 Hanke, D. *et al.* Comparison of porcine epidemic diarrhea viruses from Germany and the United States, 2014. *Emerging infectious diseases* **21**, 493-496, doi:10.3201/eid2103.141165 (2015).
- 26 Huang, Y. W. *et al.* Origin, evolution, and genotyping of emergent porcine epidemic diarrhea virus strains in the United States. *MBio* **4**, 1-8, doi:10.1128/mBio.00737-13 (2013).
- 27 Henniger, T., Schwarz, B.A. Porcine epidemic diarrhea (PED) - Neuausbrüche in deutschen Mastschweinebeständen. *Tierärztl. Umschau* **69**, 394-398 (2014).
- 28 Dastjerdi, A., Carr, J., Ellis, R. J., Steinbach, F. & Williamson, S. Porcine Epidemic Diarrhea Virus among Farmed Pigs, Ukraine. *Emerg Infect Dis* **21**, 2235-2237, doi:10.3201/eid2112.150272 (2015).
- 29 Grasland, B. *et al.* Complete genome sequence of a porcine epidemic diarrhea s gene indel strain isolated in france in december 2014. *Genome announcements* **3**, doi:10.1128/genomeA.00535-15 (2015).

- 30 Steinrigl, A. *et al.* First detection, clinical presentation and phylogenetic characterization of Porcine epidemic diarrhea virus in Austria. *BMC Vet Res* **11**, 310, doi:10.1186/s12917-015-0624-1 (2015).
- 31 Mesquita, J. R. *et al.* Outbreak of Porcine Epidemic Diarrhea Virus in Portugal, 2015. *Transbound Emerg Dis* **62**, 586-588, doi:10.1111/tbed.12409 (2015).
- 32 Theuns, S. *et al.* Complete genome sequence of a porcine epidemic diarrhea virus from a novel outbreak in Belgium, January 2015. *Genome announcements* **3**, doi:10.1128/genomeA.00506-15 (2015).
- 33 Stadler, J. *et al.* Emergence of porcine epidemic diarrhea virus in southern Germany. *BMC Vet Res* **11**, 142, doi:10.1186/s12917-015-0454-1 (2015).
- 34 Boniotti, M. B. *et al.* Porcine Epidemic Diarrhea Virus and Discovery of a Recombinant Swine Enteric Coronavirus, Italy. *Emerging infectious diseases* **22**, 83-87, doi:10.3201/eid2201.150544 (2016).
- 35 Chang, S. H. *et al.* Identification of the epitope region capable of inducing neutralizing antibodies against the porcine epidemic diarrhea virus. *Mol Cells* **14**, 295-299 (2002).
- 36 Wang, L., Byrum, B. & Zhang, Y. New variant of porcine epidemic diarrhea virus, United States, 2014. *Emerging infectious diseases* **20**, 917-919, doi:10.3201/eid2005.140195 (2014).
- 37 EFSA. *Scientific Opinion on porcine epidemic diarrhoea and emerging porcine deltacoronavirus*, <<https://www.efsa.europa.eu/de/efsajournal/pub/3877>> (2014).
- 38 Hanke, D. *et al.* Porcine Epidemic Diarrhea in Europe: In-Detail Analyses of Disease Dynamics and Molecular Epidemiology. *Viruses* **9**, doi:10.3390/v9070177 (2017).
- 39 Poonsuk, K. *et al.* Quantifying the effect of lactogenic antibody on porcine epidemic diarrhea virus infection in neonatal piglets. *Veterinary microbiology* **197**, 83-92, doi:10.1016/j.vetmic.2016.11.002 (2016).
- 40 Bjustrom-Kraft, J. *et al.* Porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) detection and antibody response in commercial growing pigs. *BMC Vet Res* **12**, 99, doi:10.1186/s12917-016-0725-5 (2016).

- 41 Šinkora, M. & Butler, J. E. The ontogeny of the porcine immune system. *Developmental & Comparative Immunology* **33**, 273-283, doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.dci.2008.07.011> (2009).
- 42 Evans, P. A., Newby, T. J., Stokes, C. R. & Bourne, F. J. A study of cells in the mammary secretions of sows. *Veterinary immunology and immunopathology* **3**, 515-527, doi:[http://dx.doi.org/10.1016/0165-2427\(82\)90017-4](http://dx.doi.org/10.1016/0165-2427(82)90017-4) (1982).
- 43 Bohl, E. H., Gupta, R. K., Olquin, M. V. & Saif, L. J. Antibody responses in serum, colostrum, and milk of swine after infection or vaccination with transmissible gastroenteritis virus. *Infect Immun* **6**, 289-301 (1972).
- 44 Park, S. *et al.* Immune response of sows vaccinated with attenuated transmissible gastroenteritis virus (TGEV) and recombinant TGEV spike protein vaccines and protection of their suckling pigs against virulent TGEV challenge exposure. *Am J Vet Res* **59**, 1002-1008 (1998).
- 45 Schwartz, T. J., Rademacher, C.J. Evaluation of the effects of PEDv vaccine on PEDv naïve and previously PEDv-exposed sows in a challenge model comparing immune response and preweaning mortality. *James D. McKean Swine Disease Conference Proceedings, Iowa State University*, 36–40 (2015).
- 46 Lee, C. Porcine epidemic diarrhea virus: An emerging and re-emerging epizootic swine virus. *Virology journal* **12**, 193, doi:[10.1186/s12985-015-0421-2](https://doi.org/10.1186/s12985-015-0421-2) (2015).
- 47 Song, D. S. *et al.* Oral efficacy of Vero cell attenuated porcine epidemic diarrhea virus DR13 strain. *Res Vet Sci* **82**, 134-140, doi:[10.1016/j.rvsc.2006.03.007](https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2006.03.007) (2007).
- 48 Oh, J., Lee, K. W., Choi, H. W. & Lee, C. Immunogenicity and protective efficacy of recombinant S1 domain of the porcine epidemic diarrhea virus spike protein. *Archives of virology* **159**, 2977-2987, doi:[10.1007/s00705-014-2163-7](https://doi.org/10.1007/s00705-014-2163-7) (2014).
- 49 Ouyang, K. *et al.* Evaluation of humoral immune status in porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) infected sows under field conditions. *Vet Res* **46**, 140, doi:[10.1186/s13567-015-0285-x](https://doi.org/10.1186/s13567-015-0285-x) (2015).

- 50 Bertasio, C. *et al.* Porcine Epidemic Diarrhea Virus Shedding and Antibody Response in Swine Farms: A Longitudinal Study. *Front Microbiol* **7**, 2009, doi:10.3389/fmicb.2016.02009 (2016).
- 51 Strandbygaard, B. *et al.* Inter-laboratory study to characterize the detection of serum antibodies against porcine epidemic diarrhoea virus. *Veterinary microbiology* **197**, 151-160, doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.11.020 (2016).
- 52 Lohse, L. *et al.* Experimental Infection of Young Pigs with an Early European Strain of Porcine Epidemic Diarrhoea Virus and a Recent US Strain. *Transbound Emerg Dis*, doi:10.1111/tbed.12509 (2016).

5 Diskussion und Ausblick

5.1 Charakterisierung aktueller PEDV Stämme *in vivo* und Untersuchung der Schutzeffekte maternal vermittelter Immunität als Voraussetzung für ein Muttertierschutzimpfkonzept

5.1.1 Charakterisierung der Virulenz aktueller deutscher PEDV Stämme *in vivo*

Die PED ist in Europa seit den 1980er Jahren nur sehr sporadisch aufgetreten (Song et al. 2015). Aufgrund des geringen wirtschaftlichen Einflusses wurde eine staatliche Überwachung seit den 1980er Jahren nicht durchgeführt, weswegen aktuell wenig Informationen über den serologischen und virologischen Status der europäischen Schweinebestände vorliegen (EFSA 2016).

Im Frühjahr 2013 wurden erstmals Ausbrüche hochvirulenter PEDV-Stämme in den USA gemeldet. Der Ursprung dieser hochvirulenten Stämme liegt, basierend auf molekulargenetischen Verwandtschaftsanalysen, sehr wahrscheinlich in asiatischen Ländern, in denen das Virus seit Mitte der 1980er Jahre endemisch ist (Stevenson et al. 2013). Aufgrund des verheerenden Ausmaßes der Ausbrüche in den USA mit Verlusten bis zu 7 Millionen Ferkeln (Jung und Saif 2015), wurde auch in Europa wieder verstärkt nach dem Erreger gesucht und diverse Fälle von PED wurden bestätigt (Carvajal et al. 1995; Dastjerdi et al. 2015; Grasland et al. 2015; Martelli et al. 2008; Mesquita et al. 2015; Stadler et al. 2015; Steinrigl et al. 2015; Theuns et al. 2015; Toplak et al. 2016).

Mit Ausnahme der bei den ukrainischen Ausbrüchen diagnostizierten Stämme handelt sich bei den für die Ausbrüche verantwortlichen PEDV-Stämmen allerdings glücklicherweise eher um moderat virulente Varianten, die eng mit dem ebenfalls moderat virulenten Stamm OH851 aus den Vereinigten Staaten verwandt sind (Dastjerdi et al. 2015; Hanke et al. 2015; Stevenson et al. 2013; Wang et al. 2014). Dieser Stamm ist im Gesamtgenom zu 97-99% genetisch identisch mit den amerikanischen hochvirulenten Prototypen, unterscheidet sich allerdings im für das Spike-Protein kodierenden Genomabschnitt und ist mit mildereren Krankheitsverläufen assoziiert (Vlasova et al. 2014; Wang et al. 2014). Er repräsentiert die sogenannten S-INDEL Stämme, die durch Insertions- und Deletionsmutationen im für das Spike-Protein kodierenden Genabschnitt gekennzeichnet sind.

Genomanalysen der PEDV-Stämme in Deutschland zeigen eine sehr enge Verwandtschaft der aktuell zirkulierenden Virusstämme auf. Es handelt sich bei allen bisher sequenzierten deutschen Stämmen um S-INDEL Varianten (Hanke et al. 2017). Feldbeobachtungen geben Anlass zu der Annahme, dass diese Varianten von moderater Virulenz sind, was mit Veränderungen in dem für den Zelleintritt verantwortlichen Spike-Protein und damit einem veränderten Eintritt in die Wirtszellen erklärbar wäre (Lee 2011). Dieser Vermutung stehen allerdings Fallbeschreibungen mit sehr unterschiedlichen Morbiditäts- und Mortalitätsraten in den deutschen Schweinehaltungen entgegen (Stadler et al. 2015).

Neben den analysierten PEDV-Stämmen wurde im Rahmen der Genomanalysen deutscher Feldproben eine neuartige PEDV/TGEV Chimäre entdeckt (SeCoV), welche erstmals kurz zuvor in Italien beschrieben wurde und dort im Feld mit milderer Klinik assoziiert ist (Boniotti et al. 2016). Dieses Virus basiert auf dem Rückgrat eines TGEV, wohingegen der für das Spike-Protein kodierende Genomabschnitt eng verwandt mit dem des PEDV ist. Diese Art von Rekombinante kann in Gegenden, in denen sowohl PEDV als auch TGEV kursieren, die Diagnostik erschweren (Akimkin et al. 2016). Weitere Untersuchungen zur *in vivo* Virulenz der SeCoV oder etwaiger Ko-Infektionen von SeCoV und PEDV liegen bisher nicht vor.

In den vorliegenden Studien wurden zwei Stämme, ein Zellkulturisolat aus einem deutschen Ausbruch und Feldmaterial (Darmmaterial infizierter Ferkel sowie virushaltige Faeces ohne vorherige Zellpassage) aus Deutschland *in vivo* im Saugferkelmodell verglichen, um die Virulenz dieser Stämme unter standardisierten Bedingungen zu evaluieren. Während das Feldmaterial die Situation im Feld direkter abbildet, ist das Zellkulturisolat besser für zukünftige Studien zu standardisieren und kann in ausreichend hohen Mengen für weitere Untersuchungen generiert werden. Um eine etwaige Modifikationen der Virulenz des Zellkulturisolates *in vivo* durch Adaptationsprozesse an die Zellkultur beurteilen zu können, wurde das Feldmaterial im direkten Vergleich eingesetzt.

Alle Tiere wurden unter Bedingungen gehalten, die auch im Feld vorzufinden sind. Ferkeln aller Gruppen standen während der gesamten Versuchsdauer sowohl Milchaustauscher als auch Elektrolyttränke zur Verfügung sowie zusätzliche Wärmequellen, um Temperaturverlust durch Feuchtigkeit bei erkrankten und geschwächten Tieren zu mindern beziehungsweise zu verhindern und somit die

potentielle Verlustrate so gering wie möglich zu halten. Ähnliche Managementmaßnahmen werden bei Durchfallerkrankungen auch in der kommerziellen Schweinehaltung zur Reduzierung der Verlusten ergriffen.

Unter Versuchsbedingungen zeigte sich, dass beide eingesetzten Stämme von moderater Virulenz waren. Beide zeigten Morbiditätsraten von 100% mit etwas deutlicher ausgeprägter Klinik bei den Tieren, die mit dem Feldmaterial inokuliert wurden. Die beobachtete Mortalität war allerdings in beiden Gruppen sehr gering. Zu schweren Krankheitsverläufen kam es lediglich bei Tieren, die allgemein von schwächerer Konstitution waren. Dies bestätigt die Annahme, dass Stämme, die Mutationen im für das Spike-Protein kodierenden Genabschnitt aufweisen (S-INDEL), von moderater Virulenz sind.

Dennoch beeinflussen andere Faktoren wie Alter der Tiere oder Ko-Infektionen mit anderen enteralen Erregern im Feld den Krankheitsverlauf. Dies wurde unter anderem in Studien bestätigt, in denen Tiere unterschiedlicher Altersklassen mit demselben Virenstamm infiziert wurden und deutliche altersabhängige Unterschiede im klinischen Verlauf und der Virusausscheidung beobachtet wurden (Gerber et al. 2016; Jung et al. 2015). Diese Beobachtungen stehen im Zusammenhang mit der unterschiedlichen Reife der angeborenen Immunabwehr und damit z.B. einem geringeren Gehalt an natürlichen Killerzellen und Interferon γ bei neun Tage alten Tieren im Vergleich zu 26 Tage alten Tieren (Annamalai et al. 2015). Darüber hinaus spielen auch Unterschiede in der Geschwindigkeit der Abschilferung und Regeneration von Dünndarmepithelzellen bei Neonaten im Vergleich zu drei Wochen alten Tieren eine Rolle in Bezug auf die Schwere des Krankheitsverlaufes (Moon et al. 1973). Insgesamt bilden die Tiere eine gewisse Altersimmunität aus, die sich durch eine erhöhte minimale infektiöse Dosis und verringerte Schwere der klinischen Verläufe auszeichnet (Gerber et al. 2016; Jung et al. 2015; Thomas et al. 2015).

Bezüglich des Einflusses von Ko-Infektionen brachten Metagenomanalysen bisher noch keinen eindeutigen Zusammenhang zwischen der Schwere des PED-Verlaufes und spezifischen Pathogenen (Hanke et al. 2017). Nichtsdestotrotz ist bei Vorliegen einer Infektion mit anderen enteralen Pathogenen wie beispielsweise Rotavirus A oder Parasitenbelastung von einer Verschärfung der Situation für das Einzeltier auszugehen.

Die Vorinfektion mit einem moderat virulenten PEDV-Stamm ist in der Lage einen zumindest partiellen Schutz gegen die Infektion mit einer hochvirulenten Variante zu induzieren. Klinische Symptome sind milder und es wird im Vergleich zu naiven Tieren weniger Virus mit dem Kot ausgeschieden (Goede et al. 2015; Lin et al. 2015). Dadurch könnte sich für Europa im Falle einer Einschleppung eines hochvirulenten Erregers aufgrund der aktuellen Infektionslage im günstigsten Fall eine Teilimmunität der Bestände und damit eine Verringerung der wirtschaftlichen Einbußen ergeben. Allerdings sind aufgrund einer Infektion gebildete Antikörper nicht von allzu langer Lebensdauer und einmal infizierte Tiere sind bereits nach kurzer Zeit reinfizierbar (Bertasio et al. 2016; Bjustrom-Kraft et al. 2016).

5.1.2 Schutzeffekt maternalen Antikörper und Vakzinen

In den vorliegenden Studien wurde der Schutzeffekt maternal vermittelter Immunität gegen homologe Belastungsinfektion der Ferkel in der ersten Lebenswoche untersucht. Hierzu wurden die Sauen im letzten Drittel der Trächtigkeit entsprechend der natürlichen Infektionsroute oral inokuliert. Die Art der Applikation des Antigens hat laut Literatur wesentlichen Einfluss auf die Ausprägung der Immunantwort der Sau und damit auch auf die Ausbildung einer belastbaren laktogenen vermittelten Immunität der Ferkel (Langel et al. 2016).

Aufgrund der Tatsache, dass Ferkel agammaglobulinämisch geboren werden, sind sie auf die Aufnahme maternalen Antikörper und Immunzellen angewiesen, um in den ersten Lebenswochen vor Infektionen geschützt zu sein (Šinkora und Butler 2009). Hierbei ist zwischen der Aufnahme von Kolostrum und Milch zu unterscheiden. Das Kolostrum ist reich an Immunglobulinen vom Isotyp G (Ig G), die durch Transsudation über die Blut-Milchschanke gelangen und das Ferkel nach Kolostrumaufnahme vor systemischen Infektionen schützen. Zum Schutz vor lokalen, im Falle von PEDV enteralen Infektionen, spielt zusätzlich die ständige Aufnahme von sekretorischem Immunglobulin A (Ig A) über die Milch der Sau eine entscheidende Rolle. Sekretorische Ig A stellen von 3 bis 5 Tage nach der Geburt bis zum Laktationsende den dominierenden Antikörperisotyp in der Milch dar und sind aufgrund einer hohen Säurestabilität in der Lage eine Magenpassage zu überstehen und eine lokale Schutzwirkung im Darm zu vermitteln. Ein hoher Gehalt an sekretorischem Ig A in der Milch wird über eine Stimulation der Darm-Milchdrüsen-Achse der Sau erreicht, die wiederum nur bei lokalem Kontakt des Erregers mit der Darmschleimhaut angesprochen wird (Langel et al. 2016). Somit ist der Kontakt zwischen Schleimhaut und Antigen bei einer Immunisierung der Sau essentiell, um neben einem messbaren Ig G-Gehalt im Kolostrum der Sau - und damit nach Kolostrumaufnahme auch im Serum der Ferkel - eine zufriedenstellende Schutzwirkung über die ständige Aufnahme von Ig A durch die Milch zu erreichen (Salmon et al. 2009).

In den vorliegenden Studien konnte eine zuverlässige maternal vermittelte Immunität gegen eine homologe Belastungsinfektion mit PEDV im Saugferkel bestätigt werden. Ferkel seropositiver Sauen zeigten allenfalls geringe und inkonsistente klinische Symptome der PED. Die Virusausscheidung konnte durch die Vorinfektion der Sauen nicht zu 100% verhindert werden, war aber deutlich reduziert. Diese Beobachtungen

korrelieren mit Studienergebnissen aus der Literatur (Baek et al. 2016; Gerber et al. 2016). Allerdings kann sich diese residuale Virusauscheidung bei einer Bestandssanierung als problematisch erweisen.

Wie für das eng verwandte Virus der Transmissiblen Gastroenteritis (TGEV) bereits gezeigt werden konnte, kann über eine parenterale Immunisierung der trächtigen Sau kein oder nur ein geringer, partieller passiver Schutz der Ferkel erzielt werden, obwohl die Sauen zuverlässig serokonvertieren und durchaus hohe Gehalte an Ig G im Serum nachgewiesen werden können. Erst eine enterale Immunisierung durch eine Infektion der Sauen führte zu einem effektiven passiven Schutz der Ferkel vor der Transmissiblen Gastroenteritis (TGE) über sekretorische Ig A in der Milch (Bohl et al. 1972; Lanza et al. 1995).

Aufgrund dessen muss die Frage gestellt werden, ob eine Aussage über die Schutzwirkung einer potentiellen Vakzine gegen PEDV allein durch die serologische Kontrolle der Ig G-Antikörperentwicklung im Serum der Sau getroffen werden kann oder ob die Bestimmung des Ig A Gehaltes in beispielsweise Rektal- oder Speicheltupfern oder des Kolostrums bzw. der Milch der Sau eine bessere prospektive Aussagekraft hat (Bjuström-Kraft et al. 2016; Gerber et al. 2014; Gerber und Opriessnig 2015).

Eine wichtige Rolle in der Qualität der maternal vermittelten passiven Immunität spielt aber auch das Alter der Sau und damit die Anzahl der bereits erfolgten Geburten und Laktationen. Untersuchungen zur Schutzwirkung von Rotavirus Vakzinen beim Rind haben gezeigt, dass primipare Tiere nach einer einmaligen Immunisierung einen insgesamt geringeren Antikörperspiegel in Kolostrum und Milch aufwiesen als multipare Tiere. Eine Arbeitsgruppe um Ouyang hat 2015 ebenfalls gezeigt, dass bei multiparen Sauen im Vergleich zu primiparen Tieren eine größere Zahl an Ig A bildenden B-Zellen in Ileum, mesenterialen Lymphknoten und Milz zu finden ist. Dies verleitet zu der Annahme, dass die Wanderung von Plasmazellen über die Darm-Milchdrüse-Achse mit steigender Zahl der Trächtigkeiten effizienter wird. Weitere Beobachtungen im Feld unterstützen diese Ergebnisse. Im Rahmen von Studien zur Feedback-Immunisierung und Bestandssanierung wurde beobachtet, dass ein einmaliger Kontakt der naiven Jungsau mit PEDV zwar zur Serokonversion führt, der Schutz der Ferkel in der Laktation durch Ig A allerdings eher schwach ausfällt verglichen mit einer zweiten Gruppe von Sauen, die dem Erreger zweimal ausgesetzt

worden sind. Die Häufigkeit des Kontaktes mit dem Erreger in der Trächtigkeit hat somit durch einen gewissen Boostereffekt einen steigernden Einfluss auf die Qualität der vermittelten maternalen Immunität (Srijangwad et al. 2017).

Des Weiteren ist eine differenzierte Betrachtung von naiven und bereits serokonvertierten Sauen notwendig. Studien zu einem vorläufig zugelassenen Impfstoff gegen PEDV im Muttertierschutzimpfkonzept in den USA haben gezeigt, dass Sauen, die bereits einmal Kontakt zu dem Erreger hatten, auf eine Impfung mit vermehrter Bildung von sekretorischen Ig A in der Milch im Vergleich zu naiven Sauen reagieren, während die Ig G Gehalte im Serum vergleichbar waren (Schwartz und Rademacher 2016). Diese Frage bedarf allerdings noch weiterer Untersuchungen ebenso wie die Frage nach dem optimalen Impfzeitpunkt in der Trächtigkeit und eventueller Erhöhung der Impfdosis oder der Anzahl der Vakzinierungen bei primiparen Tieren (Chattha et al. 2015). Wie die vorliegenden Studien zeigen, gilt dies nicht, wenn der erste Erregerkontakt, dem natürlichen Infektionsweg folgend, oral stattfindet. Alle naiven, präpartal infizierten Sauen serokonvertierten und vermittelten eine belastbare laktogene Immunität hinsichtlich klinischer PED.

Die Halbwertszeit der Antikörper im Serum und die Langzeitschutzwirkung sind bisher nicht abschließend geklärt. In den vorliegenden Studien hat sich allerdings gezeigt, dass die Antikörperspiegel im Serum der Sauen bereits acht Wochen nach der Infektion eine sinkende Tendenz aufweisen, die Tiere jedoch nach wie vor positiv in den Antikörpertests reagieren. Feldstudien haben ergeben, dass Seren von Sauen auch sechs Monate nach Erregerkontakt noch positiv in ELISAs und Virusneutralisationstests reagieren (Ouyang et al. 2015). Es fehlt allerdings an bestätigenden Studien zur Effektivität eines passiven Schutzes für die Ferkel dieser Sauen.

Diese Beobachtungen sind die Grundlage für die Annahme, dass ein Impfkonzept für Sauen zum maternalen Schutz der Saugferkel gegen PEDV nur effektiv sein kann, wenn die Sauen in jeder Trächtigkeit erneut immunisiert werden.

Im Rahmen dieser Überlegungen ergibt sich auch die Frage der Halbwertszeit der Antikörper bei Ferkeln, die eine Infektion überstanden haben. Langzeitstudien zu dieser Frage fehlen bislang, allerdings gibt es Hinweise in der Literatur, dass Antikörper im Blut bis zu 100 Tage nach Infektion nachweisbar sind (Bertasio et al.

2016; Bjustrom-Kraft et al. 2016). Über den Schutzeffekt dieser Antikörper vor erneuter Infektion ist bislang jedoch nichts bekannt. Allerdings werden im Feld Re-Infektionen mit erneuter Durchfallssymptomatik im selben Produktionszyklus beobachtet (Bertasio et al. 2016).

Die Frage der Kreuzprotektivität ist ebenfalls nicht einfach zu klären. Bisher eingesetzte Vakzinen im asiatischen Raum lassen zum Großteil lediglich einen partiellen Kreuzschutz mit reduzierter Virusausscheidung und oft mildereren Krankheitsverläufen erkennen. Des Weiteren kommt es auch in geimpften Beständen immer wieder zu Impfdurchbrüchen mit zum Teil schweren klinischen Verläufen (Pan et al. 2012; Sun et al. 2012). Insgesamt ist sowohl bei Infektion als auch Immunsierung der Tiere von einem partiellen Kreuzschutz gegen andere genetisch divergente Virusstämme auszugehen (Goede et al. 2015; Lin et al. 2015). Dies ist vermutlich bedingt durch die Diversität der PEDV-Stämme im für das Spike-Protein kodierenden Genabschnitt. Das Spike-Protein ist verantwortlich für die Rezeptorbindung an der Wirtszelle, sowie den Eintritt in die Zielzelle und stellt das Hauptantigen und damit das Hauptziel neutralisierender Antikörper dar (Song und Park 2012). Diese Annahme wird durch *in vitro* Studien gestützt, die eine Kreuzreaktivität und kreuzneutralisierende Effekte zwischen Isolaten nachgewiesen haben, die sich im Hauptantigen, dem Spike-Protein sehr ähnlich sind (Chen et al. 2016). Hier bedarf es weiterer Studien um nähere Erkenntnisse über einen möglichst effektiven Kreuzschutz zwischen den Stämmen zu erlangen, besonders im Hinblick auf die Impfstoffentwicklung.

5.2 Schlussfolgerungen und Ausblick

Nach den verheerenden PED-Ausbrüchen in den USA wurde die Ursache der Erregereinschleppung trotz intensiver Forschung nicht gefunden. Bisher ist unklar, ob PEDV ausschließlich direkt übertragen wird oder ob auch Vektoren oder Virusreservoirwirte eine Rolle spielen, auch wenn dazu bisher keine eindeutigen Hinweise vorliegen. Aufgrund der möglicherweise drohenden Einschleppung hochvirulenter PEDV-Stämme - wie in den USA - wurde europaweit wieder verstärkt auf PEDV untersucht. Neben Fallberichten aus vielen europäischen Ländern sind auch in Deutschland Ausbrüche beschrieben worden. Molekulargenetische und -epidemiologische Methoden haben gezeigt, dass sich die aktuellen deutschen Virenstämme deutlich von den frühen Stämmen der 80er Jahre unterscheiden, aber untereinander eine hohe genetische Ähnlichkeit aufweisen. In den durchgeführten Studien zeigten die deutschen PEDV Varianten unter standardisierten Versuchsbedingungen eine moderate Virulenz mit hoher Morbidität, aber geringer Letalität. Hochvirulente Verläufe mit hohen Letalitätsraten konnten nicht beobachtet werden.

Die im Gegensatz dazu beobachtete unterschiedliche Virulenz der deutschen S-INDEL-Stämme im Feld ist nicht abschließend geklärt und bedarf weiterer Untersuchungen. Die Unterscheidung in aggressive NON-INDEL Stämme und weniger virulente S-INDEL-Stämme ist hinweisend im Bezug auf die klinische Ausprägung der Symptomatik, allerdings legt die beobachtete variable Virulenz nahe, dass noch weitere Faktoren auf Genomebene oder im Management der Tiere eine Rolle spielen.

Die Diversität der PEDV-Stämme erschwert die Diagnostik und die Vorhersage einer potentiellen Kreuzimmunität nach Impfung oder vorangegangener Infektion. Laut Literatur konnte bislang unter experimentellen Bedingungen kein vollständiger Kreuzschutz zwischen unterschiedlich virulenten Stämmen nachgewiesen werden. Es wurde bisher lediglich ein partieller Schutz der Tiere beobachtet. Die Klinik der zweiten Infektion zeigte sich in der Regel deutlich abgemildert im Vergleich zu naiven Kontrolltieren und auch die Virusausscheidung ist verringert und zeitlich verkürzt.

Da auch bei einem partiellen Schutz der Ferkel größere wirtschaftliche Einbußen gemildert oder verhindert werden können, scheinen die Entwicklung und der Einsatz

von Impfstoffen gegen PEDV sinnvoll. Um den Schutz der empfänglichsten Wirtsgruppe, der Saugferkel, zu gewährleisten, ist das einzig denkbare Konzept die Muttertierschutzimmunisierung. Die bisherigen Versuche mit inaktivierten oder attenuierten Impfstoffen unterlagen wechselhaftem Erfolg. In zukünftigen Studien ist zu untersuchen, ob gegebenenfalls eine Abänderung der Applikationsform der Impfstoffe von parenteral hin zur mukosalen Applikation eine Verbesserung der Impfwirkung durch die verbesserte Induktion der Bildung von Immunglobulin A im Hinblick auf den Saugferkelschutz erbringt.

Mit den vorliegenden Studien wurde der Grundstein für die Etablierung eines effektiven Muttertierschutzimpfkonzeptes gelegt. Die positive Bestätigung des Schutzeffekts maternaler Antikörper gegen eine homologe Belastungsinfektion der Ferkel und die Etablierung eines Saugferkelmodells für PEDV Infektionen sind unerlässlich für die Entwicklung und Testung zukünftiger Impfstoffkandidaten. Des Weiteren liefern diese Untersuchungen wertvolle Daten zur Antikörperentwicklung und –kinetik bei enteralen Infektionen.

6 Zusammenfassung

Die porcine epidemische Diarrhoe (PED), eine hochkontagiöse Darmerkrankung des Schweines, wird verursacht durch das gleichnamige *Alphacoronavirus*, Porzines Epidemisches Diarrhoe Virus (PEDV), das vor allem bei Saugferkeln schwere Durchfallerkrankungen auslöst. PED wurde erstmals 1971 in Großbritannien beschrieben und war in Europa bis Anfang der 1990er Jahre weit verbreitet. In den Folgejahren wurden aus Europa nur einzelne Ausbrüche gemeldet, wohingegen das Virus in Asien seit den 1980er Jahren endemisch ist.

Seit dem Frühjahr 2013 wurden erstmals seuchenartig verlaufende Ausbrüche von PED mit hohen Mortalitätsraten in den Vereinigten Staaten von Amerika beschrieben. In Deutschland wurden aufgrund verstärkter Untersuchungen seit 2014 Fälle von PED in Mast- und Ferkelerzeugerbetrieben diagnostiziert. Die deutschen Ausbrüche zeichnen sich trotz enger Verwandtschaft der ursächlichen Viren durch starke Variabilität im Krankheitsbild und den Mortalitätsraten aus.

Bislang sind keine Impfstoffe in Europa zugelassen und der Impferfolg hängt wesentlich von der Möglichkeit ab, das Wirtstier Schwein in jungem Alter vor einer Infektion zu schützen.

In den vorliegenden Studien wurden die aktuellen in Deutschland auftretenden Stämme *in vivo* im Sau-Ferkel-Modell charakterisiert. Die Untersuchungen haben gezeigt, dass die deutschen PEDV Varianten unter standardisierten Versuchsbedingungen eine moderate Virulenz mit hoher Morbidität, aber geringer Letalität aufweisen. Des Weiteren wurde der Schutzeffekt maternaler Antikörper gegen eine homologe Belastungsinfektion der Ferkel untersucht. Maternale Antikörper nach oraler präpartaler Infektion der Sau sind in der Lage einen zuverlässigen klinischen Schutz der Ferkel vor einer homologen Belastungsinfektion mit den aktuellen moderat virulenten deutschen Stämmen zu vermitteln und auch die Virusausscheidung drastisch zu reduzieren. Diese Vorinformation ist essentiell zur Etablierung eines belastbaren Muttertierschutzimpfkonzeptes, das die Infektion der Saugferkel verhindert und somit wirtschaftliche Verluste reduziert oder vermeidet.

7 Summary

Porcine epidemic diarrhea (PED), a highly contagious enteric disease of swine, is caused by an eponymous *Alphacoronavirus*, Porcine epidemic diarrhea virus (PEDV), which leads to severe enteritis particularly in suckling piglets. PED was first described 1971 in Great Britain and widely spread in Europe until the 1990s. In the following years case reports declined in Europe whereas the virus became endemic in Asia since the 1980s. Since spring 2013, outbreaks of PED with high mortality rates were reported from the United States of America. With surveillance being reinforced in Germany, several cases of PED were reported since 2014 in fattening and breeding farms. The German outbreaks are characterized by a high variability in disease course and mortality rates despite a detected high genomic relationship between the causative viruses. Up to now, no vaccine is licensed in Europe and vaccination success is largely dependent on the possibility of protecting young pigs.

In the presented studies, the current German PEDV strains were characterized *in vivo* in a suckling piglet model. The investigations have shown that the German PEDV variants are of moderate virulence under standardized experimental conditions with high morbidity, but low lethality. Furthermore, the protective effect of maternally derived antibodies against homologous challenge of piglets was investigated. Maternally derived antibodies obtained by prepartal oral infection of the sow are able to provide reliable protection of piglets against homologous challenge infection with current moderate virulent German strains, and to reduce virus shedding drastically. This information is essential for the establishment of a solid sow vaccination concept which avoids the infection of the piglets and reduces tremendous economic losses.

8 Literaturverzeichnis

- Akimkin, V., Beer, M., Blome, S., Hanke, D., Hoepfer, D., Jenckel, M., Pohlmann, A. (2016). New Chimeric Porcine Coronavirus in Swine Feces, Germany, 2012. *Emerg Infect Dis* 22 (7): 1314-1315.
- Annamalai, T., Saif, L. J., Lu, Z., Jung, K. (2015). Age-dependent variation in innate immune responses to porcine epidemic diarrhea virus infection in suckling versus weaned pigs. *Vet Immunol Immunopathol* 168 (3-4): 193-202.
- Baek, P. S., Choi, H. W., Lee, S., Yoon, I. J., Lee, Y. J., Lee du, S., Lee, S., Lee, C. (2016). Efficacy of an inactivated genotype 2b porcine epidemic diarrhea virus vaccine in neonatal piglets. *Vet Immunol Immunopathol* 174: 45-49.
- Bertasio, C., Giacomini, E., Lazzaro, M., Perulli, S., Papetti, A., Lavazza, A., Lelli, D., Alborali, G., Boniotti, M. B. (2016). Porcine Epidemic Diarrhea Virus Shedding and Antibody Response in Swine Farms: A Longitudinal Study. *Front Microbiol.* doi: 10.3389/fmicb.2016.02009.
- Bjstrom-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. (2016). Porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) detection and antibody response in commercial growing pigs. *BMC Vet Res.* doi: 10.1186/s12917-016-0725-5.
- Bohl, E. H., Gupta, R. K., McCloskey, L. W., Saif, L. (1972). Immunology of transmissible gastroenteritis. *J Am Vet Med Assoc* 160 (4): 543-549.
- Bohl, E. H., Gupta, R. K., Olquin, M. V., Saif, L. J. (1972). Antibody responses in serum, colostrum, and milk of swine after infection or vaccination with transmissible gastroenteritis virus. *Infect Immun* 6 (3): 289-301.
- Boniotti, M. B., Papetti, A., Lavazza, A., Alborali, G., Sozzi, E., Chiapponi, C., Faccini, S., Bonilauri, P., Cordioli, P., Marthaler, D. (2016). Porcine Epidemic Diarrhea Virus and Discovery of a Recombinant Swine Enteric Coronavirus, Italy. *Emerg Infect Dis* 22 (1): 83-87.
- Brandstadter, J. D., Yang, Y. (2011). Natural killer cell responses to viral infection. *J Innate Immun* 3 (3): 274-279.
- Carvajal, A., Lanza, I., Diego, R., Rubio, P., Cármenes, P. (1995). Seroprevalence of porcine epidemic diarrhea virus infection among different types of breeding swine farms in Spain. *Prev Vet Med* 23: 33-40.

- CFSPH (2004). Iowa State University of Science and Technology. Vaccines : Porcine Epidemic Diarrhea. abgerufen: April 2017, http://www.cfsph.iastate.edu/Vaccines/disease_list.php?disease=porcine-epidemic-diarrhea&lang=en.
- Chamley, W. A., Buckmaster, J. M., Cerini, M. E., Cumming, I. A., Goding, J. R., Obst, J. M., Williams, A., Winfield, C. (1973). Changes in the levels of progesterone, corticosteroids, estrone, estradiol 17 β , luteinizing hormone, and prolactin in the peripheral plasma of the ewe during late pregnancy and at parturition. *Biol Reprod* 9 (1): 30-35.
- Chattha, K. S., Roth, J. A., Saif, L. J. (2015). Strategies for design and application of enteric viral vaccines. *Annu Rev Anim Biosci* 3: 375-395.
- Chen, Q., Thomas, J. T., Giménez-Lirola, L. G., Hardham, J. M., Gao, Q., Gerber, P. F., Opriessnig, T., Zheng, Y., Li, G., Gauger, P. C., Madson, D. M., Magstadt, D. R., Zhang, J. (2016). Evaluation of serological cross-reactivity and cross-neutralization between the United States porcine epidemic diarrhea virus prototype and S-INDEL-variant strains. *BMC Vet Res*. doi: 10.1186/s12917-016-0697-5 (70).
- Crawford, K., Lager, K., Miller, L., Opriessnig, T., Gerber, P., Hesse, R. (2015). Evaluation of porcine epidemic diarrhea virus transmission and the immune response in growing pigs. *Vet Res*. doi: 10.1186/s13567-015-0180-5.
- Curtis, J., Bourne, F. J. (1971). Immunoglobulin quantitation in sow serum, colostrum and milk and the serum of young pigs. *Biochim Biophys Acta* 236 (1): 319-332.
- Dastjerdi, A., Carr, J., Ellis, R. J., Steinbach, F., Williamson, S. (2015). Porcine Epidemic Diarrhea Virus among Farmed Pigs, Ukraine. *Emerg Infect Dis* 21 (12): 2235-2237.
- Ding, Z., Fang, L., Jing, H., Zeng, S., Wang, D., Liu, L., Zhang, H., Luo, R., Chen, H., Xiao, S. (2014). Porcine epidemic diarrhea virus nucleocapsid protein antagonizes beta interferon production by sequestering the interaction between IRF3 and TBK1. *J Virol* 88 (16): 8936-8945.
- EFSA (2016). Collection and review of updated scientific epidemiological data on porcine epidemic diarrhoea. abgerufen: Mai 2017, <https://www.efsa.europa.eu/de/efsajournal/pub/4375>.

- Evans, P. A., Newby, T. J., Stokes, C. R., Bourne, F. J. (1982). A study of cells in the mammary secretions of sows. *Vet Immunol Immunopathol* 3 (5): 515-527.
- Gerber, P. F., Gong, Q., Huang, Y. W., Wang, C., Holtkamp, D., Opriessnig, T. (2014). Detection of antibodies against porcine epidemic diarrhea virus in serum and colostrum by indirect ELISA. *Vet J* 202 (1): 33-36.
- Gerber, P. F., Opriessnig, T. (2015). Detection of immunoglobulin (Ig) A antibodies against porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) in fecal and serum samples. *MethodsX* 2: 368-373.
- Gerber, P. F., Xiao, C.-T., Lager, K., Crawford, K., Kulshreshtha, V., Cao, D., Meng, X.-J., Opriessnig, T. (2016). 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*. doi: 10.1186/s13567-016-0402-5.
- Gerdts, V., Zakhartchouk, A. (2016). Vaccines for porcine epidemic diarrhea virus and other swine coronaviruses. *Vet Microbiol* 206: 45-51.
- Goede, D., Murtaugh, M. P., Nerem, J., Yeske, P., Rossow, K., Morrison, R. (2015). Previous infection of sows with a "mild" strain of porcine epidemic diarrhea virus confers protection against infection with a "severe" strain. *Vet Microbiol* 176 (1-2): 161-164.
- Grasland, B., Bigault, L., Bernard, C., Quenault, H., Toulouse, O., Fablet, C., Rose, N., Touzain, F., Blanchard, Y. (2015). Complete genome sequence of a porcine epidemic diarrhea s gene indel strain isolated in france in december 2014. *Genome Announc*. doi: 10.1128/genomeA.00535-15.
- Hammer, D. K., Mossmann, H. (1978). The importance of membrane receptors in the transfer of immunoglobulins from plasma to the colostrum. *Ann Rech Vet* 9 (2): 229-234.
- Hanke, D., Jenckel, M., Petrov, A., Ritzmann, M., Stadler, J., Akimkin, V., Blome, S., Pohlmann, A., Schirrmeyer, H., Beer, M., Hoepfer, D. (2015). Comparison of porcine epidemic diarrhea viruses from Germany and the United States, 2014. *Emerg Infect Dis* 21 (3): 493-496.

- Hanke, D., Pohlmann, A., Sauter-Louis, C., Hoepfer, D., Stadler, J., Ritzmann, M., Steinrigl, A., Schwarz, B. A., Akimkin, V., Fux, R., Blome, S., Beer, M. (2017). Porcine Epidemic Diarrhea in Europe: In-Detail Analyses of Disease Dynamics and Molecular Epidemiology. *Viruses*. doi: 10.3390/v9070177.
- Jung, K., Annamalai, T., Lu, Z., Saif, L. J. (2015). Comparative pathogenesis of US porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) strain PC21A in conventional 9-day-old nursing piglets vs. 26-day-old weaned pigs. *Vet Microbiol* 178 (1-2): 31-40.
- Jung, K., Saif, L. J. (2015). Porcine epidemic diarrhea virus infection: Etiology, epidemiology, pathogenesis and immunoprophylaxis. *Vet J* 204 (2): 134-143.
- Killian, D. B., Garverick, H. A., Day, B. N. (1973). Peripheral Plasma Progesterone and Corticoid Levels at Parturition in the Sow1. *J Anim Sci* 37 (6): 1371-1375.
- Langel, S. N., Paim, F. C., Lager, K. M., Vlasova, A. N., Saif, L. J. (2016). Lactogenic Immunity and Vaccines for Porcine Epidemic Diarrhea Virus (PEDV): Historical And Current Concepts. *Virus Res* 226: 93-107.
- Lanza, I., Shoup, D. I., Saif, L. J. (1995). Lactogenic immunity and milk antibody isotypes to transmissible gastroenteritis virus in sows exposed to porcine respiratory coronavirus during pregnancy. *Am J Vet Res* 56 (6): 739-748.
- Lee, D.-K., Se-Yeoun Cha and Changhee Lee (2011). The N-terminal Region of the Porcine Epidemic Diarrhea Virus Spike Protein is Important for the Receptor Binding. *Korean J Microbiol Biotechnol* 39: 140-145.
- Li, W., Li, H., Liu, Y., Pan, Y., Deng, F., Song, Y., Tang, X., He, Q. (2012). New variants of porcine epidemic diarrhea virus, China, 2011. *Emerg Infect Dis* 18 (8): 1350-1353.
- Lin, C. M., Annamalai, T., Liu, X., Gao, X., Lu, Z., El-Tholoth, M., Hu, H., Saif, L. J., Wang, Q. (2015). Experimental infection of a US spike-insertion deletion porcine epidemic diarrhea virus in conventional nursing piglets and cross-protection to the original US PEDV infection. *Vet Res*. doi: 10.1186/s13567-015-0278-9.
- Makadiya, N., Brownlie, R., van den Hurk, J., Berube, N., Allan, B., Gerds, V., Zakhartchouk, A. (2016). S1 domain of the porcine epidemic diarrhea virus spike protein as a vaccine antigen. *Virology*. doi: 10.1186/s12985-016-0512-8.

- Martelli, P., Lavazza, A., Nigrelli, A. D., Merialdi, G., Alborali, L. G., Pensaert, M. B. (2008). Epidemic of diarrhoea caused by porcine epidemic diarrhoea virus in Italy. *Vet Rec* 162 (10): 307-310.
- Meng, F., Ren, Y., Suo, S., Sun, X., Li, X., Li, P., Yang, W., Li, G., Li, L., Schwegmann-Wessels, C., Herrler, G., Ren, X. (2013). Evaluation on the Efficacy and Immunogenicity of Recombinant DNA Plasmids Expressing Spike Genes from Porcine Transmissible Gastroenteritis Virus and Porcine Epidemic Diarrhea Virus. *Plos One* 8 (3): 1-14.
- Mesquita, J. R., Hakze-van der Honing, R., Almeida, A., Lourenco, M., van der Poel, W. H., Nascimento, M. S. (2015). Outbreak of Porcine Epidemic Diarrhea Virus in Portugal, 2015. *Transbound Emerg Dis* 62 (6): 586-588.
- Moon, H. W., Norman, J. O., Lambert, G. (1973). Age dependent resistance to transmissible gastroenteritis of swine (TGE). I. Clinical signs and some mucosal dimensions in small intestine. *Can J Comp Med* 37 (2): 157-166.
- Ouyang, K., Shyu, D. L., Dhakal, S., Hiremath, J., Binjawadagi, B., Lakshmanappa, Y. S., Guo, R., Ransburgh, R., Bondra, K. M., Gauger, P., Zhang, J., Specht, T., Gilbertie, A., Minton, W., Fang, Y., Renukaradhya, G. J. (2015). Evaluation of humoral immune status in porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) infected sows under field conditions. *Vet Res*. doi: 10.1186/s13567-015-0285-x.
- Pan, Y., Tian, X., Li, W., Zhou, Q., Wang, D., Bi, Y., Chen, F., Song, Y. (2012). Isolation and characterization of a variant porcine epidemic diarrhea virus in China. *Virol J* 9 (1): 1-9.
- Park, S., Sestak, K., Hodgins, D. C., Shoup, D. I., Ward, L. A., Jackwood, D. J., Saif, L. J. (1998). Immune response of sows vaccinated with attenuated transmissible gastroenteritis virus (TGEV) and recombinant TGEV spike protein vaccines and protection of their suckling pigs against virulent TGEV challenge exposure. *Am J Vet Res* 59 (8): 1002-1008.
- Salmon, H., Berri, M., Gerdtz, V., Meurens, F. (2009). Humoral and cellular factors of maternal immunity in swine. *Dev Comp Immunol* 33 (3): 384-393.
- Schnulle, P. M., Hurley, W. L. (2003). Sequence and expression of the FcRn in the porcine mammary gland. *Vet Immunol Immunopathol* 91 (3-4): 227-231.

- Schwartz, T. J., Rademacher, C. J. (2016). Evaluation of the effects of PEDv vaccine on PEDv naïve and previously PEDv-exposed sows in a challenge model comparing immune response and preweaning mortality. Proceedings of the 47th AASV Annual Meeting, New Orleans Louisiana 2016, 36–40.
- Šinkora, M., Butler, J. E. (2009). The ontogeny of the porcine immune system. *Dev Comp Immunol* 33 (3): 273-283.
- Song, D., Moon, H., Kang, B. (2015). Porcine epidemic diarrhea: a review of current epidemiology and available vaccines. *Clin Exp Vaccine Res* 4 (2): 166-176.
- Song, D., Park, B. (2012). Porcine epidemic diarrhoea virus: a comprehensive review of molecular epidemiology, diagnosis, and vaccines. *Virus Genes* 44 (2): 167-175.
- Song, D. S., Oh, J. S., Kang, B. K., Yang, J. S., Moon, H. J., Yoo, H. S., Jang, Y. S., Park, B. K. (2007). Oral efficacy of Vero cell attenuated porcine epidemic diarrhea virus DR13 strain. *Res Vet Sci* 82 (1): 134-140.
- Srijangwad, A., Stott, C. J., Temeeyasen, G., Senasuthum, R., Chongcharoen, W., Tantituvanont, A., Nilubol, D. (2017). Immune response of gilts to single and double infection with porcine epidemic diarrhea virus. *Arch Virol* 162 (7): 2029-2034.
- Stadler, J., Zoels, S., Fux, R., Hanke, D., Pohlmann, A., Blome, S., Weissenbock, H., Weissenbacher-Lang, C., Ritzmann, M., Ladinig, A. (2015). Emergence of porcine epidemic diarrhea virus in southern Germany. *BMC Vet Res*. doi: 10.1186/s12917-015-0454-1.
- Steinrigl, A., Fernandez, S. R., Stoiber, F., Pikalo, J., Sattler, T., Schmoll, F. (2015). First detection, clinical presentation and phylogenetic characterization of Porcine epidemic diarrhea virus in Austria. *BMC Vet Res* 11 (310).
- Stevenson, G. W., Hoang, H., Schwartz, K. J., Burrough, E. R., Sun, D., Madson, D., Cooper, V. L., Pillatzki, A., Gauger, P., Schmitt, B. J., Koster, L. G., Killian, M. L., Yoon, K. J. (2013). Emergence of Porcine epidemic diarrhea virus in the United States: clinical signs, lesions, and viral genomic sequences. *J Vet Diagn Invest* 25 (5): 649-654.

- Sun, R. Q., Cai, R. J., Chen, Y. Q., Liang, P. S., Chen, D. K., Song, C. X. (2012). Outbreak of porcine epidemic diarrhea in suckling piglets, China. *Emerg Infect Dis* 18 (1): 161-163.
- Theuns, S., Conceicao-Neto, N., Christiaens, I., Zeller, M., Desmarests, L. M., Roukaerts, I. D., Acar, D. D., Heylen, E., Matthijnsens, J., Nauwynck, H. J. (2015). Complete genome sequence of a porcine epidemic diarrhea virus from a novel outbreak in Belgium, January 2015. *Genome Announc.* doi: 10.1128/genomeA.00506-15.
- Thomas, J. T., Chen, Q., Gauger, P. C., Gimenez-Lirola, L. G., Sinha, A., Harmon, K. M., Madson, D. M., Burrough, E. R., Magstadt, D. R., Salzbrenner, H. M., Welch, M. W., Yoon, K. J., Zimmerman, J. J., Zhang, J. (2015). Effect of Porcine Epidemic Diarrhea Virus Infectious Doses on Infection Outcomes in Naive Conventional Neonatal and Weaned Pigs. *Plos One* 10 (10): 1-18.
- Toplak, I., Ipavec, M., Kuhar, U., Kusar, D., Papic, B., Koren, S., Toplak, N. (2016). Complete Genome Sequence of the Porcine Epidemic Diarrhea Virus Strain SLO/JH-11/2015. *Genome Announc.* doi: 10.1128/genomeA.01725-15.
- Vlasova, A. N., Marthaler, D., Wang, Q., Culhane, M. R., Rossow, K. D., Rovira, A., Collins, J., Saif, L. J. (2014). Distinct characteristics and complex evolution of PEDV strains, North America, May 2013-February 2014. *Emerg Infect Dis* 20 (10): 1620-1628.
- Wang, L., Byrum, B., Zhang, Y. (2014). New variant of porcine epidemic diarrhea virus, United States, 2014. *Emerg Infect Dis* 20 (5): 917-919.
- Watson, D. L. (1980). Immunological functions of the mammary gland and its secretion--comparative review. *Aust J Biol Sci* 33 (4): 403-422.
- Wesley, R. D., Lager, K. M. (2003). Increased litter survival rates, reduced clinical illness and better lactogenic immunity against TGEV in gilts that were primed as neonates with porcine respiratory coronavirus (PRCV). *Vet Microbiol* 95 (3): 175-186.
- Zhang, Q., Shi, K., Yoo, D. (2016). Suppression of type I interferon production by porcine epidemic diarrhea virus and degradation of CREB-binding protein by nsp1. *Virology* 489: 252-268.

Zhang, Q., Yoo, D. (2016). Immune evasion of porcine enteric coronaviruses and viral modulation of antiviral innate signaling. *Virus Res* 226: 128-141.

9 Abkürzungsverzeichnis

BHZZ	Bundeshybridzuchtprogramm
DNA	desoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure
dpi	days post inoculation, Tage nach der Inokulation
E.coli	<i>Escherichia coli</i>
ED	epidemic diarrhea, Epidemische Diarrhoe
ELISA	Enzym-Linked-Immunosobent-Assay
EU	European Union, Europäische Union
FLI	Friedrich-Loeffler-Institut
G1	genogroup 1, Genogruppe 1
G2	genogroup 1, Genogruppe 2
hpi	hours post inoculation, Stunden nach der Inokulation
Ig	immunoglobulin, Immunglobulin
LALLF	Landesamt für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei
MDA	maternally derived antibodies, Maternal übertragene Antikörper
MV	Mecklenburg-Western Pomerania, Mecklenburg-Vorpommern
NGS	next-generation-sequencing
NK	natural killer cell, natürliche Killerzelle
NON-INDEL	virus strain without insertion and deletion mutations, Virusstamm ohne Insertions- und Deletionsmutationen
Nsp	non-structural protein, Nicht-Strukturprotein
ORF	open-reading frame, offener Leserahmen
PBS	phosphate-buffered saline, Phosphat gepufferte Salzlösung
PED	porcine epidemic diarrhea, Porzine epidemische Diarrhoe

9 Abkürzungsverzeichnis

PEDV	porcine epidemic diarrhea virus, Porzine epidemische Diarrhoe Virus
PEV	porcine enterovirus, Porzines Enterovirus
PDCoV	porcine delta-coronavirus, Porzines Delta-Coronavirus
PRCV	porcine respiratory coronavirus, Porzines respiratorisches Coronavirus
RNA	ribonucleic acid, Ribonukleinsäure
RT-PCR	reverse-transcriptase-polymerase-chain reaction, Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
SeCoV	swine enteric coronavirus, enterisches Schweinecoronavirus
S-INDEL	virus strain with insertion and deletion mutations, Virusstamm mit Insertions- und Deletionsmutationen
S. Typhisuis	<i>Salmonella</i> Typhisuis
S. Thyphimurium	<i>Salmonella</i> Thyphimurium
TCID ₅₀	tissue culture infectious dose ₅₀ , Kulturinfektiöse Dosis ₅₀
TGEV	transmissible gastroenteritis virus, Transmissible Gastroenteritis Virus
UK	United Kingdom, Vereinigtes Königreich
US	United States, Vereinigte Staaten
USA	United States of America, Vereinigte Staaten von Amerika

10 Danksagung

Allen voran möchte ich Prof. Dr. Sutter und der Gutachterin für die Beurteilung dieser Arbeit danken.

Vielen Dank auch an meinen Mentor PD Dr. Martin Beer für die Gelegenheit an seinem Institut an meiner Promotion zu arbeiten. Danke für das geduldige Lesen meiner Manuskripte und die vielen konstruktiven Kommentare zu meiner Arbeit!

Mein herzlichster Dank gilt PD Dr. Sandra Blome. Sie hat mir immer mit Rat und Tat zur Seite gestanden und mich geduldig in die Forschungsarbeit eingeführt. Auch dir Sandra vielen Dank für das unermüdliche Korrigieren meiner Manuskripte, deine Ratschläge in allen Fragen rund um das Projekt und deine Unterstützung bei der Fertigstellung dieser Arbeit! Vielen lieben Dank auch für die schönen Ausflüge in und um Greifswald, Stralsund und Rügen!

Ferner möchte ich mich ganz besonders bei Dr. Charlotte Schröder bedanken. Ohne ihre unermüdliche Hilfe im Stall wären diese Versuche nur schwer durchführbar gewesen. Mein Dank geht gleichermaßen an Svenja Mamerow, die mir bei vielen Arbeiten während und nach der Geburt meiner Ferkel zur Seite gestanden hat.

Danke auch an Bärbel Hammerschmidt für das geduldige Beantworten vieler organisatorischer Fragen rund um die Tiere und die Mithilfe im Stall wann immer ich sie brauchte.

Ganz, ganz lieben Dank an alle Kollegen aus dem ASP/KSP Referenzlabor. Ihr wart mir eine große Hilfe und ich konnte immer auf euch zählen, egal ob es um Etiketten kleben, um ausgedehnte Probennahmen in der Patho oder um „wissenschaftliche Diskussionen“ bei einem Bierchen am Ryck ging! Ulrike Kleinert., Ulrike Wilhelm, Dr. Carolin Dräger, Ph.D. Jolene Carlson, Laura Zani und Julia Henke, vielen Dank für die schöne Zeit!

Großer Dank geht an das Labor Wernike. Danke an Dr. Kerstin Wernike, Bianka Hillmann und Alrik-Markis Kunisch für das Bereitstellen eines „Labor-Asyls“ außerhalb des Hochsicherheitsbereiches der 48 während meiner Tierversuche. Es war schön bei euch!

Vielen Dank auch an meine Kollegen aus der Immunologie, insbesondere Dr. Ulrike Blohm, Steffi Knöfel und Dr. Theresa Schwaiger für die unermüdliche Arbeit am FACS, auch wenn es nicht immer möglich war, die Proben gleich morgens um 8 Uhr abzuliefern!

Großer Dank geht auch nach Kanada an Ph.D. Aruna Ambagala für die schnelle serologische Untersuchung meiner Milchproben!

Besten Dank auch an Boehringer Ingelheim für die Projektfinanzierung und die regen Diskussionen bezüglich des Studiendesigns.

Außerdem geht mein großer Dank an das Labor Höper für die Sequenzierung meiner PEDV-Stämme und das Auswerten der Daten.

Besonders bedanken möchte ich mich noch bei allen Tierpflegern und Sektionshelfern, die mir bei meinen Tierversuchen die Arbeit sehr erleichtert haben und allzeit bereit waren mich auch zu eher unüblichen Arbeitszeiten zu unterstützen.

Und nicht zuletzt:

Vielen Dank an meine Schwester Irene, meine Vater und alle Freunde für eure immerwährende Unterstützung. Ohne euch wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen!