



DOI 10.2376/1439-0299-2022-15

Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit, Institut für veterinärmedizinische Untersuchungen, Mödling, Österreich<sup>1</sup>;  
Universität Leipzig, Großtierklinik, Leipzig, Deutschland<sup>2</sup>

Peer-reviewed | Eingegangen: 28.07.2022 | Angenommen: 22.03.2023 | Veröffentlicht: 13.04.2023

## Nachweis und Quantifizierung von PCV-3 in österreichischen Schweinen mittels duplex Real-Time PCR

Martina Mayrhofer<sup>1</sup>, Tatjana Sattler<sup>1,2</sup>, Adi Steinrigl<sup>1</sup>

Korrespondenzadresse: adi.steinrigl@ages.at

**Zusammenfassung** Das porcine Circovirus 3 (PCV-3) ist ein zirkuläres DNA-Virus, welches im Jahr 2015 in den USA erstmals in Schweinen nachgewiesen wurde. Es gehört gemeinsam mit den porcinen Circoviren 1, 2 und 4 zur Familie Circoviridae. PCV-3 ist global verbreitet und wurde in diversen europäischen, asiatischen und amerikanischen Ländern nachgewiesen. Die Pathogenität des Virus wird bislang kontrovers diskutiert. In der vorliegenden Arbeit wurde eine bereits publizierte PCV-3 Real-Time PCR-Methode durch Einbeziehung eines parallelen Tests zum Nachweis einer endogenen Kontrolle an die Erfordernisse der klinischen Diagnostik angepasst (PCV-3/ $\beta$ -Aktin duplex Real-Time PCR) und validiert. Mit dieser Methode wurden in der Folge Proben österreichischer Schweine auf das Vorkommen von PCV-3-DNA getestet.

Eine sensitive (Detektionslimit: 25 Kopien/PCR) und spezifische duplex Real-Time PCR zur Detektion von PCV-3 und  $\beta$ -Aktin als endogene Kontrolle wurde etabliert. Anschließend wurden 27 Seren von gesunden Ebern sowie 30 Seren und Organpools von 119 kranken Schweinen verschiedenen Alters und Organpools von 41 Aborten auf PCV-3 getestet und die positiven Proben anschließend quantifiziert. Dabei wurden 15,4 % der Seren gesunder Eber, 6,7 % der Seren sowie 12,6 % der Organpools kranker Schweine und 9,8 % der Aborte positiv auf PCV-3 getestet. Die Quantifizierung der Proben gab mit  $9,1 \times 10^8$  Kopien/ml die höchste Viruslast in einer Abortprobe, sämtliche positiv getesteten Seren blieben unterhalb des Quantifizierungslimits von 250 Kopien/PCR.

**Schlüsselwörter** Porzines Circovirus 3, Validierung, klinische Proben, Quantifizierung

### *Detection and quantification of PCV-3 in Austrian pigs using duplex Real-Time PCR*

**Summary** Porcine circovirus 3 (PCV-3) is a circular DNA-Virus, which was first discovered in swine in the USA in 2015. It belongs to the family Circoviridae, together with porcine circovirus 1, 2 and 4. PCV-3 is distributed globally and has been detected in several European, Asian and American countries. The pathogenicity of this virus is still controversial. In this study, a published PCV-3 real-time PCR method was improved by inclusion of a parallel endogenous control assay, in order to be better suited to testing clinical samples (PCV-3/ $\beta$ -Actin duplex Real-Time PCR), and validated. Using this test, clinical samples from Austrian pigs were subsequently screened for the presence of PCV-3 DNA.

A sensitive (limit of detection: 25 copies/PCR) and specific duplex real-time PCR for the detection of PCV-3 and  $\beta$ -Actin as endogenous control was established. Afterwards, 27 sera from healthy boars, as well as 30 sera and 119 tissue pools from sick pigs of different ages and 41 tissue pools from aborted pig fetuses were tested for PCV-3.

Finally, 15.4 % of sera from healthy pigs, 6.7 % of sera and 12.6 % of tissue pools from sick pigs as well as 9.8 % of aborted fetuses were tested positive for PCV-3. The highest viral load ( $9.1 \times 10^8$  copies/ml) was observed in an aborted fetus, while all PCV-3 positive sera remained below the limit of quantification (250 copies/PCR).

**Keywords** porcine circovirus 3, validation, clinical samples, quantification

### Einleitung

Porzine Circoviren sind einzelsträngige, zirkuläre DNA-Viren von Schweinen, die zur Familie Circoviridae, Genus *Circovirus* gezählt werden. Das porcine Circovirus 1 (PCV-

1) wurde 1974 erstmals in kontaminierten Schweinenierenzellkulturen nachgewiesen. PCV-1 ist weit verbreitet und kann mit keinem Krankheitsbild assoziiert werden (Tischer et al. 1982). PCV-2 hingegen ist ein pathogenes Schweinevirus, welches unter anderem mit dem Post-

Weaning Multisystemic Wasting Syndrome (PMWS) und dem Porcine Dermatitis und Nephropathy Syndrome (PDNS) in Verbindung gebracht wird. Jedoch kann für diese Krankheiten kein monokausaler Zusammenhang mit PCV-2 hergestellt werden, vielmehr handelt es sich um ein multifaktorielles Geschehen. PMWS-erkrankte Schweine wachsen kaum, kümmern und sind anorektisch. PDNS führt bei Schweinen zu epidermalen Nekrosen, petechialen Hautblutungen sowie Entzündungen der Kapillaren, Arteriolen und Venolen (Segalés 2012).

Im Jahr 2015 wurde ein bislang unbekanntes Circovirus, PCV-3, von zwei unabhängigen Forscherteams in den USA entdeckt. In beiden Fällen zeigten die Tiere klinische Symptome wie PDNS und kardiovaskuläre Entzündungen (Palinski et al. 2016, Phan et al. 2016). Seitdem wurde PCV-3 in diversen europäischen, asiatischen und amerikanischen Ländern, wie Deutschland, Spanien, Ungarn, Polen, China, Korea, USA und Brasilien detektiert. Auch in diesen Studien zeigten die Tiere Symptome wie gastrointestinale, neurologische, respiratorische, reproduktive und systemische Probleme (Palinski et al. 2016, Stadejek et al. 2017, Fux et al. 2018, Kim et al. 2018a, Klaumann et al. 2018a, Shen et al. 2018, Tochetto et al. 2018, Deim et al. 2019).

In anderen Studien wurde PCV-3 jedoch auch in klinisch unauffälligen Schweinen nachgewiesen (Zheng et al. 2017, Zou et al. 2018, Saporiti et al. 2020). Studien zur Pathogenität von PCV-3 sind auch durch die Tatsache eingeschränkt, dass das Virus bisher nicht in Reinkultur isoliert werden konnte und entsprechende Infektionsversuche daher nicht möglich sind (Klaumann et al. 2018b). Das trifft ebenso auf das jüngst entdeckte PCV-4 zu, dessen Vorkommen bisher nur in Asien beschrieben wurde (Wang et al. 2022).

Trotz der bisher erfolgten Nachweise von PCV-3 in unmittelbaren Nachbarländern und der Hinweise zur Pathogenität dieses Virus gibt es bisher nur vereinzelt Erkenntnisse zum Vorkommen dieses Virus in Österreich (Eddicks et al. 2022).

Das erste Ziel dieser Arbeit war es, eine geeignete Real-Time PCR-Methode zur Detektion von PCV-3 zu validieren und anschließend Serum und Organproben von Hausschweinen aus Österreich auf PCV-3 zu testen.

Nach sorgfältiger Analyse der veröffentlichten PCR-Methoden erschien als Grundlage die von Palinski et al. (2016) publizierte PCV-3 Real-Time PCR am vielversprechendsten. Diese wurde zu einer duplex Real-Time PCR-Methode zur parallelen Detektion von PCV-3 und  $\beta$ -Aktin als endogene Kontrolle weiterentwickelt. Anschließend wurden die Seren und Organe von gesunden Ebern und kranken bzw. mit anderen Erregern infizierten Schweinen auf das Vorhandensein von PCV-3-DNA getestet und deren Viruslast mittels absoluter Quantifizierung erhoben.

## Material und Methoden

### Etablierung der PCV-3/ $\beta$ -Aktin duplex Real-Time PCR

#### Auswahl der verwendeten Primer und Sonden

Die Primer PCV-3-F (5'-AGT GCT CCC CATTGA ACG-3') und PCV-3-R (5'-ACA CAG CCG TTA CTT CAC-3') wurden direkt von Palinski et al. (2016) übernommen,

wohingegen die Sonde PCV-3-FAM (5'-FAM-ACC CCA TGG CTC AAC ACA TAT GAC C-BHQ1-3') von Fux et al. (2018) übernommen wurde. Primer und Sonde sind gegen eine 112 bp Region des Cap-Gens gerichtet und wurden in einigen Studien bereits erfolgreich zur PCV-3-Detektion eingesetzt (Stadejek et al. 2017, Zhai et al. 2017, Hayashi et al. 2018, Kim et al. 2018b, Li et al. 2018, Shen et al. 2018). Primer und Sondensequenzen wurden mit 267 PCV-3-Genomsequenzen aus der GenBank (Download: 22.01.2019) verglichen. Dabei gab es im Bindungsbereich des Forward-Primers fünf Sequenzen und im Bereich des Reverse-Primers acht Sequenzen mit je einem Mismatch zur Primersequenz. In zwei Fällen waren die Mismatches im Reverse-Primer Bereich am 3'-Ende des Primers angesiedelt. Im Bindungsbereich der Sonde gab es zwölf Sequenzen mit einem Mismatch und zwei Sequenzen mit mehr als zwei Mismatches. Alle anderen Sequenzen wiesen 100% Identität zu den Primer- bzw. Sondensequenzen auf.

Für den Nachweis des zellulären  $\beta$ -Aktin Gens wurden die Primer  $\beta$ -Aktin-1030-F (5'-AGC GCA AGT ACT CCG TGT G-3'),  $\beta$ -Aktin-1135-R (5'-CGG ACT CAT CGT ACT CCT GCT T-3') und die Sonde  $\beta$ -Aktin-1081-HEX (5'-HEX-TCG CTG TCC ACC TTC CAG CAG ATG T-BHQ1-3') ausgewählt (Toussaint et al. 2007).

#### Optimierung der PCV-3 singleplex und PCV-3/ $\beta$ -Aktin duplex Real-Time PCR

Zur Bestimmung von Reaktionseffizienz, dynamischem Bereich und Nachweisgrenze, sowie als Positivkontrolle für die weiteren Tests wurde eine 155 Nukleotide lange, synthetische einzelsträngige DNA synthetisiert (Eurofins Genomics, Ebersberg, Deutschland), deren Sequenz den Nukleotiden 1417 bis 1571 des PCV-3 Stammes 29160 (USA, 2015) entspricht (GenBank-Zugangsnummer: NC\_031753). Die Molarität C der Positivkontrolle wurde anhand der für das Fragment errechneten Molekülmasse (unter Annahme einer Molekülmasse pro Nukleotid von 330 g/Mol bei einzelsträngiger DNA) und der vom Hersteller angegebenen Konzentration der synthetischen DNA (in g/l) in Microsoft Excel 2016 berechnet:

$$c_{\text{Positivkontrolle (M)}} = \frac{\text{DNA-Konzentration (g/l)}}{\text{Molekülmasse} \left( \frac{\text{g}}{\text{Mol}} \right)}$$

Die Anzahl an PCV-3 DNA-Kopien in der Positivkontrolle errechnete sich dann aus C und der konstanten Anzahl an Molekülen/Mol (Avogadro-Konstante) wie folgt:

$$\frac{\text{Anzahl Kopien}}{l} = c_{\text{Positivkontrolle (M)}} \times (6,02 \times 10^{23})$$

Mithilfe dieser synthetischen Positivkontrolle wurde eine zehnfache geometrische Verdünnungsreihe von  $10^8$  bis  $10^{-2}$  Kopien/ $\mu$ l in 30 ng/ $\mu$ l Hefe tRNA (Invitrogen-Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) hergestellt, die zur Optimierung der PCV-3 singleplex Real-Time PCR verwendet wurde. Dabei wurde zunächst der Denaturierungsschritt verkürzt, dann die optimale Annealing-/Extensionstemperatur anhand einer Gradienten-PCR in acht unterschiedlichen Abstufungen von 63,6 bis 53,6 °C bestimmt und anschließend die Konzentration von Forward- und Reverse-Primer durch gegenseitige Titration von jeweils 0,2  $\mu$ M, 0,4  $\mu$ M, 0,6  $\mu$ M und 0,8  $\mu$ M pro

Primer optimiert. Die Konzentration der PCV-3-Sonde betrug dabei stets 0,2 µM.

Um den Einfluss von Schweine-Nukleinsäure auf die PCV-3 Detektion alleine und in Kombination mit einer parallelen β-Aktin-Detektion zu untersuchen (PCV-3/β-Aktin duplex Real-Time PCR), wurde im nächsten Schritt eine Verdünnungsreihe der PCV-3 Positivkontrolle ( $10^8$  bis  $10^{-2}$  Kopien/µl) in gepoolten Nukleinsäureextrakten von Schweineorganen hergestellt, welche zuvor negativ auf PCV-3 getestet worden waren. Diese Verdünnungsreihe wurde unter drei unterschiedlichen Bedingungen angesetzt: einmal ohne parallele β-Aktin-Detektion und zweimal mit β-Aktin-Detektion (0,2 µM pro Primer, bzw. 0,1 µM Sonde), wobei eine PCV-3 Primerkonzentration von 0,8 µM mit einer PCV-3 Primerkonzentration von 0,4 µM je Primer verglichen wurde. Die Konzentration der PCV-3-Sonde betrug jeweils 0,2 µM. Diese drei unterschiedlichen Ansätze wurden im Duplikat in einem einzigen Lauf getestet.

#### **Finaler Reaktionsansatz und analytische Spezifität der PCV-3-β-Aktin duplex Real-Time PCR**

Nach Einbeziehung aller Ergebnisse aus den Optimierungsversuchen ergab sich folgender finaler Reaktionsansatz für die PCV-3/β-Aktin duplex Real-Time PCR: 6,25 µl 2x QuantiTect® Multiplex PCR NoROX Kit (Qiagen, Venlo, Niederlande), 1 µl PCV-3-Primer-Sonden-Mix (0,4 µM Primer und 0,2 µM Sonde), 1 µl β-Aktin-Primer-Sonden-Mix (0,2 µM Primer bzw. 0,1 µM Sonde), 0,25 µl 50-fach ROX™ (1:10 verdünnt) und 1,5 µl steriles Wasser. Anschließend wurden 2,5 µl Template (Nukleinsäureextrakt) dazugegeben, wodurch sich ein finales Volumen von 12,5 µl ergab.

Das PCR-Protokoll beinhaltete folgende Schritte: 15 Minuten initiale Denaturierung bei 95 °C, 15 Sekunden Denaturierung bei 95 °C und Annealing/Extension für 60 Sekunden bei 60 °C für 45 Zyklen.

Die Spezifität der PCV-3/β-Aktin duplex Real-Time PCR wurde mithilfe folgender Viren und Bakterien getestet, die entweder der Familie Circoviridae angehören, oder als Krankheitserreger in Schweinen vorkommen: PCV-1, PCV-2, *Psittacines Beak and Feather Disease Virus*, *Porzines Reproduktives und Respiratorisches Syndrom Virus 1 und 2* (PRRSV), *Afrikanisches Schweinepest Virus* (ASFV), *Klassisches Schweinepest Virus* (CSFV), *Suides Herpesvirus 1* (SuHV-1), *Porzines Parvovirus* (PPV), Schweineinfluenzavirus (SIV), *Leptospira sp.*, *Chlamydia abortus*, *Coxiella burnetii*, *Brucella suis*, Rotavirus, Porzines Enterovirus, Porzines Teschovirus, *Salmonella enteritidis*, Porzines Deltacoronavirus, *Clostridium perfringens* Typ A, *Lawsonia intracellularis*, *Escherichia coli*, *Transmissibles Gastroenteritis Virus*, *Porzines Epidemisches Diarrhoe Virus*, *Brachyspira hyodysenteriae/intermedia linnocens /murdochii /pilosicoli*.

Zur Spezifitätstestung wurden Extrakte von Schweineseren und Organpools herangezogen, welche zuvor mittels PCR positiv auf den jeweiligen Erreger getestet worden waren. Für die Detektion der *Leptospira sp.* wurde das Extrakt einer Bakterienkultur verwendet. Die Proben wurden im Einfachansatz getestet.

#### **Testung von Serum und Organproben mit der PCV-3/β-Aktin duplex Real-Time PCR und anschließende Quantifizierung**

Nukleinsäureextrakte von insgesamt 57 Seren und Organpools von 160 Schweinen wurden zur Testung auf

PCV-3 ausgewählt. Diese Proben waren im Laufe des Jahres 2018 genommen und im Rahmen der Routinediagnostik der AGES GmbH auf diverse Schweineerreger getestet worden.

27 Schweineseren stammten von klinisch gesunden Ebern mehrerer Betriebe, die im Rahmen periodisch stattfindender Gesundheitskontrollen mittels PCR auf PRRSV getestet worden waren, wobei alle Proben negativ waren. Die anderen 30 Seren von neun Ferkeln, drei Jungsauen, zwei Mastschweinen, fünf Zuchtsauen und elf Proben von Schweinen unbekanntes Alters stammten aus mindestens 15 verschiedenen Betrieben. Sie waren alle mittels PCR positiv auf PRRSV und/oder PCV-2 getestet worden und zeigten laut Vorbericht zumeist Symptomatik wie Husten, Fieber, Kümmern oder Aborte.

119 der 160 getesteten Organpools stammten von klinisch kranken Schweinen aus mindestens 62 verschiedenen Betrieben, die im Rahmen eines amtlichen Monitorings mittels PCR auf ASFV und CSFV getestet worden waren. Die Organpools enthielten vor allem Proben von Milz, Niere, Leber, Lunge, Lymphknoten und Tonsillen, fallweise auch von Darm und Herz. Die Tiere zeigten, soweit bekannt, vor allem Symptome wie Kümmern, Durchfall und Atemwegsproblematik wie Husten, aber auch Arthritis oder ZNS-Symptome. Es wurden 77 Ferkel, 21 Mastschweine, eine Zuchtsau und 20 Schweine unbekanntes Alters getestet.

Die restlichen Organpools (zumeist aus Lunge, Milz und Plazenta) wurden von 41 Aborten entnommen, die aus 39 Betrieben stammten und im Rahmen eines weiteren amtlichen Screenings mittels PCR auf vier anzeigepflichtige Schweineerreger (*Brucella sp.*, ASFV, CSFV und SuHV-1) getestet worden waren. Einige dieser Aborte wurden auf Verlangen der Einsender zusätzlich mittels PCR auf PCV-2, PRRSV, *Chlamydia abortus*, PPV, *Leptospira sp.*, SIV und Pestiviren getestet.

Die Nukleinsäureextraktion aller Proben erfolgte automatisch auf dem Kingfisher® Flex (®Thermo Fisher Scientific). Zur Organextraktion wurde der NukleoMag® VET (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland), zur Extraktion von Flüssigkeiten der MagVet® Universal Isolation Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) verwendet. Die extrahierte Nukleinsäure wurde bei einer Ausgangsmenge von 100 µl Serum bzw. 200 µl Organhomogenat in einem Volumen von 80 µl (Serum) bzw. 100 µl (Organhomogenat) eluiert. Die Extrakte wurden zur Kurzzeitlagerung bei -25 °C, zur Langzeitlagerung bei -70 °C gelagert. Als negative Extraktionskontrolle wurde nukleasefreies Wasser verwendet.

Für die anschließende PCR wurde als Negativkontrolle nukleasefreies Wasser, als Positivkontrolle eine Verdünnungsstufe der Positivkontrolle mit einer Konzentration von  $10^3$  Kopien/µl verwendet.

Alle PCV-3-positiven Proben wurden anschließend in einem separaten Real-Time PCR-Lauf quantifiziert. Dazu wurden eine Verdünnungsreihe von  $10^8$  bis  $10^{-2}$  Kopien/µl und die positiven Proben im Doppelansatz gemessen. Nur Proben, bei denen sich das positive PCR-Ergebnis im ersten Lauf in zumindest einem Replikat des Quantifizierungslaufes bestätigen ließ, wurden final als PCV-3 positiv beurteilt.

Zur Bestimmung der Kopienzahl/ml Ausgangsprobe wurde die experimentell erhobene Kopienzahl pro PCR mit dem Faktor 320 (Serum) bzw. 200 (Organhomoge-

nate) multipliziert. Dieser Faktor ergab sich aus dem oben beschriebenen Verhältnis von Proben- und Eluatmenge bei der Extraktion und einem Einsatz von 2,5 µl Eluat in der PCV-3/β-Aktin duplex Real-Time PCR. Als Quantifizierungslimit wurden 250 Kopien/PCR festgelegt (siehe Ergebnisse).

#### **Methodenvergleich mit einem kommerziellen Kit**

Um die Leistung der validierten PCV-3/β-Aktin duplex Real-Time PCR hinsichtlich Qualität und Quantität der Ergebnisse zu überprüfen, wurde diese mit dem Bio-T kit® PCV2 & PCV3 (Biosellal, Dardilly, Frankreich) verglichen. Bei diesem Kit handelt es sich um eine triplex Real-Time PCR, welche PCV-2, PCV-3 und eine exogene Kontrolle parallel detektiert.

Der dafür notwendige Standard, der eine Konzentration von  $10^6$  Kopien/PCR aufwies, wurde ebenfalls von der Firma bereitgestellt und in tRNA verdünnt. Im Anschluss wurden alle PCV-3-positiven Proben sowie vier PCV-3-negative Proben mit dem Kit getestet und mittels einer Verdünnungsreihe von  $10^6$  bis  $10^1$  Kopien/PCR quantifiziert. Alle Proben wurden im Doppelansatz getestet. Positivkontrolle und exogene Kontrolle sind Bestandteile des Testkits. Als Negativkontrolle wurde steriles Wasser verwendet. Reaktionsansatz sowie Temperaturprofil wurden dem Handbuch entsprechend übernommen.

Der Faktor zur Berechnung der Kopienzahl/ml Probe beim Biosellal-Kit betrug für Organe 100 und für Seren 160, da pro Reaktionsansatz 5 µl Eluat verwendet wurde.

#### **Geräte, Software und Datenanalyse**

Für die Analysen wurde entweder das 7500 Fast Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific) oder das CFX96 Touch® Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, Hercules, USA) verwendet.

Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit der 7500 Software v2.3 bzw. der Bio-Rad CFX Maestro-Software. Beim 7500 Fast-Cycler wurde das Fluoreszenzsignal des Reporters gegen 6-Carboxyl-X-Rhodamine (ROX®) normalisiert. Zur Cq-Wert-Bestimmung wurde bei beiden Cyclern die Fit-Point Methode angewendet.

Statistische Kennzahlen wurden sowohl automatisch mithilfe der 7500 Software v2.3 bzw. der Bio-Rad CFX Maestro-Software als auch manuell mithilfe von Excel 2007 und Excel 2016 berechnet.

## **Ergebnisse**

#### **Analytische Sensitivität und Optimierung der PCV-3 singleplex Real-Time PCR**

Die Nachweisgrenze der PCV-3-Singleplex-PCR betrug 10 Kopien/µl bzw. 25 Kopien pro PCR.

In der Gradienten-PCR konnten alle Verdünnungsstufen von  $10^8$  bis  $10^1$  Kopien/µl bei jeder Annealing-/Extensionstemperatur detektiert werden. Die Nachweisgrenze wurde somit durch keine der unterschiedlichen Temperaturen verschlechtert. Da bei einer Annealing-/Extensionstemperatur von 60 °C das stärkste Fluoreszenzsignal detektiert wurde und der Cq-Wert im mittleren Bereich lag, wurde diese Temperatur für alle weiteren Analysen beibehalten.

Die Auswertung der Primer-Matrix zeigte nur geringe Unterschiede zwischen den durchschnittlichen Cq-

Werten, die mit den getesteten Primerkonzentrationen erzielt wurden: diese schwankten zwischen 26,3 und 26,6 (maximale Differenz von 0,3 Zyklen). Die unterschiedlichen Konzentrationen hatten daher kaum Einfluss auf die Amplifikation der PCR. Jedoch wurden bei einer Endkonzentration von 0,2 µM bei Forward- und/oder Reverse-Primer die höchsten Cq-Werte und die schwächsten Fluoreszenzsignale detektiert. Bei den Konzentrationen 0,4, 0,6 und 0,8 µM war keine derartige Tendenz zu erkennen.

#### **Analytische Sensitivität und Spezifität der PCV-3/β-Aktin duplex Real-Time PCR**

Zur Optimierung der PCV-3/β-Aktin duplex Real-Time PCR wurden alle Verdünnungen von  $10^8$  bis  $10^1$  Kopien/µl bei PCV-3 Primerkonzentrationen von 0,4 und 0,8 µM sowie als Vergleich ohne parallele Amplifizierung von β-Aktin getestet. Die in der PCV-3 singleplex PCR beobachtete Nachweisgrenze von  $10^1$  Kopien/µl änderte sich durch die gleichzeitige Detektion von β-Aktin nicht. Bei paralleler Verwendung des β-Aktin Reaktionsmixes wurde β-Aktin in allen Verdünnungsstufen stabil detektiert (Daten nicht gezeigt).

Der Vergleich zwischen den beiden PCV-3 Primerkonzentrationen von 0,4 und 0,8 µM (mit paralleler β-Aktin-Detektion) zeigte, dass bei den einzelnen Verdünnungen von  $10^8$  bis  $10^2$  Kopien/µl kaum Unterschiede zwischen den Cq-Werten und der Stärke des Fluoreszenzsignals vorhanden waren. Die Differenz der durchschnittlichen Cq-Werte lag unter einem Zyklus. Erst bei einer Templatekonzentration von  $10^1$  Kopien/µl wurde eine starke Differenz (2,5 Zyklen) der durchschnittlichen Cq-Werte zwischen den getesteten Primer-Konzentrationen beobachtet, wobei bei einer Primerkonzentration von 0,4 µM die Cq-Werte niedriger und das Fluoreszenzsignal stärker waren als bei 0,8 µM. Daher wurde für die PCV-3/β-Aktin duplex Real-Time PCR eine PCV-3 Primerkonzentration von 0,4 µM festgelegt. Da bei einer PCV-3 Konzentration von  $10^1$  Kopien/µl die Replikat bereits eine Standardabweichung von über 0,5 Cq aufwiesen und die Linearität der Standardkurve nicht länger gegeben war, wurde das Quantifizierungslimit für die duplex Real-Time PCR auf  $10^2$  Kopien/µl (250 Kopien/PCR) festgelegt.

Keiner der im Kapitel „Material und Methoden“ angeführten nicht PCV-3 Erreger wurde im Rahmen des Spezifitätstests von der PCV-3/β-Aktin duplex Real-Time PCR detektiert.

#### **Serum und Organproben**

Von den 27 Seren von klinisch gesunden, PRRSV-negativen Ebern wurden 26 Seren zur Datenanalyse herangezogen. Eine β-Aktin-negative Probe wurde aus der Auswertung ausgeschlossen. Vier der 26 Proben (15,4 %) wurden positiv auf PCV-3 getestet. Die Cq-Werte lagen zwischen 35,6 und 38,3.

Zwei der 30 Seren (6,7 %) von kranken Schweinen waren PCV-3-positiv. Beide waren mittels PCR zuvor positiv auf PRRSV und eine der beiden zusätzlich positiv auf PCV-2 getestet worden. Die Cq-Werte der PCV-3-PCR betragen 37,6 und 38,4. Eine der beiden positiven Proben stammte von einem Ferkel, die zweite von einem Schwein unbekanntes Alters.

15 der 119 Organpools (12,6 %) wurden positiv auf PCV-3 getestet, wobei die Cq-Werte zwischen 22,1 und

44,7 lagen. Dabei waren von 77 Ferkeln zehn PCV-3-positiv (13,0 %), von 21 Mastschweinen waren drei positiv (14,3 %). Zwei positive Proben stammten von Schweinen unbekanntes Alters. Von den PCV-3-positiven Tieren litten zwei an Anämie nach dem Absetzen, fünf hatten Durchfall und/oder kümmerten, ein Tier hatte Fieber und Husten, ein weiteres hatte Arthritis. Die Symptomatik der restlichen sechs Tiere war unbekannt.

Vier der 41 Organpools (9,8 %) von Aborten wurden PCV-3-positiv getestet. Die Cq-Werte reichten von 19,2 bis 38,5. Nur zwei der PCV-3-positiven Aborte waren mit einem anderen Krankheitserreger (PCV-2 bzw. PRRSV) koinfiziert.

In Summe wurden sechs von 56 Seren (10,7 %) und 19 von 160 Organpools bzw. Aborten (11,9 %) positiv auf PCV-3 getestet.

### Quantifizierung

Da alle PCV-3-positiven Seren unterhalb der Quantifizierungsgrenze von 10<sup>2</sup> Kopien/µl (250 Kopien/PCR) lagen, konnte ihre Kopienzahl nicht genau ermittelt werden. Auch bei den PCV-3-positiven Organpools konnten einige Proben aufgrund ihrer hohen Cq-Werte nicht quantifiziert werden. Von den insgesamt 25 PCV-3-positiven Proben waren deshalb nur elf quantifizierbar (44 %). Bei einem Abort sowie zehn der Organpools aus dem ASFV/CSFV-Screening konnten Kopienzahlen von 2,07 × 10<sup>5</sup> bis 9,10 × 10<sup>8</sup> Kopien/ml Probe bestimmt werden (Tab. 1).

**TAB. 1:** PCV-3 Kopienzahl/ml Probe, Symptome sowie Alter/Nutzungs-kategorie der Schweine, in deren Proben eine PCV-3 Quantifizierung mit der PCV-3/β-Aktin duplex Real-Time PCR möglich war

Proben-ID	Kopienzahl/ml Probe	Symptome	Alter/Nutzungs-kategorie
323	9,10E+08	Abort	Fötus
304	9,38E+07	unbekannt	unbekannt
438-1	8,68E+07	unbekannt	Ferkel
254-13	5,88E+07	Arthritis	Mastschwein
1023-1	3,51E+07	Durchfall	Ferkel
179-1	2,71E+07	unbekannt	Ferkel
709-3	1,98E+07	Anämie	Ferkel
709-2	3,05E+06	Anämie	Ferkel
343-4	9,09E+05	Durchfall	Mastschwein
1957-1	6,53E+05	unbekannt	unbekannt
254-16	2,07E+05	Kümmern, Durchfall	Ferkel

**TAB. 2:** Vergleich zwischen der jeweils mit der PCV-3/β-Aktin duplex Real-Time PCR und dem Bio-T kit® PCV2 & PCV3 (Biosellal) ermittelten Viruslast (PCV-3 Kopien/ml Probe) sowie der absoluten (in Kopien/ml) und relativen (%) Differenz zwischen den Viruslasten. Die mit einem \* gekennzeichneten Proben sind Seren.

Proben-ID	Durchschnittliche PCV-3 Kopienzahl/ml (PCV-3-β-Aktin duplex Real-Time PCR)	Durchschnittliche PCV-3 Kopienzahl/ml (Bio-T kit® PCV2 & PCV3)	Absolute Differenz (Kopien/ml Probe)	Relative Differenz (%)
323	9,10E+08	6,51E+07	8,45E+08	7,15
304	9,38E+07	1,06E+07	8,32E+07	11,30
438-1	8,68E+07	2,29E+07	6,39E+07	26,38
254-13	5,88E+07	5,43E+06	5,34E+07	9,23
1023-1	3,51E+07	2,85E+06	3,23E+07	8,12
179-1	2,71E+07	2,89E+06	2,42E+07	10,66
709-3	1,98E+07	1,60E+06	1,82E+07	8,08
709-2	3,05E+06	3,13E+05	2,74E+06	10,26
343-4	9,09E+05	7,24E+04	8,37E+05	7,96
1957-1	6,53E+05	1,51E+05	5,02E+05	23,12
254-16	2,07E+05	7,54E+04	1,32E+05	36,43
2399-1*	Nicht quantifizierbar (<10E+05 Kopien/ml)	3,45E+03	-	-
1042-1*	Nicht quantifizierbar (<10E+05 Kopien/ml)	1,70E+03	-	-
594-1	Nicht quantifizierbar (<10E+05 Kopien/ml)	1,34E+03	-	-
336-1	Nicht quantifizierbar (<10E+05 Kopien/ml)	1,21E+03	-	-

### Methodenvergleich

Alle mit der PCV-3/β-Aktin duplex Real-Time PCR positiv detektierten Proben (n = 25) wurden mit dem kommerziellen Bio-T Kit® PCV2 & PCV3 bestätigt. Ebenso waren die vier zuvor mit der PCV-3-β-Aktin duplex Real-Time PCR negativ getesteten Proben mit dem Bio-T Kit® PCV2 & PCV3 ebenfalls PCV-3-negativ.

Das Quantifizierungslimit des kommerziellen Kits lag bei 10 Kopien/PCR und war damit geringer als das der PCV-3/β-Aktin duplex Real-Time PCR (250 Kopien/PCR). Daher konnten mit dem kommerziellen Kit vier weitere Proben, darunter zwei Seren, quantifiziert werden. Die ermittelte Kopienzahl/ml Probe war bei der PCV-3/β-Aktin duplex Real-Time PCR allerdings deutlich höher (durchschnittlich um einen Faktor von 9,17) als beim kommerziellen Kit (Tab. 2).

### Diskussion

Seit der Entdeckung von PCV-3 wurde dieses in diversen amerikanischen (USA, Kolumbien, Brasilien), europäischen (Deutschland, Spanien, Polen etc.) und asiatischen (China, Japan, Korea etc.) Ländern detektiert (Klaumann et al. 2018b). Zudem wurden bereits einige Methoden zur Detektion des Virus entwickelt. Dazu gehören unter anderem ELISA, singleplex und multiplex Real-Time PCRs, welche Hydrolyse-Sonden oder SYBR® Green verwenden, sowie konventionelle PCRs (Palinski et al. 2016, Chen et al. 2018, Deng et al. 2018, Fux et al. 2018, Li et al. 2018, Zou et al. 2018, Yang et al. 2019).

In dieser Arbeit wurde eine PCV-3-β-Aktin duplex Real-Time PCR zur parallelen Detektion von PCV-3 und β-Aktin als endogene Kontrolle etabliert. Die parallele β-Aktin-Detektion führte zu einer geringen Verschlechterung der PCR-Performance, vor allem der PCR-Effizienz (Daten nicht gezeigt). Jedoch wird dieser Nachteil durch die Tatsache aufgehoben, dass die endogene Kontrolle eine wichtige Rolle bei der Vermeidung falsch negativer Testergebnisse spielt und die Materialkosten durch das duplex Real-Time PCR-Verfahren kaum erhöht wurden.

Unseres Wissens hatte bisher nur eine einzige Studie Proben von österreichischen Schweinen auf PCV-3 untersucht: Eddicks et al. (2022) fanden bei von ihren

Müttern erdrückten Saugferkeln aus insgesamt 16 deutschen und österreichischen Betrieben eine individuelle PCV-3 Positivität von 13%, wobei die österreichischen Betriebe nicht gesondert ausgewiesen wurden. In der hier vorgestellten Untersuchung ausschließlich österreichischer Proben wurden vier von 26 Seren (15,4 %) gesunder Eber, zwei von 30 Seren (6,7 %) PCV-2 bzw. PRRSV infizierter Schweine, 15 von 119 Organpools (12,6 %) von klinisch auffälligen Schweinen und vier von 41 Organpools (9,8 %) von Aborten positiv auf PCV-3 getestet. Es ist jedoch wichtig darauf hinzuweisen, dass im Rahmen dieser Studie keine repräsentative Stichprobe untersucht wurde und die hier berichteten Häufigkeiten somit kaum ein realitätsnahes Abbild der tatsächlichen PCV-3 Prävalenz in Österreich darstellen. Dennoch sind die in unserem Probenmaterial gefundenen Häufigkeiten durchaus vergleichbar mit den Studien von Hayashi et al. (2018) mit 9,6 %, Klaumann et al. (2018a) mit 11,5 % sowie Kim et al. (2018a) mit 12,9 % PCV-3-positiven Proben. In den Untersuchungen von Wen et al. (2018) und Zheng et al. (2017) hingegen wurden wesentlich höhere PCV-3-Prävalenzen ermittelt (38,0 % sowie 59,5 %).

PCV-3 wurde in mehreren Studien bei Schweinen mit respiratorischen, gastrointestinalen, systemischen oder reproduktiven Symptomen detektiert (Zhai et al. 2017, Zheng et al. 2017, Klaumann et al. 2018a). Auch in dieser Arbeit konnte PCV-3 in kranken, aber auch in klinisch gesunden Schweinen nachgewiesen werden. Der Nachweis von PCV-3 im Serum klinisch unauffälliger Schweine wurde ebenfalls von mehreren Autoren beschrieben (Zheng et al. 2017, Saporiti et al. 2020).

Die Viruslast der PCV-3-positiven Proben in der hier vorgestellten Untersuchung war zumeist niedrig. Daher waren nur elf der 25 positiven Proben (44 %), bei denen es sich sämtlich um Organpools handelte, mit der PCV-3/ $\beta$ -Aktin duplex Real-Time PCR seriös quantifizierbar. Diese stammten von klinisch auffälligen Schweinen mit reproduktiven Beschwerden, gastrointestinalen Problemen, Anämie, Arthritis oder unbekanntem Symptomen. Für PCV-2 wird angenommen, dass der Schweregrad von PDNS und PMWS mit der Viruslast korreliert (Olvera et al. 2004). Dies könnte bei PCV-3 auch der Fall sein, wie Fux et al. (2018) und Zhai et al. (2017) bereits andeuteten. Würde in Analogie zu PCV-2 für PCV-3 ebenfalls ein Grenzwert zur klinischen Signifikanz von  $10^7$  Kopien/ml Serum angenommen (Olvera et al. 2004), so wäre dies bei sechs der in dieser Studie untersuchten Schweine der Fall. Derzeit gibt es jedoch noch keinen Konsens hinsichtlich der Aussagekraft einer hohen bzw. niedrigen PCV-3-Viruslast oder davon ableitbare diagnostisch verwendbare Grenzwerte zur Differenzierung einer klinisch manifesten Erkrankung von einer subklinischen Infektion.

Keines der PCV-3-positiven Seren, sowohl von erkrankten als auch von gesunden Schweinen, konnte aufgrund der niedrigen Viruslasten von unter 250 Kopien/PCR, mit der PCV-3- $\beta$ -Aktin duplex Real-Time PCR quantifiziert werden. Eine mögliche Erklärung dafür könnte eine generell niedrigere Viruslast in Seren sein. Auch Fux et al. (2018) und Saporiti et al. (2020) wiesen in ihren Studien auf die niedrige Viruslast in Seren hin. Dabei unterschied sich die Viruslast klinisch gesunder nicht von der kranker Schweine (Saporiti et al. 2020), ein klarer Kontrast zu PCV-2 (Olvera et al. 2004).

PCV-3 wurde von Palinski et al. (2016) erstmals in Aborten auf einer Farm in den USA detektiert. Tochetto et al. (2018) wiesen PCV-3 in Schweinen nach, die zuvor Totgeburten zur Welt gebracht hatten. Auch in dieser Arbeit konnte PCV-3 in Aborten nachgewiesen werden. Während die Viruslast bei drei getesteten Aborten unterhalb des Quantifizierungslimits blieb, wurde bei einem Abort mit  $9,10 \times 10^8$  Kopien/ml die höchste in dieser Studie gemessene Viruslast gemessen. Zudem wurden in dieser Probe mehrere relevante virale und bakterielle Schweineerreger (ASFV, CSFV, SuHV-1, *Brucella suis*, PCV-2, PRRSV, *Chlamydia abortus*, PPV, *Leptospira* sp.) ausgeschlossen.

Eine oft wenig berücksichtigte Quelle von Variabilität bei der Erhebung von quantitativen PCR Daten kann auch die Auswahl der PCR-Methodik mit sich bringen: ein Vergleich zwischen der PCV-3/ $\beta$ -Aktin duplex Real-Time PCR mit einem kommerziellen Kit anhand von insgesamt 25 PCV-3-positiven und vier negativen Proben zeigte qualitativ 100 % übereinstimmende Ergebnisse. Der kommerzielle Kit hatte ein niedrigeres Quantifizierungslimit (10 Kopien/PCR) als die PCV-3- $\beta$ -Aktin duplex Real-Time PCR (250 Kopien/PCR). Allerdings war die experimentell bestimmte Kopienzahl/ml Probe bei der PCV-3- $\beta$ -Aktin duplex Real-Time PCR durchschnittlich etwa zehnfach höher als beim kommerziellen Kit. Mögliche Gründe dafür könnten sein, dass die Zielregionen der beiden verglichenen Tests in unterschiedlichen PCV-3 Genregionen liegen, da die PCV-3/ $\beta$ -Aktin duplex Real-Time PCR gegen das Cap-Gen, der kommerzielle Kit hingegen gegen das Rep-Gen gerichtet ist. Auch Unterschiede in der Art und Präparation der verwendeten Standards (synthetisierte einzelsträngige DNA versus doppelsträngiger Plasmidstandard) oder Mismatches zwischen Primer bzw. Sonde und der Zielregion in den Proben könnten eine Erklärung für diese Differenz liefern (Klein et al. 2001). Aufgrund der proprietären Natur der Sequenzen von Plasmidstandard, Primern und Sonden beim kommerziellen Testkit kann die Hypothese, dass Mismatches für die mit diesem Kit gemessenen geringeren PCV-3 Viruslasten verantwortlich sind, nicht überprüft werden.

Die in dieser Studie beobachtete Diskrepanz in der absoluten Quantifizierung der PCV-3 Kopienanzahl in den parallel untersuchten Proben (im Mittel etwa eine  $\log_{10}$ -Stufe) mag überraschend hoch erscheinen. Generell ist jedoch eine hohe Variabilität zwischen Real-Time PCR-Assays bzw. durchführenden Laboratorien keine Seltenheit: für PCV-2 wurden im Rahmen einer Vergleichsuntersuchung derselben Proben mit zwei unterschiedlichen Real-Time PCR Assays ein systemischer Unterschied in der Viruslast von 1,4  $\log_{10}$  Stufen berichtet (Hjulsager et al. 2009). Eine weitere ähnlich angelegte Studie, die bis zu sieben PCV-2 Real-Time PCR - Assays verglich, kam auf Unterschiede von bis zu 4  $\log_{10}$  Stufen bei der quantitativen Analyse ein- und derselben Probe (Harding et al. 2009). Beide Autoren weisen folgerichtig auch darauf hin, dass es wenig zielführend ist, quantitative PCV-2 Werte zwischen Laboren oder Methoden zu vergleichen. Für PCV-3 ist außer dem hier vorgestellten nur ein weiterer Vergleichsversuch bekannt: in diesem wurde die Quantifizierung eines Plasmidstandards durch eine Real-Time PCR mit der durch eine digitale PCR (digital droplet PCR; ddPCR), die dieselben Primer und Sonden verwendet, publiziert

(Liu et al. 2019). Dabei wurden in der Real-Time PCR sowohl für ein PCV-2 als auch ein PCV-3 Plasmid etwa 10-fach höhere Werte gemessen, als in der ddPCR. In der ddPCR entfällt die Notwendigkeit eines externen Standards und dadurch bedingter Fehlerquellen, jedoch ist die Real-Time PCR für die klinische Anwendung (z.B. Quantifizierung der Viruslast) besser geeignet, da ihr Detektionsbereich wesentlich breiter ist (Liu et al. 2019). Eine Anregung für die bessere Standardisierbarkeit jeglicher quantitativen PCV-2 oder PCV-3 Bestimmung könnte daher die Kalibrierung von Real-Time PCR Verfahren anhand von ddPCR sein. Des Weiteren sollten Labore durch regelmäßige Teilnahme an quantitativen Laborvergleichsuntersuchungen gegenüber ihrer Kundschaft den Nachweis einer guten Quantifizierungspraxis belegen können.

Die PCV-3/ $\beta$ -Aktin duplex Real-Time PCR hat neben dem günstigeren Preis im Vergleich zum kommerziellen Assay den Vorteil, dass hier eine endogene Kontrolle ( $\beta$ -Aktin) verwendet wird, wodurch die Probenqualität besser beurteilt werden kann. Ein Vorteil des kommerziellen Kits liegt in der differenzialdiagnostischen Detektion von PCV-3 und PCV-2. Dies ist insofern interessant, da diese beiden Erreger im Zusammenhang mit ähnlicher klinischer Symptomatik beschrieben wurden (Palinski et al. 2016, Phan et al. 2016). Eine Einbindung eines PCV-2 Assays in die PCV-3- $\beta$ -Aktin duplex Real-Time PCR wäre daher hinsichtlich diagnostischer Aussagekraft und weiterer Kostensenkung vorteilhaft (Li et al. 2018).

In dieser Arbeit wurde eine duplex Real-Time PCR Methode zur parallelen Detektion von PCV-3 und  $\beta$ -Aktin in Serum und Organpools etabliert und damit PCV-3-DNA in österreichischen Schweinen nachgewiesen und quantifiziert. PCV-3 konnte sowohl in Proben klinisch gesunder, als auch erkrankter oder mit anderen Erregern koinfizierter Schweine gefunden werden, wobei hohe Viruslasten ausschließlich in Gewebeproben sowie in Abortmaterial nachweisbar waren. Die vorliegende Studie bestätigt, dass PCV-3 in Österreich sowohl in erkrankten als auch klinisch unauffälligen Schweinen zu einem gewissen Prozentsatz verbreitet ist.

## Angaben zur guten wissenschaftlichen

### Praxis

Die Autoren versichern, während des Entstehens der vorliegenden Arbeit, die allgemeingültigen Regeln guter wissenschaftlicher Praxis befolgt zu haben.

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

### Autorenbeitrag

MM führte alle Experimente durch, analysierte und interpretierte die Daten und entwarf die Rohfassung des Manuskriptes. TS revidierte das Manuskript. AS konzipierte die Studie, analysierte und interpretierte die Daten und stellte das Manuskript fertig.

## Literatur

- Chen GH, Tang XY, Sun Y, Zhou L, Li D, Bai Y, Mai KJ, Li YY, Wu QW, Ma JY (2018):** Development of a SYBR green-based real-time quantitative PCR assay to detect PCV3 in pigs. *J Virol Methods* 251: 129–132.
- Deim Z, Dencsö L, Erdélyi I, Valappil SK, Varga, C, Pósa A, Makrai L, Rákhely G (2019):** Porcine circovirus type 3 detection in a Hungarian pig farm experiencing reproductive failures. *VetRec* 185: 84.
- Deng J, Li X, Zheng D, Wang Y, Chen L, Song H, Wang T, Huang Y, Pang W, Tian K (2018):** Establishment and application of an indirect ELISA for porcine circovirus 3. *Arch Virol* 163: 479–482.
- Eddicks M, Maurer R, Deffner P, Eddicks L, Sipos W, Reese S, Cvjetković V, Krejci R, Opriessnig T, Ritzmann M, Fux R (2022):** Cross-Sectional Study on the Prevalence of PCV Types 2 and 3 DNA in Suckling Piglets Compared to Grow-Finish Pigs in Downstream Production. *Pathogens* 11: 671.
- Fux R, Söckler C, Link EK, Renken C, Krejci R, Sutter G, Ritzmann M, Eddicks M (2018):** Full genome characterization of porcine circovirus type 3 isolates reveals the existence of two distinct groups of virus strains. *Virol J* 15: 25.
- Harding JC, Baker C, Rhodes C, McIntosh KA, Bonneau M (2009):** Ring tests to evaluate the performance of Porcine circovirus-2 (PCV-2) polymerase chain reaction (PCR) assays used in North American diagnostic laboratories. *Can J Vet Res* 73: 7–14.
- Hayashi S, Ohshima Y, Furuya Y, Nagao A, Oroku K, Tsutsumi N, Sasaki C, Sato T (2018):** First detection of porcine circovirus type 3 in Japan. *J Vet Med Sci* 80: 1468–1472.
- Hjulsager CK, Grau-Roma L, Sibila M, Enøe C, Larsen L, Segalés J (2009):** Inter-laboratory and inter-assay comparison on two real-time PCR techniques for quantification of PCV2 nucleic acid extracted from field samples. *Vet Microbiol* 133: 172–8.
- Kim SC, Nazki S, Kwon S, Juhng JH, Mun KH, Jeon DY, Jeong CG, Khatun A, Kang SJ, Kim W (2018a):** The prevalence and genetic characteristics of porcine circovirus type 2 and 3 in Korea. *BMC Vet Res* 14: 294.
- Kim SH, Park JY, Jung JY, Kim HY, Park YR, Lee KK, Lyoo YS, Yeo SG, Park CK (2018b):** Detection and genetic characterization of porcine circovirus 3 from aborted fetuses and pigs with respiratory disease in Korea. *J Vet Sci* 19: 721–724.
- Klaumann F, Franzo G, Sohrmann M, Correa-Fiz F, Drigo M, Nunez JI, Sibila M, Segales J (2018a):** Retrospective detection of porcine circovirus 3 (PCV-3) in pig serum samples from Spain. *Transbound Emerg Dis* 65: 1290–1296.
- Klaumann F, Correa-Fiz F, Franzo G, Sibila M, Núñez JI, Segalés J (2018b):** Current knowledge on porcine circovirus 3 (PCV-3): A novel virus with a yet unknown impact on the swine industry. *Front Vet Sci* 5: 315.
- Klein D, Leutenegger CM, Bahula C, Gold P, Hofmann-Lehmann R, Salmons B, Lutz H, Gunzburg WH (2001):** Influence of preassay and sequence variations on viral load determination by a multiplex real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction for feline immunodeficiency virus. *J Acquir Immune Defic Syndr* 26: 8–20.
- Li X, Qiao M, Sun M, Tian K (2018):** A Duplex Real-Time PCR Assay for the Simultaneous Detection of Porcine Circovirus 2 and Circovirus 3. *Virol Sin* 33: 181–186.

- Liu Y, Meng H, Shi L, Li L (2019):** Sensitive detection of porcine circovirus 3 by droplet digital PCR. *J Vet Diagn Invest* 31: 604–607.
- Olvera A, Sibila M, Calsamiglia M, Segalés J, Domingo M (2004):** Comparison of porcine circovirus type 2 load in serum quantified by a real time PCR in postweaning multisystemic wasting syndrome and porcine dermatitis and nephropathy syndrome naturally affected pigs. *J Virol Methods* 117: 75–80.
- Palinski R, Piñeyro P, Shang P, Yuan F, Guo R, Fang Y, Byers E, Hause BM (2016):** A novel porcine circovirus distantly related to known circoviruses is associated with porcine dermatitis and nephropathy syndrome and reproductive failure. *J Virol* 91: 1–13.
- Phan TG, Giannitti F, Rossow S, Marthaler D, Knutson TP, Li L, Deng X, Resende T, Vannucci F, Delwart E (2016):** Detection of a novel circovirus PCV3 in pigs with cardiac and multi-systemic inflammation. *Virology* 13: 184.
- Saporiti V, Cruz TF, Correa-Fiz F, Núñez JL, Sibila M, Segalés J (2020):** Similar frequency of Porcine circovirus 3 (PCV-3) detection in serum samples of pigs affected by digestive or respiratory disorders and age-matched clinically healthy pigs. *Transbound Emerg Dis* 67: 199–205.
- Segalés J (2012):** Porcine circovirus type 2 (PCV2) infections: clinical signs, pathology and laboratory diagnosis. *Virus Res* 164: 10–19.
- Shen H, Liu X, Zhang P, Wang L, Liu Y, Zhang L, Liang P, Song C (2018):** Genome characterization of a porcine circovirus type 3 in South China. *Transbound Emerg Dis* 65: 264–266.
- Stadejek T, Wozniak A, Milek D, Biernacka K (2017):** First detection of porcine circovirus type 3 on commercial pig farms in Poland. *Transbound Emerg Dis* 64: 1350–1353.
- Tischer I, Gelderblom H, Vettermann W, Koch MA (1982). A very small porcine virus with circular single-stranded DNA. *Nature* 295: 64–66.**
- Tochetto C, Lima DA, Varela APM, Loiko MR, Paim WP, Scheffer CM, Herpich JL, Cerva C, Schmidt C, Cibulski SP, Santos AC, Mayer FQ, Roehe PM (2018):** Full-genome sequence of porcine circovirus type 3 recovered from serum of sows with stillbirths in Brazil. *Transbound Emerg Dis* 65: 5–9.
- Toussaint JF, Sailleau C, Breard E, Zientara S, De Clercq K (2007):** Bluetongue virus detection by two real-time RT-qPCRs targeting two different genomic segments. *J Virol Methods* 140: 115–123.
- Wang D, Mai J, Yang Y, Xiao CT, Wang N (2022):** Current knowledge on epidemiology and evolution of novel porcine circovirus 4. *Vet Res* 53: 38.
- Wen S, Sun W, Li Z, Zhuang X, Zhao G, Xie C, Zheng M, Jing J, Xiao P, Wang M, Han J, Ren J, Liu H, Jin N (2018):** The detection of porcine circovirus 3 in Guangxi, China. *Transbound Emerg Dis* 65: 27–31.
- Yang K, Jiao Z, Zhou D, Guo R, Duan Z, Tian Y (2019):** Detection of porcine circoviruses in clinical specimens using multiplex PCR in Hubei, central China. *BMC Infect Dis* 19: 778.
- Zhai S, Zhou X, Zhang H, Hause BM, Lin T, Liu R, Chen QL, Wei WK, Lv DH, Wen XH, Li F, Wang D (2017):** Comparative epidemiology of porcine circovirus type 3 in pigs with different clinical presentations. *Virology* 14: 222.
- Zheng S, Wu X, Zhang L, Xin C, Liu Y, Shi J, Peng Z, Xu S, Fu F, Yu J, Sun W, Xu S, Li J, Wang J (2017):** The occurrence of porcine circovirus 3 without clinical infection signs in Shandong Province. *Transbound Emerg Dis* 64: 1337–1341.
- Zou Y, Zhang N, Zhang J, Zhang S, Jiang Y, Wang D, Tan Q, Yang Y, Wang N (2018):** Molecular detection and sequence analysis of porcine circovirus type 3 in sow sera from farms with prolonged histories of reproductive problems in Hunan, China. *Arch Virol* 163: 2841–2847.

#### Korrespondenzadresse

Dr. med. vet. Adi Steinrigl  
 Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit  
 Institut für veterinärmedizinische Untersuchungen  
 Mödling  
 Robert Koch Gasse 17  
 2340 Mödling, Österreich  
 adi.steinrigl@ages.at