

**Phylogenetische Untersuchung von nach der H1N1 Pandemie  
2009 in süddeutschen schweinehaltenden Betrieben  
zirkulierenden Influenza A Viren**

von Jessica Pippig

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

Phylogenetische Untersuchung von nach der H1N1 Pandemie  
2009 in süddeutschen schweinehaltenden Betrieben  
zirkulierenden Influenza A Viren

von Jessica Pippig

aus Plauen

München 2016

Aus dem Zentrum für Klinische Tiermedizin der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Krankheiten des Schweines

Arbeit angefertigt unter der Leitung von:  
Univ.-Prof. Dr. Mathias Ritzmann

Angefertigt am Bayerischen Landesamt für Gesundheit und  
Lebensmittelsicherheit, Oberschleißheim

Mentorin: Dr. Antonie Neubauer-Juric

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

**Dekan:** Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

**Berichterstatter:** Univ.-Prof. Dr. Mathias Ritzmann

**Korreferent:** Univ.-Prof. Dr. Lutz S. Göhring

**Tag der Promotion: 16. Juli 2016**



Meinem Ehemann



**Inhaltsverzeichnis**

Abkürzungsverzeichnis .....	IX
Tabellenverzeichnis.....	XI
Abbildungsverzeichnis .....	XII
I. Einleitung .....	13
II. Literaturübersicht.....	15
1. Influenza A Viren beim Schwein .....	15
1.1. Taxonomie .....	15
1.2. Morphologie.....	16
1.3. Genomaufbau und Funktion viraler Proteine.....	17
1.4. Replikationszyklus .....	19
1.5. Genetische Variabilität .....	23
2. Nachweismethoden für Influenza A Viren.....	23
2.1. Virusisolierung.....	23
2.2. PCR-Verfahren.....	24
2.3. DNA-Chiptechnologie/Microarrays.....	25
2.4. Nachweis von Virusantigen mittels Immunhistochemie und Immunfluoreszenz Analysen .....	26
2.5. Hämagglutinationstest (HA) und Hämagglutinationshemmungstest (HAH) .....	26
3. Epidemiologie.....	27
3.1. Geschichte der Schweineinfluenza.....	27
3.2. Aktuelle Verbreitung von Infektionen mit porzinem IAV .....	31
3.2.1. Europa .....	31
3.2.2. Nordamerika .....	32
3.2.3. Südamerika.....	34
3.2.4. Asien .....	34
3.2.5. Afrika .....	36
3.3. Vorkommen porziner IAV Infektionen beim Menschen.....	37
III. Publikation .....	40
IV. Diskussion.....	71

---

1. Methoden für den Nachweis und die Subtypisierung porziner IAV .....	71
1.1. Konventionelle tetraplex RT-PCR .....	71
1.2. Triplex und duplex real-time RT-PCR .....	73
1.3. Singleplex RT-PCR-Methoden .....	77
1.4. Isolierung und Vermehrung von porzinen IAV in Zellkultur-Systemen.....	78
1.5. Analyse der Expression viraler Proteine in mit porzinen IAV infizierten MDCK und ..... KOP-R-Zellen .....	86
2. Vorkommen porziner IAV -Subtypen in Südbayern .....	88
3. Phylogenetische Analyse ausgewählter Virusisolate.....	92
V. Zusammenfassung .....	96
VI. Summary.....	98
VII. Literaturverzeichnis .....	100
VIII. Danksagung .....	115

**Abkürzungsverzeichnis**

AIV	aviäre Influenzaviren
avH1N1	avian-like H1N1
BHK-21	Baby Hamster Kidney
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
Bp	base pair(s)
CaCo-2	Carcinoma Colon, humane colorectale Adenokarzinomzellen
cDNA	complementary DNA
cpE	cytopathic effect
Cq	quantification cycle
CRFK	Crandell Reese Feline Kidney
Ct	treshold cycle
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonucleic acid
EFSA	European Food Safety Authority
FBS	fetales bovines Serum
G/C-Gehalt	Guanin/Cytosin-Gehalt
HA	Hämagglutinin; Hämagglutinationstest
HAH	Hämagglutinationshemmungstest
HEF	Hämagglutinin-Esterase-Fusionsprotein
huH1N2	human-like H1N2
huH3N2	human-like H3N2
IAV	Influenza A Viren
ICTV	International Committee on Taxonomy of Viruses
KLU	Kälberlungenzellen
KOP-R	bovine oropharyngeal cells
LGL	Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit
M	Matrix
MDCK	Madin Darby Canine Kidney
MDBK	Madin Darby Bovine Kidney
MEM	Minimal Essential Medium
NA	Neuraminidase

---

NBL6	Horse Dermal Fibroblasts
NEP	nuclear export protein
NLS	Nukleäre Lokalisationssignale
NP	Nukleoprotein
NRZ	Nationales Referenzzentrum
NS	Nichtstrukturprotein
PA	polymerase acidic
PB1	polymerase basic 1
PB2	polymerase basic 2
PBS	Phosphate buffered saline
pdmH1N1	pandemisches H1N1
PK-15	Porcine Kidney
RARP	RNA-abhängiger RNA-Polymerasekomplex
RK-13	Rabbit Kidney
RKI	Robert-Koch-Institut
RNA	ribonucleic acid
RNP	Ribonukleoprotein
rpm	rounds per minute
RT-PCR	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
SPF	spezifisch pathogenfrei
TRIG	triple reassortant internal gene
v-mRNA	virale messenger RNA
vRNA	virale RNA
vRNP	viraler Ribonukleinkomplex
WHO	World Health Organisation

## **Tabellenverzeichnis**

**Tabelle 1** Nachweis porziner IAV Subtypen im untersuchten Probenmaterial

## Abbildungsverzeichnis

**Abbildung 1** Struktur eines Virions des Genus A

**Abbildung 2** Schematische Darstellung des Replikationszyklus der Influenza-A-Viren  
modifiziert nach Naffakh et al., 2008

**Abbildung 3** Reassortierungsereignisse zur Entstehung des pdmH1N1, aus Kageyama, 2011

**Abbildung 4** Auftrennung der Amplifikate über Agarosegel (2%iges): Die nach der one-step tetraplex RT-PCR erhaltenen DNA-Amplifikate wurden über Agarosegelelektrophorese nach Größe aufgetrennt. Dargestellt sind die Ergebnisse für je ein H1N1, H1N2 und H3N2 in einer dezimalen Verdünnungsreihe bis zur Stufe  $10^{-5}$ , die spezifischen Banden lassen sich anhand der Beschriftung links zuordnen

**Abbildung 5** Darstellung der Amplifikationskurven auf einem MXpro3005 q PCR-System, Agilent, für je ein H1N1, H1N2 und H3N2 Genom in der one-step triplex real-time RT-PCR

**Abbildung 6** Darstellung der Amplifikationskurven auf einem MXpro3005 q PCR-System, Agilent, für je ein H1N1, H1N2 und H3N2 Genom in der one-step duplex real-time RT-PCR

**Abbildung 7** Vermehrung ausgewählter porziner IAV, H1N1, H3N2 und pdmH1N1, auf MDCK- und CaCo-2-Zellen

**Abbildung 8** Vermehrung ausgewählter porziner IAV, H1N1, H3N2 und pdmH1N1, auf MDCK-, PK-15-, RK-13-, BHK-21-, NBL6-, KLU- und MDBK-Zellen.

**Abbildung 9** Vergleichende Fluoreszenz in KOP-R und MDCK-Zelle

## I. Einleitung

Die Influenza ist eine der bedeutendsten und am weitesten verbreiteten zoonotischen Viruserkrankungen. Ursächlich sind vor allem Influenza A Viren (IAV), die in einer Vielzahl von genetischen Variationen und Subtypen vorkommen. Durch das segmentierte RNA-Genom der IAV entstehen nicht nur nach Punktmutation kontinuierlich neue Virusvarianten, sondern können auch ganze Segmente ausgetauscht werden, wenn verschiedene Viren dieselbe Wirtszelle infizieren. Wildvögel sind als Reservoirwirt für den großen genetischen Pool der IAV bekannt und gerieten mit der H5N1-Epidemie ab 2005 auch in Deutschland verstärkt in den Fokus der Aufmerksamkeit. Seitdem wird ein kontinuierliches Monitoring auf IAV in den Wildvogelpopulationen durchgeführt. Auch humane Influenza A Viren werden sorgfältig überwacht und Impfstrategien ständig angepasst. Lediglich das Monitoring der IAV in einer weiteren wichtigen Wirtspopulation, dem Schwein, verlief in den vergangenen Jahrzehnten nur lückenhaft. Dies, obwohl bekannt ist, dass Schweine mit porzinen, aber auch den aviären und den humanen Influenza A Viren infizierbar sind und somit als „Mixing vessel“ für völlig neue IAV dienen könnten. Schon seit der Spanischen Grippe 1918 ist bekannt, dass Influenza A Viren in der Lage sind spezieübergreifend zu Infektionen zu führen. Seither hat es vereinzelt immer wieder Berichte von der Übertragung porziner Influenza A Viren auf den Menschen gegeben. Von weltweiter Bedeutung war zuletzt im Jahr 2009 das Auftreten des pandemischen H1N1 (pdmH1N1), das aufgrund des vermuteten Ursprungs in der Schweinepopulation als Verursacher der humanen „Schweinegrippe“ Furore machte. Durch diese Pandemie war klar, dass auch eine vermehrte Aufmerksamkeit auf das Vorkommen und die Entwicklung von porzinen IAV gerichtet werden muss. pdmH1N1 fand schnell den Weg in deutsche schweinehaltende Betriebe und neue Reassortanten zwischen dem pdmH1N1 und enzootischen porzinen IAV bringen eine noch größere genetische Vielfalt in die Population. Kenntnisse über die nun aktuell zirkulierenden porzinen Influenza A Viren können helfen zukünftige Entwicklungen vorherzusagen, das zoonotische Potential abzuschätzen und auch effektive Impfprogramme für die Erhaltung der Gesundheit der Schweinebestände durchzuführen.

Ziel dieser Arbeit war es daher einen Überblick über aktuell zirkulierende porzine Influenza A Viren im südbayerischen Raum zu erarbeiten. Zu diesem Zweck sollten zunächst geeignete RT-PCR-Methoden für eine schnelle Subtypisierung etabliert werden. Im Anschluss sollten Proben von mit Influenza-Symptomatik erkrankten Schweinen aus den Jahren 2010 bis 2013 auf die Präsenz von IAV-Genom untersucht werden und die identifizierten IAV dann Subtypen

zugeordnet werden. Interessante IAV sollten schließlich weiter genetisch und phylogenetisch analysiert werden, um Verwandtschaftsverhältnisse zu bestimmen. Besonderes Augenmerk wurde hierbei auf den Eintrag der pdmH1N1 und das Auftreten neuer reassortanter Viren in der Schweinepopulation Südbayerns gelegt.

## II. Literaturübersicht

### 1. Influenza A Viren beim Schwein

#### 1.1. Taxonomie

In Schweinen zirkulierende Influenza A Viren (IAV), hier porcine IAV genannt, gehören zum Genus Influenzavirus A, die gemeinsam mit den Genera Influenzavirus B und C sowie den Isa-, Thogoto- und Quaranjaviren die Familie der *Orthomyxoviridae* (griechisch *orthos*: gerade, aufrecht, richtig und *myxa*: Schleim) bilden (ICTV 2014). Die Unterteilung in die drei verschiedenen Influenzavirus Genera A, B und C erfolgt anhand spezifischer Eigenschaften der Matrix (M)- und Nukleoproteine (NP). Influenza C Viren besitzen im Gegensatz zu Influenzaviren A und B statt acht nur sieben Gensegmente. Die Funktion des Hämagglutinins (HA) und der Neuraminidase (NA) erfüllt hier ein Hämagglutinin-Esterase-Fusionsprotein (HEF), welches entsprechend auf nur einem Gensegment kodiert wird (Gao et al., 2008). IAV infizieren ein breites Wirtsspektrum, das sowohl verschiedene Säuger wie Schweine, Pferde, Hunde, Katzen, Nerze, Meeressäuger und den Menschen als auch Vögel umfasst (Webster et al., 1992). Wassergeflügel stellt das natürliche Reservoir für IAV dar (Yoon et al., 2014). Anhand der jeweiligen HA- und NA-Proteine werden die IAV in Subtypen unterteilt. Derzeit unterscheidet man sechzehn HA- (1-16) und neun NA-Subtypen (1-9). Von diesen 144 möglichen Kombinationen wurden bisher 116 in unterschiedlichen Vogelarten identifiziert (Taubenberger and Kash, 2010). Erst kürzlich wurden außerdem Influenza-Virus ähnliche Virussequenzen in Fledermäusen nachgewiesen, so dass H17 und 18 sowie N10 und 11 benannt wurden, wobei sich diese Oberflächenantigene sowohl in ihrer Struktur als auch Funktion von den bisher identifizierten HA- und NA-Proteinen deutlich unterscheiden. Es bleibt zunächst bei der Bezeichnung als "Influenza-ähnliche" Virusgenome, die Rolle von Fledermäusen als natürlicher Reservoirwirt und ein mögliches zoonotisches Potential müssen noch geklärt werden (Mehle, 2014, Wu et al., 2014). IAV Isolate werden nach einer von der WHO standardisierten Nomenklatur benannt: Diese beinhaltet den Virustyp (bzw. Genus), die Spezies, von welcher das Virus isoliert wurde (wird bei humanen Isolaten nicht aufgeführt), den Ort des Nachweises, die Labornummer des Isolates und das Jahr der Identifizierung. Zudem werden für den Genus A HA- und NA-Subtyp angegeben. Das Virus A/swine/Jena/2/1996(H3N2) ist dementsprechend

ein porzines Isolat des Genus A mit der Labornummer 2, das in Jena im Jahr 1996 diagnostiziert wurde, und einen HA-Subtyp 3 und NA-Subtyp 2 hat.

Der Begriff "Schweinegrippe" bezeichnet nicht nur die Erkrankung von Schweinen nach porziner IAV-Infektion sondern hat sich viel mehr nach der letzten humanen Influenza A

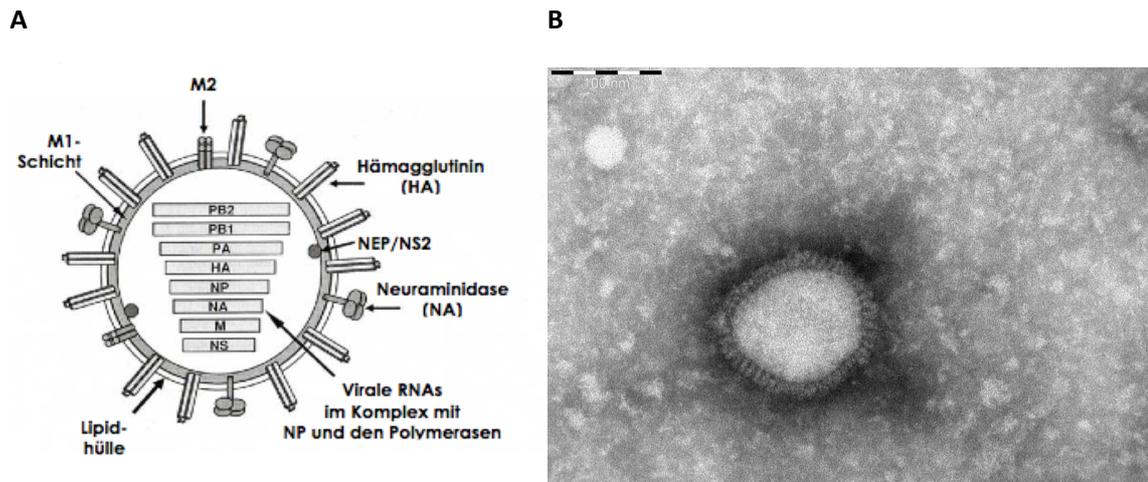
Pandemie, ausgelöst durch ein als pdmH1N1 bezeichnetes Virus, etabliert. Die

„Schweinegrippe“ wird auch als "neue Grippe" oder "neuer Influenza-A/H1N1" bezeichnet und löste 2009 und 2010 eine weltweite Infektions- und Erkrankungswelle aus.

Der Genus B wurde bisher nur beim Menschen und Robben nachgewiesen (Osterhaus et al., 2000) und Genus C hat mit dem Mensch, v.a. Kinder und vereinzelt dem Schwein und Hund ebenfalls ein enges Wirtsspektrum (Yuanji (Yuanchi) et al., 1983, Obwada et al., 1987).

## 1.2. Morphologie

Die Viruspartikel des Genus A sind pleomorph. Im natürlichen Wirt liegen sie jedoch meist sphärisch vor und erst nach Zellkultur-Passage auch filamentös. Sie haben einen Durchmesser von 80-120 nm, bei filamentösen Partikeln sind auch mehr als 300 nm Länge messbar. IAV-Partikel sind von einer Lipidhülle umgeben, welche nach Einlagerung viraler Proteine im Zuge der Virusfreisetzung aus der Oberflächenmembran der Wirtszelle rekrutiert wird. Als genuspezifisches Antigen ist das Matrix (M1)-Protein unter und das Matrix (M2)-Protein in der Lipiddoppelmembran lokalisiert (Abb. 1). In der Hülle sind zudem HA und NA als Projektionen im Verhältnis 4:1 verankert. Die viralen Nukleokapside sind von helikaler Symmetrie und werden von den Ribonukleoprotein (RNP)-Komplexen gebildet. Diese bestehen aus den viralen RNA-Genom Segmenten, dem Nukleoprotein (NP), den Polymeraseproteinen basische Polymerase 1 (PB1) und 2 (PB2) sowie der sauren Polymerase (PA) Im Virion können ebenfalls die Nicht-Struktur-Proteine NS1 und NS2 nachgewiesen werden. (Webster et al., 1992, Bouvier and Palese, 2008).



**Abb. 1:** Struktur eines Virions des Genus A

**A** – schematische Darstellung eines IAV-Partikels, Abbildung modifiziert nach Fields 5. Edition, Abbildung 47.2

**B** – Elektronenmikroskopische Darstellung eines porzinen IAV-Partikels aus Probenmaterial, negativ Kontrastierung, Skalierung 200nm (Foto: LGL, 2013)

### 1.3. Genomaufbau und Funktion viraler Proteine

Das Genom porziner IAV besteht aus acht Segmenten einer einzelsträngigen, negativ orientierten RNA, die mindestens für neun Strukturproteine und zwei Nichtstrukturproteine codiert. Die segmentierte RNA liegt im Viruspartikel durch die hochkonservierten, teilweise komplementären Enden der RNA in zirkulärer Form vor (Baudin et al., 1994). Der Größe entsprechend werden die einzelnen Segmente nummeriert. Die Segmente 1, 2 und 3 codieren für die Proteine PB2, PB1, PB1-F2 und PB1-N40 sowie PA. Die genetische Information für HA liegt auf Segment 4, für NP auf Segment 5 und für NA auf Segment 6. M1 und M2 werden auf Segment 7 und NS1 und NS2 auf Segment 8 codiert.

PB2 ist ein Bestandteil des viralen RNA-abhängigen RNA-Polymerasekomplex (RARP). Es dient der Erkennung und Bindung an die Cap-Struktur der mRNA der Wirtszelle und somit der Vermittlung des "Cap-Snatching" (Bouloy et al., 1980, Blaas et al., 1982)

PB1 ist ebenfalls ein wichtiger Bestandteil des RARP und funktioniert durch Polymeraseaktivität in der Elongation bei Transkription und Replikation (Toyoda et al., 1996). Die Funktion von PB1-F2 ist noch nicht vollständig geklärt. Es wird in den meisten, aber nicht in allen IAV synthetisiert. Bisher ist gezeigt worden, dass es proapoptische Eigenschaften zur verbesserten Freisetzung von Tochtervirionen besitzt (Chen et al., 2001). Außerdem fördert es die korrekte Lokalisierung des PB1 (Mazur et al., 2008). Des Weiteren wurde gezeigt, dass es einen

wichtigen Virulenzfaktor darstellt. Einzelne Mutationen können zu höherer Virusmenge im Lungengewebe durch schnelleren Replikationszyklus und verlangsamer Viruselimination durch das Immunsystem führen, wie Conello et al. (2007) im Mausmodell gezeigt haben. Auch die Funktion des PB1-N40, eine N-terminal verkürzte Variante des PB1, ist noch nicht lückenlos erforscht. Es reguliert die Polymeraseaktivität von PB1 und das Fehlen von PB1-N40 führt zu einer Verlangsamung, aber nicht zum vollständigen Erliegen der Replikation des Virus (Wise et al., 2009).

PA ist ebenfalls Bestandteil des RARP und ist durch Endonukleaseaktivität an der Transkription und Synthese viraler Ribonukleinkomplexe (vRNP) beteiligt (Nakagawa et al., 1996). Erst kürzlich wurde gezeigt, dass Segment 3 für ein weiteres Protein codiert, das sogenannte PA-X. Es spielt eine Rolle in der Modulation der Immunantwort des Wirtsorganismus (Jagger et al., 2012). PA-X hat die gleiche Endonukleaseaktivität wie das PA, ist aber nicht mit dem RNA-abhängigen RNA-Polymerasekomplex verbunden. Es inhibiert die Proteinsynthese der Wirtszelle durch Zerstörung der zellulären mRNA und ist somit am Host-Shut-Off beteiligt (Khapersky and McCormick, 2015). Zuletzt wurde entdeckt, dass Segment 3 noch zwei weitere Proteine verschlüsselt, das PA-N155 und PA-N182, beides N-terminal verkürzte Variationen des PA. Es wird vermutet, dass diese ebenfalls eine wichtige Rolle im Replikationszyklus der Viren spielen, denn dieser verläuft ohne sie mit reduzierter Geschwindigkeit. Auch für die Virulenz scheinen sie eine Rolle zu spielen, denn ihr Fehlen führt zu einer geringeren Infektionsrate im Mausmodell. Auf die Polymeraseaktivität selbst haben sie aber keinen Einfluss (Muramoto et al., 2013).

Das glycolysierte und als Trimer vorliegende HA wird durch eine Trypsin-ähnliche Protease vom Vorläufermolekül H0 in die Einheiten HA1 und HA2 gespalten, die über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden bleiben. HA1 vermittelt die Adsorption des Virus an endständige Neuraminsäuren auf der Oberfläche der Wirtszelle. HA2 induziert schließlich die Fusion des Viruspartikels mit der Endosomenmembran der Wirtszelle (White et al., 1982). HA induziert die Bildung neutralisierender Antikörper (Eckert, 1972).

Das Nukleoprotein ist die Hauptkomponente des Nukleokapsids. Es bindet die RNA und vermittelt deren Transport in den Zellkern. Durch Interaktion mit dem M1-Protein vermittelt es außerdem den Export neu gebildeter viraler RNA-Segmente aus dem Zellkern ins Zytoplasma der Wirtszelle (O'Neill et al., 1995, Portela and Digard, 2002).

Das Oberflächenprotein Neuraminidase liegt als Tetramer vor und induziert ebenfalls die Bildung neutralisierender Antikörper. Es spaltet Sialinsäurereste zellulärer und viraler

Glykoproteine und ermöglicht dadurch die Freisetzung neuer Viruspartikel und verhindert das Aggregieren neu gebildeter Tochterviruspartikel (Ohuchi et al., 2006).

M1 assoziiert mit der Lipidhülle, mit HA und NA sowie mit den vRNPs. Es katalysiert die Bildung neuer RNPs und bewerkstelligt zusammen mit NS2/NEP deren nukleären Export und die Knospung der neu gebildeten Tochtervirionen aus der Wirtszelle (Martin and Helenius, 1991, Gomez-Puertas et al., 2000).

Als Ionenpumpe fungiert der Protonenkanal M2. Durch die Aufnahme von  $H^+$ -Ionen aus dem Endosom in die Viruspartikel wird die Fusionsdomäne des HA aktiviert, die Viruspartikel fusionieren mit der Endosomenmembran, die RNP-Komplexe lösen sich vom M1, sodass diese ins Zytoplasma der Wirtszelle freigesetzt werden können (Abb. 2). Auch für den Zusammenbau neuer Viruspartikel hat M2 essentielle Funktionen (Martin and Helenius, 1991, Pinto et al., 1992). Wise et al. (2012) beschrieben zuletzt das M42-Protein, das durch alternatives Spleißen entsteht und auf dem siebten Gensegment kodiert wird. Es kann funktionell das M2-Protein ersetzen.

NS1 fungiert als Hemmfaktor beim Spleißen der prä-mRNA des achten Segments. Es bindet die Cap-Struktur der mRNA der Wirtszelle und verhindert so deren Export aus dem Zellkern, sodass vermehrt virale RNA in Proteine translatiert wird (Fortes et al., 1994, Hale et al., 2008).

Außerdem dient es als Interferon-Antagonist und mindert dadurch die Immunreaktion des Wirtsorganismus (Haye et al., 2009).

Das NS2/NEP schließlich ist am Export der vRNPs aus dem Zellkern beteiligt (O'Neill et al., 1998, Neumann et al., 2000). Es entsteht durch Spleißen der mRNA des achten Segments und ist ein Polymerase-Cofaktor.

#### 1.4. Replikationszyklus

Das HA bindet an Sialinsäuremoleküle auf der Oberfläche der Wirtszelle und vermittelt somit zunächst die Virusadsorption (Skehel and Wiley, 2000). Die Art der Verknüpfung des endständigen Sialinsäurerests mit dem Galaktoserest der glykolisierten Wirtszellmembran ist entscheidend für die Virusadsorption. Der C2-Kohlenstoff der endständigen Sialinsäurereste ( $\alpha$ -5-N-Acetylneuraminsäure) kann dabei mit dem C3 oder dem C6 der Galactose verbunden sein. Man spricht von  $\alpha(2,3)$ - oder  $\alpha(2,6)$ -glycosidischen Bindungen. Aviäre Influenza-A-Viren (AIV) binden bevorzugt an Moleküle mit  $\alpha(2,3)$ -Galactose-Verbindungen, während humane Influenza-A-Viren die mit  $\alpha(2,6)$ -Verbindungen präferieren (Connor et al., 1994). Die  $\alpha(2,3)$ -Sialinsäuren dominieren vor allem im epithelialen Gewebe des Darms bei Vögeln, kommen aber

auch in den Alveolen und in der Lamina propria mucosae des Darms bei Mensch und Schwein vor (Ito et al., 1998, Nelli et al., 2010).  $\alpha(2,6)$ -Verbindungen kommen vor allem im gesamten Atmungstrakt von Schwein und Mensch vor, aber auch im Respirationstrakt und Darm bei Wassergeflügel und bei landlebendem Geflügel (Kumlin et al., 2008, Nelli et al., 2010, Franca et al., 2013). Bereits einzelne Punktmutationen in der HA-codierenden Sequenz können zu Veränderungen in der Rezeptorpräferenz führen und somit die Wirtsspezifität des Virus beeinflussen und Speziesbarrieren außer Kraft setzen (Mochalova et al., 2003).

Im nächsten Schritt, der rezeptorvermittelten Endozytose, tritt das Virus in die Wirtszelle ein (Abb. 2). Zunächst umschließen zelluläre Membranen das endozytierte Viruspartikel (Martin et al., 1981). Im Endosom sinkt der pH-Wert durch  $H^+$ -ATPasen. Dies ist ein entscheidender Faktor der Virusreplikation, denn der niedrige pH-Wert induziert die Konformationsänderung des HA2 und ermöglicht so die Fusion des Viruspartikels mit der Endosomenmembran (Skehel et al., 1995, Cross et al., 2001, Smith and Helenius, 2004). Durch den erniedrigten pH-Wert im Endosom wird die Ionenkanalfunktion des M2-Proteins aktiviert. M2 lässt als integraler Ionenkanal Protonen aus dem Endosom in das Viruspartikel, wodurch die Verbindungen zwischen M1 und den RNPs gelöst werden und die RNP-Komplexe ins Zytoplasma der Wirtszelle freigesetzt werden können (Chizmakov et al., 1996, Martin and Helenius, 1991b). Dieser Schritt wird als Uncoating bezeichnet.

Transkription und Replikation der viralen Nukleinsäuren finden im Zellkern statt (Herz et al., 1981, Jackson et al., 1982).. Nukleäre Lokalisationssignale (NLS) sind überall auf den Proteinen des RNP-Komplexes vorhanden, wichtig sind vor allem diejenigen des NP- und PB2-Proteins. Importin- $\alpha$  erkennt die NLS und knüpft an den RNP-Komplex, der nun an die Kernporen bindet und in Folge aktiv, vermittelt durch Importin- $\beta$ 1, in den Kern aufgenommen wird (O'Neill et al., 1995, Cros and Palese, 2003). Auch diese Interaktion des NP mit Importin- $\alpha$  ist ein wichtiger Faktor für den Wirtszelltropismus, da NP von AIV bevorzugt an das in aviären Zellen dominierende  $\alpha$ -3-Importin binden, das von Säugern hingegen an  $\alpha$ -7-Importin. Wiederum können einzelne Aminosäureaustausche in der codierenden Sequenz des NP zu Veränderungen der Spezies-Präferenzen führen. (Gabriel et al., 2011).

Aufgrund der negativen Polarität der Virus-RNA muss zunächst die virale-messenger-RNA (v-mRNA) durch die virale RNA-Polymerase des RNP-Komplexes gebildet werden. Die v-mRNA ist eine unvollständige Kopie der vRNA (Hay et al., 1977a). Sie besitzt zwar einen 3'-Poly-A-Schwanz, doch während des sogenannten „Cap-Snatching“ werden die Cap-Strukturen zellulärer mRNA durch den viralen RARP-Komplex abgespalten. Dieser Schritt ist essentiell, um die

Transkription im Zellkern der Wirtszelle einzuleiten, da die Cap-Strukturen als Primer dienen (Krug, 1981, Blaas et al., 1982). PB2 bindet die Cap-Struktur der zellulären prä-mRNA, PA spaltet sie durch Endonukleaseaktivität ab und PB1 fungiert schließlich als Polymerase. Die Cap-Struktur bleibt nach der Abspaltung durch PB2 gebunden, welches durch Konformitätsänderung (Drehung) die Interaktion mit dem von PB1 gebundenen 3'-Ende der vRNA als Matrize vermittelt (Koppstein et al., 2015) Zugleich wird durch dieses Cap-Snatching die Produktion wirtseigener Proteine reduziert. (Engelhardt and Fodor, 2006, Vreede and Fodor, 2010).

Da die virale Polymerase am 5'-Ende der vRNA gebunden bleibt, kommt es schließlich zu einer sterischen Behinderung des Polymerasekomplexes, der mehrfachen Kopie des 5'-Endes der vRNA und damit zur Polyadenylierung und die Transkription bricht ab (Fodor, 2013).

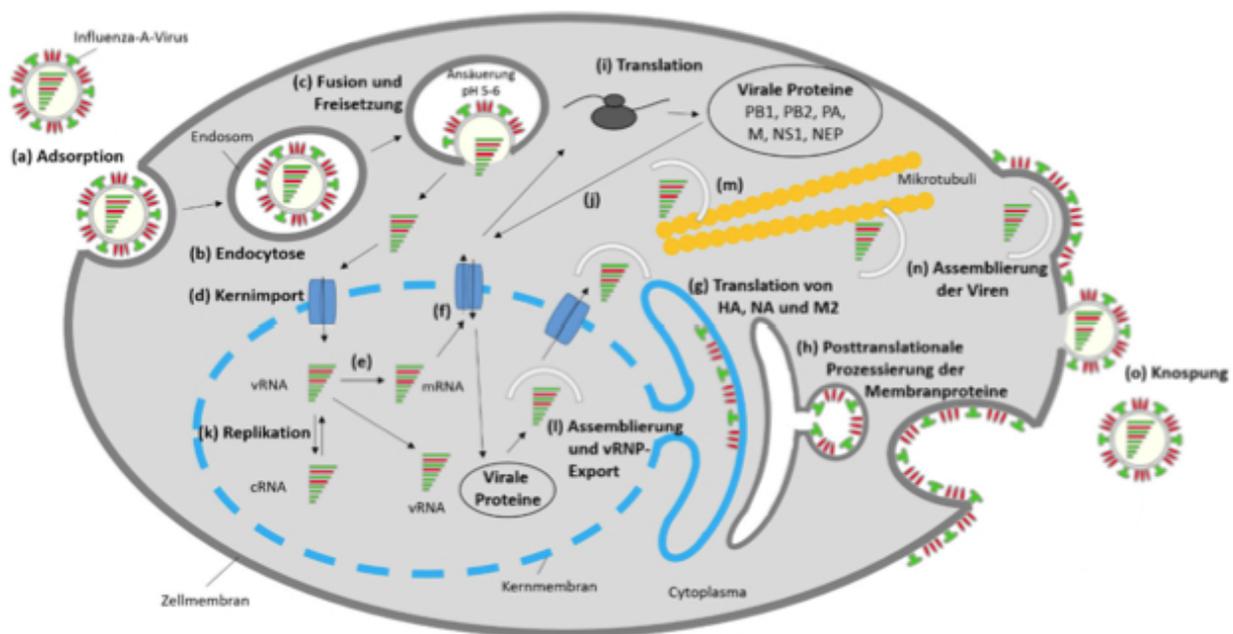
Anschließend wird die v-mRNA mit Hilfe von M1 und NS2/NEP in das Zytoplasma transportiert. Hier erfolgt die Translation der viralen Proteine. Für die Replikation wichtige Proteine, wie NP und NS, werden zuerst exprimiert (Shapiro et al., 1987). Die Proteinsynthese von PB1, PB2, PA, NP, NS1, NS2 und M1 erfolgt an den freien Ribosomen im Zytoplasma. Anschließend gelangen sie mit Hilfe von Importinen zurück in den Zellkern (Neumann et al., 1997). HA, NA und M2 hingegen werden an membrangebundenen Ribosomen translatiert. Nachfolgend werden sie im Endoplasmatischen Retikulum und über den Golgi-Apparat prozessiert und schließlich, in zellulären Membranen integriert, an die Oberfläche der Wirtszelle transportiert. Dort stehen sie für den folgenden Zusammenbau der neuen Viruspartikel im Zytoplasma zur Verfügung (Veit et al., 1991). Vermutlich ist die sukzessive Anreicherung von NP im Zellkern am Prozess der Umstellung von Translation zu Replikation beteiligt. Andere Theorien legen nahe, dass beide Vorgänge parallel ablaufen. Genau ist dieser Prozess noch nicht aufgeklärt (Vreede et al., 2004).

Nach der Translation wird die vRNA repliziert. Auch dieser Prozess wird durch den viruseigenen RNA-Polymerase-Komplex katalysiert. Die positiv orientierte v-mRNA ist aufgrund ihrer Kapfenstruktur und ihrer Polyadenylierungsstelle nicht als Matrize geeignet. Schließlich werden unterstützt durch das Protein M1 neue RNP-Komplexe im Kern gebildet. Mittels M1 und NS2/NEP werden die neu gebildeten viralen RNP-Komplexe aus dem Zellkern in das Zytoplasma transportiert (Gomez-Puertas et al., 2000). Es folgt der Zusammenbau der Viruspartikel und deren Freisetzung über Knospung ("Budding") an der äußeren Zellmembran (Nayak et al., 2004). Durch diese Knospung nehmen die Tochtervirionen die in der Lipidhülle der Wirtszelle integrierten HA, NA und M2 auf. Das NA spielt bei diesen Vorgängen eine wichtige Rolle, denn es spaltet Sialinsäurereste von der Oberfläche der Wirtszelle und der

resultierenden Virushülle ab. Somit wird verhindert, dass die neu gebildeten Viruspartikel über die Bindung von HA an die Sialinsäuren mit der Wirtszelle oder untereinander aggregieren (Palese and Compans, 1976, Ohuchi et al., 2006).

Es müssen alle acht Gensegmente in einem neu gebildeten Viruspartikel enthalten sein, damit dieses vermehrungsfähig ist. Auch wenn die Auffassung des Zufallsprinzips inzwischen überholt ist, sind die genauen Mechanismen der Verpackungsvorgänge und deren Signale noch weitgehend unklar (Hutchinson et al., 2010, Gao et al., 2012, Noda and Kawaoka, 2012, Gerber et al., 2014).

In Abbildung 2 ist der Ablauf des Virusreplikationszyklus zusammengefasst dargestellt.



**Abb. 2:** Schematische Darstellung des Replikationszyklus der Influenza-A-Viren modifiziert nach Naffakh et al., 2008

IAV-Partikel binden an die Wirtszelle und werden durch Endozytose aufgenommen. Nach Fusion der Virushülle mit der Endosomenmembran werden die vRNPs in das Zytoplasma entlassen. Die virale RNA wird in den Zellkern transportiert, wo Transkription und Replikation stattfinden. Durch Translation werden im Zytoplasma die viralen Proteine synthetisiert. Die einzelnen Komponenten werden schließlich zur Zelloberfläche transportiert, zusammengesetzt und die Partikelfreisetzung erfolgt hier durch Knospung.

### 1.5. Genetische Variabilität

Antigen-drift und –shift sind Mechanismen, welche die hohe Variabilität im Genom der IAV bedingen. Die Fähigkeit der IAV zur schnellen antigenetischen und auch funktionalen Veränderung viraler Proteine kann zur Umgehung einer präexistierenden humoralen Immunantwort und gegebenenfalls Anpassung an neue Wirte führen (Webster and Beau, 1978). Als *antigenetic drift* wird die antigenetische Veränderung nach Punktmutationen im Genom bezeichnet. Die hohe Mutationsrate basiert auf der fehlenden Korrekturlesefunktion der viralen RNA-Polymerase (Drake, 1993). Die Mutationsrate für porcine IAV liegt bei etwa  $6,8 \times 10^{-6}$  Basenaustauschen pro Nukleotid pro Replikationszyklus (Stech et al., 1999). Mit *antigenetic shift* wird der Austausch ganzer Gensegmente zwischen verschiedenen Viren bezeichnet. Voraussetzung ist die simultane Infektion einer Wirtszelle (Desselberger et al., 1978). Resultierende rekombinante Viren besitzen unvorhersehbare Segmentkombinationen und Eigenschaften. Ein Segmentaustausch kann sowohl zwischen speziesspezifischen Viren eines Wirtstyps, wie zum Beispiel porcinen IAV, als auch zwischen verschiedenen Spezies-assoziierten Viren, z.B. porcinen und aviären Viren, auftreten und kann eine wichtige Ursache für die Entstehung neuer Influenzaviren und in Konsequenz von Pandemien sein (Dugan et al., 2008). Grundvoraussetzung für ein *antigenic shift* zwischen IAV unterschiedlicher Speziespezifität ist zunächst die Infektion eines Wirtes mit entsprechendem Virus. Schweine wurden schon früh als potentielle „mixing vessel“ bezeichnet, da sie nicht nur für porcine IAV sondern auch für AIV und humane IAV empfänglich sind (Scholtissek, 1990). Die Gefahr der Koinfektionen von Schweinen mit verschiedenen IAV wurden entsprechend immer wieder postuliert, aber bisher nur sporadisch nachgewiesen (Chiapponi et al., 2012, Harder et al., 2013).

## 2. Nachweismethoden für Influenza A Viren

### 2.1. Virusisolierung

Die Virusisolierung über spezifisch pathogenfreie (SPF) embryonierte Hühnereier dient dem Nachweis und der Vermehrung von infektiösem Virusmaterial und gilt als Goldstandardmethode für die Isolation von AIV. Die Inokulation von Probenmaterial erfolgt in die Allantoishöhle. Auf die Präsenz von IAV wird nach Abschluss der Inkubation durch die Überprüfung der erhaltenen Allantoisflüssigkeit auf ein hämagglutinierendes Agens getestet, weitere Differenzierungsschritte können folgen. Die Virusisolierung über das Hühnerei ist zeitaufwendig und schnell ist eine

Adaptation an den „neuen Wirt“, das Hühnerei, zu befürchten, sodass ursprüngliche Viruseigenschaften verloren gehen (Stevens et al., 2010).

Alternativ werden verschiedene Zelllinien für die Isolierung und Vermehrung von porzinen IAV genutzt. Im Allgemeinen gelten Madin Darby Canine Kidney (MDCK) Zellen als geeignete Zelllinie (Zhang and Gauger, 2014). Chiapponi et al. (2010) verglichen jedoch die Effizienz der Virusvermehrung verschiedener porziner Isolate der Subtypen H1N1, H1N2 und H3N2 in embryonierten Hühnereiern, MDCK-Zellen und in humanen Karzinomzellen des Colons (CaCo-2-Zellen). Die Virusisolation auf CaCo-2-Zellkultur war deutlich häufiger erfolgreich als die der MDCK-Zelllinie und auch im Vergleich zu embryonierten Hühnereiern. Nur die H3N2-Viren konnten in embryonierten Hühnereiern effektiver isoliert werden. Die MDCK-Zellen zeigten sich in dieser Studie am wenigsten geeignet für die Isolierung von porzinen IAV. Auch Clavijo et al. (2002) zeigten anhand von Hämagglutinations- und indirektem Immunperoxidasetest, dass die Virusisolierung von porzinem H1N1-Virus im embryonierten Hühnerei erfolgreicher verläuft als über MDCK-Zellen. Die Autoren bemerken, dass die Effizienz der Virusisolierung in einem bestimmten Zellsystem oder im embryonierten Hühnerei ganz entscheidend vom Virusstamm und dessen Zelltropismus abhängt. Sie schlagen daher die routinemäßige Isolierung porziner IAV gleichzeitig über embryonierte Hühnereier und Zellkultur vor.

Bowman et al. (2013) hingegen stellten eine Überlegenheit der Isolation über MDCK-Zellen gegenüber der Isolation über embryonierte Hühnereier fest. Nach Inokulation beider Testsysteme mit Nasentupfermaterial prüften sie den Zellkulturüberstand bzw. die Allantoisflüssigkeit im Hämagglutinationstest. Gleichzeitig wurden die Nasentupferproben in einer Matrixgen real-time RT-PCR überprüft. Die Ergebnisse der MDCK-Zellkultur stimmten komplett mit denen der PCR überein. Herman et al. (2005) verglichen die Virusvermehrung in verschiedenen Zelllinien, in MDCK-, Porcine Kidney- (PK), Crandell Reese Feline Kidney- (CRFK), Vero-Zellen und anderen. Außer auf MDCK-Zellen war die Virusisolation auf keiner der anderen Zelllinien erfolgreich. Sie zeigten auch, dass der Zusatz von Trypsin zu MDCK-Zellen die Effizienz des Systems verbessert. Zu diesem Schluss kamen bereits Klenk et al. (1975). Sie zeigten, dass der Zusatz von Trypsin die Spaltung des Vorläufermoleküls H0 erleichtert und damit die Virusvermehrung in der Zellkultur deutlich effizienter wird.

## 2.2. PCR-Verfahren

PCR (Polymerasekettenreaktion)-Verfahren bieten gegenüber der Virusisolation einige Vorteile: PCR-Verfahren sind in der Regel sehr sensitiv, wenige Genomkopien können bereits

nachgewiesen werden. Da nur genetisches Material nachgewiesen wird, sind keine intakten, vermehrungsfähigen Virionen notwendig. Somit können auch in schlechtem Probenmaterial noch Nukleinsäuren nachgewiesen werden. Eine PCR ist zudem in der Regel schneller als eine Virusanzucht. Die Durchführung einer PCR ist mit geringem Aufwand verbunden und nahezu jedes Labor kann sie durchführen. Nach Auswahl geeigneter Primer und Sonden-Kombinationen ist außerdem die Subtypisierung der IAV beinahe uneingeschränkt möglich (Fouchier et al., 2000).

Einige multiplex-PCR Protokolle für den Nachweis und die Differenzierung verschiedener Subtypen von porzinen IAV sind publiziert. Chiapponi et al. (2012) etablierten zwei multiplex RT-PCR Protokolle zur Differenzierung der europäischen Subtypen von porzinem H1N1, H1N2 und H3N2. Nagarajan et al. (2010) entwickelten ein RT- Pentaplex System und eine Tetraplex-real-time-RT-PCR zur Differenzierung der drei wesentlichen porzinen IAV Subtypen. Allerdings stand hier die Diagnostik nordamerikanischer Isolate im Vordergrund. Schließlich wurden auch drei tetraplex-RT-PCR Systeme für den Nachweis von H1-H12 und drei triplex-RT-PCR Protokolle für N1-N9 entwickelt, die sowohl für humane, aviäre als auch porzine Proben geeignet sind (Chang et al., 2008). Der Nachweis des HA von pdmH1N1 wurde durch Hoffmann et al. (2010) mittels zweier singleplex real-time RT-PCRs beschrieben und der „Pan IAV“-taugliche Nachweis von Sequenzen des Matrixgens nach Spackman et al. (2002) modifiziert nach Hoffmann et al. (2010).

Nachteil der PCR ist, dass gerade für Influenzaviren eine Anpassung der Primer und Sonden mit der Zeit unumgänglich ist, da sich das Genom der Viren schnell verändert. Die Oligonukleotide müssen auch meist spezifisch für in einer bestimmten Region zirkulierenden IAV, wie z.B. Europa, gewählt sein.

### 2.3. DNA-Chiptechnologie/Microarrays

Bei diesem Verfahren werden kurze spezifische Oligonukleotidsequenzen, die Sonden, auf einen festen Träger fixiert. Für den Nachweis von RNA muss diese zunächst in cDNA umgeschrieben, amplifiziert und mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert werden. Anschließend wird diese DNA-Lösung auf den Chip aufgebracht. Die Zielgene hybridisieren mit den spezifischen Sonden auf dem Chip und eine messbare Farbreaktion entsteht, die mit speziellen Scannern und Software ausgewertet werden kann (Ryabinin et al., 2011). Vorteil dieser Methode ist die Möglichkeit des schnellen und gleichzeitigen Analysierens vieler Parameter gleichzeitig. Allerdings ist sie noch mit hohen Kosten verbunden (Kuck and Taylor, 2008).

Es gibt bereits einige universelle Chipassays für den Nachweis von IAV verschiedener Subtypen aus verschiedenen Spezies. Li et al. (2009) entwickelten einen Microarray zur Detektion und Differenzierung von H1N1, H1N2, H3N2, H5N1 und H9N2 in humanen, aviären und porcinen Proben. Der Test benötigt lediglich eine Laufzeit von sieben Stunden und erwies sich zudem als sehr spezifisch und sensitiv. Vasin et al. (2013) etablierten einen universellen Microarray, der alle bisher bekannten IAV identifizieren soll. Tatsächlich konnten mit diesem Chip 45 von 48 Proben sicher identifiziert werden, wobei die übrigen drei auch mit keiner anderen Methode subtypisiert werden konnten.

#### 2.4. Nachweis von Virusantigen mittels Immunhistochemie und Immunfluoreszenz Analysen

Mit Hilfe von an Enzym oder Fluorogen gekoppelten IAV Protein spezifischen Antikörpern wird die Bindung an Virusantigen in fixierten Geweben oder Zellkultur-Zellen nachgewiesen. Hoch konservierte und daher häufig genutzte Zielantigene sind sowohl das NP als auch das Matrix-Protein, doch auch mit Subtyp-spezifischen HA-Antikörpern kann gearbeitet werden. Alternativ werden polyklonale Antikörper eingesetzt, die nach Immunisierung mit komplettem Viruspartikel gewonnen wurden. Auch die Lokalisation der detektierten Antigene ist ein wichtiges Beurteilungskriterium. NP ist sowohl im Zytoplasma als auch im Kern zu finden, wohingegen Matrix- und HA-Proteine eher im Zytoplasma und in den zellulären Membranen nachzuweisen sind (Guarner et al., 2000). Durch Immunfärbung ist nicht nur der qualitative Virusantigenachweis möglich, sondern auch eine quantitative Beurteilung der Expression viraler Proteine in der Zelle. Immunfärbefahrten werden in der Routine-Diagnostik zur Bestätigung und Spezifizierung einer Virusreplikation in Zellkultur-Systemen eingesetzt.

#### 2.5. Hämagglutinationstest (HA) und Hämagglutinationshemmungstest (HAH)

Der Hämagglutinationstest (HA) nutzt die Eigenschaft des viralen HA, Erythrozyten definierter Spezies *in vitro* sichtbar zu agglutinieren. Eine sehr spezifische Differenzierung zwischen verschiedenen HA Subtypen erlaubt die Hemmung dieser Reaktion mit Hilfe Subtyp-spezifischer Antikörper im Hämagglutinationshemmungstest (HAH). Die HA-Subtypen von IAV-Isolaten können auf diese Weise mittels bekannter Referenzseren schnell und spezifisch bestimmt werden. Im Umkehrschluss ist auch die schnelle Differenzierung von Antikörpern aus Probenmaterial mit Hilfe bekannter Antigene möglich (Pedersen, 2008).

### 3. Epidemiologie

#### 3.1. Geschichte der Schweineinfluenza

IAV wurde beim Schwein zum ersten Mal im Zusammenhang mit der verheerenden „Spanischen Grippe“, die in Nordamerika, Ungarn und China im Jahr 1918 grassierte, beschrieben (Koen, 1919, Zitat nach Dorset et al., 1922). Das H1N1 verursachte eine Pandemie und forderte bis 1920 weltweit 20-50 Millionen Menschenleben (Shope, 1931, Brown, 2000, Webster 2002, Johnson and Mueller, 2002). Gleichzeitig zeigten ebenfalls Schweine grippeähnliche Symptome, sodass man heute davon ausgeht, dass das Virus vom Mensch auf das Schwein übertragen wurde. Bis heute ist die Herkunft des Virus ungeklärt, jedoch werden Wildvögel als ursprüngliches Reservoir vermutet (Taubenberger et al., 2006). Das spanische Grippe-Virus gilt als Vorläufer für das klassische H1N1, dessen Matrix-, PB2- und NS-Gensegment ihren Ursprung vom Pandemievirus von 1918 haben (Kageyama, 2011). Nachkommen dieses Virus zirkulieren bis heute in Menschen und Schweinen (Brown, 2000, Taubenberger and Morens, 2006).

1928 wurde erstmals Influenza experimentell von Schwein zu Schwein übertragen (McBryde et al., 1928). Da der virushaltige Schleim aus dem Respirationstrakt damals aber noch nicht bakterienfrei gewonnen werden konnte, bleibt ungesichert, ob die Übertragung der respiratorischen Erkrankung durch Bakterien oder tatsächlich durch das Virus verursacht war. 1930 gelang es Richard Shope zum ersten Mal das klassische H1N1 aus Schweinen zu isolieren (Shope, 1931). Dieses klassische H1N1 tauchte 1941 erstmals in der europäischen Schweinepopulation auf, um anschließend wieder zu verschwinden. 1976 wurde es wieder in europäischen Schweinen nachgewiesen, vermutlich eingetragen durch den Import amerikanischer Schweine (Nardelli et al., 1978). Schließlich wurde dieses klassische H1N1 1979 durch den Eintrag eines aviären H1N1 in die Schweinepopulation weitgehend verdrängt. Ein „avian-like“ H1N1 (avH1N1) resultierte und etablierte sich in der europäischen Population (Pensaert et al., 1981, Brown, 2000, Webby and Webster, 2001). Auch in Deutschland wurde 1979 zum ersten Mal porcines IAV vom Typ H1N1 beobachtet und aus einem Bestand in Nordrhein-Westfalen isoliert (Witte et al., 1981). Dieses Virus ist bis heute dominierend in den meisten europäischen Schweinepopulationen, nur in Großbritannien ist es inzwischen verdrängt (Brown, 2000, Kyriakis et al., 2011, Simon et al., 2014).

Durch Kombination von Gensegmenten eines humanen H3N2, das der Hong-Kong Influenza Pandemie 1970 entstammte, und Gensegmenten des avH1N1 trat 1984 ein neues, als „human-

like“ bezeichnetes H3N2-Virus (huH3N2) in der Schweinepopulation auf. Die HA und NA-kodierenden Segmente stammen vom humanen H3N2, alle anderen Segmente vom avH1N1. Auch dieses Virus ist bis heute in der Schweinepopulation Europas endemisch (Haesebrouck et al., 1985, Castrucci et al., 1993, Simon et al., 2014).

Ein weiteres neues porcines IAV (huH1N2) entstand im Jahr 1994 und wurde erstmals in Großbritannien beschrieben. Es handelt sich um eine Rekombination aus einem humanen H1N1, von dem das HA-Gensegment stammt und einem weiteren humanen H3N2, dessen Neuraminidasegen integriert ist und sich genetisch vom oben genannten huH3N2 unterscheidet. Alle weiteren Gensegmente entstammen dem avH1N1 (Brown, 2000, Kuntz-Simon and Madec, 2009). Auch dieses Virus ist bis heute stabiler Bestandteil der porcinen IAV im europäischen Schweinebestand (Kyriakis et al., 2009, Simon et al., 2014).

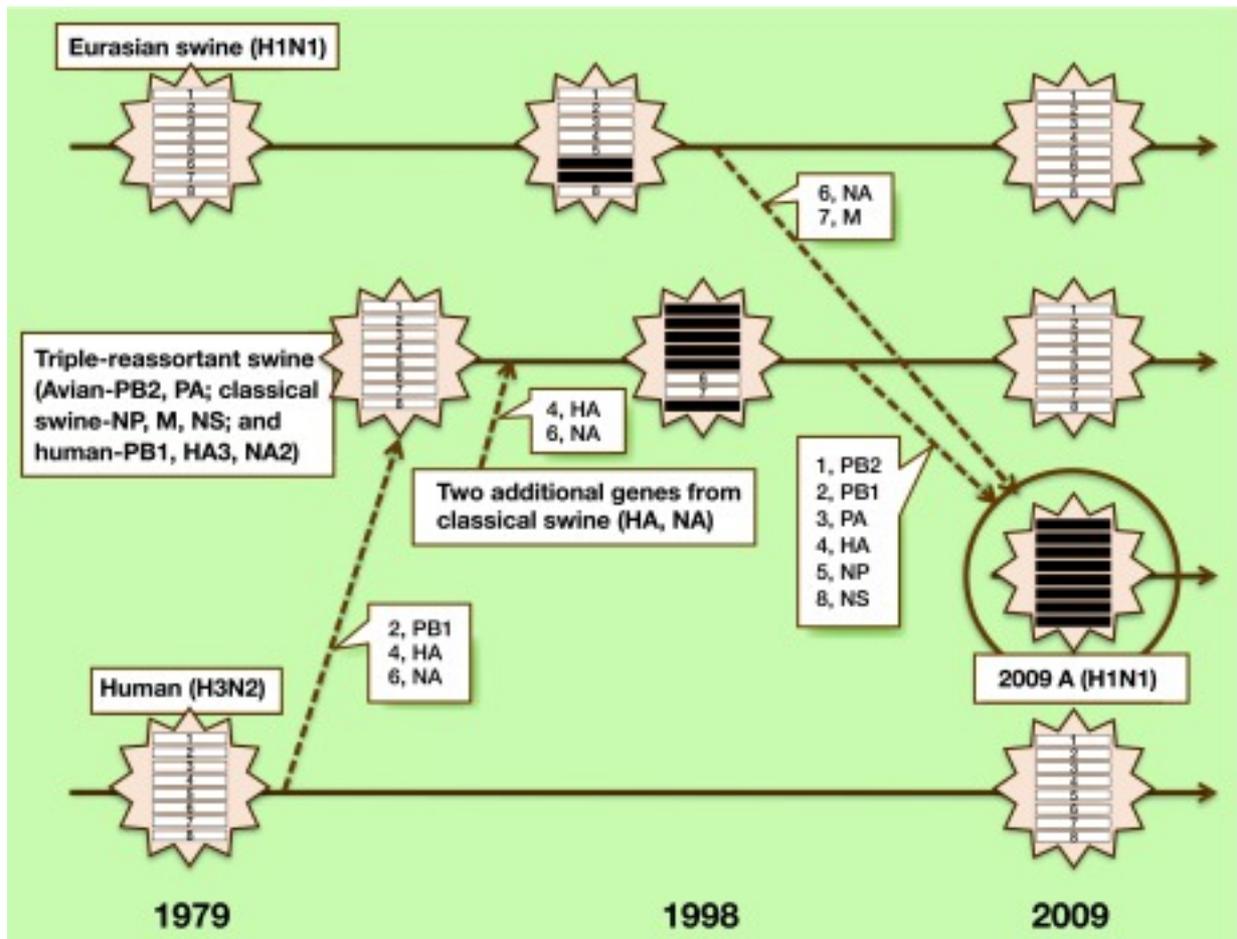
Sporadisch wurden immer wieder andere Subtypen in Schweinen isoliert aber sie konnten sich bisher offensichtlich nicht etablieren. Dazu zählt unter anderem ein H1N7, das erstmals 1992 von Schweinen in England isoliert wurde. Das HA-Gensegment entstammte einem humanen H1N1, das NA-Segment hingegen dem equinen H7N7 (Kuntz-Simon and Madec, 2009). Auch ein H3N1 konnte in Schweinen aus Italien und England detektiert werden. Für das englische Isolat konnte eine Reassortierung zwischen endemischen porcinen H1N1 und H3N2 belegt werden (Kuntz-Simon and Madec, 2009). Schließlich konnte 2003 sogar ein aviäres H7N7 aus Schweinen in Holland isoliert werden (Kuntz-Simon and Madec, 2009). Auch andere Rekombinationen von H1N2 wurden zahlreich in europäischen Schweinen isoliert, jedoch ebenfalls ohne Etablierung in den Beständen. Hierzu zählt das 1999 in Italien detektierte H1N2, dessen HA vom avH1N1 stammt und N2 vom etablierten huH1N2. Diese Rekombinante wurde 2008 auch in Frankreich und 2007 erneut in Italien isoliert (Kuntz-Simon and Madec, 2009, Kyriakis et al., 2011). In Deutschland wurde sie 2009 und 2010 nachgewiesen (Harder et al., 2013). Diese Variante des H1N2 kommt noch immer in geringer Zahl in Frankreich, Italien und Deutschland vor (Simon et al., 2014). In Deutschland wurde außerdem 2005 eine Rekombinante aus huH1N2 und huH3N2 detektiert. Die Oberflächenprotein-codierenden Gensegmente sind demnach humanen, die internen Gensegmente nach wie vor aviären Ursprungs. Dieses Virus wurde auch in Italien detektiert (Chiapponi et al., 2012, Kuntz-Simon and Madec, 2009, Zell et al., 2013). Auch H1N1-Reassortanten, deren HA-Gensegment vom H1N2 stammt und damit humanen Ursprungs ist, wurden 2006 und 2008 in Frankreich isoliert (Kyriakis et al., 2011) und 2009 und 2010 ebenfalls in Deutschland (Harder et al., 2013). In einer aktuellen Studie von Simon et al. (2014) wurde es immer noch sporadisch in Frankreich, Italien und Deutschland nachgewiesen. In Schweden zirkuliert außerdem ein H1N2, welches eine Rekombinante aus

avH1N1 und huH3N2 darstellt (Balint et al., 2009) und das heute der vorherrschende Subtyp in Dänemark ist (Watson et al., 2015).

Warum sich manche neue Subtypen oder Rekombinanten etablieren und andere nicht, ist nicht sicher aufgeklärt. Ein wichtiger Faktor ist aber sicherlich der Eintrag eines neuartigen Hämagglutinins, das dem Virus die Unterwanderung des Immunsystems und damit die Anpassung an einen neuen Wirt erleichtert (Taubenberger and Morens, 2010).

Man geht davon aus, dass es Influenzapandemien seit mehr als 500 Jahren gab, was jedoch mangels virologischer Nachweismethoden der damaligen Zeit schwer zu beweisen ist. Seit dem Jahr 1500 vermutet man aufgrund historischer Studien 14 humane Influenzapandemien, belegt sind jedoch nur die von 1889, 1918, 1957, 1968, 1977 und 2009 (Taubenberger and Morens, 2010). Wie bereits erwähnt geht man heute davon aus, dass das Virus der Spanischen Grippe aviären Ursprungs ohne Reassortierungsvorgänge komplett auf den Menschen übertragen wurde und vom Menschen schließlich auf das Schwein übergang. Das Besondere an dieser Grippewelle war, dass vor allem junge Erwachsene zwischen 20 und 40 Jahren erkrankten. Dies wird heute damit erklärt, dass ältere Menschen bereits ab 1890 Kontakt zu ähnlichen H1-Viren hatten und daher eine Immunität aufwiesen (Taubenberger and Morens, 2010). 1957 trat die Asiatische Influenzapandemie auf. Ursächlich war ein H2N2, das vom Grippevirus der Pandemie 1918 abstammte. Nur die Gensegmente, die für die Oberflächenproteine und PB1 codieren, waren durch aviäre Gensegmente ersetzt. Auch hier ist der ursprüngliche Wirt, in dem die Reassortierung stattfand, unklar. Das Virus wurde erstmals im April 1957 detektiert. Nach nur zwei Jahren wurde es endemisch und nach 11 Jahren war es schließlich ganz verschwunden und tauchte bis heute nicht mehr auf (Taubenberger and Morens, 2010). In Hong-Kong nahm schließlich 1968 die dritte Pandemie ihren Ausgang, verursacht durch ein H3N2-Virus. Hierbei handelte es sich um eine Reassortante des H2N2 von 1957. Diesmal waren die Gensegmente für HA und PB1 durch aviäre ersetzt. Auch dieses Virus wurde endemisch, zirkuliert aber bis heute (Taubenberger and Morens, 2010). Die Pandemie verlief vergleichsweise mild, vermutlich durch eine bereits ausgebildete Immunität unter den Menschen gegen das NA, das ja bereits im H2N2 der Asiatischen Pandemie involviert war (Kageyama, 2011). 1977 kam es ausgehend von Russland schließlich zu einer bis heute ungeklärten Pandemie durch H1N1. Vergleichende Untersuchungen des Virusgenoms mit denen vorheriger isolierter humaner Influenzaviren konnte keine nähere Verwandtschaft unter diesen identifizieren. Das Virus war jedoch einem H1N1-Isolat von 1950 genetisch derart ähnlich, dass man davon ausgeht, dass es durch jahrzehntelange Konservierung in einem Labor entstanden und aus diesem entwichen sei (Zimmer and Burke, 2009).

Im April 2009 kam es zu einer erneuten Influenza-Pandemie. Sie nahm ihren Ausgang in Mexiko und den USA und erreichte schließlich auch im Dezember 2009 Deutschland (Krause et al. 2010). Mehrfache Reassortierungs-Ereignisse führten zur Entstehung dieses Virus. Das Matrixgen und die Neuraminidase stammen vom eurasischen, porzinen avH1N1 während alle anderen Gensegmente vom nordamerikanischen tripleH1N2 des Schweins stammen (Abb. 3). Dieses entstand selbst durch komplizierte Rekombinationen. Das PB1- und NA-Gensegment stammte vom nordamerikanischen humanen H3N2, das wie oben beschrieben 1968 während der Hong-Kong-Pandemie seinen Ursprung in einer aviären Quelle hatte. Die PB2- und PA-Segmente stammen vom nordamerikanischen aviären H1N1 und alle anderen Gensegmente vom klassischen porzinen H1N1 (Garten et al., 2009, Trifonov et al., 2009). Die genaue Quelle des Virus konnte bis heute nicht identifiziert werden. Bis Juni 2009 erkrankten ca. 30.000 Menschen in 74 Ländern an dem neuen H1N1(pdmH1N1), sodass die WHO die Influenza-Pandemie ausrief. Im August 2010 wurde diese schließlich als beendet erklärt. Vom Menschen ging das Virus schnell auf die Schweinepopulation über. Bis heute zirkuliert dieses Virus in der europäischen Schweinepopulation und ist beim Menschen inzwischen etabliert. Alarmierend ist hingegen, dass das pdmH1N1 weiterhin reassortiert und zu einer neuen vermutlich stabilen Infektionskette mit pdmH1N2 unterschiedlichen Ursprungs beim Schwein in Deutschland und Europa führte (Harder et al., 2013, Lange et al., 2013, Simon et al., 2014, Watson et al., 2015). Die Überwachung der weiteren Entwicklung der porzinen IAV ist von enormer Wichtigkeit, da man nicht vorhersagen kann, welche neuen Reassortanten auftreten werden und ob diese zoonotisches Potential haben werden. Dieses Bewusstsein wird durch verstärkte Überwachungsstudien und Programme widergespiegelt (Watson et al., 2015).



**Abb. 3:** Reassortierungsereignisse zur Entstehung des pdmH1N1, aus Kageyama, 2011.

### 3.2. Aktuelle Verbreitung von Infektionen mit porzinem IAV

#### 3.2.1. Europa

Watson et al. (2015) untersuchten das Vorkommen von porzinen IAV in 14 europäischen Ländern zwischen 2009 und 2013. Insgesamt 23 verschiedene Genotypen wurden unterschieden. Der Einfluss des pdmH1N1 wird bei der Auswertung der Daten aus Großbritannien am deutlichsten. Es ist der europäische Staat mit der höchsten Prävalenz für pdmH1N1 und resultierenden Reassortanten. Im Jahr 2009 wurde noch eine Vielzahl an Proben als Genotyp C (huH1N2) identifiziert. Und auch pdmH1N1 wurde häufig isoliert. In den kommenden Jahren verdrängte allerdings eine neue Reassortante aus pdmH1N1 und huH1N2, die als Genotyp Q bezeichnet wurde, das endemische huH1N2 völlig. Dieser Genotyp Q trat in keinem anderen europäischen Land auf. Stattdessen etablierte sich in anderen Ländern ein Genotyp R mit NA-

codierenden Sequenzen des endemischen huH3N2 und allen anderen Gensegmenten des pdmH1N1. Mit einer relativen Häufigkeit von 26% im untersuchten Probenmaterial wurde diese pdmH1N2-Reassortante am häufigsten in Deutschland isoliert. Dänemark ist ebenfalls besonders interessant, da hier der dominierende Subtyp das rH1avN2 ist, eine Reassortante aus den enzootischen avH1N1 und huH3N2. Es kozirkuliert gemeinsam mit avH1N1 und pdmH1N1. Eine Reihe anderer Genotypen wurde detektiert (Watson et al., 2015). Diese sind jedoch eher sporadisch nachzuweisen, was bislang nicht für die Etablierung dieser Reassortanten spricht. Interessant ist auch, dass die internen Gensegmente in ihrer Konstellation fast immer stabil sind und selten einer Veränderung unterliegen. Ausnahmen sind hier lediglich die Genotypen M, N und O, bei denen sich interne Gensegmente von avH1N1 und pdmH1N1 mischten. Zusammenfassend kann man sagen, dass über alle europäischen Staaten, mit Ausnahme von Großbritannien und Dänemark, avH1N1, huH3N2, huH1N2 und pdmH1N1 noch immer die vorherrschenden Subtypen sind. Alle anderen Reassortanten D, E, F, G, Q und R werden immer nur in einigen Ländern, nie in allen, nachgewiesen und die übrigen 13 Genotypen treten nur sporadisch auf.

In Deutschland sind immer noch avH1N1, huH1N2 und huH3N2 die vorherrschend gefundenen Subtypen (Harder et al., 2013, Lange et al., 2013). Doch eine neue pdmH1N2- Reassortante entwickelt eine stabile Infektionskette. Dieses Virus entstand wie bereits oben erwähnt (Genotyp R) aus der Reassortierung von pdmH1N1 mit huH3N2. Immer noch nachweisbar, aber in sinkender Prävalenz, ist das porzine pdmH1N1 selbst. Auch andere Reassortierungen konnten nachgewiesen werden, beschränkten sich aber auf einzelne Ereignisse. Dazu zählt unter anderem das erstmals 2010 isolierte H1pdmN1, das sieben Gensegmente vom pdmH1N1 erhielt und nur das NA-codierende Gensegment vom avH1N1. Aber auch ein H1N1 aus dem Jahr 2009 fällt als neue Reassortante auf, dessen N1 zwar vom avH1N1 stammt, das H1 hingegen vom porzinen huH1N2. Auch einige Kombinationen aus dem porzinen huH1N2 und huH3N2 konnten detektiert werden. Weiterhin kamen in vier Fällen Rekombinationen vom H1 des avH1N1 und dem N2 verschiedener Linien vor (Harder et al., 2013).

### 3.2.2. Nordamerika

Die Entwicklung der porzinen IAV in Nordamerika unterscheidet sich deutlich von der Europäischen. Nach dem Auftreten des klassischen H1N1 im Jahr 1918 blieb dieses für 80 Jahre genetisch weitgehend stabil. Erst 1998 entstand eine neue Dreifach-Reassortante. Es handelte

sich um ein H3N2, dessen Matrixgen und das für NP und NS codierende Gensegment vom klassischen H1N1 stammen. Hämagglutinin und Neuraminidase sowie das PB1-Gensegment haben ihren Ursprung von einem saisonalen humanen H3N2. Die Gensegmente für PB2 und PA schließlich stammen von einem aviärem IAV (Zhou et al., 1999). Dieses Virus etablierte sich in der nordamerikanischen Schweinepopulation. Seine spezielle Genkombination wird heute als TRIG- (triple-reassortant internal gene) Kassette bezeichnet. Im Jahr 2005 wurden weitere Reassortanten aus TRIG mit Segmenten der saisonalen humanen H1N1 und H1N2 nachgewiesen (Vincent et al., 2009b). Die HA-Sequenzen dieses porzinen huH1 IAV sind phylogenetisch von klassischen H1N1-Sequenzen abzugrenzen. Die TRIG blieb immer gleich und stabil, nur die für Oberflächenproteine codierenden Segmente unterlagen genetischen Veränderungen. Für die nordamerikanischen porzinen IAV wurde ein spezifisches Genotyp-Muster entwickelt.  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Gruppierungen bezeichnen das H1 des klassischen H1N1 und seine Nachkommen, während  $\delta 1$  für das humane saisonale H1N2 und  $\delta 2$  für H1N1 steht. Alle vier Typen werden in Verbindung mit N1 oder N2 gefunden (Lorusso et al., 2011). 2009 kam das pdmH1N1 hinzu und neue Reassortanten entstanden (Ducatez et al., 2011).

Anderson et al. (2013) analysierten zwischen 2009 und 2012 Sequenzen aus 1040 Proben phylogenetisch. H1N1, H1N2 und H3N2 wurden in jedem Jahr der Untersuchung nachgewiesen, die relative Häufigkeit von H3N2 stieg im Probenmaterial deutlich an. Diese lag im Jahr 2010 noch bei 25%, 2012 hingegen bereits bei 33%. Mit 37,4% und 36,0% Nachweishäufigkeit sind H1N1 und H1N2 die vorherrschenden Subtypen. Ähnlich wie in Europa nimmt die relative Häufigkeit des pdmH1N1 ab. Doch dessen Matrixgen etablierte sich und wird unter den Subtypen H1N1, H1N2 und H3N2 mit deutlich ansteigender Häufigkeit nachgewiesen. Alle Genotypen des H1 wurden gefunden, H1 $\delta 1$  war der vorherrschende Subtyp. Im Mittleren Westen der USA wurde eine relative Häufigkeit von 18% für H1N1 und 14,5% für pdmH1N1 in einem Untersuchungszeitraum von 2009-2011 festgestellt. Für H1N2 lag sie bei 16% und für H3N2 nur bei 7,6%. Dies zeigt deutlich, dass in diesen Jahren pdmH1N1 noch deutlich häufiger nachgewiesen wurde als H3N2 (Corzo et al., 2013).

Auch in den Vereinigten Staaten sind vereinzelt Reassortanten mit pdmH1N1 detektiert worden (Ducatez et al., 2011). Ali et al. (2012) berichten von einer H1N2-Reassortante in Ohio, deren Oberflächenantigen-codierenden Segmente von einem humanen IAV stammen. Die Segmente für PB2, PB1, PA und NS stammen von der TRIG-Kassette. Das Matrixgen und das NP-Gensegment haben ihren Ursprung im pdmH1N1. Inwiefern solche neuen Kombinationen in den nordamerikanischen Schweinebeständen endemisch werden bleibt abzuwarten.

### 3.2.3. Südamerika

Bisher sind nur wenige Daten über das Vorkommen von porzinen IAV in Südamerika publiziert. Vor der Pandemie im Jahr 2009 gibt es keine belegten Untersuchungen zum Auftreten von Schweineinfluenza. Lediglich der Nachweis des huH3N2 in Schweinen Argentiniens im Jahr 2008 ist dokumentiert, wobei ungesichert ist, ob sich dieses Virus auch in den Schweinebeständen etablieren konnte (Pereda et al., 2011). In Brasilien wird seit 2009 das Auftreten von porzinen IAV untersucht und ergab hauptsächlich Infektionen mit pdmH1N1. In den Jahren 2010 und 2011 hingegen wurde eine neue Reassortante detektiert, bei der es sich um ein huH1N2 handelt. Das HA und NA bildet in phylogenetischen Untersuchungen mit der humanen Linie des H1 (H1- $\delta$ -Cluster) und des NA eine Gruppe. Die internen Gensegmente stammen vom pdmH1N1 (Schaefer et al., 2015). Die relative Häufigkeit von porzinen IAV im Osten von Kolumbien liegt bei 13,42%. Alle Isolate konnten mittels RT-PCR als pdmH1N1 identifiziert werden, wie die Studie von Karlsson et al. (2013) zwischen 2010 und 2012 zeigte. Reassortanten des pdmH1N1 wurden 2009 und 2010 in Argentinien nachgewiesen, die für HA und NA codierenden Segmente stammten von porzinen huH1N1 oder huH1N2 (Pereda et al., 2011). Anfang 2012 wurde in Argentinien ein neuartiges porzines H3N2 isoliert, dessen interne Gensegmente wiederum vom pdmH1N1 stammen. Die Gensegmente für HA und NA wurden durch ein huH3N2 eingetragen (Dibárbora et al., 2013).

Zusammenfassend kann man für Südamerika sagen, dass pdmH1N1 hier vorherrschend zirkuliert und Rekombinanten dieses Virus ihren Eintrag in die Schweinebestände gefunden haben.

### 3.2.4. Asien

Asien und allen voran China ist weltweit der größte Produzent von Schweinefleisch (Kong et al., 2014). Aber auch eine große Dichte an Nutz- und Wassergeflügel machen vor allem Südchina zu einem Hot spot für IAV und eine besonders intensive Überwachung ist indiziert, denn durch die gleichzeitige Haltung von Schweinen und Geflügel auf engem Raum in Kombination mit der hohen Bevölkerungsdichte ist das Risiko der Entstehung neuer Reassortanten mit zoonotischem Potential hoch (Ma et al., 2015).

Das erste porzine H1N1 in China wurde 1992 isoliert. Es handelte sich um das asiatische avH1N1. Es zirkulierte lange Zeit gemeinsam mit dem 1970 erstmals beschriebenen huH3N2

und dem 1996 detektierten, aus Nordamerika bekannten, porzinen klassischen H1N1 in Chinas Schweinebeständen (Yu et al., 2008, Liu et al., 2012). 2007 wurden europäische avH1N1 in Schweinen nachgewiesen (Liu et al., 2012, Kong et al., 2014). Das erste H1N2 trat 2004 auf, eine Rekombinante aus humanen und porzinen IAV. 2010 tauchte ein weiteres H1N2 auf, eine Dreifach-Reassortante aus huH3N2, von dem die Neuraminidase stammt, dem klassischen H1N1, dessen Hämagglutinin beteiligt ist, und dem nordamerikanischen triple H3N2 (Kong et al., 2014). Das gleichzeitige Auftreten des enormen Genpools aus humanen, aviären und porzinen Influenzaviren führte auch zu einigen Reassortierungsvorgängen (Vijaykrishna et al., 2011). Auch andere Subtypen, wie das inzwischen etablierte H9N2 sowie H5N1, H3N8, H4N8 und H6N6 wurden in Schweinen nachgewiesen (Kong et al., 2014). Letztlich fand auch das pdmH1N1 Eintrag in die chinesischen Schweinebestände.

In der Vergangenheit trat eine Vielzahl verschiedener H1N1 und H3N2 Subtypen auf. Yu et al. (2008) führten erstmals phylogenetische Untersuchungen verfügbarer Sequenzen porziner H3N2-Isolate aus den Jahren 1970 bis 2004 durch und analysierten zusätzlich weitere 500 Proben aus den Jahren 2005 und 2006. Die Ergebnisse belegten eine Koexistenz von huH3N2, Zweifach- und Dreifach-Reassortanten. Die Oberflächenantigene der Zweifach-Reassortanten waren humanen und die internen Gensegmente aviären Ursprungs. Komplizierter verhält es sich mit den erstmals 1980 nachgewiesenen Dreifach-Rekombinanten. Hier trat eine Vielzahl verschiedener Kombinationen von Gensegmenten humanen, aviären und porzinen Ursprungs auf. Ähnlich vielfältig sind auch die Genotypen der in China isolierten H1N1 Subtypen. Liu et al. (2012) identifizierten zehn verschiedene Genotypen von porzinen H1N1 in China aus den Jahren 1992 bis 2011. An den Rekombinanten sind das klassische H1N1, eurasische avH1N1, pandemische H1N1, saisonale humane Influenzaviren, H9N2, huH3N2 und das nordamerikanische triple-H3N2 beteiligt.

Eine retrospektive Studie von Kong et al. (2014) über die Jahre 1998 bis 2010 ergab Prävalenzen von 31,1% für H1, 28,6% für H3, 8,9% für H4, 1,3% für H5, 3,4% für H6, 0% für H7 und für H9 2,4%. Liang et al. (2014) wiesen durch komplette Genomsequenzierung von 387 Isolaten porziner IAV von 2009 bis 2012 17 verschiedene Reassortanten des pdmH1N1 in China nach. An diesen Reassortierungsvorgängen waren nur die internen Gensegmente des pdmH1N1 beteiligt. Die Oberflächenantigene hingegen wurden meist durch europäische avH1N1 oder huH3N2 ersetzt. Diese Reassortanten sowie das europäische avH1N1 sind die dominierenden porzinen IAV Subtypen in China (Liang et al., 2014).

Das erste in Japan dokumentierte porzine IAV war 1978 ein H1N2, eine Rekombinante aus dem klassischen porzinen H1N1 und dem huH3N2 (Brown, 2000). Es wurde zunächst das

dominierende porcine IAV in Japan (Kirisawa et al., 2014). Das N2-Gensegment stammt vom Hong Kong huH3N2 ab, alle anderen Segmente vom klassischen H1N1 (Ito et al., 1998). Dieses wurde wiederum 1978 erstmals in Japan detektiert und etablierte sich anschließend in der Schweinepopulation Japans (Ito et al., 1998, Brown, 2000). H3N2 etablierte sich erst in den 1990ern. Es wurde zunächst nur sporadisch in japanischen Schweinen nachgewiesen. Schließlich fand auch in Japan das pdmH1N1 im Jahr 2009 Eintrag in die Schweinebestände und schon 2011 und 2012 traten die ersten Reassortanten dieses Virus auf, ein H1N2, dessen Hämagglutinin und Neuraminidase vom H1N2 stammen und alle anderen Gensegmente vom pdmH1N1. Aber auch andere H1N2 Rekombinanten traten auf, bei denen lediglich die Neuraminidase vom H1N2 stammt (Kirisawa et al., 2014). In einer aktuellen Studie von Kirisawa et al. (2014) wurden von 2010 bis 2013 Nasentupfer und Lungengewebe von an mit für Influenza typischen Symptomen erkrankten Schweinen untersucht. Die Ergebnisse zeigten, dass keine bisher bekannten porcinen IAV isoliert wurden. Stattdessen handelte es sich bei allen untersuchten Viren um pdmH1N1 oder Rekombinanten von pdmH1N1. Insgesamt wurden sechs pdmH1N1-Varianten isoliert sowie ein H1N1, dessen Hämagglutinin vom klassischen H1N1 stammt und alle anderen Gensegmente vom pdmH1N1. Des Weiteren wurde ein H3N2 mit Obeflächenantigenen vom huH3N2 und internen Gensegmenten vom pdmH1N1 identifiziert. Außerdem wurden zwei verschiedene H1N2-Rekombinanten isoliert, die sich aus Gensegmenten vom etablierten H1N2 und pdmH1N1 zusammensetzen. Insgesamt zeigt diese Untersuchung wie weit verbreitet das pandemische H1N1 in den Schweinebeständen Japans ist und wie schnell es mit anderen zirkulierenden porcinen IAV Rekombinanten bildet.

Auch Pascua et al. (2013) isolierten in Korea neue Reassortanten, die Gensegmente von pdmH1N1 enthielten, das H3N2 und das H3N1. In Südkorea wurden im April 2010 außerdem Reassortanten des pdmH1N1 mit porcinen IAV vom Subtyp H1N2 aus Nordamerika gefunden. Das NA der reultierenden pdmH1N2 Isolate stammte vom H1N2, alle anderen Gensegmente vom pdmH1N1 (Han et al., 2012). Auch in Thailand zeigte eine aktuelle Studie von Abe et al. (2015) ähnliche Ergebnisse, nämlich eine Vielzahl neuer Rekombinanten des pdmH1N1.

### 3.2.5. Afrika

Nur wenige Daten über das Vorkommen und die Subtypen von porcinen IAV in Afrika sind der Literatur zu entnehmen. Grund hierfür könnte die geringe Anzahl an Schweinebetrieben in Afrika im Vergleich zu anderen Kontinenten sein (Conacy-Hymann et al., 2012). Die meisten

Berichte stammen aus Nigeria und Ghana, da hier die Anzahl der Schweinebetriebe innerhalb Afrikas am größten ist und auch noch weiter wächst (Adeola et al., 2015). 1970 wurde in Taiwan das erste Mal porcines IAV aus Afrika isoliert, ein huH3N2 (Adeola et al., 2015). Im Januar und Februar 2014 wurden 75 Serumproben von Schweinen aus Nigeria und 50 weitere aus Ghana mittels ELISA untersucht und ergaben eine relative Häufigkeit von huH3N2-Sero-Reaktivität von jeweils 4% in Proben aus beiden Ländern (Adeola et al., 2015). In einer weiteren serologischen Studie von 2011 bis 2012 wurden Antikörper gegen pdmH1N1 zu 27,4% in Proben aus Nigeria und 5,6% aus dem Kamerun nachgewiesen (Snoek et al., 2015). Von Oktober 2012 bis Januar 2014 wurden in einer weiteren Untersuchung 325 Nasentupfer von gesunden, gerade geschlachteten Schweinen aus Togo mittels RT-PCR auf vorhandenes Virusgenom getestet. In den positiv auf IAV Genom getesteten Proben wurde immer pdmH1N1 mittels RT-PCR nachgewiesen (Ducatez et al., 2015).

In 13,7 % der 227 Nasentupfer von Schweinen mit Influenza-ähnlichen Symptomen aus Lagos (Nigeria) wurde IAV mittels RT-PCR nachgewiesen. Die Virusisolation über embryonierte Hühnereier war für 12% der Proben erfolgreich. Davon wurden 18% mittels Hämagglutinationshemmungstest als pdmH1N1 identifiziert (Meseko et al., 2014). 2006 bis 2008 wurde eine Prävalenz von porcinen IAV in Westafrika von 0-0,28% (1. Jahr der Untersuchung) bzw. 0-5% (2. Jahr) festgestellt. Untersucht wurden Nasentupfer mittels RT-PCR und Seren mittels HAH-Test. Keines der untersuchten Seren war im HAH positiv, sodass sich die erste Zahl der Prävalenzangaben auf die untersuchten Seren bezieht. Die zweite Zahlenangabe bezieht sich auf die Prävalenz, die anhand der untersuchten Nasentupfer bestimmt wurde (Conacy-Hymann et al., 2012).

### 3.3. Vorkommen porciner IAV Infektionen beim Menschen

Immer wieder wurden Übertragungen von porcinen IAV auf den Menschen beschrieben, bisher jedoch nur sporadisch und immer im begrenzten Ausmaß. Nie konnte sich eine stabile Infektionskette mit weiterem Übertragen von Mensch zu Mensch bilden. Besonders exponiert sind offensichtlich Personen, die ständig in Kontakt mit Schweinen stehen (Myers et al., 2007, Freidl et al., 2014).

1974 wurde das erste Mal die Übertragung von porcinem IAV auf den Menschen, einen 16-jährigen Hodgkin-Patienten, der auf einem Schweinebetrieb lebte, publiziert (Smith et al., 1976). 1976 verstarb ein Soldat der US-amerikanischen Armee in Fort Dix einen Tag nach dem Auftreten erster Krankheitsanzeichen. Vier seiner Kameraden erkrankten ebenfalls und kamen

ins Krankenhaus. Ursache der Erkrankung war ein porzines IAV, das eng verwandt zum H1N1 der Spanischen Grippe war. Dieses Virus wurde als A/New Jersey/1976(H1N1) bekannt. Über die Grenzen von Fort Dix kam dieses Virus jedoch nie hinaus. Eine Exposition gegenüber Schweinen ist nicht bekannt (Gaydos et al., 1977).

Myers et al. (2007) analysierten retrospektiv insgesamt 50 Publikationen von Übertragungen porziner IAV auf den Menschen weltweit. Die Fälle wurden aus den USA, Tschechien, Russland, Holland, der Schweiz, Kanada und Hong Kong berichtet. 60% der betroffenen Personen hatten vorherichtlich Kontakt zu Schweinen. Die Literaturrecherche ergab in den Jahren 1958 bis 2005 37 Erkrankungsfälle und weitere 13 bei Soldaten in Fort Dix, wobei es sich 1958 um sechs mit H1N1 infizierte Personen aus Tschechien handelte. Eine 40-jährige Laborantin hatte Kontakt zu Schweinen. Vermutlich fand eine Übertragung zwischen ihr und den fünf weiteren erkrankten Personen statt.

Freidl et al. (2014) führten im Rahmen der FLURISK-Initiative der European Food Safety Authority (EFSA) eine aktuelle Literaturrecherche durch, die insgesamt 396 natürliche Infektionen des Menschen mit porzinen IAV aufdeckten. Die meisten Übertragungen fanden auch hier durch Kontakt zu Schweinen statt und wieder entstand in keinem der Fälle eine stabile Infektkette von Mensch zu Mensch. Zusätzlich zu den bereits aufgezeigten Fällen von Myers et al. (2007) fanden die Autoren ab dem Jahr 2005 noch 14 weitere Studien mit weiteren 363 Fällen von SIV beim Menschen. Von den insgesamt 396 Erkrankungsfällen stammen elf aus Europa (Schweiz, Holland, Spanien), sechs aus Asien und alle weiteren aus Nordamerika. Bei den isolierten Virusstämmen handelte es sich um 47 H1N1, 2 H1N2, 7 H3N2 und 340 H3N2v (Dreifach-Reassortante Nordamerikas mit einem von pdmH1N1 stammenden Matrixgen), in Europa führten H1N1 und H3N2 zu Infektionen des Menschen. Die Fälle ereigneten sich in den Jahren 1974 bis 2013. Eine tabellarische Auflistung der Ereignisse mit jeweiliger Angabe der literarischen Quelle ist in der Veröffentlichung von Freidl et al. (2014) zu finden.

Auch in Deutschland, im Besonderen Niedersachsen, wurden fünf Fälle von porzinen Influenzavirusinfektionen beim Menschen dokumentiert (Buda et al., 2011). Das Nationale Referenzzentrum (NRZ) für Influenza am Robert-Koch-Institut (RKI) meldete zuletzt 2011 den Fall eines 18 Monate alten Jungen, der an Fieber und grippeähnlichen Symptomen erkrankte. Die Analyse einer Abstrichprobe ergab die Infektion mit einem porzinen H1N1. Eine Exposition gegenüber Schweinen konnte hier im elterlichen Betrieb ausfindig gemacht werden. Der Junge wurde nach wenigen Tagen Krankenhausaufenthalt wieder gesund. Im selben Jahr erkrankte in einem anderen Landkreis Niedersachsens ein 10-jähriger Junge. Ein porzines H1N2 konnte in diesem Falle isoliert werden. Auch hier waren alle acht Gensegmente eindeutig porzinen

Ursprungs. Die Eltern besaßen ebenfalls einen Schweinebetrieb. Ein 37-jähriger Mann infizierte sich 2010 mit einem porzinen H1N1. Der Mann unterzog sich einer Knochenmarkstransplantation und war daher immunsupprimiert. Eine Exposition gegenüber Schweinen ist diesem Falle nicht bekannt. 2007 wurden zudem ein Fall einer Infektion mit H1N1 und H3N2 porzinen Ursprungs bei Menschen in Niedersachsen gemeldet. Ob man von einer Häufung des Vorkommens von Schweineinfluenza beim Menschen in Niedersachsen sprechen kann ist schwer zu beurteilen. Zu berücksichtigen ist in jedem Falle die außerordentlich hohe Dichte von Schweinebetrieben in diesem Bundesland und damit die beruflich bedingte Exposition (Buda et al., 2011).

Im August 2011 wurde in den USA außerdem von zwei Kindern berichtet, die sich mit einem porzinen H3N2v infiziert hatten, dessen Matrixgen vom pdmH1N1 stammte. Es hatte also eine Reassortierung stattgefunden, die auf den Menschen übertragen werden konnte. Die Symptome verliefen mild und keines der Kinder musste ins Krankenhaus. Beide Kinder hatten Kontakt zu Schweinen (CDC, 2011). Bis zum Ende des Jahres erkrankten neun weitere Kinder und ein erwachsener Mann (CDC, 2012). Bis Ende 2015 wurden dann insgesamt 346 Fälle verzeichnet, davon einer mit tödlichem Ausgang (CDC, 2016). Sporadische Übertragungen des H3N2v von Mensch zu Mensch wurden dokumentiert.

Welche Voraussetzungen nötig sind, damit eine stabile Übertragung dieser Viren von Mensch zu Mensch möglich ist, ist bis heute nicht geklärt. Sicher ist aber, dass es sich um ein komplexes polygenetisches Geschehen handelt. Diese Lücken in unserem Wissen über die Biologie und Evolution der Influenzaviren belegt, wie wichtig die Überwachung der Dynamik dieser Viren in allen Populationen, einschließlich der Schweinepopulationen ist.

### **III. Publikation**

#### **Influenza A viruses detected in swine in Southern Germany after the H1N1 pandemic in 2009**

J. Pippig<sup>1</sup>, M. Ritzmann<sup>2</sup>, M. Büttner<sup>1</sup>, and A. Neubauer-Juric<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Bavarian Health and Food Safety Authority, Oberschleissheim, Germany,

<sup>2</sup>Clinic for Swine, Ludwig-Maximilians-Universität München, Oberschleissheim, Germany,

#### **Corresponding author:**

Antonie Neubauer-Juric

Bavarian Health and Food Safety Authority

Veterinaerstrasse 2

85764 Oberschleissheim

Germany

Phone: +49 913168085824

Fax: +49 913168085194

E-mail address: [antonie.neubauer-juric@lgl.bayern.de](mailto:antonie.neubauer-juric@lgl.bayern.de)

## Summary

Infections with Influenza A viruses (IAV) are highly prevalent in swine populations and stable cocirculation of at least three lineages has been well documented in European swine - till 2009. However, since the emergence of the human pandemic pdmH1N1 virus in 2009, that has been (re)introduced into individual swine herds worldwide, the situation has been changing. These variations in the respective IAV pools within pig populations are of major interest and the zoonotic potential of putative emerging viruses needs to be evaluated. As data on recent IAV in swine from Southern Germany were relatively sparse, the purpose of this study was to determine the major IAV subtypes actually present in this region. To this aim, from 2010 to 2013, 1,417 nasal swabs or lung tissue samples from pigs with respiratory disease were screened for IAV genomes. Overall in 130 holdings IAV genomes were detected by real time RT-PCR targeting the matrix protein gene. For further analyses, several PCR protocols were adapted to quickly subtype between H1, pdmH1, H3, N1, and N2 sequences. Taken together, cocirculation of the three stable European lineages of IAV was confirmed for Bavaria. H1N1 sequences were identified in 59, whereas H1N2 genomes were only diagnosed in 14, and H3N2 in 9 of the holdings analysed. However, pdmH1 in combination with N1 was detected in 2010, 2012, and 2013 confirming a presence, albeit in low prevalence, likewise pdmH1N2 reassortant viruses. Interestingly, individual cases of coinfections with more than one subtype were diagnosed. Partial genome sequences were determined and phylogenetic analyses performed. Clearly other than in the human population classically circulating IAV have not been displaced by pdmH1N1 in Bavarian swine. However, some interesting viruses were detected. Further surveillance of these viruses in the Bavarian pig population will be of major importance, to monitor future developments.

## Keywords

Influenza A virus, swine influenza, phylogeny, subtypes, pdmH1, Southern Germany

## Impacts:

- Influenza A viruses circulating in swine in Southern Germany between January 2010 and December 2013 were analysed
- pdmH1N1 reassortant and pdmH1N2 reassortant viruses were found in several independent occasions, but still avH1N1 is the predominant subtype.

- Occasionally coinfections and additional reassortant viruses were detected within Southern German pig populations underlining the importance of ongoing surveillance

## Introduction

Influenza A viruses (IAV) are feared for their zoonotic potential, their extraordinary genetic and antigenic variability, and the resulting capability to repeatedly cause devastating disease (Taubenberger & Kash, 2010). It has been known for many decades that IAV can be shared by different hosts including humans and pigs. However, direct transmission of IAV from swine to humans has only been noted sporadically, mostly resulting in self-limiting events. Human Influenza A viruses transmitted to the swine population seem to establish somewhat more frequent (Nelson *et al.*, 2012, Shu *et al.*, 2012, Vincent *et al.*, 2014, Zell *et al.*, 2013, Nelson & Vincent, 2015, Freidl *et al.*, 2014). Despite intense research, it is still hard to predict which combinations of genetic changes are required for successful virus interspecies transmissions and in consequence establishment of new virus lineages (Capua & Munoz, 2013, Kuntz-Simon & Madec, 2009).

IAV are primarily classified by their surface glycoproteins, the hemagglutinin (HA) and the neuraminidase (NA). 16 types of HA and 9 of NA can theoretically result in 144 antigenically distinct subtypes, whereof at least 110 have been isolated to date. Most of these were detected in the natural reservoir for IAV, namely wild aquatic birds (Taubenberger & Kash, 2010, Zell *et al.*, 2013). Recently, detection of novel Influenza like virus genomes were described from bats, represented by H17, H18, and N10, N11 (Wu *et al.*, 2014). Major hosts for IAV, other than the large reservoir of wild waterfowl, are domestic poultry and several mammalian species, such as pigs, horses, and humans (Taubenberger & Kash, 2010).

Swine influenza is one of the most prevalent respiratory diseases in pigs (Meiners *et al.*, 2014, Zell *et al.*, 2013). Three stable IAV genetic lineages circulate in Europe, which are distinct from their counterparts in North America and Asia (Brown, 2000, Kuntz-Simon & Madec, 2009, Vincent *et al.*, 2014, Kyriakis *et al.*, 2011). In 1979 avian H1N1 viruses were transmitted from wild ducks to pigs resulting in a new endemic reassortant, the 'avian-like' swine H1N1 (avH1N1) and replacing classical swine H1N1 (Pensaert *et al.*, 1981). This avH1N1 is still predominant in Europe (Kuntz-Simon & Madec, 2009, Simon *et al.*, 2014, Watson *et al.*, 2015). Subsequently, two more avH1N1 derivatives established: In 1984 the 'human-like' swine H3N2 (huH3N2) with the internal genes of the avH1N1 and the HA and NA of the human H3N2 'Hong Kong flu' virus (Castrucci *et al.*, 1993, Haesebrouck *et al.*, 1985, Simon *et al.*, 2014). In 1994 the 'human-like' swine H1N2 (huH1N2), involving a human H1N1 contributing the HA and another human virus from which it obtained the NA, yet genetically distinct from that of the huH3N2 described above. The other segments came from the avH1N1 (Brown, 2000, Kuntz-Simon & Madec, 2009). Occasionally, reassortants between those lineages or between IAVs and seasonal human

influenza viruses were found, however, no further spread of any of these viruses has been documented (Zell *et al.*, 2008, Kuntz-Simon & Madec, 2009, Zell *et al.*, 2013, Watson *et al.*, 2015). Furthermore, IAV of other subtypes have been isolated sporadically, but apparently, so far most of these viruses have not adapted to the European pig population (Kuntz-Simon & Madec, 2009, Simon *et al.*, 2014, Zell *et al.*, 2013).

In early April 2009 a new pandemic H1N1 virus emerged in Mexico and the USA (CDC, 2009) and reached Germany in April peaking in winter 2009 (Krause *et al.*, 2010). In summary, a quadruple complex reassortment gave rise to this pandemic virus: The NA and M protein are derived from the Eurasian avian-like swine H1N1, whereas the HA, NP, and NS proteins came from the classical swine H1N1, circulating in North America. The PB1 segment originated from the North American human H3N2 and the PB2 and PA from a North American avian H1N1 virus. Taken together, the most accepted phylogenetic hypothesis is that the pdmH1N1 arose through the reassortment of the Eurasian avH1N1 (NA + M) and the North American triple reassortant H1N2 (PB1 and PB2, PA, HA, NP, NS gene segments) (Garten *et al.*, 2009, Smith *et al.*, 2009). After emergence this new pdmH1N1 quickly jumped over from human to swine (Howden *et al.*, 2009, Vincent *et al.*, 2014) and rapidly numerous outbreaks in swine were reported worldwide, including Europe (Nelson *et al.*, 2012, Welsh *et al.*, 2010, Nelson & Vincent, 2015).

After multiple introduction events, to date this virus seems somewhat established within European countries. In the UK actually a replacement of the endemic avian like H1N1 took place (Simon *et al.*, 2014, Watson *et al.*, 2015). In addition, several new reassortant genotypes have been reported in European swine, further increasing the potential for evolution of IAV in swine (Simon *et al.*, 2014, Watson *et al.*, 2015). In Germany some cocirculation of pdmH1N1 with endemic viruses and particularly important, new reassortant pdmH1N2 within an apparently stable infection chain were observed (Harder *et al.*, 2013, Lange *et al.*, 2013, Starick *et al.*, 2012).

Adaptation of a “newly” transmitted influenza virus to pigs might take many years and also depend on regional circumstances such as overall pig density or size and type of holdings. In consequence, careful surveillance of subtypes and putative reassortants is absolutely necessary for several years after this transmission including a broad regional spectrum. Not only areas with high density pig populations such as for example Northwest Germany should be closely monitored, but also areas of low density pig populations such as Upper Bavaria. Especially, with regard to the potential zoonotic impact of new swine flu viruses to public health and the presently incomplete knowledge about IAV species barriers, continuous surveillance seems

imperative. In the current study swine IAV from Bavaria were analysed more closely over a four year period, subtypes determined, and selected sequences of hemagglutinin and neuraminidase encoding genes compared.

### **Materials and Methods**

**Samples.** Between January 2010 and end of December 2013 nasal swabs (n= 460) or lung tissue samples (n= 957) taken from pigs with respiratory disease, sent in either by field veterinarians or by pathologists of the Bavarian Health and Food Safety Authority for diagnosis of Influenza A virus infection, were included into this study.

**PCR analysis.** RNA was extracted from nasal swabs using the QIAamp® Viral RNA Mini Kit (Qiagen) and from tissue samples using the Rneasy® Mini Kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. IAV RNA was detected using a one-step real time RT-PCR targeting the matrix protein (M) gene based on the publication by Spackmann et al. (2002) but using the modified reverse primer IAV-M1.2.-R and protocols as described by Hoffmann et al. (2010).

To quickly distinguish between H1, H3, N1, or N2 containing subtypes two one-step multiplex real time RT-PCR assays, i.e. one triplex assay combining primers specific for sequences encoding for the matrix protein, for N1, and for N2, and one duplex assay combining detection and distinction between H1 and H3 encoding sequences were compiled. Primer sequences were chosen based on alignments (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) of the HA segments of at least 20 recent sequences from Germany and Southern Europe available from GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) and the NCBI Influenza Virus database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/FLU/Database/nph-select.cgi?go=database>). Information about primer sequences and real time RT-PCR protocols are given in table 1. If samples with lower genome load had to be analyzed (Quantification cycle (cq) values > 30 in the M gene real time RT-PCR) subtypes were distinguished via respective singleplex real time PCR formats to increase sensitivity. In addition, several conventional multiplex and singleplex RT-PCR assays were established. Amongst others a protocol adapted from information given by Nagarajan et al. (2010) was used (Table 2). One-step real time RT-PCR assays for specific detection of pdmH1 sequences were used as described by Hoffmann et al. (2010).

**Virus isolation.** If genome loads in samples were judged to be sufficient by real time RT PCR, virus was isolated using MDCK cells in 6 well plates, as described by Lange et al. (2009). If necessary, separation of subtypes within virus mixtures was attempted adding methocell to the overlay medium and isolating single plaques for maximally three rounds. Viral RNA extracted

from cell culture supernatants or isolated single plaques suspended in cell culture medium were then subjected to further analyses by RT-PCR, as described above.

**Sequence and phylogenetic analysis.** Selected IAV genomes directly from nasal swabs, lung tissues, or in some cases after virus isolation in MDCK cells were subjected to partial sequencing of hemagglutinin and neuraminidase encoding segments. IAV genomes chosen for sequence analysis were selected by genome loads as measured in the M gene specific real time RT-PCR (cq values  $\leq 25$ ) and also for coverage of a broad spectrum of IAV subtypes found in Southern Germany. For sequence analysis, amplicons were generated by conventional RT-PCR as summarized in table 3, with the exception of H1 sequence amplification that was done as listed in table 2. PCR products were directly purified from agarose gels using the QIAquick gel extraction kit (Qiagen). Sequences were determined using forward and reverse primers independently (Eurofins MWG Operon, Ebersberg). Sequence data were combined to consensus sequences using ClustalOmega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) and trimmed to equal length as indicated in the figure legends. Using BLAST search (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) closely related sequences from GenBank were identified in a first step. Other reference sequences were retrieved from the GISAID EPIFLU database (<http://platform.gisaid.org/>). In a second step identical sequences were identified and in the majority of cases reduced to one sequence to avoid the presentation of identical sequences within phylogenetic trees. Then sequence comparison was done with the ClustalOmega algorithm and phylogenetic trees were created employing the maximum likelihood, maximum parsimony, and neighbour joining methods using the MEGA 5.2 package (Tamura *et al.*, 2011). Each tree was generated at a consensus of 1000 bootstrap replicates. As results obtained with the different methods were comparable, phylogenetic trees generated by the maximum likelihood approach are shown exemplarily in figures 3 to 6.

**Nucleotide sequence accession numbers.** Influenza A virus sequences reported here have been deposited in the NCBI GenBank database under the accession numbers listed in table 4.

**Table 1: Information about real-time RT-PCRs, primer and probe sequences used in this study**

Real-time RT-PCR	primers and probes	Literature (if applicable)	final concentration in 25 $\mu$ l reaction
Triplex M, N1, and N2	M-F: 5'-AGATGAGTCTTCTAACCGAGGTCG-3' M-R: 5'-TGCAAAGACACTTTCCAGTCTCTG-3' M-probe: 5'-ROX-TCAGGCCCCCTCAAAGCCGA-BHQ2-3'  N1-F: 5'-AGRCCTTGYYTCTGGGTTGA-3' N1-R: 5'-ACCGTCTGGCCAAGACCA-3' N1-probe: 5'-FAM-ATYTGGACYAGYGGGAGCAGCAT-BHQ1-3'  N2-F: 5'-RCARGGRACCACRCTRGGAC-3' N2-R: 5'-ATGCAGCCATGCTTTTCCA-3' N2-probe: 5'-Cy5-CYAAATGAAATGGAACACCCAAYTCATTC-BBQ-3'	M-primer and probe (Hoffmann et al., 2010)  N1 primer and probe (Fereidouni et al., 2012)  Modified, N2 probe (Nagarajan et al., 2010)	0,2 $\mu$ M 0,2 $\mu$ M 0,06 $\mu$ M  1 $\mu$ M 1 $\mu$ M 0,12 $\mu$ M  0,5 $\mu$ M 0,5 $\mu$ M 0,2 $\mu$ M
Duplex H1 and H3	H1-F: 5'-TTCATTGAAGGRGGATGGAC-3' H1-R: 5'-GCWGCRARCCAGAMCC-3' H1-probe: 5'-YAK-CCATACCATCCATCTATCATTCC-BBQ-3' H3-F: 5'-CRACAGGRATGMGGAAT-3' H3-R: 5'-CTGAAACCR TACCARCCGT-3' H3-probe: 5'-FAM-CCARCCATTY TCTATGAAHCCTGCTATTGC-BBQ-3'		0,5 $\mu$ M 0,5 $\mu$ M 0,16 $\mu$ M 0,6 $\mu$ M 0,6 $\mu$ M 0,16 $\mu$ M

Amplification parameters for the Triplex M, N1, N2-PCR were: 50°C for 30 min; 95°C for 15 min and 45 cycles (94°C for 30 s, 56°C for 30 s, 72°C for 20 s) using the QuantiTect® Multiplex RT-PCR Kit (Qiagen).

Amplification parameters for the Duplex H1, H3 – PCR were: 50°C for 30 min; 94°C for 2 min and 45 cycles (94°C for 15 s, 50°C for 30 s, 68°C for 60 s) using the SuperScript® III One step RT PCR Kit (Invitrogen)

**Table 2: Information about conventional RT-PCRs and primer sequences used in this study**

RT-PCR	primers	Literature (if applicable)	final concentration in 25 $\mu$ l reaction	Amplicon size (bp)
Tetraplex M, H3, N1, and N2	M-F: 5'-AGATGAGTCTTCTAACCGAGGTCG-3' M-R: 5'-TGCAAAGACACTTCCAGTCTCTG-3'	M-primer (Hoffmann et al., 2010)	0,2 $\mu$ M 0,2 $\mu$ M	100
	H3-F: 5'-TGCTCCTCGRGGTACTTCA-3' H3-R: 5'-ATTCKCATCCCTGTYGCCA-3'	H3-primer modified after (Nagarajan et al., 2010)	0,2 $\mu$ M 0,2 $\mu$ M	211
	N1-F: 5'-GYAATGGTGTGGATAGGRAG-3' N1-R: 5'-ATGCTGCTCCCRCTAGYCCAG-3'	N1-primer (Nagarajan et al., 2010)	0,6 $\mu$ M 0,6 $\mu$ M	267
	N2-F: 5'-RCARGGRACCACRCTRGGAC-3' N2-R: 5'-ATGCAGCCATGCTTTTCCA-3'		0,4 $\mu$ M 0,4 $\mu$ M	169
H1	H1-F: 5'-ATGCTAACAAAYTCCACMGACACTGT-3' H1-R: 5'-TCCTGTCCATCCYCCTTCWATGAATCC-3'		0,2 $\mu$ M 0,2 $\mu$ M	1007

Amplification parameters for the Tetraplex M, H3, N1, N2 – PCR were: 50°C for 30 min; 95°C for 2 min and 45 cycles (95°C for 15 s, 50°C for 30 s, 68°C for 60 s), 68°C for 5 min, using the SuperScript® III One step RT PCR Kit (Invitrogen)

Amplification parameters for the H1–PCR were: 50°C for 30 min; 95°C for 2 min and 35 cycles (95°C for 60 s, 52°C for 30 s, 68°C for 60 s), 68°C for 5 min, using the SuperScript® III One step RT PCR Kit (Invitrogen)

**Table 3: Information about conventional RT-PCRs and primer sequences used for production of longer amplicates**

RT-PCR	primers	Literature (if applicable)	final concentration in 25 $\mu$ l reaction	Amplicon size (bp)
H3	H3-F: 5'-ATGCRGTGCCAAACGGAACGC-3' H3-R: 5'-CTGAAACCR TACCARCCGT-3'		0,4 $\mu$ M 0,4 $\mu$ M	1009
N1	N1-F: 5'-GYAATGGTGGTTGGATAGGRAG-3' N1-R: 5'-ACCGTCTGGCCAAGACCA-3'		0,6 $\mu$ M 0,6 $\mu$ M	320
N2	N2-F: 5'-AGAGAACCYTATGTRTCATGYG-3' N2-R: 5'-ATAAKTGGAADCAATGCTATAATC-3'		0,6 $\mu$ M 0,6 $\mu$ M	597

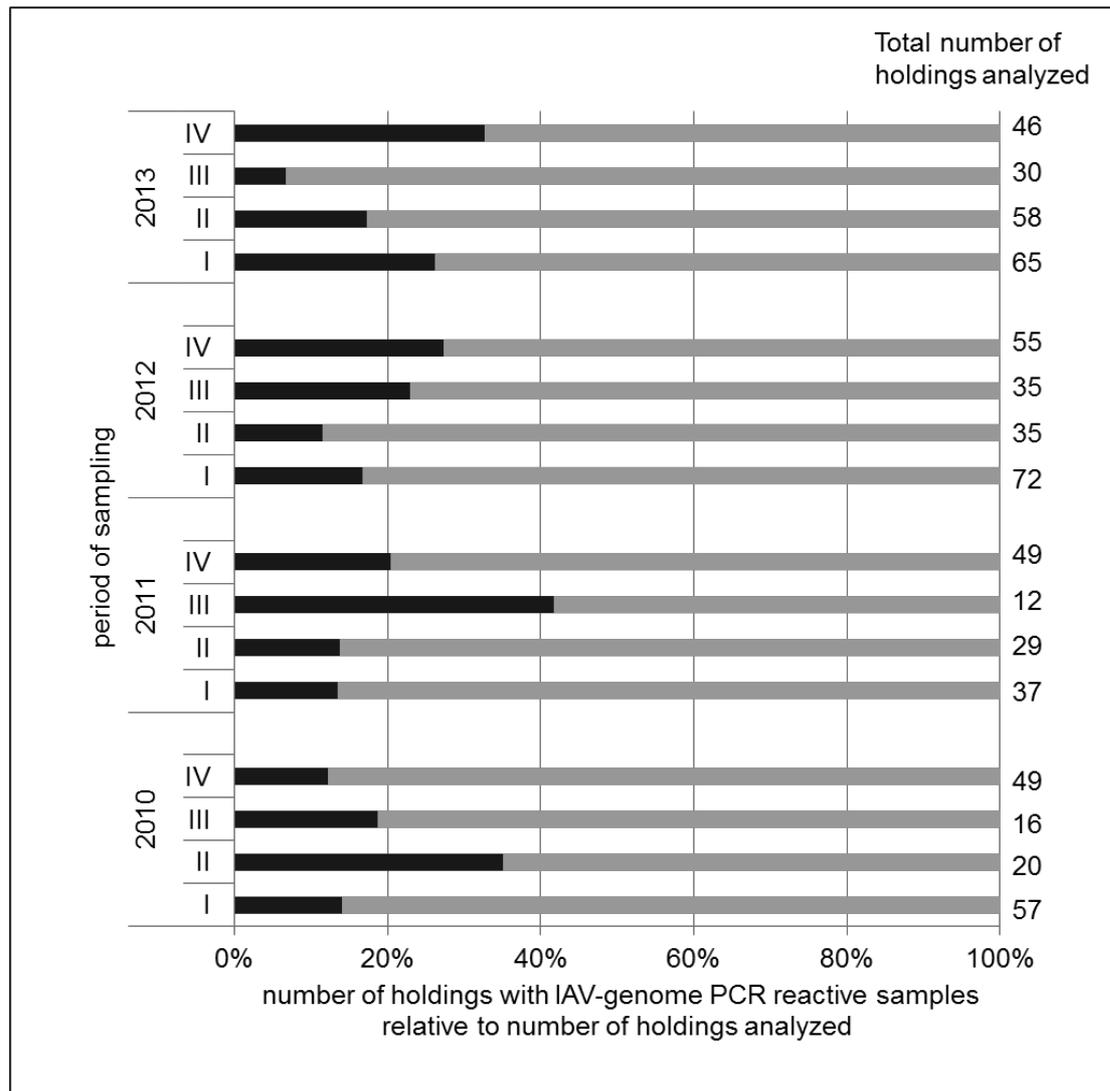
Amplification parameters for the individual PCRs were: 50°C for 30 min; 95°C for 2 min and 45 cycles (95°C for 15, X°C for 30 s, 68°C for 60 s), 68°C for 5 min, using the SuperScript III One step RT PCR Kit (Invitrogen). X°C: H3 – 53°C; N1 – 45°C; N2 – 48°C.

## Results

**Influenza A virus infections diagnosed in swine in Southern Germany:** Between January 2010 and December 2013, 1,417 samples from pigs stemming from 665 holdings from Southern Germany were screened for the presence of Influenza A virus (IAV) RNA by real time RT-PCR, targeting the M gene. These 460 nasal swabs and 957 lung samples were taken from animals presenting with clinical symptoms suggesting IAV infection, such as fever, respiratory problems on the one hand, or indicative lung pathology on the other hand.

The largest part of samples, namely from 94.6% of the holdings analysed, originated in regions in Southern Bavaria, in the administrative regions Swabia, Upper, and Lower Bavaria. Individual samples, however, came from the four Northern Bavarian administrative regions, from Baden Wuerttemberg, and from Hesse.

Out of these samples an overall of 19.3 % (n= 273) contained IAV RNA, indicating a good preselection of samples by influenza like symptoms or pathology. In figure 1 results are shown referring to holdings analysed and assigned to the respective quarters of the year. In tendency more samples were analysed in quarters 1 and 4 and no seasonality of IAV infection in swine can be inferred from this data.

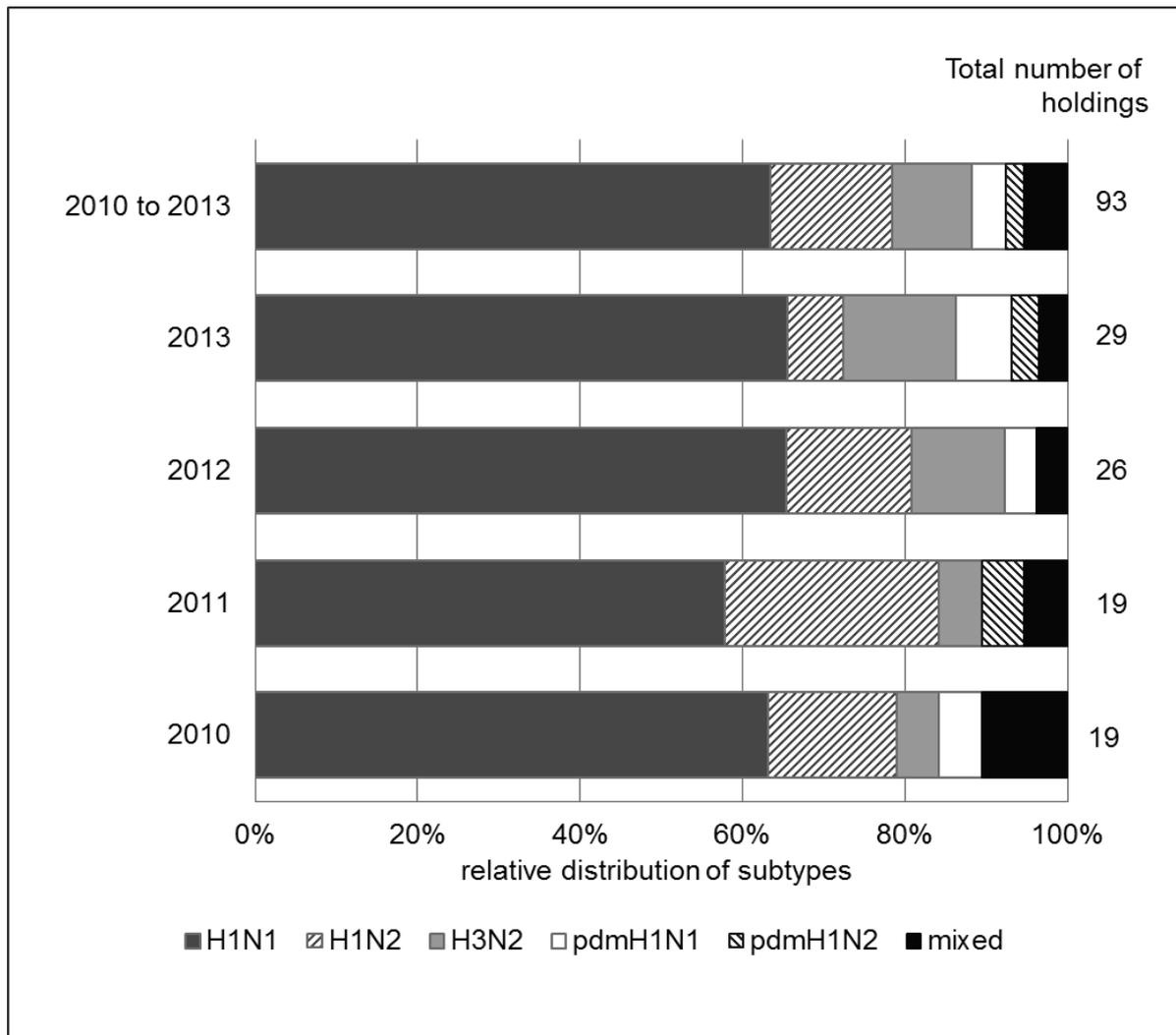


**Fig. 1: Influenza A virus genomes detected in samples from holdings preselected for the presence of respiratory disease**

Between January 2010 and December 2013 1.417 samples (460 nasal swabs and 957 lung samples) derived from pigs with respiratory symptoms from 665 holdings in Southern Germany were analyzed for the presence of Influenza A virus genomes by real time RT-PCR. The percentage of holdings with reactive samples is indicated in black relative to the overall number of holdings analyzed. Data is shown per quarter of the respective year. The total numbers of holdings included into analyses of respective quarters are given at the right.

The 273 reactive samples represent 130 holdings. Subtypes could be determined for 198 of these samples, corresponding to 93 holdings. The genome loads and/or RNA quality of the remaining samples were too low to allow further analyses. The distribution of subtypes relative to the year of sampling is given in figure 2. As expected, H1N1 was the most common subtype and was found in 63.4 % (n= 59) of the 93 holdings. Some variance in the relative detection rate between H1N2 and H3N2 occurred between the years. All together H1N2 was detected slightly more

often, namely in 14 holdings (15%), than H3N2, the latter being present in 9 of the 93 holdings analysed (9.7%). Virus genomes were classified as pdmH1N1 if in combination with N1 sequences pdmH1 sequences were detected using the specific PCR protocols described in Material and Methods. Following this criterion pdmH1N1 was detected in four holdings, in 2010 (n= 1), 2012 (n=1), and 2013 (n=2). Reassortant pdmH1N2, carrying the pdmH1 but not the respective N1, was detected as single event only in 2011 and 2013. In addition, in a few cases several subtypes were detected in parallel. Either different subtypes were found in samples taken at the same time but from different animals belonging to one holding (n=1) or results of individual samples indicated the presence of more than one subtype in one individual. These “mixed” infections were detected in every year during the study, albeit at low ratios, namely in one to two holdings per year. Interestingly, between 2010 and 2012 subtypes originating from mixed infections were constantly H1N1 in combination with H1N2, but in 2013 in one lung tissue sample sequences from H1, H1pdm, N1, and N2 were simultaneously detected. To enable further classification, individual viruses were isolated by plaque isolation in MDCK cells. The H1N1, pdmH1N1, and H1N2 plaque – isolates received from the mixed infection found in 2013 - were named A/swine/Bavaria/81031/2013(H1N1), /81032/2013(pdmH1N1), and /81033/2013(H1N2) and partial sequences were determined (Fig. 3; Fig. 5; Fig. 6).



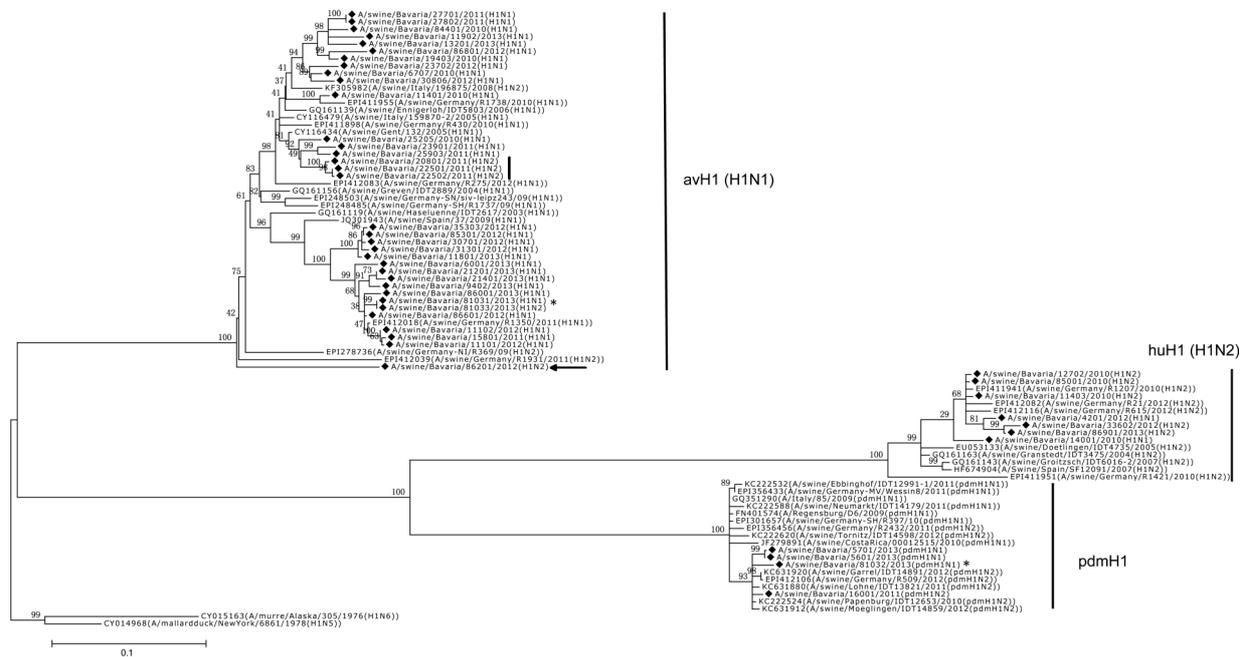
**Fig. 2: porcine IAV subtypes detected in samples collected between 2010 and 2013**

Influenza A virus genomes were subjected to further analyses for subtype determination, if genome loads had been sufficient, as described in the Material and Methods section. Subtypes are given associated to holdings. The distribution of individual subtypes is depicted per year and in total. The respective numbers of holdings analyzed are given. If within samples of one individual or over several samples of one holding more than one subtype was detected, the result is indicated as “mixed” infection.

### **Phylogenetic analysis of H1 of swine Influenza A virus genomes from Southern Germany:**

In total 45 partial sequences of the HA1 encoding region of selected H1N1, H1N2, and pdmH1 in combination with N1 or N2 were determined, clipped to 787 nucleotides, and used in phylogenetic analyses (Fig. 3). Usually for an infection event within one holding one sequence is given. Nevertheless, in the case of H1 two or more sequences are reported for seven holdings. This was done either because more than one subtype was diagnosed in one holding, such as A/swine/Bavaria/11401/2010(H1N1) and /11403/2010(H1N2) or

A/swine/Bavaria/81031/2013(H1N1), /81032/2013(pdmH1N1), and /81033/2013(H1N2), or in other cases because genetic variations of viruses within one holding were assessed.



**Fig. 3: Phylogenetic analysis of H1 hemagglutinin gene sequences of influenza A viruses detected in pigs in Southern German regions between 2010 to 2013.**

(a) The phylogenetic analysis of H1 sequences, based on alignments of nucleotides 163 to 949 (787nt) of the HA1 open reading frame, using the maximum likelihood method is given. A/murre/Alaska/305/1976 (H1N6) and A/mallardduck/NewYork/6861/1979 (H1N5) were used as outgroup sequences. Sequences determined in this study are indicated by diamonds. Genbank accession numbers are listed in table 4. Further sequences have been extracted from GenBank or the EpiFlu database, and accession numbers are indicated in the trees. Clustering information is given by assignments behind vertical bars. To improve resolution of the data sets avH1 (H1N1) sequences (b), huH1 (H1N2) sequences (c), and pdmH1 sequences (d) are depicted separately. Trees are drawn to scale as indicated by bars. (b) A/swine/Bavaria/20801/2011, /22501/2011, and /22502/2011 are marked by a vertical bar, A/swine/Bavaria/86201/2012 by an arrow, and A/swine/Bavaria/81031/2013 and /81033/2013 by a star (\*). (d) A/swine/Bavaria/81032/2013 is by a star (\*).

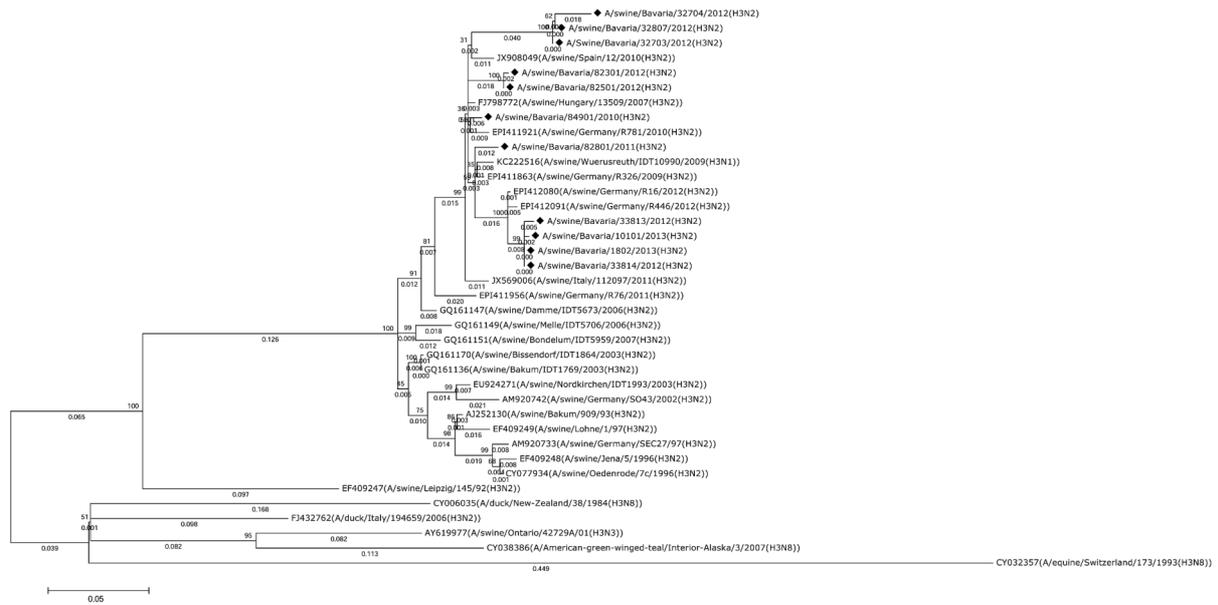
However, putative genetic variations occurring in virus genomes within one holding were negligible as shown for example for sequences A/swine/Bavaria/21201/2013(H1N1) and /21401/2013(H1N1), or for sequences A/swine/Bavaria/5601/2013(pdmH1N1) and /5701/2013(pdmH1N1).

In summary, as depicted in figure 3, all Bavarian H1 sequences correlated well to one of three main clusters, avH1 (H1N1), huH1 (H1N2), and pdmH1, that have been described for IAV

sequences from German swine (Harder et al., 2013, Lange et al., 2013). Most sequences determined stemmed from samples clearly containing either subtype H1N1 (n=28) or H1N2 (n=9) and correlated accordingly (Fig. 3). Interestingly the closely related A/swine/Bavaria/20801/2011, /22501/2011, and /22502/2011 (the latter two sequences originating from one holding) did not group together with huH1 but rather with avH1 sequences, although these H1 sequences had been detected in combination with N2 and were therefore subtyped as H1N2 (Fig. 3). In figure 3 these sequences are marked by an additional vertical bar. Also another H1N2, albeit slightly more distantly related, grouped to the avH1(H1N1) cluster. Namely A/swine/Bavaria/86201/2012 (figure 3, arrow), was found near sequences such as A/swine/Germany/R1931/2011(H1N2) or A/swine/Germany-N/R369/09(H1N2) (accession numbers are indicated in figure 3), clearly belonging to the avH1 cluster (Fig. 3).

Among the detected pdmH1 sequences only genome loads of A/swine/Bavaria/5601/2013(pdmH1N1), /5701/2013(pdmH1N1) (originating from one holding), and A/swine/Bavaria/16001/2011(pdmH1N2) allowed successful virus isolation and sequence analyses. As demonstrated in figure 3, all these pdmH1 sequences grouped together with sequences of “reassortant porcine pandemic strains” such as A/swine/Germany/R509/2012(pdmH1N2) and as defined by Harder et al. (2013).

In addition, selected isolates from mixed infections were analyzed in detail. This was done directly after amplification of viral sequences from organ material and if necessary after single plaque isolation in MDCK cells. Interestingly, while the H1 sequences of plaque isolates A/swine/Bavaria/81031/2013(H1N1) and /81033/2013(H1N2) were basically identical and grouped within the avian clade (Fig. 3, marked by \*), was the pdmH1 sequence of the corresponding third plaque isolate /81032/2013(pdmH1N1) clearly classified into the pdmH1 cluster of “reassortant porcine pandemic strains” (Fig. 3, marked by \*). Another mixed infection is represented by A/swine/Bavaria/11401/2010(H1N1), grouping within the avH1 cluster and by A/Bavaria/11403/2010(H1N2) belonging into the huH1 cluster.



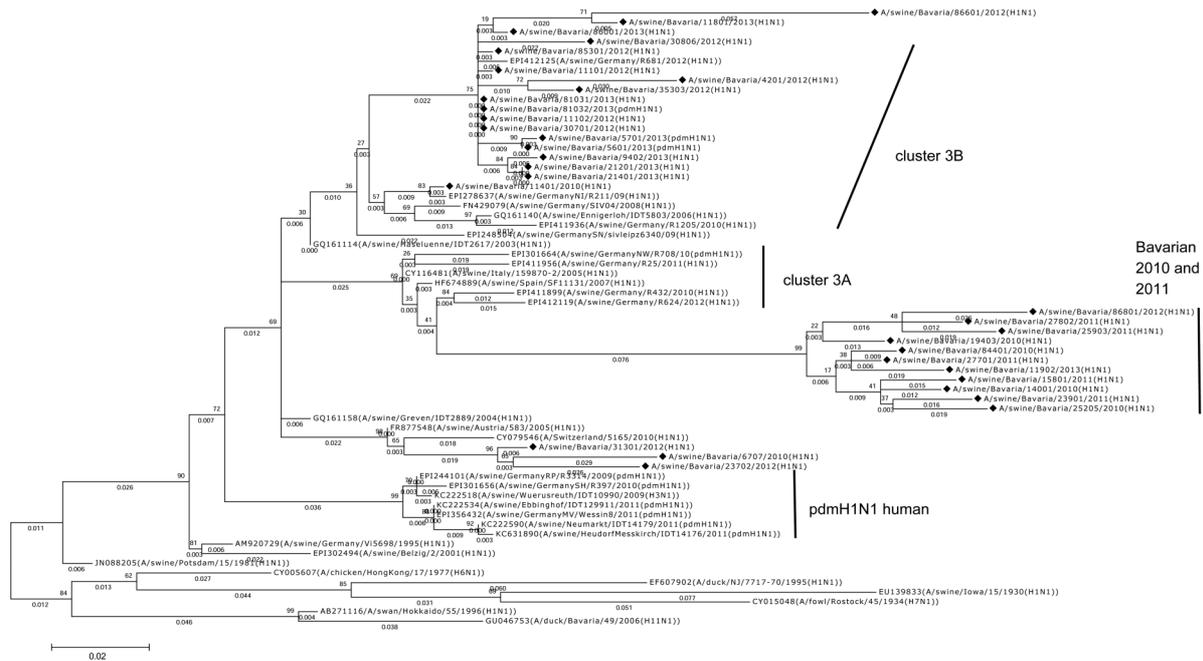
**Fig. 4: Phylogenetic analysis of H3 hemagglutinin gene sequences of influenza A viruses detected in pigs in Southern German regions between 2010 to 2013.**

The phylogenetic analysis of H3 sequences, based on alignments of nucleotides 155 to 1002 (848nt), using the maximum likelihood method is given. A/equine/Switzerland/173/1993(H3N8), A/American-green-winged-teal/Interior-Alaska/3/2007(H3N8), A/duck/Italy/194659/2006(H3N2) and A/duck/New-Zealand/38/1984(H3N8) were used as outgroup sequences. Sequences determined in this study are indicated by diamonds. GenBank accession numbers are listed in table 4. Further sequences have been extracted from GenBank or the EpiFlu database, and accession numbers are indicated in the trees. Trees are drawn to scale as indicated by bars.

### Phylogenetic analysis of H3 of swine Influenza A virus genomes from Southern Germany:

Recent H3 sequences from Germany have been shown to belong to a cluster slightly distant to other recent European swine H3 sequences (Harder et al., 2013). Within the frame of this study only nine distinct cases were diagnosed as H3N2 infection. For this reason only few Bavarian H3N2 sequences were determined, one sequence from 2010, one from 2011, ten sequences from 2012, the latter representing three distinct cases only. From another two cases in 2013 were three sequence data sets analyzed. As several of the 2012 and two of the 2013 sequences were identical over a stretch of 848 nucleotides, only seven (2012) and one example (2013) were used for phylogenetic analyses. Slight variations between sequences obtained from one holding are shown for some of these sequences analyzed from samples gained in 2012, such as A/swine/Bavaria/33813/2012 (H3N2) and /33814/2012 (H3N2). Results of phylogenetic analyses are depicted in figure 4, showing the close relationship between all Bavarian sequences analyzed.

**Phylogenetic analysis of N1 of swine Influenza A virus genomes from Southern Germany:** Partial N1 encoding sequences encompassing 309 nucleotides only could be compared. On this basis a total of 32 sequences were determined and included into the phylogenetic tree shown in figure 5. Harder et al (2013) reported clear clustering of N1 sequences when comparing full length NA sequences. Swine, avian derived N1 were separable into three clusters. Within these clusters the N1 sequences of the original pdmH1N1 genomes built a monophyletic clade (Harder et al., 2013). This clade is highlighted in figure 5 (vertical bar, pdmH1N1 human), albeit no Bavarian sequences could be added. A/swine/Germany/R3314/2009(pdmH1N1) is a representative of this clade and is found to be distinct to the Bavarian N1 (pdm) sequences (Fig. 5). Interestingly, the N1 partial sequences determined for Bavarian pdmH1N1 (A/swine/Bavaria/5601/2013, 5701/2013, 81032/2013) grouped together with sequences of a good portion of the more recent Bavarian N1 (H1N1), namely from 2012 and 2013, and together with sequences that belonged into porcine cluster 3B (figure 5, bar, cluster 3B) as defined by Harder et al. (2013). Taking into account the 309 nucleotides analyzed in this study, all but one (A/swine/Bavaria/6707/2010 (H1N1)) sequence derived in 2010 and 2011 were closely related with each other and separable to cluster 3A or 3B sequences (figure 5, bar). All these sequences that are marked in figure 5 with “Bavarian 2010 and 2011” were single representatives of cases and obtained from five different administrative regions of Bavaria.



**Fig. 5: Phylogenetic analysis of N1 neuraminidase gene sequences of influenza A viruses detected in pigs in Southern German regions between 2010 to 2013.**

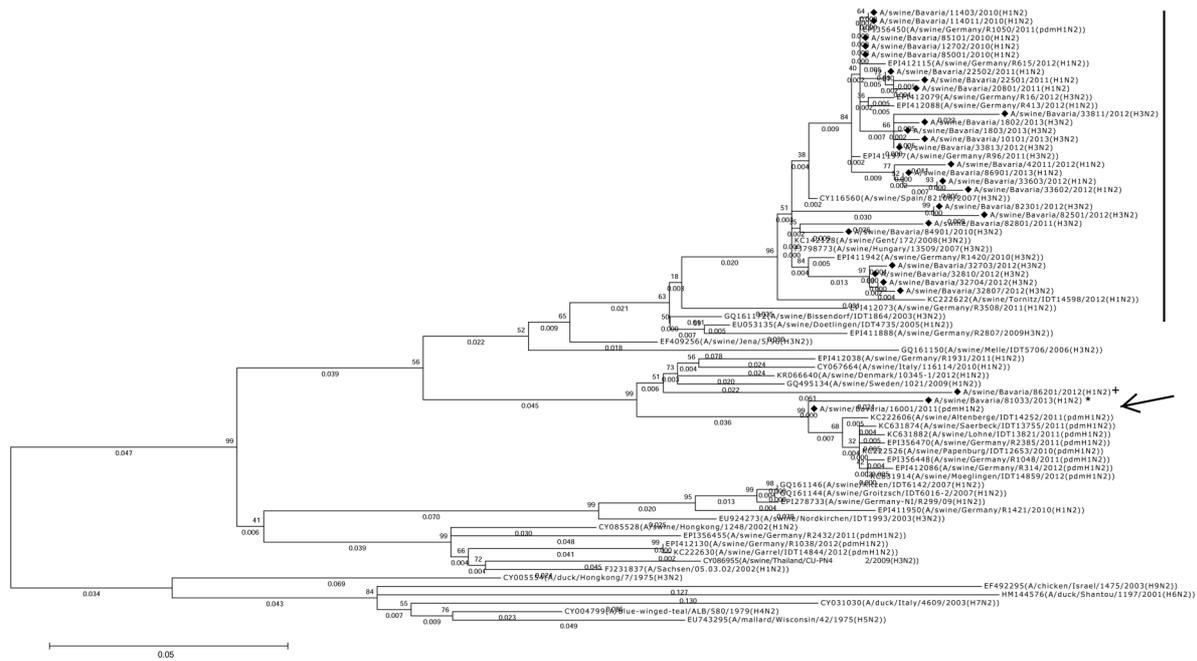
The phylogenetic analysis of N1 sequences, based on alignments of nucleotides 1065 to 1373 (309nt), using the maximum likelihood method is given. A/chicken/Hong-Kong/17/1977 (H6N1), A/duck/NJ/7717-70/1995 (H1N1), A/fowl/Rostock/45/1934 (H7N1), A/swan/Hokkaido/55/1996 (H1N1), and A/duck/Bavaria/49/2006 (H11N1) were used as outgroup sequences. Sequences determined in this study are indicated by diamonds. Clustering information is given by assignments behind vertical bars. GenBank accession numbers are listed in table 4. Further sequences have been extracted from GenBank or the EpiFlu database, and accession numbers are indicated in the trees. Trees are drawn to scale as indicated by bars.

**Phylogenetic analysis of N2 of swine Influenza A virus genomes from Southern Germany:**

Finally, N2 sequences of 475 nucleotides were compared and subjected to phylogenetic analysis. Results from 28 Bavarian sequences are depicted in figure 6. A clear distinction between the N2 of the A/swine/Bavaria/16001/2011(pdmH1N2) and most of the traditional Bavarian N2 from subtypes H1N2 and H3N2 is demonstrated. The pdmH1N2 /16001/2011 (marked by an arrow) is grouped with sequences such as A/swine/Germany/R1048/2011(pdmH1N2) that have been associated into a cluster 2 by Harder et al. (2013). Another previously reported cluster contains most recent, traditional HxN2 strains and is represented in figure 6 by sequences such as A/swine/Germany/R1050/2011(pdmH1N2) but also A/swine/Germany/R615/2011(H1N2), or A/swine/Germany/R96/2011(H3N2), and A/swine/Germany/R3508/2011(H1N2) (vertical bar). Most Bavarian sequences presented in this study group into this cluster, that was previously designated as cluster 3 (Harder et al., 2013). However, the N2 sequences obtained from plaque isolate A/swine/Bavaria/81033/2013(H1N2) (marked by \*) are closely related to

A/swine/Bavaria/16001/2011(pdmH1N2) and do not belong into cluster 3. A/swine/Bavaria/81033/2013(H1N2) resulted after single plaque isolation out of a mixed virus population propagated in MDCK cells from lung material of one animal. Finally, the genome of A/swine/Bavaria/86201/2012(H1N2) is exceptional since both the H1 and the N2 sequences were not associated with the expected groups or clusters. The H1 sequence was found related to the avH1 and not as expected to the huH1 cluster (Fig. 3) and in addition a closer association of the respective N2 sequences to that of the pdmH1N2 reassortant A/swine/Bavaria/16001/2011(pdmH1N2) was found, even closer than to traditional sequences sorted into cluster 3 (Fig. 6, marked by an +). Further analyses will be necessary to more clearly elucidate the genomic backbone of this virus.

In summary phylogenetic analysis of Bavarian H1, H3, N1, and N2 sequences allows concluding that traditional H1N1 strains are still predominant in the Bavarian pig population. However unusual combinations and genomic variants of swine IAV occur. These observations clearly demonstrate the importance of continuous surveillance to address the actual impact and fluctuation of these genome variants.



**Fig. 6: Phylogenetic analysis of N2 neuraminidase gene sequences of influenza A viruses detected in pigs in Southern German regions between 2010 to 2013.**

The phylogenetic analysis of N2 sequences, based on alignments of nucleotides 425 to 899 (475 nt), using the maximum likelihood method is given. Diverse sequences stemming from waterfowl, chicken, or human were used as outgroup sequences. Sequences determined in this study are indicated by diamonds. A/swine/Bavaria/16001/2011(pdmH1N2) is marked by an arrow, plaque isolate A/swine/Bavaria/81033/2013(H1N2) by a star (\*), and A/swine/Bavaria/86201/2012(H1N2) by a plus (+). GenBank accession numbers are listed in table 4. Further sequences have been extracted from GenBank or the EpiFlu database, and accession numbers are indicated in the trees. Trees are drawn to scale as indicated by bars.

## DISCUSSION

The recent human H1N1 pandemic starting in 2009 clearly opened our eyes. In subsequent years the interest into the actual epidemiology and evolution of Influenza A viruses in pig populations worldwide increased massively. Soon suspicions arose that a multitude of interspecies transmission events between pigs and humans might have passed unnoticed. Although the original source of the recent pandemic virus, pdmH1N1, and the circumstances of its emergence in 2009 have not yet been fully understood, the role of swine as putative “mixing vessels” and the interaction between swine and human and also avian IAVs came back into focus. Bavaria is the largest federal state of Germany situated in the South and possesses regions with high and with low pig density. Because for a very long time only sparse data were available regarding the presence of IAV subtypes in swine herds especially in regions of Southern Bavaria with low pig density, the aim of this study was to collect more information about IAV circulating

in these particular regions.

The initial characterization of 273 IAV sequences, sampled over a four year period, from 2010 till 2013, confirmed the dominance of the three well known European subtypes avH1N1, huH1N2, and huH3N2. These data were consistent with results of earlier and concurrent studies from Germany and Europe (Harder et al., 2013, Simon et al., 2014, Watson et al., 2015). European avH1N1 were found in about two-thirds of the subtyped samples, whereas the combinations H1N2 or H3N2 were diagnosed in considerably fewer cases. These findings also corroborate respective previous studies (Harder et al., 2013, Simon et al., 2014, Watson et al., 2015).

pdmH1 in combination with N1 was over a four year period detected in four holdings only, out of 130 holdings diagnosed with Influenza. As pdmH1 together with N1 was found once in 2012 and then twice in 2013 it can be deduced that these viruses might still be an issue. Interestingly, the presented pdmH1 and associated N1 sequences were definitely distant to the respective human pdmH1N1 sequences. Actual Bavarian pdmH1 sequences did cluster with sequences from porcine reassortant and not with standard pandemic strains (Figure 3); (Harder et al., 2013). Furthermore, the corresponding N1 sequences did cluster with recent sequences of “traditional” avH1N1 (Fig. 5) and not as could have been expected with sequences of cluster 3A encompassing sequences of porcine pdmH1N1 identified by Harder et al. (2013). These results might suggest that reassortment and possibly adaptation to the pig population of these individual porcine pdmH1N1 (reassortant) viruses took place. In any case, original, human pdmH1N1 viruses were not detected in the frame of this study. That the high susceptibility of swine for the original pdmH1N1 and putative high transmission rates (Lange et al., 2009) did not result in a fast replacement of the circulating IAV population in Bavaria, could be explained by preexisting cross-immunity between swine H1N1 and the original pdmH1N1 as has been reported before (Durrwald *et al.*, 2010, Kyriakis *et al.*, 2010). In addition pig population dynamics in Southern Bavaria might have influenced the outcome. In the present study single Bavarian samples only, stemming from 2011 and 2013, could be diagnosed as pdmH1N2 reassortants, if simply defined as pdmH1 sequences in combination with N2 sequences. Unfortunately low genome loads allowed further analyses only in one case. The detection of pdmH1 in combination with N2 is principally congruent with the results of previous studies (Harder et al., 2013, Lange et al., 2013, Starick et al., 2012, Starick *et al.*, 2011, Watson et al., 2015) but the incidence of pdmH1N2 reassortant infection in the present study is very low, lower than reported for the respective genotype R by Watson et al (2015) and certainly does not yet allow for an assumption about infection chains in Bavaria. Again, preexisting complex immunity to subtype components

(Durrwald et al., 2010, Kyriakis et al., 2010) and the low pig density in the respective regions could play a role and hinder the establishment of new viruses within the population.

Interestingly, parallel coinfections with different subtypes were detected in several cases, namely in one or two holdings per year. In most cases H1, N1, and N2 sequences were amplified and components confirmed by sequence analyses. In all cases coinfections were found in lung material from animals carrying multiple pathogens at the same time. Always bacterial infections were additionally diagnosed, indicating complex and prolonged infection events. Characterization of viral populations by isolating single plaques was conducted and allowed to verify the presence of H1N1 and H1N2 in the original samples. In 2013, interestingly, H1, pdmH1, N1, and N2 sequences were detected in one lung sample. Plaque purification led to isolation of H1N1, H1N2, and a pdmH1N1 reassortant (A/swine/Bavaria/81031 to 81033/2013). Repeated attempts to isolate other subtype combinations failed and were hampered by the predominance of H1N1 plaques. However, as shown in figure 6 the N2 sequences of the plaque purified H1N2 (A/swine/Bavaria/81033/2013) was closely related to N2 sequences of the Bavarian pdmH1N2 reassortant (fig 6, \*), initiating for this particular case further speculations: The artificial process of plaque separation might have led to isolation of new reassortant viruses in MDCK cells, generated off the original gene pool. A putative original pdmH1N2 reassortant might have recombined in the presence of H1N1 to a pdmH1N1 reassortant, whereas simultaneously an additional H1N2 combination arose. These plaque purified viruses might therefore not reflect the subtype combinations originally infecting the animal but rather events generated in cell culture. Importantly though, whether in the animal or in MDCK cells, the high potential for recombination in these coinfection scenarios is clearly demonstrated.

With only few exceptions, such as for example A/swine/Germany-NI/R369/09(H1N2), A/swine/Germany/R1931/2011(H1N2), A/swine/Italy/196875/2008(H1N2), A/swine/Bavaria/14001/2010(H1N1), A/swine/Bavaria/86201/2012(H1N2), or A/swine/Bavaria/22501/2011(H1N2)), H1 sequence built clear groups, either assignable to huH1, to avH1, or to pdmH1 (Fig. 3). Exceptions appear particular interesting and will be more thoroughly characterized in follow up analyses. Particularly, the genome of A/swine/Bavaria/86201/2012(H1N2) is exceptional in as much as not only the H1 but also the N2 sequences showed unusual features: A proximity to the respective N2 sequences of the pdmH1N2 reassortant A/swine/Bavaria/16001/2011(pdmH1N2) was found, combined with distance to the into cluster 3 sorted “traditional” Bavarian sequences (Fig. 6, marked by +). Complete genome analyses of these viruses genomes will be addressed in future studies.

N1 sequences analyzed in this study separated into several subgroups. For example, N1

sequences of the human pdmH1N1 genomes built a monophyletic clade, a reported before (Harder et al., 2013). Interestingly, a new albeit slight fissure was demonstrated between Bavarian sequences of the years 2010 and 11 and sequences sorted into the previously described clusters 3A and 3B. However, with the exception of one sequence, namely, A/swine/Bavaria/86801/2012(H1N1), no sequences from 2012 or 2013 are found in this Bavarian 2010 and 2011 group, putatively indicating temporal and maybe some geographical aspects. Geographical aspects would then mean a distinction between more Southern and more Northern German sequences as the 2010 and 2011 Bavarian sequences grouping together in this analysis stemmed from multiple administrative regions over Bavaria.

Sequences of N2 from H1N2 and H3N2 seemed to cluster nearly homogenously again on the basis of geographical and temporal aspects. N2 from the Bavarian pdmH1N2 reassortant A/swine/Bavaria/16001/2011 and the putative pdmH1-N2, A/swine/Bavaria/81033/2013 (H1N2) + A/swine/Bavaria/81032/2013 (pdmH1N1) as has been discussed above, formed one monophyletic group possibly picking up their N2 from other Eurasian H3N2 viruses as Starick et al.(2012) demonstrated before.

Taken together a year-round and wide spread cocirculation of at least three stable lineages of Influenza A viruses in swine, namely mostly avH1N1, but also huH1N2, and huH3N2 was confirmed. In addition evidence, albeit infrequent, for pdmH1N1 or pdmH1N2 reassortant infections was noted in Southern Bavaria. However, these pdmH1Nx reassortants and also further and apparently distinct H1N1 and H1N2 viruses do warrant increased attention and ongoing surveillance is definitely needed.

**Table 4: Assignment of GenBank accession number for Bavarian sequences determined**

isolate	segment	GenBank accession number
A/swine/Bavaria/6707/2010(H1N1)	4	KU320682
A/swine/Bavaria/14001/2010(H1N1)	4	KU320683
A/swine/Bavaria/19403/2010(H1N1)	4	KU320684
A/swine/Bavaria/25205/2010(H1N1)	4	KU320685
A/swine/Bavaria/84401/2010(H1N1)	4	KU320686
A/swine/Bavaria/15801/2011(H1N1)	4	KU320687
A/swine/Bavaria/23901/2011(H1N1)	4	KU320688
A/swine/Bavaria/25903/2011(H1N1)	4	KU320689
A/swine/Bavaria/27701/2011(H1N1)	4	KU320690
A/swine/Bavaria/27802/2011(H1N1)	4	KU320691
A/swine/Bavaria/11101/2012(H1N1)	4	KU320692

A/swine/Bavaria/11102/2012(H1N1)	4	KU320693
A/swine/Bavaria/23702/2012(H1N1)	4	KU320694
A/swine/Bavaria/30701/2012(H1N1)	4	KU320695
A/swine/Bavaria/31301/2012(H1N1)	4	KU320696
A/swine/Bavaria/30806/2012(H1N1)	4	KU320697
A/swine/Bavaria/35303/2012(H1N1)	4	KU320698
A/swine/Bavaria/85301/2012(H1N1)	4	KU320699
A/swine/Bavaria/86601/2012(H1N1)	4	KU320700
A/swine/Bavaria/86801/2012(H1N1)	4	KU320701
A/swine/Bavaria/6001/2013(H1N1)	4	KU320702
A/swine/Bavaria/9402/2013(H1N1)	4	KU320703
A/swine/Bavaria/11801/2013(H1N1)	4	KU320704
A/swine/Bavaria/11902/2013(H1N1)	4	KU320705
A/swine/Bavaria/13201/2013(H1N1)	4	KU320706
A/swine/Bavaria/21201/2013(H1N1)	4	KU320707
A/swine/Bavaria/21401/2013(H1N1)	4	KU320708
A/swine/Bavaria/86001/2013(H1N1)	4	KU320709
A/swine/Bavaria/5601/2013(H1N1)	4	KU320710
A/swine/Bavaria/5701/2013(H1N1)	4	KU320711
A/swine/Bavaria/11401/2010(H1N1)	4	KU320712
A/swine/Bavaria/4201/2012(H1N1)	4	KU320713
A/swine/Bavaria/81031/2013(H1N1)	4	KU320714
A/swine/Bavaria/81032/2013(H1N1)	4	KU320715
A/swine/Bavaria/81033/2013(H1N2)	4	KU320716
A/swine/Bavaria/16001/2011(H1N2)	4	KU320717
A/swine/Bavaria/11403/2010(H1N2)	4	KU320718
A/swine/Bavaria/12702/2010(H1N2)	4	KU320719
A/swine/Bavaria/85001/2010(H1N2)	4	KU320720
A/swine/Bavaria/20801/2011(H1N2)	4	KU320721
A/swine/Bavaria/22501/2011(H1N2)	4	KU320722
A/swine/Bavaria/22502/2011(H1N2)	4	KU320723
A/swine/Bavaria/33602/2012(H1N2)	4	KU320724
A/swine/Bavaria/86201/2012(H1N2)	4	KU320725
A/swine/Bavaria/86901/2013(H1N2)	4	KU320726
A/swine/Bavaria/84901/2010(H3N2)	4	KU320727
A/swine/Bavaria/82801/2011(H3N2)	4	KU320728
A/swine/Bavaria/82301/2012(H3N2)	4	KU320729
A/swine/Bavaria/82501/2012(H3N2)	4	KU320730
A/swine/Bavaria/32703/2012(H3N2)	4	KU320731

A/swine/Bavaria/32704/2012(H3N2)	4	KU320732
A/swine/Bavaria/32807/2012(H3N2)	4	KU320733
A/swine/Bavaria/33813/2012(H3N2)	4	KU320734
A/swine/Bavaria/33814/2012(H3N2)	4	KU320735
A/swine/Bavaria/1802/2013(H3N2)	4	KU320736
A/swine/Bavaria/10101/2013(H3N2)	4	KU320737
A/swine/Bavaria/6707/2010(H1N1)	6	KU320738
A/swine/Bavaria/14001/2010(H1N1)	6	KU320739
A/swine/Bavaria/19403/2010(H1N1)	6	KU320740
A/swine/Bavaria/25205/2010(H1N1)	6	KU320741
A/swine/Bavaria/84401/2010(H1N1)	6	KU320742
A/swine/Bavaria/15801/2011(H1N1)	6	KU320743
A/swine/Bavaria/23901/2011(H1N1)	6	KU320744
A/swine/Bavaria/25903/2011(H1N1)	6	KU320745
A/swine/Bavaria/27701/2011(H1N1)	6	KU320746
A/swine/Bavaria/27802/2011(H1N1)	6	KU320747
A/swine/Bavaria/11101/2012(H1N1)	6	KU320748
A/swine/Bavaria/11102/2012(H1N1)	6	KU320749
A/swine/Bavaria/23702/2012(H1N1)	6	KU320750
A/swine/Bavaria/30701/2012(H1N1)	6	KU320751
A/swine/Bavaria/31301/2012(H1N1)	6	KU320752
A/swine/Bavaria/30806/2012(H1N1)	6	KU320753
A/swine/Bavaria/35303/2012(H1N1)	6	KU320754
A/swine/Bavaria/85301/2012(H1N1)	6	KU320755
A/swine/Bavaria/86601/2012(H1N1)	6	KU320756
A/swine/Bavaria/86801/2012(H1N1)	6	KU320757
A/swine/Bavaria/9402/2013(H1N1)	6	KU320758
A/swine/Bavaria/11801/2013(H1N1)	6	KU320759
A/swine/Bavaria/11902/2013(H1N1)	6	KU320760
A/swine/Bavaria/21201/2013(H1N1)	6	KU320761
A/swine/Bavaria/21401/2013(H1N1)	6	KU320762
A/swine/Bavaria/86001/2013(H1N1)	6	KU320763
A/swine/Bavaria/5601/2013(H1N1)	6	KU320764
A/swine/Bavaria/5701/2013(H1N1)	6	KU320765
A/swine/Bavaria/11401/2010(H1N1)	6	KU320766
A/swine/Bavaria/4201/2012(H1N1)	6	KU320767
A/swine/Bavaria/81031/2013(H1N1)	6	KU320768
A/swine/Bavaria/81032/2013(H1N1)	6	KU320769
A/swine/Bavaria/114011/2010(H1N2)	6	KU320770

A/swine/Bavaria/42011/2012(H1N2)	6	KU320771
A/swine/Bavaria/81033/2013(H1N2)	6	KU320772
A/swine/Bavaria/16001/2011(H1N2)	6	KU320773
A/swine/Bavaria/11403/2010(H1N2)	6	KU320774
A/swine/Bavaria/12702/2010(H1N2)	6	KU320775
A/swine/Bavaria/85001/2010(H1N2)	6	KU320776
A/swine/Bavaria/85101/2010(H1N2)	6	KU320777
A/swine/Bavaria/20801/2011(H1N2)	6	KU320778
A/swine/Bavaria/22501/2011(H1N2)	6	KU320779
A/swine/Bavaria/22502/2011(H1N2)	6	KU320780
A/swine/Bavaria/33602/2012(H1N2)	6	KU320781
A/swine/Bavaria/33603/2012(H1N2)	6	KU320782
A/swine/Bavaria/86201/2012(H1N2)	6	KU320783
A/swine/Bavaria/86901/2013(H1N2)	6	KU320784
A/swine/Bavaria/84901/2010(H3N2)	6	KU320785
A/swine/Bavaria/82801/2011(H3N2)	6	KU320786
A/swine/Bavaria/82301/2012(H3N2)	6	KU320787
A/swine/Bavaria/82501/2012(H3N2)	6	KU320788
A/swine/Bavaria/32703/2012(H3N2)	6	KU320789
A/swine/Bavaria/32704/2012(H3N2)	6	KU320790
A/swine/Bavaria/32807/2012(H3N2)	6	KU320791
A/swine/Bavaria/32810/2012(H3N2)	6	KU320792
A/swine/Bavaria/33811/2012(H3N2)	6	KU320793
A/swine/Bavaria/33813/2012(H3N2)	6	KU320794
A/swine/Bavaria/1802/2013(H3N2)	6	KU320795
A/swine/Bavaria/1803/2013(H3N2)	6	KU320796
A/swine/Bavaria/10101/2013(H3N2)	6	KU320797

### Acknowledgements

We thank Isabella Dzijan for excellent technical assistance and Dr. Robert Fux, Ludwig-Maximilians-University Munich for support with interesting samples. Special thanks to all the veterinarians in the field and to our pathologists for supplying additional samples to this study.

### References

Brown, I. H., 2000: The epidemiology and evolution of influenza viruses in pigs. *Veterinary microbiology*, **74**, 29-46.

- Capua, I. and O. Munoz, 2013: Emergence of influenza viruses with zoonotic potential: open issues which need to be addressed. A review. *Veterinary microbiology*, **165**, 7-12.
- Castrucci, M. R., I. Donatelli, L. Sidoli, G. Barigazzi, Y. Kawaoka and R. G. Webster, 1993: Genetic reassortment between avian and human influenza A viruses in Italian pigs. *Virology*, **193**, 503-506.
- CDC, 2009: Swine influenza A (H1N1) infection in two children--Southern California, March-April 2009. *MMWR. Morbidity and mortality weekly report*, **58**, 400-402.
- Durrwald, R., A. Krumbholz, S. Baumgarte, M. Schlegel, T. W. Vahlenkamp, H. J. Selbitz, P. Wutzler and R. Zell, 2010: Swine influenza A vaccines, pandemic (H1N1) 2009 virus, and cross-reactivity. *Emerging infectious diseases*, **16**, 1029-1030.
- Freidl, G. S., A. Meijer, E. de Bruin, M. de Nardi, O. Munoz, I. Capua, A. C. Breed, K. Harris, A. Hill, R. Kosmider, J. Banks, S. von Dobschuetz, K. Stark, B. Wieland, K. Stevens, S. van der Werf, V. Enouf, K. van der Meulen, K. Van Reeth, G. Dauphin and M. Koopmans, 2014: Influenza at the animal-human interface: a review of the literature for virological evidence of human infection with swine or avian influenza viruses other than A(H5N1). *Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*, **19**.
- Garten, R. J., C. T. Davis, C. A. Russell, B. Shu, S. Lindstrom, A. Balish, W. M. Sessions, X. Xu, E. Skepner, V. Deyde, M. Okomo-Adhiambo, L. Gubareva, J. Barnes, C. B. Smith, S. L. Emery, M. J. Hillman, P. Rivailier, J. Smagala, M. de Graaf, D. F. Burke, R. A. Fouchier, C. Pappas, C. M. Alpuche-Aranda, H. Lopez-Gatell, H. Olivera, I. Lopez, C. A. Myers, D. Faix, P. J. Blair, C. Yu, K. M. Keene, P. D. Dotson, Jr., D. Boxrud, A. R. Sambol, S. H. Abid, K. St George, T. Bannerman, A. L. Moore, D. J. Stringer, P. Blevins, G. J. Demmler-Harrison, M. Ginsberg, P. Kriner, S. Waterman, S. Smole, H. F. Guevara, E. A. Belongia, P. A. Clark, S. T. Beatrice, R. Donis, J. Katz, L. Finelli, C. B. Bridges, M. Shaw, D. B. Jernigan, T. M. Uyeki, D. J. Smith, A. I. Klimov and N. J. Cox, 2009: Antigenic and genetic characteristics of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza viruses circulating in humans. *Science*, **325**, 197-201.
- Haesebrouck, F., P. Biront, M. B. Pensaert and J. Leunen, 1985: Epizootics of respiratory tract disease in swine in Belgium due to H3N2 influenza virus and experimental reproduction of disease. *American journal of veterinary research*, **46**, 1926-1928.
- Harder, T. C., E. Grosse Beilage, E. Lange, C. Meiners, S. Dohring, S. Pesch, T. Noe, C. Grund, M. Beer and E. Starick, 2013: Expanded cocirculation of stable subtypes, emerging

- lineages, and new sporadic reassortants of porcine influenza viruses in swine populations in Northwest Germany. *Journal of virology*, **87**, 10460-10476.
- Hoffmann, B., T. Harder, E. Lange, D. Kalthoff, I. Reimann, C. Grund, R. Oehme, T. W. Vahlenkamp and M. Beer, 2010: New real-time reverse transcriptase polymerase chain reactions facilitate detection and differentiation of novel A/H1N1 influenza virus in porcine and human samples. *Berliner und Munchener tierarztliche Wochenschrift*, **123**, 286-292.
- Howden, K. J., E. J. Brockhoff, F. D. Caya, L. J. McLeod, M. Lavoie, J. D. Ing, J. M. Bystrom, S. Alexandersen, J. M. Pasick, Y. Berhane, M. E. Morrison, J. M. Keenliside, S. Laurendeau and E. B. Rohonczy, 2009: An investigation into human pandemic influenza virus (H1N1) 2009 on an Alberta swine farm. *The Canadian veterinary journal. La revue veterinaire canadienne*, **50**, 1153-1161.
- Krause, G., A. Gilsdorf, J. Becker, K. Bradt, C. Dreweck, B. Gartner, J. Lower, A. Marcic, A. Nicoll, E. Pott, L. Schaade, A. Schoeller, V. Stollorz, C. Trader and O. Razum, 2010: [First exchange of experiences concerning the H1N1 pandemic in Germany 2009/2010: report on a workshop held March 22-23, 2010, in Berlin]. *Bundesgesundheitsblatt, Gesundheitsforschung, Gesundheitsschutz*, **53**, 510-519.
- Kuntz-Simon, G. and F. Madec, 2009: Genetic and antigenic evolution of swine influenza viruses in Europe and evaluation of their zoonotic potential. *Zoonoses and public health*, **56**, 310-325.
- Kyriakis, C. S., I. H. Brown, E. Foni, G. Kuntz-Simon, J. Maldonado, F. Madec, S. C. Essen, C. Chiapponi and K. Van Reeth, 2011: Virological surveillance and preliminary antigenic characterization of influenza viruses in pigs in five European countries from 2006 to 2008. *Zoonoses and public health*, **58**, 93-101.
- Kyriakis, C. S., C. W. Olsen, S. Carman, I. H. Brown, S. M. Brookes, J. V. Doorselaere and K. V. Reeth, 2010: Serologic cross-reactivity with pandemic (H1N1) 2009 virus in pigs, Europe. *Emerging infectious diseases*, **16**, 96-99.
- Lange, E., D. Kalthoff, U. Blohm, J. P. Teifke, A. Breithaupt, C. Maresch, E. Starick, S. Fereidouni, B. Hoffmann, T. C. Mettenleiter, M. Beer and T. W. Vahlenkamp, 2009: Pathogenesis and transmission of the novel swine-origin influenza virus A/H1N1 after experimental infection of pigs. *The Journal of general virology*, **90**, 2119-2123.
- Lange, J., M. Groth, M. Schlegel, A. Krumbholz, K. Wiczorek, R. Ulrich, S. Koppen, K. Schulz, D. Appl, H. J. Selbitz, A. Sauerbrei, M. Platzer, R. Zell and R. Durrwald, 2013:

- Reassortants of the pandemic (H1N1) 2009 virus and establishment of a novel porcine H1N2 influenza virus, lineage in Germany. *Veterinary microbiology*, **167**, 345-356.
- Meiners, C., S. Loesken, S. Doehring, E. Starick, S. Pesch, A. Maas, T. Noe, M. Beer, T. Harder and E. Grosse Beilage, 2014: Field study on swine influenza virus (SIV) infection in weaner pigs and sows. *Tierärztliche Praxis. Ausgabe G, Grosstiere/Nutztiere*, **42**, 351-359.
- Nagarajan, M. M., G. Simard, D. Longtin and C. Simard, 2010: Single-step multiplex conventional and real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays for simultaneous detection and subtype differentiation of Influenza A virus in swine. *Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*, **22**, 402-408.
- Nelson, M. I., M. R. Gramer, A. L. Vincent and E. C. Holmes, 2012: Global transmission of influenza viruses from humans to swine. *The Journal of general virology*, **93**, 2195-2203.
- Nelson, M. I. and A. L. Vincent, 2015: Reverse zoonosis of influenza to swine: new perspectives on the human-animal interface. *Trends in microbiology*, **23**, 142-153.
- Pensaert, M., K. Ottis, J. Vandeputte, M. M. Kaplan and P. A. Bachmann, 1981: Evidence for the natural transmission of influenza A virus from wild ducks to swine and its potential importance for man. *Bulletin of the World Health Organization*, **59**, 75-78.
- Shu, B., R. Garten, S. Emery, A. Balish, L. Cooper, W. Sessions, V. Deyde, C. Smith, L. Berman, A. Klimov, S. Lindstrom and X. Xu, 2012: Genetic analysis and antigenic characterization of swine origin influenza viruses isolated from humans in the United States, 1990-2010. *Virology*, **422**, 151-160.
- Simon, G., L. E. Larsen, R. Durrwald, E. Foni, T. Harder, K. Van Reeth, I. Markowska-Daniel, S. M. Reid, A. Dan, J. Maldonado, A. Huovilainen, C. Billinis, I. Davidson, M. Agüero, T. Vila, S. Herve, S. O. Breum, C. Chiapponi, K. Urbaniak, C. S. Kyriakis, I. H. Brown and W. Loeffen, 2014: European surveillance network for influenza in pigs: surveillance programs, diagnostic tools and Swine influenza virus subtypes identified in 14 European countries from 2010 to 2013. *PloS one*, **9**, e115815.
- Smith, G. J., D. Vijaykrishna, J. Bahl, S. J. Lycett, M. Worobey, O. G. Pybus, S. K. Ma, C. L. Cheung, J. Raghvani, S. Bhatt, J. S. Peiris, Y. Guan and A. Rambaut, 2009: Origins and evolutionary genomics of the 2009 swine-origin H1N1 influenza A epidemic. *Nature*, **459**, 1122-1125.
- Spackman, E., D. A. Senne, T. J. Myers, L. L. Bulaga, L. P. Garber, M. L. Perdue, K. Lohman, L. T. Daum and D. L. Suarez, 2002: Development of a real-time reverse transcriptase

- PCR assay for type A influenza virus and the avian H5 and H7 hemagglutinin subtypes. *Journal of clinical microbiology*, **40**, 3256-3260.
- Starick, E., E. Lange, S. Fereidouni, C. Bunzenthall, R. Hoveler, A. Kuczka, E. grosse Beilage, H. P. Hamann, I. Klingelhofer, D. Steinhauer, T. Vahlenkamp, M. Beer and T. Harder, 2011: Reassorted pandemic (H1N1) 2009 influenza A virus discovered from pigs in Germany. *The Journal of general virology*, **92**, 1184-1188.
- Starick, E., E. Lange, C. Grund, E. Grosse Beilage, S. Dohring, A. Maas, T. Noe, M. Beer and T. C. Harder, 2012: Reassortants of pandemic influenza A virus H1N1/2009 and endemic porcine HxN2 viruses emerge in swine populations in Germany. *The Journal of general virology*, **93**, 1658-1663.
- Tamura, K., D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei and S. Kumar, 2011: MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular biology and evolution*, **28**, 2731-2739.
- Taubenberger, J. K. and J. C. Kash, 2010: Influenza virus evolution, host adaptation, and pandemic formation. *Cell host & microbe*, **7**, 440-451.
- Vincent, A., L. Awada, I. Brown, H. Chen, F. Claes, G. Dauphin, R. Donis, M. Culhane, K. Hamilton, N. Lewis, E. Mumford, T. Nguyen, S. Parchariyanon, J. Pasick, G. Pavade, A. Pereda, M. Peiris, T. Saito, S. Swenson, K. Van Reeth, R. Webby, F. Wong and J. Ciacci-Zanella, 2014: Review of influenza A virus in swine worldwide: a call for increased surveillance and research. *Zoonoses and public health*, **61**, 4-17.
- Watson, S. J., P. Langat, S. M. Reid, T. T. Lam, M. Cotten, M. Kelly, K. Van Reeth, Y. Qiu, G. Simon, E. Bonin, E. Foni, C. Chiapponi, L. Larsen, C. Hjulsager, I. Markowska-Daniel, K. Urbaniak, R. Durrwald, M. Schlegel, A. Huovilainen, I. Davidson, A. Dan, W. Loeffen, S. Edwards, M. Bublot, T. Vila, J. Maldonado, L. Valls, I. H. Brown, O. G. Pybus and P. Kellam, 2015: Molecular Epidemiology and Evolution of Influenza Viruses Circulating within European Swine between 2009 and 2013. *Journal of virology*.
- Welsh, M. D., P. M. Baird, M. P. Guelbenzu-Gonzalo, A. Hanna, S. M. Reid, S. Essen, C. Russell, S. Thomas, L. Barrass, F. McNeilly, J. McKillen, D. Todd, V. Harkin, S. McDowell, B. Choudhury, R. M. Irvine, J. Borobia, J. Grant and I. H. Brown, 2010: Initial incursion of pandemic (H1N1) 2009 influenza A virus into European pigs. *The Veterinary record*, **166**, 642-645.
- Wu, Y., B. Tefsen, Y. Shi and G. F. Gao, 2014: Bat-derived influenza-like viruses H17N10 and H18N11. *Trends in microbiology*, **22**, 183-191.

- Zell, R., S. Motzke, A. Krumbholz, P. Wutzler, V. Herwig and R. Durrwald, 2008: Novel reassortant of swine influenza H1N2 virus in Germany. *The Journal of general virology*, **89**, 271-276.
- Zell, R., C. Scholtissek and S. Ludwig, 2013: Genetics, evolution, and the zoonotic capacity of European Swine influenza viruses. *Current topics in microbiology and immunology*, **370**, 29-55.

## IV. Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Daten über das aktuelle Vorkommen der verschiedenen Subtypen porciner Influenza-A-Viren (IAV) im südbayerischen Raum zu gewinnen. Ein besonderes Augenmerk lag auf dem Nachweis des pdmH1N1 und neuer Reassortanten, da durch die humane Pandemie im Jahr 2009 und nachfolgenden Berichten über Einträge des auslösenden Virus, pdmH1N1, in die Schweinepopulationen mit einer geänderten Infektionslage auch dort zu rechnen war. Daher wurden zwischen 2010 und 2013 Proben von mit Influenza-Symptomatik erkrankten und verendeten Schweinen mittels verschiedener PCR-Methoden untersucht. Um eine schnelle Subtypisierung der Proben zu gewährleisten wurden zunächst multiplex-PCR-Systeme etabliert. Die anschließende Teilsequenzierung des Hämagglutinin- und Neuraminidase-Gensegments einiger interessanter Isolate und die darauf folgende phylogenetische Analyse sollte Aufschluss über Verwandtschaftsverhältnisse bringen. Da weitergehende Sequenzanalysen direkt aus Probenmaterial nicht immer möglich waren, wurde zusätzlich nach einem optimierten System für die Isolierung porciner IAV gesucht und die Eigenschaften verschiedener Zelllinien vergleichend getestet.

### 1. Methoden für den Nachweis und die Subtypisierung porciner IAV

Aufgrund des schnellen Krankheitsverlaufs und der raschen Ausbreitung der porcinen IAV-Infektionen, hat die PCR in der Diagnostik deutlich an Bedeutung gewonnen. Auch die genetische Komplexität der porcinen IAV erfordert PCR-Protokolle, die eine spezifische und sensitive Subtypisierung und damit epidemiologische Überwachung ermöglichen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden daher verschiedene PCR-Protokolle etabliert oder den aktuellen epidemiologischen Voraussetzungen angepasst.

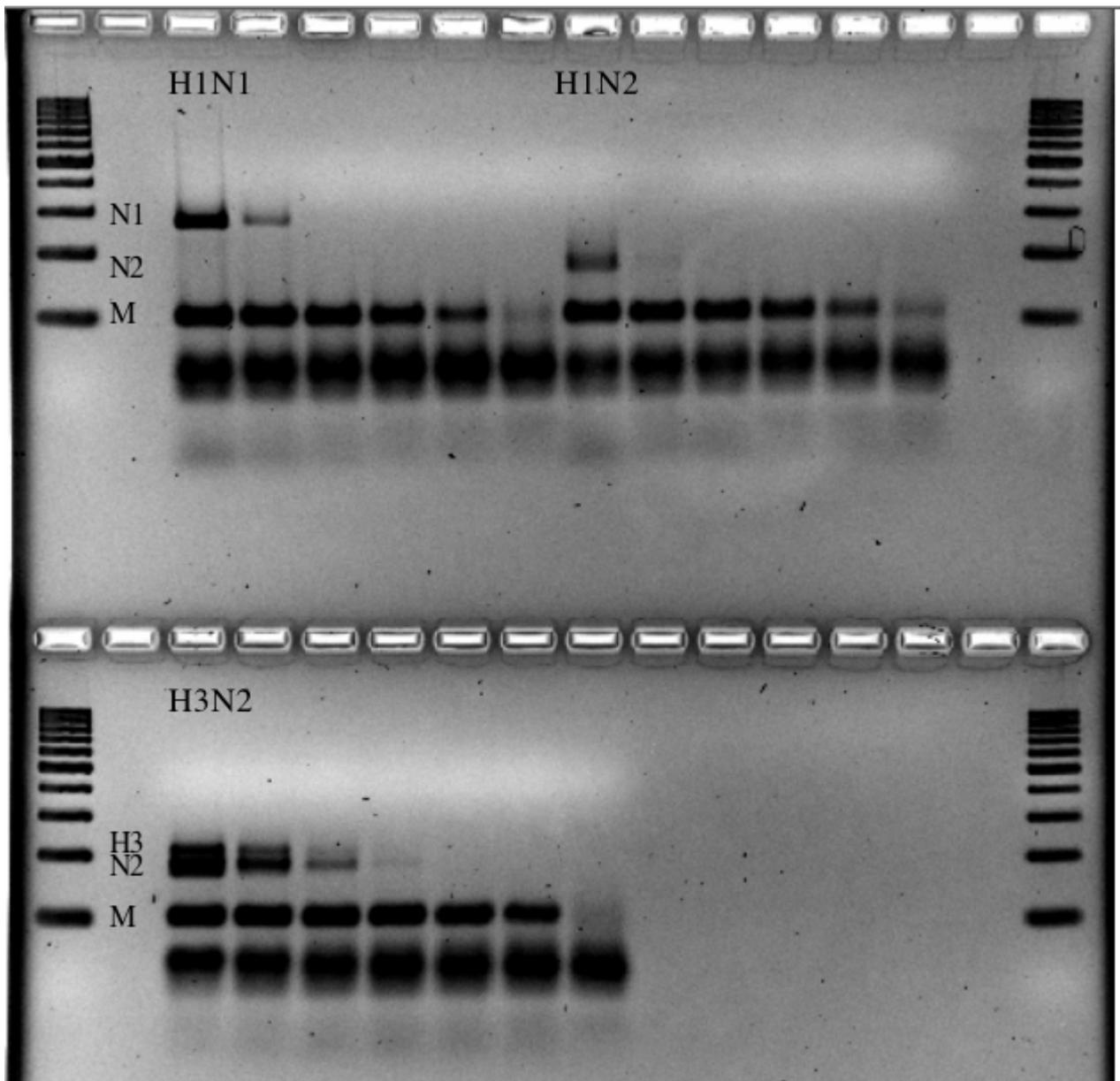
#### 1.1. Konventionelle tetraplex RT-PCR

In Anlehnung an die Publikation von Nagarajan et al. (2010) war ein Ziel dieser Arbeit die Etablierung einer konventionellen „one-step pentaplex RT-PCR“. Da sich Nagarajan et al. (2010) jedoch mit dem Nachweis nordamerikanischer porciner IAV beschäftigten, mussten die Primersequenzen an die im Süddeutschen Raum primär zu erwartenden IAV Sequenzen angepasst werden. (siehe Table 2 der Publikation Pippig et al., 2016). In das Primerdesign

wurden verschiedene Kriterien einbezogen. Die Schmelztemperatur aller Primerpaare sollte eng beieinander und möglichst zwischen 55°C und 60°C liegen, um eine für alle Primer geeignete Annealingtemperatur bestimmen zu können. Der G/C-Gehalt sollte 40%-60% betragen. Einzelne Basenwiederholungen von mehr als drei und interne Sekundärstrukturen, wie sogenannte "hair pins" sollten vermieden werden. Es sollten möglichst wenige degenerierte Basen, sogenannte "wobbles" enthalten sein. Überprüft wurden die entwickelten Primer mit Hilfe des Programms Primer3 Input (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/primer3/>). Da es nicht gelang, eine pentaplex RT-PCR zu entwickeln, bei der auch die H1-Amplifikation reproduzierbar funktionierte, musste schließlich auf diese Komponente verzichtet werden. Es entstand also eine konventionelle tetraplex RT-PCR für den Nachweis von für M-, N1, N2 und H3 kodierenden Sequenzen. Die konventionelle H1-RT-PCR wurde als singleplex PCR etabliert. Gründe für Schwierigkeiten in der Integration der H1-RT-PCR könnten in unspezifischen Interaktionen zwischen den gewählten Primern liegen, die nicht vorher berechenbar waren. Die tetraplex RT-PCR wurde mit verschiedenen kommerziellen RT-PCR Kits und jeweils mit Temperaturgradienten ausgetestet. Der Zusatz von DMSO und Magnesiumsulfat in weiteren Konzentrationen erbrachte aber keine deutlichen Vorteile. Die resultierenden Konditionen für die PCR sind ebenfalls aus Table 2 der Publikation ersichtlich.

Alle IAV Genom enthaltenden Proben durchliefen das etablierte PCR-Protokoll. Es konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass es geeignet war, zuverlässig direkt aus Organmaterial, Nasentupfern, Allantoisflüssigkeit und Zellkulturüberstand die einzelnen Komponenten zu detektieren. Die Spezifität der PCR erwies sich als sehr gut. Mischinfektionen konnten zuverlässig identifiziert werden. Die etablierte PCR eignet sich jedoch nur für Proben mit einem ausreichenden hohen Genom-Gehalt von einem in der Matrixgen-spezifischen real-time RT-PCR gemessenen Cq- bis höchstens 30. Insgesamt ist die in der vorliegenden Arbeit beschriebene konventionelle tetraplex-RT-PCR für die schnelle, initiale Subtypisierung porziner IAV gut geeignet. Für Probenmaterial mit geringerer IAV-Genomlast oder schlechter RNA-Qualität muss jedoch auf singleplex-PCRs mit höherer Sensitivität zurückgegriffen werden.

Aus Abbildung 4 ist die vergleichende Sensitivität der tetraplex RT-PCR für die einzelnen Komponenten ersichtlich.

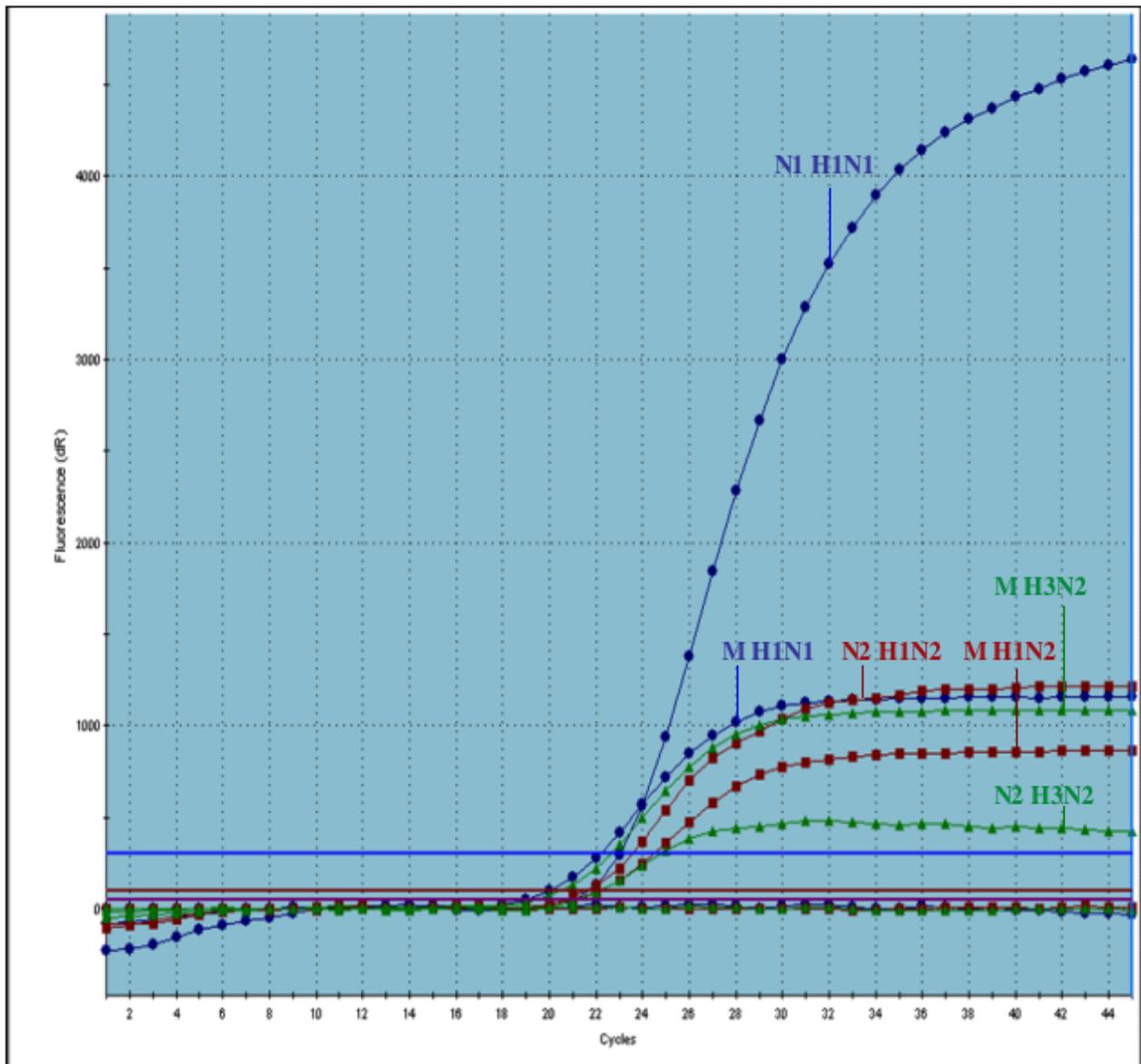


**Abb. 4:** Auftrennung der Amplifikate über Agarosegelelektrophorese (2%iges): Die nach der one-step tetraplex RT-PCR erhaltenen DNA-Amplifikate wurden über Agarosegelelektrophorese nach Größe aufgetrennt. Dargestellt sind die Ergebnisse für je ein H1N1, H1N2 und H3N2 in einer dezimalen Verdünnungsreihe bis zur Stufe  $10^{-5}$ , die spezifischen Banden lassen sich anhand der Beschriftung links zuordnen.

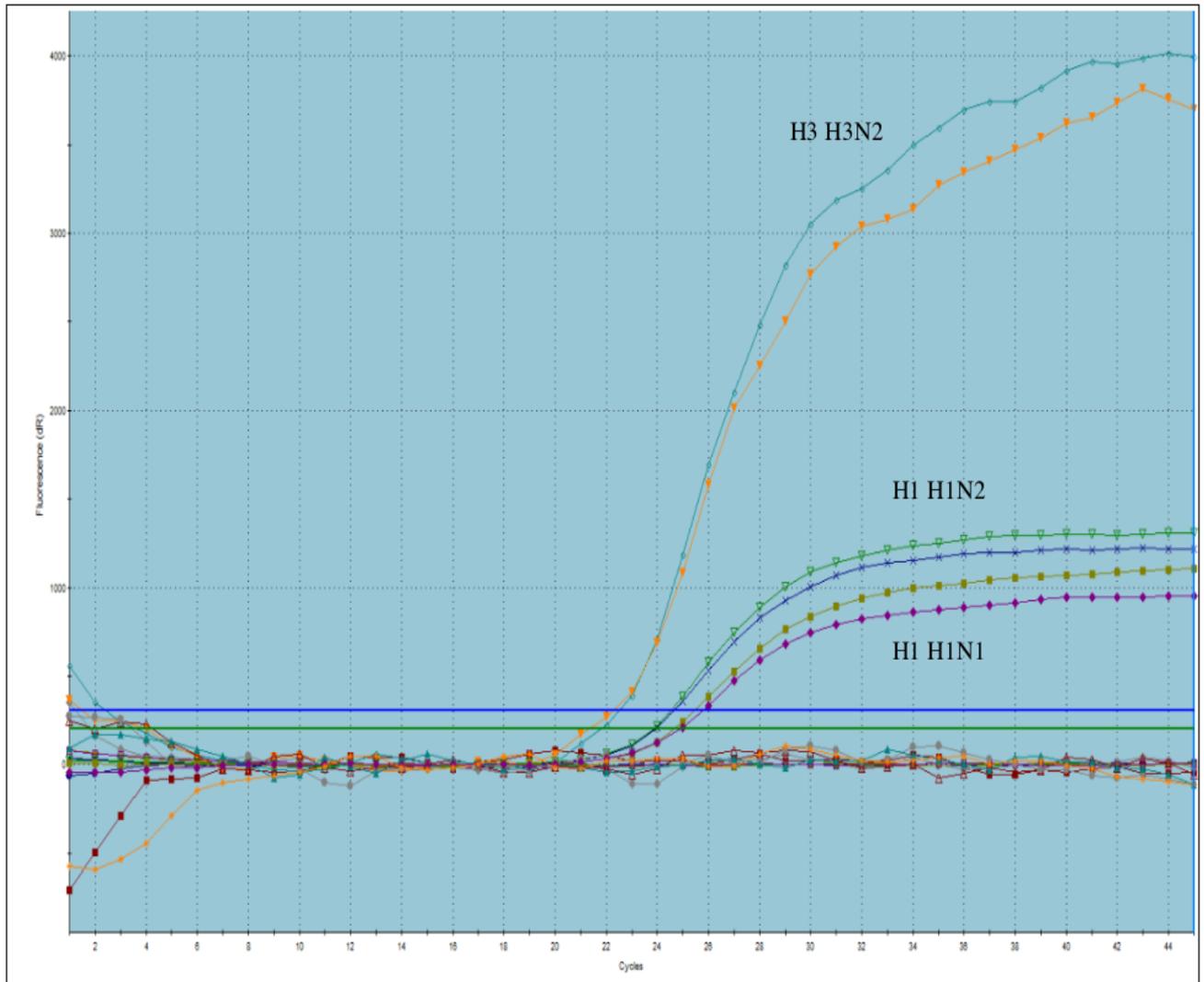
#### 1.2. Triplex und duplex real-time RT-PCR

Ein weiteres Ziel der Arbeit war die Etablierung einer multiplex real time RT-PCR zur schnellen Subtyp-Einordnung der porzinen IAV Sequenzen. Wiederum diente das PCR-Protokoll der real-

time tetraplex RT-PCR-1 von Nagarajan et al. (2010) als Orientierung. Primer und Sonden mussten wiederum für süddeutsche Sequenzen optimiert werden. Für den Nachweis der M- und der N1-Sequenzen wurde auf bereits etablierte und veröffentlichte Protokolle zurückgegriffen (siehe Table 1 der Publikation Pippig et al., 2016). Für die N2-Komponente konnte die Sonde durch einige Modifikationen angepasst werden. N2-spezifische Primersequenzen mussten jedoch neu gewählt werden, ebenso wie die Sequenzen der Primer und Sonden für H3 und H1. Für das Primerdesign wurden weitestgehend dieselben Kriterien zugrunde gelegt, wie für die konventionelle PCR beschrieben. Zudem sollten die PCR-Produkte eine Größe von 150bp nicht überschreiten. Die Länge der Sonden wurde zwischen 20 und 30 Basen gewählt. Das 5'-Ende der Sonden sollte möglichst nicht weiter als 60 Basen vom 3'Ende des betreffenden Primers liegen. Die Schmelztemperatur der Primer sollte 5-10°C unter der der Sonde liegen, was im Falle der PCRs der vorliegenden Arbeit nicht immer realisiert werden konnte. Schließlich muss ausgeschlossen werden, dass eine Komplementarität zwischen den Primern und Sonden besteht.



**Abb. 5:** Darstellung der Amplifikationskurven auf einem MXpro3005 q PCR-System, Agilent, für je ein H1N1, H1N2 und H3N2 Genom in der one-step triplex real-time RT-PCR.



**Abb. 6:** Darstellung der Amplifikationskurven auf einem MXpro3005 q PCR-System, Agilent, für je ein H1N1, H1N2 und H3N2 Genom in der one-step duplex real-time RT-PCR.

Die H1 und H3 Sequenz Amplifikation war nicht optimal in die multiplex RT-PCR integrierbar und wurden daher als zusätzliche duplex real time RT-PCR etabliert. In einer Reihe von Experimenten wurden die RT-PCR Bedingungen ausgetestet und optimiert. Die finalen PCR-Protokolle sind in Table 1 der Publikation dargestellt.

Auch die real time RT-PCR Protokolle erwiesen sich als hoch spezifisch und bedingt sensitiv. Probenmaterial mit einem Cq von mehr als 30 in der Matrixgen-spezifischen real-time RT-PCR waren nicht mehr sicher subtypisierbar und wurden daher in entsprechenden Singleplex-Ansätzen untersucht.

Durch Literaturrecherche wurde zum Zeitpunkt der Arbeiten keine vergleichbare multiplex PCR-Methodik zur Subtypisierung deutscher oder europäischer porziner IAV gefunden. Gall et al. typisierten porzine IAV mittels konventioneller pan-HA PCRs (Gall et al., 2008) und pan-NA PCRs mit anschließender Teilsequenzierung der prozessierten Amplifikate. Die Sequenzen werden mit bereits vorhandenen Sequenzen in Datenbanken verglichen und auf diese Weise typisiert (Harder et al., 2013). Diese Verfahren sind zeitaufwendig und kostenintensiv. Alternativ wird mittels konventioneller singleplex-PCRs typisiert (Simon et al., 2014), was ebenfalls material- und zeitaufwendig ist und darüber hinaus mehr Probenmaterial benötigt. In Abbildung 5 und 6 sind die Amplifikationskurven je eines Vertreters von H1N1, H1N2 und H3N2 in der triplex und duplex real-time PCR dargestellt.

### 1.3. Singleplex RT-PCR-Methoden

Alle Proben wurden zunächst auf die Präsenz porziner IAV-Genome mittels Matrixgen-spezifischer real-time RT-PCR nach Spackman et al. (2002), modifiziert nach Hoffmann et al. (2010), untersucht. Zur Detektion der Sequenzen des pandemischen H1 dienten die PCR-Protokolle nach Hoffmann et al. (2010).

Alle Primer und Sonden aus den oben aufgeführten multiplex real-time RT-PCR Protokollen wurden zur Typisierung von Proben mit geringer Genomlast, zur Erhöhung der Sensitivität, als singleplex RT-PCRs eingesetzt. Die N1-spezifische real-time RT-PCR wurde nach Fereidouni et al. (2012) durchgeführt. Die H1- und N2-spezifischen real-time PCRs konnten in einem Ansatz durchgeführt werden, da das Temperaturprofil für beide identisch ist: 30min bei 50°C, 2min 94°C, gefolgt von 45 Zyklen mit je 15sec 94°C, 30sec 50°C und 60sec bei 68°C. Für beide Protokolle wurde das SuperScript®III One-Step RT-PCR Kit verwendet. Für die singleplex H3-spezifische real-time RT-PCR hingegen wurde das QuantiTect®Multiplex RT-PCR NR Kit zu den gleichen Konditionen wie in der triplex real-time RT-PCR benutzt.

Im Laufe der Etablierung der konventionellen tetraplex PCR wurden weitere Primersequenzen und Kombinationen ausgetestet, die sich teilweise auch für zusätzliche singleplex RT-PCRs eignen. Sie kamen während der Typisierungsarbeit jedoch nur selten zum Einsatz und werden daher nicht näher beschrieben.

#### 1.4. Isolierung und Vermehrung von porcinen IAV in Zellkultur-Systemen

Auch die Virusisolierung über Zellkultur ist nach wie vor eine wichtige Methode zum Nachweis infektiösen Virus. Nach einer Isolierung steht Probenmaterial mit höherer Viruslast zur Verfügung, was weitere Analysen und auch Konservierung über Jahre hinweg ermöglicht.

MDCK-Zellen gelten unter Zusatz von Trypsin zum Zellkulturmedium als Goldstandard für die Isolation porciner IAV (Herman et al., 2005). Im Rahmen der vorliegenden Studie wurde für alle Proben, die IAV Genom enthielten, eine Virusisolation auf MDCK-Zellen versucht. Nach Isolierung wurde eine Subtypisierung der Genome aus dem Zellkulturüberstand vorgenommen. Ziel war es, genügend Virusmaterial für die weitere Subtypisierung oder auch Sequenzierung zu erhalten, falls dies aus dem originalen Probenmaterial nicht abschließbar war. Außerdem sollte genügend Material konserviert werden können, um besonders interessante Isolate später weiter untersuchen zu können.

Aus einem Drittel der Proben dieser Studie war Virus vermehrbar. Überprüft wurde die Virusisolation mittels M-spezifischer real-time RT-PCR (Hoffmann et al., 2010). Waren die Cq-Werte niedriger als im Ausgangsmaterial, wurde eine Vermehrung als produktiv gewertet. Wahrscheinlich war in den Proben, aus denen die Virus-Anzucht nicht mehr gelang, kein bzw. zu wenig infektiöses Virus vorhanden, während Genome noch nachweisbar waren. IAV haben eine sehr geringe Tenazität und verlieren ihre Infektiosität schnell, wenn die Proben nicht ausreichend gekühlt gelagert werden oder zu lange Zeiten zwischen Probennahme und Virusisolierung vergehen. Auch häufiges Auftauen und Einfrieren vom Probenmaterial führt zu deutlichen Infektiositätsverlusten. Sicher spielen auch der Virusstamm und dessen Zelltropismus eine Rolle. Ein Nachteil des routinemäßigen Zusatzes von Trypsin zum Zellkulturmedium ist, dass in einigen Zellsystemen ein toxischer Effekt induziert wird. So kann mikroskopisch nicht von einem Virus-induzierten cpE unterschieden werden und es ist nicht auszuschließen, dass sich die toxischen Effekte auch auf die Effizienz der Virusreplikation auswirken.

Daher sollte im Rahmen der Dissertation auch die Effizienz der Isolierung porciner IAV in MDCK-Zellen im Vergleich zu CaCo-2-Zellen (Carcinoma Colon, humane colorectale Adenokarzinomzellen) untersucht werden. CaCo-2-Zellen sind aus der Literatur als geeignetes System für die Vermehrung humaner IAV, auch ohne Trypsin-Zusatz bekannt. Zudem ist nicht eine Apoptose aller Zellen nach Infektion mit IAV beschrieben, sondern ein distinkter, klar abgrenzbarer cpE (Zhirnov und Klenk, 2003). In einer weiteren Reihe von Experimenten wurden zudem MDCK (Madin Darby Canine Kidney), PK-15 (Porcine Kidney), RK-13 (Rabbit

Kidney), BHK-21 (Baby Hamster Kidney), NBL-6 (Horse Dermal Fibroblast), KLU (Kälberlungenzellen) und MDBK (Madin Darby Bovine Kidney)-Zellen bezüglich ihrer Eignung zur Isolation porziner IAV verglichen.

Es wurde je ein aktueller Vertreter eines porzinen H1N1, H3N2 und pdmH1N1 ausgewählt. Die Viren waren zuvor auf MDCK-Zellkulturen isoliert worden (= 1. Passage). Die resultierenden virushaltigen Zellkulturüberstände hatten in einem Volumen von 140µl Ausgangs-Cqs von 12,4 bis 12,8 in der M-spezifischen real-time RT-PCR nach Hoffmann et al. (2010). Es wurden im Doppelansatz je zwei Vertiefungen einer 6-Loch Platte mit der jeweiligen Zelllinie pro Virussubtyp simultan mit 1ml virushaltigen Überstand inokuliert. Danach erfolgte die Inkubation für 2 Stunden bei 37°C. Anschließend wurde der Zellkulturüberstand abgenommen und der Zellrasen zwei Mal mit je 1ml Minimal Essential Medium (MEM) gewaschen. Dieses enthielt entweder fetales bovines Serum (FBS) oder Trypsin in einer Konzentration von 2µg/ml. Im nächsten Schritt wurden unter 2ml des entsprechenden Mediums bei 35°C für 48 Stunden und im Falle des Versuchs mit CaCo-2-Zellen bis zu 72 Stunden inkubiert. Für die Bewertung der Viruslast direkt nach Temperaturwechsel (= 0h post shift) wurden der Überstand und die Zellen sofort getrennt voneinander geerntet. Die Zellen wurden in diesem Falle und bei Vorliegen eines umgrenzten cpE in PBS abgeschabt. Zeigte der Zellrasen deutlichen cpE, wurde der Zellkulturüberstand abgenommen und bei 2000rpm 10 Minuten zentrifugiert, sodass sich die Zellen am Boden des Röhrchens absetzten. Die virale RNA wurde aus dem Zell- und Überstandmaterial mittels BioSprint 96 One-For-All Vet Kit von Qiagen® automatisiert über den BioSprint96 nach Herstellerangaben extrahiert. Die Bestimmung der Cqs in der M- real-time RT-PCR (Hoffmann et al., 2010) wurde als Parameter für die semi-quantitative Beurteilung viraler Genom-Lasten herangezogen.

Wie erwartet war im Falle des Zusatzes von Trypsin in allen Zelllinien und allen drei Subtypen nach 48 Stunden der Zellrasen komplett zerstört. Ohne den Zusatz von Trypsin war der typische cpE mikroskopisch erkennbar. Allerdings galt dies nicht für die CaCo-2-Zellen. Entgegen den Beobachtungen von Zhirnov und Klenk (2003) mit humanen IAV, war in diesem Versuch auch ohne den Zusatz von Trypsin schon nach 48h der Zellrasen fast vollständig abgelöst.

Die Ergebnisse der Cq-Messungen nach vergleichender Infektion der MDCK-Zellen und CaCo-2-Zellen sind in Abbildung 7 jeweils für ein H1N1, ein H3N2 und ein pdmH1N1 dargestellt. Der Cq in den MDCK-Zellen zum Zeitpunkt des Mediumwechsels (shift) wurde als Referenzwert gewählt, da zu diesem Zeitpunkt noch keine Virusvermehrung stattgefunden haben sollte. Alle anderen Cqs werden in Relation zu diesem Referenzwert gesetzt. Ein im Vergleich zur Referenz

niedrigerer Cq, gleichbedeutend mit einer höheren Viruslast, wird als Wert der Differenz zwischen den Cqs über null dargestellt. Die Differenz bei einem höheren Cq, also einer geringeren Viruslast, wurde entsprechend im Negativbereich dargestellt. Es wurde jeweils die Viruslast in den Zellen und im Zellkulturüberstand zum Zeitpunkt 0, 48 Stunden und 72 Stunden post shift verglichen. Außerdem wurde auch zwischen dem Ansatz mit Trypsin, als "+" gekennzeichnet, und ohne Trypsin, als "-" gekennzeichnet, verglichen.

Die Ergebnisse zeigen bei allen untersuchten Subtypen auf beiden Zellsystemen eine Zunahme der Viruslast. Es besteht keine prinzipielle Präferenz einer Zelllinie für einen bestimmten Subtyp. In diesem Experiment konnte keine signifikante Steigerung der Effizienz der Virusvermehrung durch den Zusatz von Trypsin verzeichnet werden. Eine Differenz von bis zu 3 Cqs wird als akzeptable Schwankung zwischen zwei Replikationsansätzen betrachtet. Eine Ausnahme hierzu ist lediglich die zellassozierte Genomlast des CaCo-2-Systems nach 48h dar. Zu diesem Zeitpunkt stellt es unter Zusatz von Trypsin das überlegene System dar. Bei einer Ernte nach 72h ist dieser Effekt jedoch nicht mehr erkennbar. Ohne den Zusatz von Trypsin benötigt das CaCo-2-Zellkultursystem eine längere Inkubationszeit von 72h, um einen vergleichbaren Cq zu MDCK-Zellen mit Trypsinzusatz zu erzielen. Generell ist bei der Interpretation der Ergebnisse jedoch zu beachten, dass das Experiment, wenn auch im Mehrfachansatz, nur einmal durchgeführt wurde. Die Interaktion zwischen Virus und Zellen kann also nur in Bezug auf diesen Versuchsansatz beurteilt werden. Daher können lediglich erste Tendenzen abgeleitet werden.

Abbildung 8 stellt die Ergebnisse der Experimente auf MDCK-, PK15-, RK13-, BHK21-, NBL6-, KLU- und MDBK-Zellen in gleicher Weise dar wie für Abbildung 7 bereits beschrieben. In diesem Versuch wurde eine Inkubationszeit von 48 Stunden nicht überschritten. Es sind die Ergebnisse von zwei unabhängigen Experimenten und insgesamt drei Ansätzen dargestellt.

Interessanterweise fand in allen untersuchten Zelllinien eine Vermehrung viraler RNA statt, wobei deutliche Unterschiede zwischen den Zellsystemen aber auch zwischen den Viren auftraten. Insbesondere die Differenzen der zellassozierten Cq zwischen Start des Experiments und 48 h post shift waren nach pdmH1N1 Infektion am deutlichsten. Tendenziell hatte in dieser Versuchsreihe der Zusatz von Trypsin einen sichtbaren Effekt, nämlich das deutlichere Cq Differenzen für alle getesteten Viren und mit Ausnahme der KLU-Zellen auf allen Zelllinien

auftraten. Nach Trypsinzusatz erwiesen sich in diesem Vergleich die MDCK- und PK15-Zellkultursysteme als am effizientesten, wobei PK15-Zellen hier überraschend gute Ergebnisse und für den Virussubtyp H1N1 sogar etwas bessere Ergebnisse erbrachten als MDCK-Zellen. Dies steht in klarem Kontrast zu den Ergebnissen der Untersuchungen von Herman et al. (2005), bei der die Virusisolierung auf PK-15-Zellen erfolglos verlief. Die KLU-Zellen erwiesen sich, wie erwartet, als für die Virusisolierung ungeeignet. Diese Zelllinie war zur Validierung des Versuchsansatzes mitgenommen worden. Die Ergebnisse der möglicherweise permissiven Zellen sollten im Vergleich zu den Ergebnissen einer Zelllinie, von der angenommen wurde, dass sie als primäre Zelllinie aus einer Kälberlunge keine gute Permissivität für die Infektion mit porzinen IAV zeigt, beurteilt werden.

Zusammenfassend ließ dieser vergleichende experimentelle Ansatz unter Beurteilung eines wichtigen Parameters, nämlich der Präsenz viraler RNA, die folgenden Schlüsse zu: CaCo-2-Zellkulturen können eine Alternative für die Vermehrung porziner IAV zu MDCK-Zellen darstellen, die tatsächliche Produktion infektiöser Nachkommenviren scheint nach den Ergebnissen wahrscheinlich, müsste aber noch bewiesen werden. Ohne den Zusatz von Trypsin bedarf es allerdings einer längeren Inkubationszeit von 72 Stunden, um auf RNA-Ebene vergleichbare Ergebnisse zur Anzucht auf MDCK-Zellen mit Trypsinzusatz zu erzielen. Der Aspekt von Zhirnov und Klenk (2003), dass die erfolgreiche Virusvermehrung in CaCo-2-Zellen ohne Apoptose und damit vollständiger Lyse des Zellrasens erfolgen würde, konnte im vorliegenden Experiment mit porzinen IAV nicht bestätigt werden. Dieses Zellkultursystem bietet hier also nicht den Vorteil eines zuverlässig beurteilbaren, Virus-spezifischen cpEs. Außerdem erwiesen sich die CaCo-2-Zellen auch als wesentlich effizienter unter dem Zusatz von Trypsin und zeigten unter diesen Bedingungen sogar noch bessere Ergebnisse als die verglichenen MDCK-Zellen. Dann wäre auch eine Inkubationszeit von 48 Stunden ausreichend. Die Ergebnisse waren zudem für alle drei untersuchten Virussubtypen vergleichbar, zumindest für die ausgewählten Isolate, sodass keine Präferenz für einen bestimmten Subtyp vorzuliegen scheint.

Ähnliches gilt auch für die PK15-Zelllinie. Mit ihr konnten gleich gute und im Falle von H1N1 sogar geringfügig bessere Virus-RNA-Ausbeuten erzielt werden als in der etablierten MDCK-Zellkultur. Allerdings ist auch hier der Zusatz von Trypsin sinnvoll und es muss auch hier die Produktion infektiöser Nachkommenviren noch beurteilt werden.

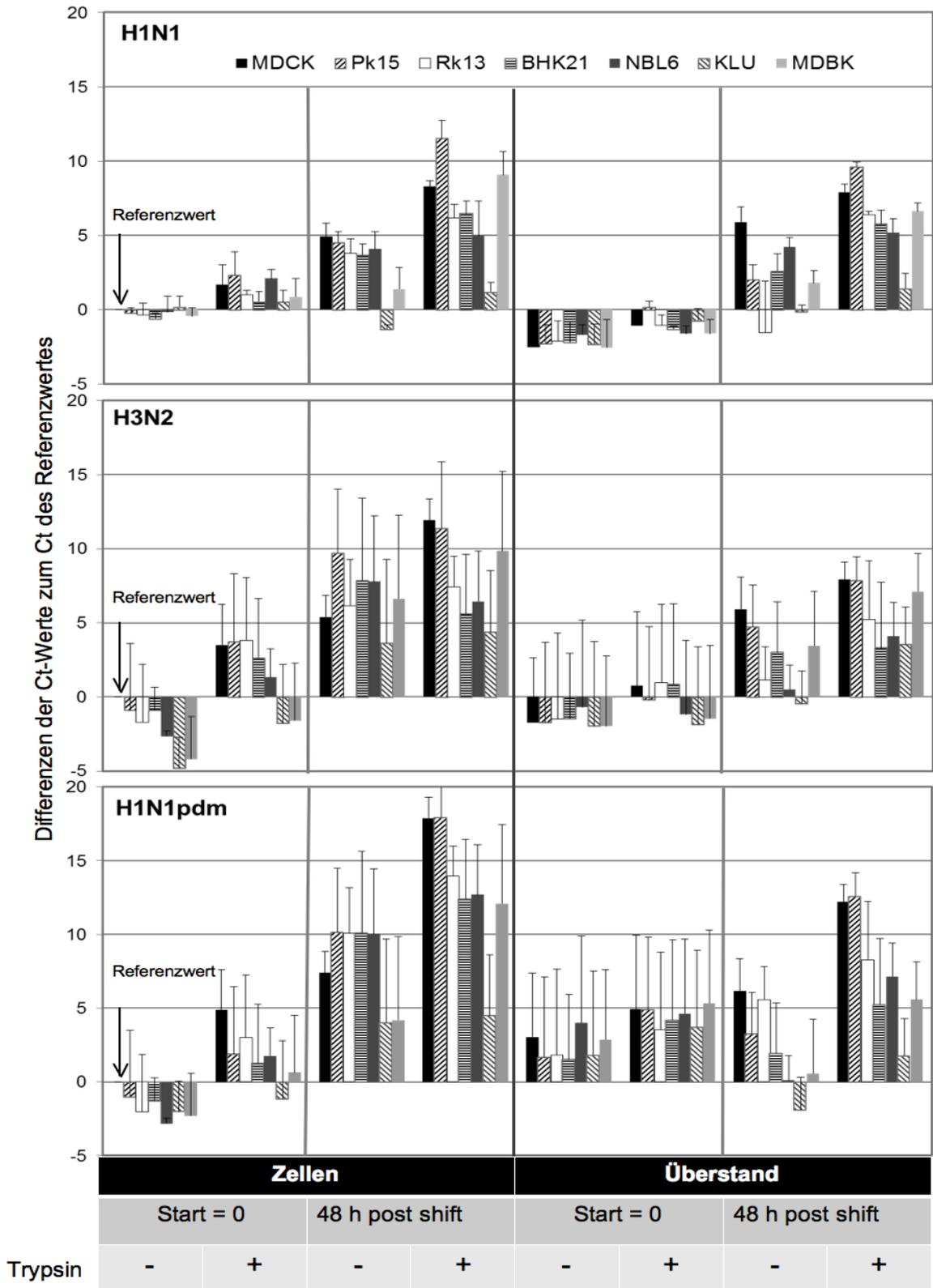
Da die Versuche allerdings nur in einem bzw. in zwei unabhängigen Versuchsansätzen durchgeführt wurden und die Eigenschaften von nur jeweils einem Vertreter von H1N1, H3N2

und pdmH1N1 untersucht wurden, muss in weiteren Experimenten die Eignung der CaCo-2- und insbesondere der PK15-Zellen für die Isolierung porciner IAV mit sowohl einem breiteren Spektrum porciner IAV und weiteren Parameter beurteilt werden, um ein optimales Isolierungssystem für diese Viren abschließend definieren zu können.



**Abb. 7:** Vermehrung ausgewählter porziner IAV, H1N1, H3N2 und pdmH1N1, auf MDCK- und CaCo-2-Zellen.

Die Virusvermehrung wurde anhand der Menge viraler RNA, mittels real-time RT-PCR für das Matrixgen nach Hoffmann et al. (2010) beurteilt. Die zellassoziierte Virus RNA-Last und die in den Zellkulturüberständen wurde 0, 48 und 72 Stunden nach Beginn des Experiments (shift) gemessen. Der optionale Zusatz von Trypsin zum Zellkulturmedium ist durch + bzw. – gekennzeichnet. Der Cq-Wert der MDCK-Zellen zum Zeitpunkt 0 ohne Zusatz von Trypsin gilt jeweils als Referenzwert. Dieser betrug für H1N1 23,87, für H3N2 21,47 und für pdmH1N1 22,49. Die Ergebnisse aller anderen Cq-Messungen werden als Differenz zum Referenzwert angegeben. Die Standardabweichung ist für jeden Wert eingezeichnet.



**Abb. 8:** Vermehrung ausgewählter porziner IAV, H1N1, H3N2 und pdmH1N1, auf MDCK-, PK-15-, RK-13-, BHK-21-, NBL6-, KLU- und MDBK-Zellen.

Die Virusvermehrung wurde anhand der Menge viraler RNA mittels real-time RT-PCR für das Matrixgen nach Hoffmann et al. (2010) beurteilt. Die zellassoziierte Virus RNA-Last und die in den Zellkulturüberständen wurde 0 und 48 Stunden nach Beginn des Experiments (shift) gemessen. Der optionale Zusatz von Trypsin zum Zellkulturmedium ist durch + bzw. – gekennzeichnet. Der Cq-Wert der MDCK-Zellen zum Zeitpunkt 0 ohne Zusatz von Trypsin gilt jeweils als Referenzwert. Dieser betrug für H1N1 24,07, für H3N2 25,5 und für pdmH1N1 31,08. Die Ergebnisse aller anderen Cq-Messungen werden als Differenz zum Referenzwert angegeben. Die Standardabweichung ist für jeden Wert eingezeichnet.

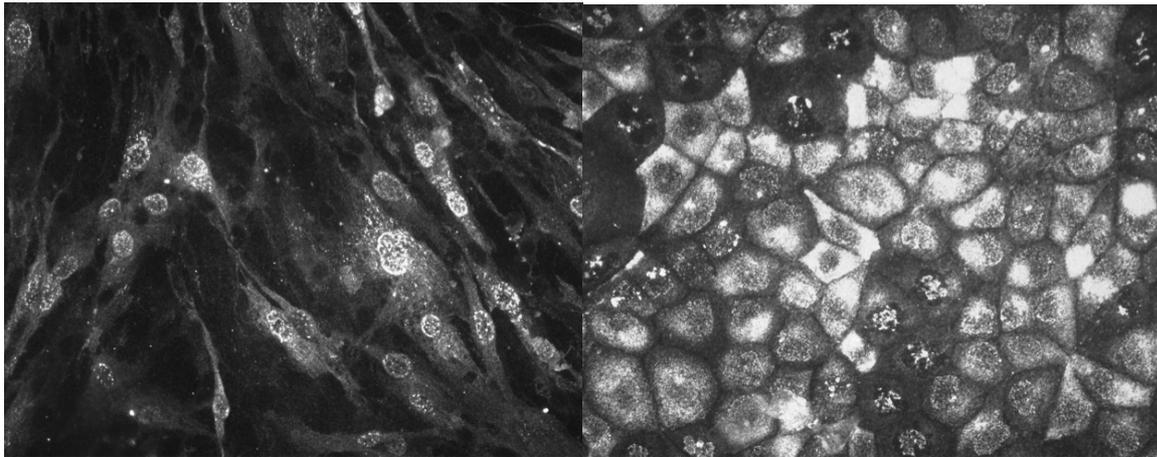
#### 1.5. Analyse der Expression viraler Proteine in mit porzinen IAV infizierten MDCK und KOP-R-Zellen

Als weiterer Parameter für die Beurteilung von verschiedenen Zelllinien bezüglich ihrer Effizienz in der Virusisolierung porziner IAV kann die Expression viraler Proteine herangezogen werden. Daher wurden initiale, indirekte Immunfluoreszenztests durchgeführt. Ziel war es zu überprüfen, ob Proteinexpression und RNA-Vermehrung in diesen Systemen miteinander korrelieren. Daher wurden für diese Experimente die Zelllinien, die sich zuvor als Extreme erwiesen hatten ausgewählt, einerseits KOP und MDCK andererseits

Zwei 24-Lochplatten wurden mit Glaseinsätzen für jede Vertiefung versehen und entweder MDCK-Zellen oder KOP-Zellen eingesät. Wie zuvor beschrieben, waren die MDCK-Zellen als effizientes Isoliersystem bestätigt, die KOP-Zellen hingegen sollten ungeeignet sein. Nachdem der Zellrasen ausreichend dicht gewachsen war, wurde jede Vertiefung mit virushaltigem Zellkulturüberstand aus vorheriger Virusisolation auf MDCK-Zellen inokuliert. Es wurde wiederum je ein porzines IAV des Subtyps H1N1, H3N2 und pdmH1N1 eingesetzt. Je sechs Vertiefungen wurden mit jeweils einem Isolat inokuliert und zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Danach wurde das virushaltige Medium wieder abgenommen. Anschließend erfolgte nach zweimaligem Waschen ein Wechsel des Mediums in drei der sechs Vertiefungen jeweils mit Trypsinzusatz, in den anderen drei Vertiefungen ohne. Die vierte verbleibende Reihe wurde als Zellkontrolle verwendet und entsprechend nicht mit Virus inokuliert. Es folgte die Inkubation bei 35°C. Nach 24 Stunden war bereits ein deutlicher cpE zu erkennen, sodass der Zellkulturüberstand vorsichtig mit einer Pasteurpipette abgesaugt wurde. Alle Vertiefungen

wurden anschließend mit PBS ohne Calcium- und Magnesiumzusatz gewaschen, dann wurde 70%iges Aceton zugegeben und die Platten für 30 Minuten bei -20°C inkubiert, um den Zellrasen zu fixieren. Im nächsten Schritt wurden alle Vertiefungen wieder mit PBS gewaschen und für 10 Minuten rehydriert. Nach einer Stunde Inkubation mit 10% Pferdeserum zur Blockierung unspezifischer Bindungen wurde mit einem Matrixantigen spezifischen Antikörper (OBT 0939, M-Antikörper) und einem polyklonalen Antikörper, der gegen das Gesamtviruspartikel erzeugt worden war (OBT 1551, GP-Antikörper), eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend folgten drei Waschschrte mit PBS für jeweils 10 Minuten zur Entfernung von überschüssigem ungebundenem Antikörper, um danach in 100µl des Fluorochrom gekoppelten Anti-Spezies IgG Antikörpers (Ziege) für wiederum eine Stunde bei Raumtemperatur unter Lichtabschluss zu inkubieren. Anschließend wurde wiederum drei Mal mit PBS gewaschen, die Zellen luftgetrocknet und dann mit einem Glycerin-PBS Gemisch auf Objektträger verbracht. Trypsin hatte einen deutlich toxischen Effekt auf die KOP-R-Zellen, was es schwer machte die unter Trypsin infizierten KOP-R-Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop gut darzustellen. Das Fluoreszenzsignal sowohl nach Inkubation mit dem Matrixprotein-spezifischen als auch dem polyklonalen Antikörper war interessanter Weise nach Infektion mit H3N2 wesentlich stärker in den KOP-R-Zellen als für die Isolate der Subtypen H1N1 und pdmH1N1. In den MDCK-Zellen war die spezifische Fluoreszenz im Zytoplasma erwartungsgemäß weitaus deutlicher, unabhängig davon mit welchem Isolat infiziert worden war. Auch der Einsatz von Trypsin schien sich lediglich auf die Proteinexpression in den mit pdmH1N1 infizierten MDCK-Zellen auszuwirken.

Zusammenfassend weist dieses initiale Experiment auf die Eignung des Versuchsansatzes für die Beurteilung des Parameters Proteinexpression in der Virusreplikation von porzinen IAV in Zellkulturen hin. Die Ergebnisse des Experiments lassen außerdem spekulieren, dass das pdmH1N1 für die Replikation in MDCK-Zellen in besonderem Maße auf den Zusatz von Trypsin angewiesen ist. Allerdings hatte die Beurteilung der Virusreplikation auf RNA-Ebene keinen entsprechenden Hinweis geliefert. Möglicherweise liegt die Ursache für diese diskrepanten Ergebnisse in der abweichenden Inkubationszeit, die Virus RNA wurde erst nach 48 Stunden bzw. 72 h beurteilt, die Proteinexpression bereits nach 24 h. Daher lassen sich sichere Schlüsse nicht aus diesen initialen Experiment ziehen. Weitere Versuche müssten unter Anpassung der Bedingungen zwischen Virus-RNA-Bestimmung und Beurteilung der Proteinexpression durchgeführt werden, um diese Beobachtungen zu untermauern.



**Abb. 9:** Vergleichende Fluoreszenz in KOP-R und MDCK-Zellen

Die linke Abbildung stellt das für den polyklonalen Antikörper (OBT 1551) spezifische Fluoreszenzsignal in mit H3N2 inokulierten KOP-R-Zellen ohne den Zusatz von Trypsin dar. Virale Proteine wurden im Zytoplasma und Zellkern detektiert. Rechts ist das vergleichsweise deutlich stärkere Fluoreszenzsignal für den monoklonalen Antikörper (OBT 0939) in mit H1N1 inokulierten MDCK-Zellen ohne Trypsinzusatz dargestellt.

## 2. Vorkommen porziner IAV -Subtypen in Südbayern

Zwischen 2010 und 2013 wurden von 1471 untersuchten Proben aus 665 Betrieben insgesamt in 273 aus 130 Betrieben IAV Genom mittels Matrixgen-spezifischen real-time PCR nachgewiesen (Publikation Pippig et al., 2016). Hiervon konnten wiederum 198 subtypisiert werden. Figure 1 dieser Publikation gibt den Prozentsatz der Betriebe mit IAV-Nachweis pro Quartal in den Jahren der Untersuchung wieder. Figure 2 stellt die relative Häufigkeit der Subtypen pro Jahr auf Betriebsebene dar. Ein Subtyp repräsentiert also einen Betrieb. In Tabelle 1 sind zusätzlich die Ergebnisse aller untersuchten und subtypisierten Proben ohne Bezug auf die Betriebe wieder gegeben und auch die nur teilweise oder nicht typisierbaren Proben berücksichtigt.

Wie Figure 1 der Publikation deutlich zeigt, wurde für die Häufigkeit des Nachweises porziner IAV keine saisonal bedingte erhöhte Häufigkeit festgestellt, wie es für die humanen IAV der Fall ist. Zu vergleichbaren Ergebnissen kamen auch andere Studien aus Deutschland und anderen europäischen Ländern (Kyriakis et al., 2011, Harder et al., 2013). Gründe hierfür könnten die

Haltungsbedingungen der Tiere sein. Die hohe Luftfeuchtigkeit und der permanente enge Körperkontakt zwischen den Schweinen ermöglichen den Viren das Überleben in der Umgebung und die schnelle Ausbreitung in der Tiergruppe. Wie Harder et al. (2013) bereits anmerken, bedeutet dies auch ein ganzjähriges Risiko für die Übertragung porziner IAV auf den Menschen.

In allen vier Jahren der Untersuchung war H1N1 mit 58% bis 65% relativer Nachweishäufigkeit der häufigste Subtyp (Figure 2 der Publikation aus dieser Arbeit). H1N2 und H3N2 hatten eine deutlich geringere Nachweisrate von 6% bis 24% und 4% bis 12% der IAV positiven Betriebe. pdmH1N1 bzw. pdmH1N1 Reassortanten, wie sich aus der phylogenetischen Analyse vermuten lässt, konnten 2010 in nur einem Betrieb gefunden werden und 2013 in zwei Beständen.

pdmH1N2Reassortanten wurden 2011 und 2013 jeweils in einem Betrieb isoliert. 24% aller IAV Genom-haltigen Proben konnten nicht oder nur teilweise subtypisiert werden.

Die für den südbayerischen Raum nachgewiesenen Häufigkeiten der drei endemischen porzinen Influenzavirus-Subtypen spiegelt die Ergebnisse vorangegangener Studien in Deutschland und in den meisten anderen europäischen Ländern wider (Van Reeth et al., 2008, Kyriakis et al., 2011, Harder et al., 2013, Lange et al., 2013, Simon et al., 2014, Watson et al., 2015). Sie sind die dominierenden Subtypen und zirkulieren in einer stabilen Infektkette innerhalb der Schweinebestände. Die Anzahl der nicht typisierbaren Proben lässt sich in den meisten Fällen durch die geringe Menge viraler RNA im Ausgangsmaterial erklären. In diesen Fällen waren auch keine ausreichenden Mengen an infektiösem Virus mehr vorhanden, sodass auch über die Virusisolierung keine Subtypisierung möglich war. Weitere denkbare Ursachen für Schwierigkeiten bei der Subtypisierung können auch in Mutationen und Sequenzänderungen im Virusgenom liegen, so dass die ausgewählten Primer und Sonden nicht binden konnten.

Mischinfektionen wurden in allen Jahren der Untersuchung in geringer Anzahl nachgewiesen, wobei es sich 2011 um unterschiedliche Subtypen in zwei verschiedenen Tieren desselben Betriebs handelte. In den anderen Jahren der Untersuchung konnten die beteiligten Subtypen aus ein und derselben Probe isoliert werden. Interessanter Weise handelte es sich in den Jahren 2010 bis 2012 bei den beteiligten Komponenten immer um H1, N1 und N2. Erst 2013 konnten in einer Probe sowohl H1, N1 und N2 als auch pdmH1 nachgewiesen werden. Die Bestimmung der beteiligten Subtypen erfolgte über die Virusisolierung auf MDCK-Zellen mit Hilfe des Zusatzes von Methylcellulose zum Zellkulturmedium, wie in der Publikation beschrieben. Mittels der beschriebenen multiplex RT-PCRs wurden die beteiligten Komponenten aus isolierten Einzel-Plaques bestimmt und somit der Subtyp identifiziert. Durch diese Methodik konnten für 2010 bis

2012 jeweils H1N1 und H1N2 aus Doppelinfektionen isoliert werden. Für die Dreifachinfektion waren H1N1, H1N2 und pdmH1N1 die isolierten Subtypen. Für diese Mischinfektion kann spekuliert werden, ob die isolierten Subtypen auch tatsächlich die Situation im infizierten Wirt widerspiegeln.

Von besonderem Interesse in dieser Studie war der Einfluss des pandemischen H1N1-Virus auf das Influenza-Geschehen in den Schweinebeständen Südbayerns. Überraschender Weise wurde eine pdmH1 mit N1 Kombination nur sporadisch nachgewiesen. In den vier Untersuchungsjahren wurde es nur im Jahr 2010 und 2012 in jeweils einem Betrieb isoliert. 2013 konnte es aus drei Proben zweier verschiedener Bestände detektiert werden und es war vermutlich eine beteiligte Komponente der oben beschriebenen Dreifachinfektion. Obwohl das pdmH1N1 schnell zwischen dem Wirt Schwein übertragen wird und das Schwein hoch empfänglich für dieses Virus ist (Lange et al., 2009), scheint die relative Häufigkeit des Vorkommens dieses Subtyps stark abzunehmen. Auch diese Erkenntnis stimmt mit den Ergebnissen anderer Studien in Deutschland und den meisten Ländern Europas überein (Harder et al., 2013, Lange et al., 2013, Simon et al., 2014, Watson et al., 2015). Allerdings wurde in den genannten Studien die Etablierung einer N2 Reassortante des pdmH1N1 gezeigt. Lange et al. (2013) beschreiben verschiedene Rekombinanten des pdmH1N2. Durchsetzen konnte sich in dieser Studie jedoch nur das pdmH1N2, dessen Neuraminidase-codierendes Segment vom porzinen endemischen H3N2 stammt und die anderen Gensegmente vom pdmH1N1 beibehält. Eine andere Kombination, bei der das Neuraminidase-Gensegment vom humanen saisonalen H3N2 stammt, konnte nur sporadisch nachgewiesen werden und scheint sich nicht etabliert zu haben. Ähnliche Beobachtungen machten auch Harder et al. (2013) in ihrer Untersuchung zum Vorkommen porziner IAV in Nordwestdeutschland, eine Region mit intensiver Schweineproduktion. In der vorliegenden Untersuchung kann dieses Ergebnis für den südbayerischen Raum hingegen noch nicht bestätigt werden. Es konnte jeweils nur in einem Betrieb in den Jahren 2011 und 2013 ein pdmH1N2 isoliert werden. Anhand der vorliegenden Daten ist es noch nicht möglich zuverlässige Schlüsse zur Etablierung dieses neuen Subtyps in Südbayern zu ziehen. Das Vorkommen der porzinen IAV Subtypen in Deutschland ist nach Simon et al. (2014) vergleichbar mit dem in den meisten anderen europäischen Ländern, wie Frankreich, Italien, Spanien, Holland und Polen. In diesen europäischen Ländern wurde das avH1N1 nachgewiesen, meist als dominierender Subtyp. Ausnahmen bilden Dänemark und Großbritannien. Im Vereinigten Königreich dominiert nun vor allem das "klassische" pdmH1N1 (Genotyp P nach Watson et al. (2015)) und hat das bis dahin endemische avH1N1 (Genotyp A

nach Watson et al. (2015)) weitgehend verdrängt. In Dänemark hingegen scheint sich vor allem eine Rekombinante aus avH1N1 und huH3N2 etabliert zu haben, das rH1avN2 (Genotyp D nach Watson et al. (2015)), dessen Hämagglutinin nun nicht mehr humanen, sondern aviären Ursprungs ist. Es kozirkuliert in Dänemark mit avH1N1, dem "klassischen" pdmH1N1 und pdmH1N2 (Genotyp R nach Watson et al. (2015)). Das "klassische" pandemische H1N1 konnte in Belgien, Holland und Spanien, anders als in Deutschland, gar nicht mehr nachgewiesen werden, sehr frequent hingegen in Polen, Ungarn und wie bereits erwähnt in Dänemark. Reassortierungen dieses Virus, meist ein pdmH1N2, treten vor allem in Deutschland auf, aber auch in Dänemark, Großbritannien und sporadisch in Ungarn, Italien und Holland. Eine Besonderheit bildet hier wieder Großbritannien. Während das Neuraminidase-kodierende Gensegment nur hier vor allem vom huH1N2 (Genotyp C nach Watson et al. (2015)) stammt, wurde es in anderen europäischen Ländern, wie vor allem Deutschland, Italien und Holland, vom H3N2 (Genotyp B nach Watson et al. (2015)) rekrutiert. Das entstandene pdmH1N2 (Genotyp Q nach Watson et al. (2015)) hat im Vereinigten Königreich das huH1N2 fast vollständig verdrängt. Anders als in Deutschland wurde huH3N2 in Dänemark, Großbritannien und Frankreich gar nicht mehr isoliert.

Zusammenfassend sind die Ergebnisse der vorliegenden Studie vergleichbar mit denen anderer Untersuchungen. Die ganzjährig vorkommenden endemischen Subtypen avH1N1, huH1N2 und huH3N2 kozirkulieren stabil in den Schweinebeständen Südbayerns, wobei avH1N1 deutlich dominiert. Überraschend war jedoch der nur sporadische Nachweis von pdmH1 in Kombination mit einem N1 und von rekombinantem pdmH1N2. Mischinfektionen konnten regelmäßig, aber in einer niedrigen Nachweisrate, detektiert werden. Die weitere Entwicklung der neuen Reassortanten pdmH1N1 und pdmH1N2 im südbayerischen Raum bleibt abzuwarten und kontinuierlich zu überwachen.

**Tab. 1: Nachweis porziner IAV Subtypen im untersuchten Probenmaterial**

	2010	2011	2012	2013	gesamt	% aller Isolate	% aller Sybtypisierungen
<b>H1N1</b>	32 <sup>a</sup>	22	28 <sup>b</sup>	44 <sup>c</sup>	126	45,65	62,06
<b>H1N2</b>	11 <sup>a</sup>	7	17 <sup>b</sup>	3 <sup>c</sup>	38	13,77	18,71
<b>H3N2</b>	1	1	23	6	31	11,23	15,27
<b>pdmH1N1</b>	1	0	1	4 <sup>c</sup>	6	2,17	2,96
<b>pdmH1N2</b>	0	1	0	1	2	0,72	0,99
<b>H1Nx</b>	0	1	2	2	5	1,81	-
<b>HxN1</b>	1	0	0	0	1	0,36	-
<b>HxN2</b>	0	2	2	0	4	1,45	-
<b>HxNx</b>	10	14	16	23	63	22,83	-
gesamt	56	48	89	83	276	100	100

<sup>a</sup> 4 Doppelinfektion mit H1N1 und H1N2, beide Virussubtypen wurden jeweils mitgezählt

<sup>b</sup> Doppelinfektion mit H1N1 und H1N2, beide Virussubtypen wurden mitgezählt

<sup>c</sup> Dreifachinfektion mit H1N1, H1N2 und pdmH1N1, die drei Virussubtypen wurden jeweils mitgezählt

### 3. Phylogenetische Analyse ausgewählter Virusisolate

Die phylogenetische Analyse einiger repräsentativer und interessanter Isolate sollte Aufschluss über deren Abstammung und Verwandtschaftsverhältnis zu anderen in Datenbanken verfügbaren Sequenzen bringen und eventuelle Reassortierungsprozesse offenlegen.

Insgesamt wurden 45 H1-Sequenzen von Virusisolaten dieser Studie aus unterschiedlichen Landkreisen und Beständen Südbayerns analysiert. In voran gegangenen Studien konnten drei genetische H1-Gruppen deutlich unterschieden werden: die Gruppe des avian-like H1, die des human-like H1 und der Stamm, der die pdmH1-Sequenzen in sich vereint (Harder et al., 2013, Lange et al., 2013). Diese Unterteilung korreliert auch mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit und die untersuchten H1-Sequenzen lassen sich alle in einen dieser Stämme eingliedern. Interessanterweise finden sich die sequenzierten pdmH1 der pdmH1N1-Isolate zwar gut in die entsprechende Gruppe ein, doch sind sie enger verwandt mit den H1 der aktuellen reassortierten

pdmH1N2 als mit den "klassischen" pdmH1N1. Auch das dazu gehörige N1 dieser Isolate bildet eher eine Gruppe mit aktuelleren N1-Sequenzen von H1N1-Isolaten aus den Jahren 2012 und 2013 (Cluster 3B nach Harder et al., 2013) statt mit den N1 anderer pdmH1N1 (Cluster 2 nach Harder et al., 2013). Eine mögliche Erklärung hierfür könnte in Reassortierungsvorgängen liegen, in denen das N1 des "klassischen" pdmH1N1 durch das des avian-like H1N1, dem dominierenden Subtyp in Südbayern, ersetzt wurde. Dies könnte zu einem Selektionsvorteil in dieser Region geführt haben.

Besondere Aufmerksamkeit ziehen auch die Sequenzen der Isolate A/swine/Bavaria/20801-, -22501- und -22502/2011 auf sich. Sie wurden als H1N2 subtypisiert und sollten daher erwartungsgemäß in der Gruppe der human-like H1-Sequenzen wieder zu finden sein. Entgegen dieser Erwartung reihen sie sich jedoch in die Gruppe des avian-like H1 ein. Ähnlich verhält es sich mit der Referenzsequenz A/swine/Italy/196875/2008. Vermutlich handelt es sich hierbei um Reassortanten, ähnlich der bereits beschriebenen Reassortante rH1avN2, die in neueren Studien immer wieder sporadisch in Deutschland gefunden wurde. Das zugehörige N2 dieser Isolate reiht sich in die Gruppe der meisten H1N2 und H3N2 ein (Cluster 3 nach Harder et al., 2013). Dies bestärkt die Annahme, dass es sich bei den drei genannten Isolaten um eine Rekombinante aus dem avH1N1 und dem huH1N2 handelt. Etwas anders verhält es sich mit der Probe A/swine/Bavaria/86201/2012(H1N2). Auch hier bildet das H1 zwar unerwarteter Weise eine Gruppe mit dem avian-like H1, doch es scheint weniger eng verwandt mit diesen zu sein und findet sich zusammen mit der Sequenz der Isolate A/swine/Germany-NI/R369/09(H1N2) und A/swine/Germany/R1931/2011(H1N2) am Rande der Gruppe wieder. Das zugehörige N2 dieser zwei viralen Genome ordnet sich ebenfalls nicht wie erwartet in Cluster 3 der "klassischen" N2-Sequenzen ein. Es bildet eine Gruppe mit den N2-Sequenzen von pdmH1N2-Isolaten. Auch das N2 von A/swine/Bavaria/86201/2012(H1N2) liegt zwischen der Gruppe der typischen N2 und der des pdmH1N2. Allerdings war der verglichene Sequenzabschnitt relativ kurz, so dass diese Verwandtschaftsverhältnisse über längere Bereiche überprüft werden muss. Weitere Untersuchungen zu A/swine/Bavaria/86201/2012(H1N2) in Form von Gesamtgenomsequenzierung und phylogenetischer Analyse sollten Aufschluss über die Besonderheiten dieses Virus bringen.

Ganz ähnlich verhält es sich mit den Sequenzen der durch Plaqueisolierung gewonnenen Subtypen A/swine/Bavaria/81031(H1N1)-, -81032(pdmH1N1)- und 81033(H1N2)/2013. Sie entstammen einer Probe. Die phylogenetische Analyse zeigt, dass das H1 der Plaques H1N1 und H1N2 wie erwartet eine Gruppe mit anderen avian-like H1 bildet. Das H1 des pdmH1N1-Plaques ordnet sich jedoch in die Gruppe der bereits angepassten pdmH1 ein. Die Sequenz des

N2 von 81033 ist verwandt zu der Gruppe der pdmH1N2 und nicht wie erwartet in Cluster 3. Möglicherweise fanden durch den Versuch der Plaqueisolierung Reassortierungsprozesse in den MDCK-Zellen statt, die erst zum Entstehen des H1N2- und pdmH1N1-Subtyps führten, wenn man von einer Ausgangsinfektion mit H1N1 und pdmH1N2 ausgeht. Andere Subtypen, wie zum Beispiel das pdmH1N2, konnten jedoch nicht identifiziert werden, was nicht zuletzt auch an der Dominanz des H1N1-Subtyps liegen könnte, der am häufigsten isoliert wurde. Durch die überwiegende Replikation des H1N1-Virus könnte die Vermehrung anderer beteiligter Subtypen möglicherweise gehemmt worden sein. Dies sind jedoch lediglich Spekulationen bezüglich der Ausgangslage im Wirtstier, die nicht abschließend bewiesen werden konnten. In jedem Falle belegt dieses Beispiel deutlich die Fähigkeit der porcinen Influenzaviren zur Reassortierung, sei es in der Zellkultur oder im Wirt selbst. Dies verdeutlicht erneut die Gefahr der Entstehung neuer potentiell zoonotischer Influenzaviren, die vom Schwein als "mixing vessel" ausgeht.

Ein solches Ereignis könnte die Entstehung eines Subtyps, wie das Isolat A/swine/Bavaria/86201/2012(H1N2) ihn darstellt, erklären, nämlich die Kombination aus avH1N1 und pdmH1N2 mit Austausch der Oberflächenantigene. Dabei würden, wie vielleicht in Zellkultur geschehen, pdmH1N1 und avH1pdmN2 entstehen. Auch hier sollten weitere genetische Untersuchungen Aufschluss über die Entstehung der Virusvarianten bringen. Eine weitere Auffälligkeit in der phylogenetischen Analyse der H1-Sequenzen zeigt sich außerdem bei der Probe A/swine/Bavaria/14001/2010(H1N1), die nicht wie erwartet mit den avH1 gruppiert, sondern mit den huH1. Vermutlich handelt es sich bei dieser Probe um eine seltener beschriebene, aber bereits publizierte Rekombinante aus avH1N1 und huH1N2, bei der das avH1 durch das huH1 ausgetauscht wird (Harder et al., 2013). Ergebnis ist das rH1huN1. Genauso verhält es sich mit A/swine/Bavaria/4201/2012(H1N1), das zudem aus einer Mischinfektion stammt und damit sogar eine aktuelle Reassortierung darstellen könnte, die gar nicht weiter in der Population bestehen würde.

Bei der phylogenetischen Analyse der N1-Sequenzen fällt auf, dass sich ähnlich wie bei Harder et al. (2013) der berechnete Baum in drei Teile gliedert. Eine Gruppe wird klassifiziert durch die N1 Sequenzen der pdmH1N1-Isolate, eine weitere durch die der älteren Isolate von avH1N1 bis 2011 (Cluster 3A nach Harder et al., 2013). Die dritte Gruppe entsteht durch neuere avH1N1-Isolate von 2012 und 2013. Diese Beobachtung ist der Publikation von Lange et al. (2013) nicht zu entnehmen. Nur wenige Genome lassen sich nicht nach dieser Regel klassifizieren. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte in einer Reihe von Mutationen liegen, die im Laufe der Evolution aufgetreten sind und die Sequenzänderungen bedingt haben könnten.

Die Sequenz des N2 des einzigen analysierten pdmH1N2-Isolats dieser Arbeit gliedert sich in die Gruppe anderer pdmH1N2-Reassortanen ein (Cluster 2 nach Harder et al., 2013), für die gezeigt werden konnte, dass das Neuraminidase-Genesegment vom H3N2 stammt. Ähnliche Spekulationen lassen sich auch für das Genom des Isolats

A/swine/Bavaria/16001/2011(pdmH1N2) ziehen. Die meisten anderen in dieser Arbeit untersuchten Sequenzen lassen sich hingegen dem "klassischen" N2 (Cluster 3 nach Harder et al., 2013) zuordnen.

Die phylogenetische Analyse der H3-Sequenzen ergab eine einzige recht homogene Gruppe, in die sich die wenigen Sequenzen der vorliegenden Arbeit ebenfalls ohne besondere Auffälligkeiten einreihen. Gleiches haben auch Lange et al. (2013) und Harder et al. (2013) für H3 festgestellt.

Zusammenfassend ergab die phylogenetische Analyse, dass die meisten Isolate dieser Studie den bekannten endemischen Subtypen H1N1, H1N2 und H3N2 entsprechen. Nur wenige ungewöhnliche Kombinationen lassen Raum für Spekulationen und bedürfen weiterer genetischer Untersuchungen. Sie zeigen aber auch, dass Rekombinationen innerhalb der Subtypen porciner IAV immer wieder zu beobachten sind und dass die Situation möglicherweise nicht so stabil ist wie lange Jahre angenommen. Der Neueintrag des humanen pdmH1N1 spielt hierbei natürlich eine wesentliche Rolle, aber auch andere Rekombinationen werden beobachtet und könnten die Situation auf Dauer verändern. Eine dauerhafte Überwachung der aktuell zirkulierenden und sich etablierenden porcinen IAV in der Schweinepopulation erscheint daher unerlässlich.

## **V. Zusammenfassung**

### **Phylogenetische Untersuchung von nach der H1N1 Pandemie 2009 in süddeutschen schweinehaltenden Betrieben zirkulierenden Influenza A Viren**

Infektionen mit porzinen Influenza A Viren (IAV) sind in schweinehaltenden Betrieben weit verbreitet und die parallele Zirkulation von drei endemischen Linien ist für Deutschland gut dokumentiert. Da die letzte Influenza-Pandemie ab 2009 durch das pdmH1N1 verursacht wurde, dessen genetischer Ursprung auf porzine IAV zurückgeht, wird der Überwachung der Influenza A Virus-Situation in den schweinehaltenden Betrieben wieder mehr Aufmerksamkeit gewidmet. Von besonderem Interesse sind Veränderungen nach dem Eintrag des pdmH1N1 auch in die deutschen Schweinebestände. Da nur wenige Daten über das Vorkommen porziner IAV in Süddeutschland verfügbar waren, war das Ziel der vorliegenden Arbeit, aktuell kursierende IAV Subtypen in süddeutschen Schweinebetrieben zu bestimmen und insbesondere die Auswirkungen des pdmH1N1 Eintrages zu beobachten.

Um zunächst eine schnelle Differenzierung zwischen den Sequenzen von H1, H3, pdmH1, N1 und N2 zu gewährleisten, wurden verschiedene PCR-Protokolle etabliert. Es konnte gezeigt werden, dass diese multiplex RT-PCR-Protokolle spezifisch und zuverlässig geeignet waren, direkt aus Probenmaterial zwischen den einzelnen Subtypen zu unterscheiden. Um die Sensitivität der Assays für Proben mit geringer Virusgenom-Last zu erhöhen, wurden auch entsprechende singleplex PCR Protokolle angewandt.

Zwischen 2010 und 2013 wurden 1417 Nasentupfer und Lungengewebeproben von Schweinen mit respiratorischen Symptomen auf die Präsenz von Influenza A Virus Genom getestet. 73% der 273 IAV-Genom positiven Proben konnten mit Hilfe der neu entwickelten konventionellen und real-time PCRs subtypisiert werden. Der vorherrschende Subtyp war, wie erwartet, H1N1, während die relative Häufigkeit von H1N2 und H3N2 zwischen den Jahren der Untersuchung variierte. Interessanterweise wurde pdmH1 in Kombination mit N1 2010, 2012 und 2013 nachgewiesen, was eine anhaltende Präsenz belegt. Außerdem konnte eine pdmH1N2 Reassortante sowohl 2011 als auch 2013 detektiert werden. Mischinfektionen traten in jedem Jahr der Untersuchung auf, wenn auch jeweils in Einzelfällen.

Das Genom einiger ausgewählter IAV wurde teilsequenziert und anschließend das Verwandtschaftsverhältnis zu verfügbaren IAV Sequenzen beurteilt. Die phylogenetische Analyse zeigte nicht nur, dass pdmH1 sowohl als N1 als auch als N2 Reassortante nachgewiesen worden war, sondern auch dass weitere unterscheidbare H1N1 und H1N2 Reassortanten

vorkommen. Mit diesen Daten wird eindeutig bestätigt, dass Rekombinationen von ko-zirkulierenden Subtypen auch in süddeutschen schweinehaltenden Betrieben auftreten. In weiteren Arbeiten scheint es essentiell, die Etablierung dieser neuen Viren in den Populationen nachzuverfolgen.

Alle Influenza A Viren sollten im Rahmen der vorgelegten Arbeit gleichzeitig über MDCK-Zellen isoliert werden. Dies gelang nicht immer. Um alternative Isolierungssysteme zu überprüfen, wurden verschiedenen Zelllinien wie MDCK, MDBK, KOP (bovin), NBL-6 (equin), RK13, BHK21, PK15 und CaCo-2 Zellen ausgewählt und jeweils ein aktuelles Isolat von H1N1, H3N2 und pdmH1N1 getestet. Der Erfolg der Virusvermehrung wurde anhand der viralen RNA-Last überprüft, und ließ sich auf den meisten Ziellinien zeigen. Besonders CaCo-2 und PK-15 Zellen könnten eine sinnvolle Alternative zu MDCK-Zellen sein. Weitere Experimente sind jedoch notwendig für eine abschließende Beurteilung.

Zusammenfassend konnte in der vorgelegten Arbeit gezeigt werden, dass neue IAV Reassortanten in schweinehaltenden Betrieben in Süddeutschland auftreten. Ein kontinuierliches Monitoring erscheint daher unabdingbar, um die weitere Entwicklung der genetischen aber auch phänotypischen Eigenschaften neuer, reassortanter IAV zu überwachen.

## **VI. Summary**

### **Influenza A Viruses Detected in Swine in Southern Germany after the H1N1 Pandemic in 2009**

Infections with influenza A viruses (IAV) are highly prevalent in swine populations and cocirculation of at least three endemic lineages is well documented in European swine. Since the emergence of the human pandemic 2009, pdmH1N1 virus was traced back to IAV of porcine origin, the interest in the actual situation within swine populations increased. Putative changes due to introduction of pdmH1N1 are of major interest and the zoonotic potential of emerging viruses needs to be evaluated. As data on porcine IAV within southern Germany were relatively sparse the first aim of this study was to determine the major IAV subtypes present in swine herds in southern Germany and to promptly detect potential new reassortants.

Therefore in a first step several PCR protocols were established to readily differentiate between sequences of H1, H3, pdmH1, N1 and N2. These multiplex RT-PCR protocols were shown to be specific and reliable in distinguishing subtypes directly from field specimens. For samples with lower genome loads, respective singleplex PCR protocols were used to increase sensitivity.

Between 2010 and 2013 1.417 samples of nasal swabs and lung tissues derived from pigs with respiratory symptoms were analysed for the presence of influenza A virus genomes. For 73% of the 273 IAV genome positive samples subtypes could be determined using the newly established conventional and q-RT-PCR protocols. The predominant subtype in the years 2010 to 2013 was, as expected, H1N1 but the relative presence of H1N2 and H3N2 varied between years. Interestingly, pdmH1 in combination with N1 was detected in 2010, 2012 and 2013 confirming a presence, albeit in low prevalence. Additionally reassortant pdmH1N2 viruses were found in 2011 and 2013. Mixed infections were discovered in every year even though at low rates.

A selection of genomes was submitted to partial sequence analyses and genetic relationships to other IAV sequences available were determined. Interestingly, in phylogenetic analysis not only the reassortation of pdmH1 segments with porcine N1 and N2 but also several distinct reassortants of H1N1 and H1N2 were detected. These results clearly corroborated the hypothesis about actual recombination events of IAV within the Bavarian swine population. In follow up studies, the establishment of such reassortant viruses will need to be surveyed.

In addition isolation of IAV on MDCK cells was attempted for all genome positive samples. To assess alternative cell systems for porcine IAV isolation, various cell lines such as MDCK, MDBK, KOP (bovine), NBL-6 (equine), Rk13, BHK21, PK15, and CaCo-2 were analysed. To

this aim one isolate respectively of H1N1, H3N2, and H1N1pdm viruses was used. All viruses replicated surprisingly effectively on most of these cell lines as measured by comparison of viral RNA loads. In particular CaCo-2 and PK-15 cells are suggested to be an alternative to MDCK cells for porcine IAV isolation.

Taken together some interesting new recombinant viruses were detected within the Bavarian swine population. Further surveillance will be of major importance, to monitor future developments and putative zoonotic potentials.

## VII. Literaturverzeichnis

- Abe, H, Mine, J, Parchariyanon, S, Takemae, N, Boonpornprasert, P, Ubonyaem, N, Patcharasinghawut, P, Nuansrichay, B, Tanikawa, T, Tsunekuni, R, Saito, T (2015).** Co-infection of influenza A viruses of swine contributes to effective shuffling of gene segments in a naturally reared pig. *Virology* **484**: 203-212.
- Adeola, OA, Olugasa, BO, Emikpe, BO (2015).** Antigenetic Detection of Human Strain of Influenza Virus A (H3N2) in Swine Populations at Three Locations in Nigeria and Ghana during the Dry Early Months of 2014. *Zoonoses Public Health* **06/2015**; DOI:10.1111/zph.12210 · 2.07, Epub.
- Adeola, OA, Olugasa, BO, Emikpe, BO (2015).** Detection of pandemic strain of influenza virus (A/H1N1/pdm09) in pigs, West Africa: implications and considerations for prevention of future influenza pandemics at the source. *Infect Ecol Epidemiol* **2015**, **5**: 30227 - <http://dx.doi.org/10.3402/iee.v5.30227>
- Ali, A, Khatri, M, Wang, L, Saif, YM, Lee, C-W (2012).** Identification of swine H1N2/pandemic H1N1 reassortant influenza virus in pigs, United States. *Vet Microbiol* **158**, 60-68.
- Anderson, TK, Nelson, MI, Kitikoon, P, Swenson, SL, Korslund, JA, Vincent, AL (2013).** Population dynamics of cocirculating swine influenza A viruses in the United States from 2009 to 2012. *Influenza Other Respir Viruses* **4**: 42-51.
- Balint, A, Metreveli, G, Widén, F, Zohari, S, Berg, M, Isaksson, M, Renström, LH, Wallgren, P, Belák, S, Segall, T, Kiss, I (2009).** The first Swedish H1N2 swine influenza virus isolate represents an uncommon reassortant. *Virol J* **6**: 180-181.
- Baudin, F, Bach, C, Cusack, S, Ruigrok, RWH (1994).** Structure of influenza virus RNP. I. Influenza virus nucleoprotein melts secondary structure in panhandle RNA and exposes the bases to the solvent. *EMBO J* **13**: 3158-3165.
- Blaas, D, Patzelt, E, Kuechler, E (1982).** Identification of the cap binding protein of influenza virus. *Nucleic Acids Res* **10**: 4803-4812.
- Bouloy, M, Plotch, SJ, Krug, RM (1980).** Both the 7-methyl and the 2'-O-methyl groups in the cap of mRNA strongly influence its ability to act as primer for influenza virus RNA transcription. *Proc Natl Acad Sci USA* **77**: 3952-3956.
- Bouvier, NM and Palese, P (2008).** The Biology of Influenza Viruses. *Vaccine* **26**, D49-D53.

- Bowman, AS, Nelson, SW, Edwards, JL, Hofer, CC, Nolting, JM, Davis, IC, Slemons, RD (2013).** Comparative effectiveness of isolation techniques for contemporary Influenza A virus strains circulating in exhibition swine. *J Vet Diagn Invest* **25**: 82-90.
- Brown, IH, 2000.** The epidemiology and evolution of influenza viruses in pigs. *Vet Microbiol* **74**: 29-46.
- Buda, S, Haas, W, Baillot, A, Beyrer, K, Monazahian, M, Pulz, M, Benzler, J, Harder, TC, Schweiger, B (2011).** Humane Fälle mit Infektion durch Schweineinflenzaviren. *Epidemiol Bull RKI* **39**: 357-359.
- Castrucci, MR, Donatelli, I, Sidoli, L, Barigazzi, G, Kawaoka, Y, Webster, RG (1993).** Genetic reassortment between avian and human influenza A viruses in Italian pigs. *Virology* **193**: 503-506.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (2011).** Swine-origin Influenza A (H3N2) virus infection in two children – Indiana and Pennsylvania, July-August 2011. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* **60**: 1213-1215.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (2012).** Update: Influenza A (H3N2)v transmission and guidelines – five states, 2011. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* **60**: 1741-1744.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (2016).** Case Count: Detected U.S. Human Infections with H3N2v by State since August 2011. Zugänglich unter (letzter Zugriff 26.01.2016): <http://www.cdc.gov/flu/swineflu/h3n2v-case-count.htm>
- Chang, HK, Park, JH, Song, M-S, Oh, T-K, Kim, S-Y, Kim, C-J, Kim, H, Sung, M-H, Han, H-S, Hahn, Y-S, Choi, Y-K (2008).** Development of Multiplex RT-PCR Assays for Rapid Detection and Subtyping of Influenza Type A Viruses from Clinical Specimens. *J Microbiol Biotechnol* **18**: 1164-1169.
- Chiapponi, C, Zanni, I, Garbarino, C, Barigazzi, G, Foni, E (2010).** Comparison of the usefulness of the CaCo-2 cell line with standard substrates for isolation of swine influenza A viruses. *J Virol Methods* **163**: 162-165.
- Chiapponi, C, Moreno, A, Barbieri, I, Merenda, M, Foni, E (2012).** Multiplex RT-PCR assay for differentiating European swine influenza virus subtypes H1N1, H1N2 and H3N2. *J Virol Methods* **184**: 117-120.
- Chen, W, Calvo, PA, Malide, D, Gibbs, J, Schubert, U, Bacik, I, Basta, S, O'Neill, R, Schickli, J, Palese, P, Henklein, P, Bennink, JR, Yewdell, JW (2001).** A novel influenza A virus mitochondrial protein that induces cell death. *Nat Met* **7**: 1306-1312.

- Chizmakov, IV, Geraghty, FM, Ogden, DC, Hayhurst, A, Antonion, M, Hay, AJ (1996).** Selective proton permeability and pH regulation of the influenza virus M2 channel expression in mouse erythroleukaemia cells. *J Physiol* **494**: 329-336.
- Clavijo, A, Tresnan, DB, Jolie, R, Zhou, E-M (2002).** Comparison of embryonated chicken eggs with MDCK cell culture for the isolation of swine influenza virus. *Can J Vet Res* **66**: 117-121.
- Conacy-Hymann, E, Kouakou, VA, Aplogan, GL, Awoume, F, Kouakou, CK, Kakpo, L, Sharp, BR, McClenaghan, L, McKenzie, P, Webster, RG, Webby, RJ, Ducatez, MF (2012).** Surveillance for influenza viruses in poultry and swine, west Africa, 2006-2008. *Emerg Infect Dis* **18**: 1446-1452.
- Conello, GM, Zamarin, D, Perrone, LA, Tumpey, T, Palese, P (2007).** A single mutation in the PB1-F2 of H5N1 (HK/97) and 1918 influenza A viruses contributes to increased virulence. *PLoS Pathog* **3**: 1414-1421.
- Connor, RJ, Kawaoka, Y, Webster, RG, Paulson, JC (1994).** Receptor specificity in human, avian, and equine H2 and H3 influenza virus isolates. *Virology* **205**: 17-23.
- Corzo, CA, Culhane, M, Juleen, K, Stigger-Rosser, E, Ducatez, MF, Webby, RJ, Lowe, JF (2013).** Active surveillance for influenza A virus among swine, midwestern United States, 2009-2011. *Emerg Infect Dis* **19**: 954-960.
- Cros, JF, Palese, P (2003).** Trafficking of viral genomic RNA into and out of the nucleus: influenza, Thogoto and Borna disease viruses. *Virus Res* **95**: 3-12.
- Cross, KJ, Burleigh, LM, Steinhauer, DA (2001).** Mechanisms of cell entry by influenza virus. *Expert Rev Mol Med* **2001**: 1-18.
- Desselberger, U, Nakajima, K, Alfino, P, Pedersen, FS, Haseltine, WA, Hannoun, C, Palese, P (1978).** Biochemical evidence that "new" influenza virus strains in nature may arise by recombination (reassortment). *Proc Natl Acad Sci USA* **75**: 3341-3345.
- Dibárbora, M, Cappuccio, J, Olivera, V, Quiroga, M, Machuca, M, Perfumo, C, Pérez, D, Pereda, A (2013).** Swine influenza: clinical, serological, pathological, and virological cross-sectional studies in nine farms in Argentina. *Influenza Other Respir Viruses* **7**: 10-15.
- Dorset, M, McBryde, CN, Niles, WB (1922-1923).** Remarks on "hog" flu. *J Am Vet Med Assn* **62**: 162-171.
- Drake, JW (1993).** Rates of spontaneous mutation among RNA viruses. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 4171-4175.

- Ducatez, MF, Hause, B, Stigger, Rosser, E, Darnell, D, Corzo, C, Juleen, K, Simonson, R, Brockwell-Staats, C, Rubrum, A, Wang, D, Webb, A, Crumpton, J-C, Lowe, J, Gramer, M, Webby, RJ (2011).** Multiple Reassortment between Pandemic (H1N1) 2009 and Endemic Influenza Viruses in Pigs, United States. *Emerg Infect Dis* **17**, 1624-1629.
- Ducatez, MF, Awoume, F, Webby, RJ (2015).** Influenza A (H1N1)pdm09 virus in pigs, Togo, 2013. *Vet Microbiol* **177**: 201-205.
- Dugan, VG, Chen, R, Spiro, DJ, Sengamalay, N, Zaborsky, J, Ghedin, E, Nolting, J, Swayne, DE, Runstadler, JA, Happ, GM, Senne, DA, Wang, R, Slemons, RD, Holmes, EC, Taubenberger, JK (2008).** The evolutionary genetics and emergence of avian influenza viruses in wild birds. *PLoS Pathog* 2008, **4**.
- Eckert, EA (1972).** Properties of an antigenetic glycoprotein isolated from influenza virus hemagglutinin. *J Virol* **11**: 183-192.
- Engelhardt, OG, Fodor, E (2006).** Functional association between viral and cellular transcription during influenza virus infection. *Rev Med Virol* **16**: 329-345.
- Fereidouni, SR, Harder, TC, Gaidet, N, Ziller, M, Hoffmann, B, Hammoumi, S, Globig, A, Starick, E (2012).** Saving resources: Avian influenza surveillance using pooled swab samples and reduced reaction volumes in real-time RT-PCR. *J Virol Methods* **186**: 119-125.
- Fodor, E. (2013).** The RNA polymerase of influenza A virus: mechanisms of viral transcription and replication. *Acta Virologica* **57**: 113–122.
- Fortes, P, Beloso, A, Ortin, J (1994).** Influenza virus NS1 protein inhibits pre-mRNA splicing and blocks mRNA nucleoplasmic transport. *EMBO J* **13**: 704-712.
- Fouchier, RA, Bestebroer, TM, Herfst, S, Van Der Kemp, L, Rimmelzwaan, GF, Osterhaus, AD (2000).** Detection of influenza A viruses from different species by PCR amplification of conserved sequences in the matrix gene. *J Clin Microbiol* **38**: 4096- 4101.
- Franca, M, Stallknecht, DE, Howerth, EW (2013).** Expression and distribution of sialic acid influenza virus receptors in wild birds. *Avian Pathol* **42**: 60-71.
- Freidl, GS, Meijer, A, de Bruin, E, de Nardi, M, Munoz, O, Capua, I, Breed, AC, Harris, K, Hill, A, Kosmider, R, Banks, J, von Dobschuetz, S, Stark, K, Wieland, B, Stevens, K, van der Werf, S, Enouf, V, van der Meulen, K, Van Reeth, K, Dauphin, G, Koopmans, M, FLURISK Consortium (2014).** Influenza at the animal-human interface: a review of the literature for virological evidence of human infection

- with swine or avian influenza viruses other than A(H5N1). *Euro Surveill* 2014;19(18):pii=20793. Available online: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=20793>
- Gabriel, G, Klingel, K, Otte, A, Thiele, S, Hudjetz, B, Arman-Kalcek, G, Sauter, M, Schmidt, T, Rother, F, Baumgarte, S, Keiner, B, Hartmann, E, Bader, M, Brownlee, GG, Fodor, E, Klenk, HD (2011).** Differential use of importin- $\alpha$  isoforms governs cell tropism and host adaptation of influenza virus. *Nat Commun* 2: article number 156, doi:10.1038/ncomms1158
- Gall, A, Hoffmann, B, Harder, T, Grund, C, Beer, M (2008).** Universal primer set for amplification and sequencing of HA0 cleavage sites of all influenza A viruses. *J Clin Microbiol* 46: 2561-2567.
- Gao, Q, Brydon, EW, Palese, P (2008).** A seven-segmented influenza A virus expressing the influenza C virus glycoprotein HEF. *J Virol* 82: 6419-6426.
- Gao, Q, Chou, Y-Y, Doganay, S, Vafabakhsh, R, Ha, T, Palese, P (2012).** The Influenza A Virus PB2, PA, NP, and M Segments Play a Pivotal Role during Genome Packaging. *J Virol* 86: 7043-7051.
- Garten, RJ, Davis, CT, Russell, CA, Shu, B, Lindstrom, S, Balish, A, Sessions, WM, Xu, X, Skepner, E, Deyde, V, Okomo-Adhiambo, M, Gubareva, L, Barnes, J, Smith, CB, Emery, SL, Hillman, MJ, Rivaller, P, Smagala, J, de Graaf, M, Burke, DF, Fouchier, RAM, Pappas, C, Alpuche-Aranda, CM, López-Gatell, H, Olivera, H, López, I, Myers, CA, Faix, D, Blair, PJ, Yu, C, Keene, KM, Dotson Jr., PD, Boxrud, D, Sambol, AR, Abid, SH, St. George, K, Bannerman, T, Moore, AL, Stringer, DJ, Blevins, P, Demmler-Harrison, GJ, Ginsberg, M, Kriner, P, Waterman, S, Smole, S, Guevara, HF, Belongia, EA, Clark, PA, Beatrice, ST, Donis, R, Katz, J, Finelli, L, Bridges, CB, Shaw, M, Jernigan, DB, Uyeki, TM, Smith, DJ, Klimov, AI, Cox, NJ (2009).** Antigenic and genetic characteristics of the early isolates of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza viruses circulating in humans. *Science* 325: 197-201.
- Gaydos JC, Hodder RA, Top FH, Jr, et al. Swine influenza A at Fort Dix, New Jersey (January-February 1976). II. Transmission and morbidity in units with cases. *J Infect Dis.* 136: 363–368.**
- Gerber, M, Isel, C, Moules, V, Marquet, R (2014).** Selective packaging of the influenza A genome and consequences for genetic reassortment. *Trends Microbiol* 22: 446-455.
- Gómez-Puertas, P, Albo, C, Pérez-Pastrana, E, Vivo, A, Portela, A (2000).** Influenza virus

- matrix protein is the major driving force in virus budding. *J Virol* **74**: 11538-11547.
- Guarner, J, Shieh, WJ, Dawson, J, Subbaro, K, Shaw, M, Ferebee, T, Morken, T, Nolte, KB, Freifeld, A, Cox, N, Zaki, SR (2000).** Immunohistochemical and in situ hybridization studies of influenza A virus infection in human lungs. *Am J Clin Pathol* **114**: 227-233.
- Haesebrouck, F, Biront, P, Pensaert, MB, Leunen, J (1985).** Epizootics of respiratory tract disease in swine in Belgium due to H3N2 influenza virus and experimental reproduction of disease. *Am J Vet Res* **46**: 1926-1928.
- Hale, BG, Randall, RE, Ortin, J, Jackson, D (2008).** The multifunctional NS1 protein of influenza A viruses. *J Gen Virol* **89**: 2359-2376.
- Han, JY, Park, SJ, Kim, HK, Rho, S, Nguyen, GV, Song, D, Kang, BK, Moon, HJ, Yeom, MJ, Park, BK (2012).** Identification of reassortant pandemic H1N1 influenza virus in Korean pigs. *J Microbiol Biotechnol* **22**: 699-707.
- Harder, TC, grosse Beilage, E, Lange, E, Meiners, C, Döhring, S, Resch, S, Noé, T, Grund, C, Beer, M, Starick, E (2013).** Expanded Cocirculation of Stable Subtypes, Emerging Lineages, and New Sporadic Reassortants of Porcine Influenza Viruses in Swine Population in Northwest Germany. *J Virol* **87**: 10460-10476.
- Hay, AJ, Abraham, G, Skehell, JJ, Smith, JC, Fellner, P (1977).** Influenza virus messenger RNAs are incomplete transcripts of the genome RNAs. *Nucl. Acids Res* **4**: 4197-4209.
- Haye, K, Bourmakina, S, Moran, T, Garcia-Sastre, A, Fernandez-Sesma, A (2009).** The NS1 protein of a human influenza virus inhibits type I interferon production and the induction of antiviral responses in primary human dendritic and respiratory epithel cells. *J Virol* **83**: 6849-6862.
- Herman, M, Hangernd, S, Malik, YS, Goyal, SM (2005).** Improved In Vitro Cultivation of Swine Influenza Virus. *Intern J Appl Res Vet Med* **3**: 124-128.
- Herz, C, Stavnezer, E, Krug, R, Gurney Jr, T (1981).** Influenza virus, an RNA virus, synthesizes its messenger RNA in the nucleus of infected cells. *Cell* **26**: 391-400.
- Hoffmann, B, Harder, T, Lange, E, Kalthoff, D, Reimann, I, Grund, C, Oehme, R, Vahlenkamp, TW, Beer, M (2010).** New real-time reverse transcriptase polymerase chain reactions facilitate detection and differentiation of novel A/H1N1 influenza virus in porcine and human samples. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* **123**: 286-292.
- Hutchinson, EC, von Kirchbach, JC, Gog, JR, Digard, P (2010).** Genome packaging in influenza A virus. *J Gen Virol* **91**: 313-328.

- ICTV, Orthomyxoviridae (2014).** In "Virus Taxonomy: IXth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses". (2012) Ed: King, AMQ, Adams, MJ, Carstens, EB, Lefkowitz, EJ, San Diego: Elsevier Academic Press  
Zugänglich unter (letzter Zugriff 02.02.2016):  
<http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>.
- Ito, T, Kawaoka, Y, Vines, A, Ishikawa, H, Asai, T, Kida, H (1998).** Continued circulation of reassortant H1N2 influenza viruses in pigs in Japan. *Arch Virol* **143**: 1773-1782.
- Ito, T, Couceiro, JN, Kelm, S, Baum, LG, Krauss, S, Castrucci, MR, Donatelli, I, Kida, H, Paulson, JC, Webster, RG, Kawaoka, Y (1998).** Molecular basis for the generation in pigs of influenza A viruses with pandemic potential. *J Virol* **72**: 7367-7373.
- Jackson, DA, Caton, AJ, McCready, SJ, Cook, PR (1982).** Influenza virus RNA is synthesized at fixed sites in the nucleus. *Nature* **296**: 366-368.
- Jagger, BW, Wise, HM, Kash, JC, Walters, KA, Wills, MM, Xiao, YL, Dunfee, RL, Schwartzman, LM, Ozinsky, A, Bell, GL, Dalton, RM, Lo, A, Efstathion, S, Atkins, JF, Firth, AE, Taubenberger, JK, Digard, P (2012).** An overlapping protein-coding region in influenza A viruses segment 3 modulates the host response. *Science* **337**: 199-204.
- Johnson, NPAS, Mueller, J (2002).** Updating the accounts: global mortality of the 1918-1919 "Spanish" influenza pandemic. *Bull Hist Med* **76**: 105-115
- Kageyama, S (2011).** Pandemic Influenza: A Never-Ending Story. *Yonago Acta Med* **54**: 41-48.
- Karlsson, EA, Ciuoderis, K, Freiden, PJ, Seufzer, B, Jones, JC, Johnson, J, Parra, R, Gongora, A, Cardenas, D, Barajas, D, Osorio, JE, Schultz-Cherry, S (2013).** Prevalence and characterization of influenza viruses in diverse species in Los Llanos, Colombia. *Emerg Microbes Infect* **2**: e20, Epub.
- Khapersky, DA, McCormick, C (2015).** Timing is Everything: Coordinated Control of Host Shutoff by Influenza A Virus NS1 and PA-X Proteins. *J Virol* **89**: 6528-6531.
- Kirisawa, R, Ogasawara, Y, Yoshitake, H, Koda, A, Furuya, T (2014).** Genomic Reassortants of Pandemic A (H1N1) 2009 Virus and Endemic Porcine H1 and H3 in Swine in Japan. *J Vet Med Sci* **76**: 1457-1470.
- Klenk, H-D, Rott, R, Orlich, M, Blödorn, J (1975).** Activation of influenza A viruses by trypsin treatment. *Virology* **68**: 426-439.

- Kong, W, Ye, J, Guan, S, Liu, J, Pu, J (2014).** Epidemic Status of Swine Influenza Virus in China. *Indian J Microbiol* **54**: 3-11.
- Koppstein, D., Ashour, J., Bartel, DP. (2015).** Sequencing the cap-snatching repertoire of H1N1 influenza provides insight into the mechanism of viral transcription initiation. *Nucl Acids Res* **43**: 5052-5064.
- Krause, G, Gilsdorf, A, Becker, J, Bradt, K, Dreweck, C, Gartner, B, Lower, J, Marcic, A, Nicoll, A, Pott, E, Schaade, L, Schoeller, A, Stollorz, V, Trader, C, Razum, O (2010).** First exchange of experiences concerning the H1N1 pandemic in Germany 2009/2010: report on a workshop held March 22-23, 2010, in Berlin. *Bundesgesundheitsblatt, Gesundheitsforschung, Gesundheitsschutz* **53**: 510-519.
- Krug, RM (1982).** Priming of influenza viral RNA transcription by capped heterologous RNAs. *Curr Top Microbiol Immunol* **93**: 125-149.
- Kuck, LR, Taylor, AW (2008).** Photopolymerisation as an innovative detection technique for low-density microarrays. *BioTechniques* **45**: 179-186.
- Kumlin, U, Olofsson, S, Dimock, K, Arnberg, N (2008).** Sialic acid tissue distribution and influenza virus tropism. *Influenza Other Respir Viruses* **2**: 147-154.
- Kuntz-Simon, G, Madec, F (2009).** Genetic and antigenetic evolution of swine influenza viruses in Europe and evaluation of their zoonotic potential. *Zoonoses Public Health* **56**: 310-325.
- Kyriakis, CS, Brown, IH, Foni, E, Kuntz-Simon, G, Maldonado, J, Madec, F, Essen, SC, Chiapponi, C, Van Reeth, K (2011).** Virological surveillance and preliminary antigenetic characterization of influenza viruses in pigs in five European countries from 2006-2008. *Zoonoses Public Health* **58**: 93-101.
- Lange, E, Kalthoff, D, Blohm, U, Teifke, JP, Breithaupt, A, Maresch, C, Starick, E, Fereidouni, S, Hoffmann, B, Mettenleiter, TC, Beer, M, Vahlenkamp, TW (2009).** Pathogenesis and transmission of the novel swine-origin influenza virus A/H1N1 after experimental infection of pigs. *J Gen Virol* **90**: 2119-2123.
- Lange, J, Groth, M, Schlegel, M, Krumbholz, A, Wieczorek, K, Ulrich, R, Köppen, S, Schulz, K, Appl, D, Selbitz, H-J, Sauerbrei, A, Platzer, M, Zell, R, Dürrwald, R (2013).** Reassortants of the pandemic (H1N1) 2009 virus and establishment of a novel porcine H1N2 influenza virus lineage in Germany. *Vet Microbiol* **167**: 345-356.
- Li, X, Qi, X, Miao, L, Wang, Y, Liu, F, Gu, H, Lu, S, Yang, Y, Liu, F (2009).** Detection and subtyping of influenza A viruses based on a short oligonucleotide microarray. *Diagn Microbiol Infect Dis* **65**: 261-270.

- Liang, H, Lam, TT-Y, Fan, X, Chen, X, Zeng, Y, Zhou, J, Duan, L, Tse, M, Chan, C-H, Li, L, Leung, T-Y, Yip, C-H, Cheung, C-L, Zhou, B, Smith, DK, Poon, LL-M, Peiris, M, Guan, Y, Zhu, H (2014).** Expansion of Genotypic Diversity and Establishment of 2009 H1N1 Pandemic-Origin Internal Genes in Pigs in China. *J Virol* **88**: 10864-10874.
- Liu, Y, Wang, J, Ji, J, Chang, S, Xue, C, Ma, J, Bi, Y, Xie, Q (2012).** Phylogenetic diversity and genotypic complexity of H1N1 subtype swine influenza viruses isolated in Mainland China. *Virology Journal* **9**: 289.
- Lorusso, A, Vincent, AL, Harland, ML, Alt, D, Bayles, DO, Swensn, SL, Gramer, MR, Russell, Ca, Smith, DJ, Lager, KM, Lewis, NS (2011).** Genetic and antigenetic characterization of H1 influenza viruses from United States swine from 2008. *J Gen Virol* **92**: 919-930.
- Ma, M, Anderson, BD, Wang, T, Chen, Y, Zhang, D, Gray, GC, Lu, J (2015).** Serological Evidence and Risk Factors for Swine Influenza Infections among Chinese Swine Workers in Guangdong Province. *PLoS ONE* **10**(5): e0128479.  
doi:10.1371/journal.pone.0128479
- Martin, K, Reggio, SH, Helenius, A, Simmonds, K (1981).** Infections entry pathway of influenza virus in a canine kidney cell line. *J Cell Biol* **91**: 601-613.
- Martin, K, Helenius, A (1991).** Nuclear transport of influenza virus ribonucleoproteins: the viral matrix protein (M1) promotes export and inhibits import. *Cell* **67**: 117-130.
- Martin, K, Helenius, A (1991b).** Transport of incoming influenza virus nucleocapsids into the nucleus. *J Virol* **65**: 232-244.
- Mazur, I, Anhlan, D, Mitzner, D, Wixler, L, Schubert, U, Ludwig, S (2008).** The proapoptotic influenza A virus protein PB1-F2 regulates viral polymerase activity by interaction with the PB1 protein. *Cell Microbiol* **10**: 1140-1152.
- McBryde, CN, Niles, WB, Moskey, HE (1928).** Investigations on the transmission and etiology of hog flu. *J Am Vet Med Assoc* **73**: 331-346.
- Mehle, A (2014).** Unusual Influenza A Viruses in Bats. *Viruses* **6**: 3438-3449.
- Meseko, CA, Odaibo, GN, Olaleye, DO (2014).** Detection and isolation of 2009 pandemic influenza A/H1N1 virus in commercial piggery, Lagos Nigeria. *Vet Microbiol* **168**: 197-201.
- Mockalova, L, Gambaryan, A, Romanova, J, Tuzikov, A, Chinarev, A, Katinger, D, Katinger, H, Egorov, A, Bovin, N (2003).** Receptor-binding properties of modern human influenza viruses primarily isolated in Vero and MDCK cells and chicken

- embryonated eggs. *Virology* **313**: 473-480.
- Muramoto, Y, Noda, T, Kawakami, E, Akkina, R, Kawaoka, Y (2013)**. Identification of novel influenza A virus proteins translated from PA mRNA. *J Virol* **87**: 2455-2462.
- Myers, KP, Olsen, CW, Gray, GC (2007)**. Cases of Swine Influenza in Humans. A Review of the Literature. *Clin. Infect Dis* **44**: 1084-1088.
- Naffakh, N, Tomoiu, A, Rameix-Welti, M-A, van der Werf, S (2008)**. Host restriction of avian influenza viruses at the level of the ribonucleoproteins. *Annu Rev Microbiol* **62**: 403-424.
- Nagarajan, MM, Simard, G, Longtin, D, Simard, C (2010)**. Single-step multiplex conventional and real-time reverse transcription polymerase chain reaction assay for simultaneous detection and subtype differentiation of influenza A virus in swine. *J Vet Diagn Invest* **22**: 402-408.
- Nakagawa, Y, Oda, K, Nakada, S (1996)**. The PB1 subunit alone can catalyze cRNA synthesis, and the PA subunit in addition to the PB1 subunit is required for viral RNA synthesis in replication of the influenza virus genome. *J Virol* **70**: 6390-6394.
- Nardelli, L, Pascucci, S, Gualandi, GL, Loda, P (1978)**. Outbreaks of Classical Swine Influenza in Italy in 1976. *Zbl Vet Med B* **25**: 853-857.
- Nayak, DP, Hui, EK, Barman, S (2004)**. Assembly and budding of influenza virus. *Virus Res* **106**: 147-165.
- Nelli, RK, Kuchipudi, SV, White, GA, Perez, BB, Dunham, SP, Chang, K-C (2010)**. Comparative distribution of human and avian type sialic acid influenza receptors in the pig. *BMC Vet Res* **6**: 4.
- Neumann, G, Castrucci, MR, Kawaoka, Y (1997)**. Nuclear Import and Export of Influenza Virus Nucleoprotein. *J Virol* **71**: 9690-9700.
- Neumann, G, Hughes, MT, Kawaoka, Y (2000)**. Influenza A virus NS2 protein mediates vRNP nuclear export through NES-independent interaction with UCRM1. *EMBO J* **19**: 6751-6758.
- Noda, T, Kawaoka, Y (2012)**. Packaging of influenza virus genome: Robustness of selection. *PNAS* **109**: 8797-8798.
- Ohuchi, M, Asaoka, N, Sakai, T, Ohuchi, R (2006)**. Roles of neuraminidase in the initial stage of influenza virus infection. *Microbes and infection* **8**: 1287-1293.
- Obwada, K, Kitame, F, Sugawara, K, Nishimura, H, Homma, M, Nakamura, K (1987)**. Distribution of the antibody to influenza C virus in dogs and pigs in Yamagata Prefecture, Japan. *Microbiol Immunol* **31**: 1173-1180.

- O'Neill, RE, Jaskunas, R, Blobel, G, Palese, P, Moroianu, J (1995).** Nuclear import of influenza virus RNA can be mediated by viral nucleoprotein and transport factors required for protein import. *J Biol Chem* **270**: 22701-22704.
- O'Neill, RE, Talon, J, Palese, P (1998).** The influenza virus NEP (NS2 protein) mediates the nuclear export of viral ribonucleoproteins. *EMBO J* **17**: 288-296.
- Osterhaus, AP, Rimmelzwaan, GF, Martina, BE, Bestebroer, TM, Fouchier, RA (2000).** Influenza B virus in seals. *Science* **288**: 1051-1053.
- Palese, P, Compans, RW (1976).** Inhibition of influenza virus replication in tissue culture by 2-deoxy-2,3-dehydro-N-trifluoroacetylneuraminic acid (FANA): mechanism of action. *J Gen Virol* **33**: 159-163.
- Pascua, PN, Lim, GJ, Kwon, HI, Park, SJ, Kim, EH, Song, MS, Kim, CJ, Choi, YK (2013).** Emergence of H3N2pM-like and novel reassortant H3N1 swine viruses possessing segments derived from the A(H1N1)pdm09 influenza virus, Korea. *Influenza Other Respir Viruses* **7**: 1283-1291.
- Pedersen, JC (2008).** Hemagglutination-inhibition test for avian influenza virus subtype identification and the detection and quantification of serum antibodies to the avian influenza virus. *Methods Mol Biol* **436**: 53-66.
- Pensaert, M, Ottis, K, Vandeputte, J, Kaplan, MM, Bachmann, PA (1981).** Evidence for the natural transmission of influenza A virus from wild ducks to swine and its potential importance for man. *Bull. World Health Organ.* **59**: 75-78.
- Pereda, A, Rimondi, A, Cappuccio, J, Sanguinetti, R, Angel, M, Ye, J, Sutton, T, Dibárbora, M, Olivera, V, Craig, MI, Quiroga, M, Machuca, M, Ferrero, A, Perfumo, C, Perez, DR (2011).** Evidence of Reassortment of Pandemic H1N1 Influenza Virus in Swine in Argentina: Are we facing the expansion of potential epicenters of influenza emergence? *Influenza Other Respi Viruses* **5**: 409-412.
- Pinto, LH, Holsinger, LJ, Lamb, RA (1992).** Influenza virus M2 protein has ion channel activity. *Cell* **69**: 517-528.
- Pippig, J, Ritzmann, M, Büttner, M, Neubauer-Juric, A (2016).** Influenza A viruses detected in swine in Southern Germany after the H1N1 pandemic in 2009. *Zoonoses Public Health* doi: 10.1111/zph.12264.
- Portela, A, Digard, P (2002).** The influenza virus nucleoprotein: a multifunctional RNA-binding protein pivotal to virus replication. *J Gen Virol* **83**: 723-734.

- Ryabinin, VA, Kostina, EV, Maksakova, GA, Neverov, AA, Chumakov, KM, Sinyakov, AN (2011).** Universal Oligonucleotide Microarray for Sub-Typing of Influenza A Virus. *PloS ONE* **6**(4): e17529. doi:10.1371/journal.pone.0017529.
- Schaefer, R, Rech, RR, Gava, D, Cantao, ME, da Silva, MC, Silveira, S, Zanella, JR (2015).** A human-like H1N2 influenza virus detected during an outbreak of acute respiratory disease in swine in Brazil. *Arch Virol* **160**: 29-38.
- Scholtissek, C (1990):** Pigs as the 'mixing vessel', for the creation of new pandemic influenza A viruses. *Med Princip Prac* **2**: 65-71.
- Shapiro, GI, Gurney Jr., T, Krug, RM (1987).** Influenza virus gene expression control mechanisms at early and late times of infection and nuclear-cytoplasmic transport of virus-specific RNAs. *J Virol* **61**: 764-773.
- Shope, RE (1931).** The etiology of swine influenza. *Science* **73**: 214-215.
- Shope, RE (1931).** Swine Influenza. III. Filtration experiments and aetiology. *J Exp Med.* **54**: 373-380.
- Simon, G, Larsen, LE, Durrwald, R, Foni, E, Harder, T, Van Reeth, K, Markowska-Daniel, I, Reid, SM, Dan, A, Maldonado, J, Huovilainen, A, Billinis, C, Davidson, I, Agüero, M, Vila, T, Herve, S, Breum, SO, Chiapponi, C, Urbaniak, K, Kyriakis, CS, Brown, IH, Loeffen, W (2014).** European surveillance network for influenza in pigs: surveillance programs, diagnostic tools and Swine influenza virus subtypes identified in 14 European countries from 2010 to 2013. *PloS ONE* **9**, e115815.
- Skehel, JJ, Bizebard, T, Bullough, PA, Hughson, FM, Kuossow, M, Steinhauer, DA, Wharton, SA, Wiley, DC (1995).** Membrane fusion by influenza hemagglutinin. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **60**: 573-580.
- Skehel, JJ, Wiley, DC (2000).** Receptor binding and membran fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin. *Annu Rev Biochem* **69**: 531-569.
- Smith, TF, Burgert Jr, EO, Dowdle, WR, Noble, GR, Campbell, RJ, Van Scoy, RE (1976).** Isolation of swine influenza virus from autopsy lung tissue of man. *N Engl J Med* **294**: 708-710.
- Smith, AE, Helenius, A (2004).** How viruses enter animal cells. *Science* **304**: 237-242.
- Snoeck, CJ, Abiola, OJ, Sausy, A, Okwen, MP, Olubayo, AG, Owoade, AA, Muller, CP (2015).** Serological evidence of pandemic (H1N1) 2009 virus in pigs, west and central Africa. *Vet Microbiol* **176**: 165-171.

- Spackman, E, Senne, DA, Myers, TJ, Bulaga, LL, Garber, LP, Perdue, ML, Lohman, K, Daum, LT, Suarez, DL (2002).** Development of a Real-Time Reverse Transcriptase PCR Assay for Type A Influenza Virus and the Avian H5 and H7 hemagglutinin subtypes. *J Clin Microbiol* **40**: 3256-3260.
- Stech, J, Xiong, X, Scholtissek, C, Webster, RG (1999).** Independence of Evolutionary and Mutational Rates after Transmission of Avian influenza Viruses to Swine. *J Virol* **73**: 1878-1884.
- Stevens, J, Chen, L-M, Carney, PJ, Garten, R, Foust, A, Le, J, Pokorny, BA, Manojkumar, R, Silverman, J, Devis, R, Rhea, K, Xu, X, Bucher, DJ, Paulson, J, Cox, NJ, Klimov, A, Donis, RO (2010).** Receptor Specificity of Influenza A H3N2 Viruses Isolated in Mammalian Cells and Embryonated Chicken Eggs. *J Virol* **84**: 8287-8299.
- Taubenberger, JK, Morens, DM (2006).** 1918 Influenza: the Mother of All Pandemics. *Emerg Infect Dis* **12**: 15-22.
- Taubenberger JK, Reid AH, Lourens RM, Wang R, Jin G, Fanning TG (2006).** Molecular virology: was the 1918 pandemic caused by a bird flu? Was the 1918 flu avian in origin? (Reply.) *Nature* **440**: E9–E10.
- Taubenberger, JK, Morens, DM (2010).** Influenza: The Once and Future Pandemic. *Public Health Rep* **125**: 16-26.
- Taubenberger, JK, Kash, JC (2010).** Influenza Virus Evolution, Host Adaption and Pandemic Formation. *Cell Host Microbe* **7**: 440-451.
- Toyoda, T, Kobayashi, M, Nakada, S, Ishihama, A (1996).** Molecular dissection of influenza virus RNA polymerase: PB1 subunit alone is able to catalyze RNA synthesis. *Virus Genes* **12**: 155-163.
- Trifonov, V, Khiabani, H, Rabadan, R (2009).** Geographic dependence, surveillance, and origins of the 2009 influenza A (H1N1) virus. *N. Engl. J. Med.* **361**: 115-119.
- Van Reeth, K, Brown, IH, Dürrwald, R, Foni, E, Labarque, G, Lenihan, P, Maldonado, J, Markowska-Daniel, I, Pensaert, M, Pospisil, Z, Koch, G (2008).** Seroprevalence of H1N1, H3N2 and H1N2 influenza viruses in pigs in seven European countries in 2002-2003. *Influenza Other Respi Viruses* **2**: 99-105.
- Vasin, AV, Sandybaev, NT, Plotnikova, MA, Klotchenko, SA, Cherviakova, OV, Strochkov, VM, Tailakowa, ET, Temkina, OA, Brodskaia, AV, Zabrodskaia, IaA, Nikulenkov, KP, Egorov, VV, Koshemetov, ZhK, Sancyzbai, AR, Kiselev, OI**

- (2013). Universal diagnostic oligonucleotide microarray for subtyping of human and animal influenza A viruses. *Vopr Virusol* **58**: 32-37.
- Veit, M, Kretzschmar, E, Kuroda, K, Garten, W, Schmidt, MFG, Klenk, H-D, Rott, R (1991).** Site-Specific Mutagenesis Identifies Three Cysteine Residues in the Cytoplasmatic Tail as Acylation Sites of Influenza Virus Hemagglutinin. *J Virol* **65**: 2491-2500.
- Vijaykrishna, D, Smith, GJ, Pybus, OG, Zhu, H, Bhatt,S, Poon, LL, Riley, S, Bahl, J, Ma, SK,Cheung, CL, Perera, RA, Chen, H, Shortridge, KF, Webby, RJ, Webster, RG, Guan, Y, Peiris, JS (2011).** Long-term evolution and transmission dynamics of swine influenza A virus. *Nature* **473**: 519-522.
- Vincent, AL, Ma, W, Lager, KM, Gramer, MR, Richt, JA, Janke, HB (2009b).** Characterization of a newly emerged genetic cluster of H1N1 and H1N2 swine influenza virus in the United States. *Virus Genes* **39**: 176-185.
- Vreede, FT, Jung, TE, Brownlee, GG (2004).** Model Suggesting that Replication of Influenza Virus is Regulated by Stabilisation of Replicative Intermediates. *J Virol* **78**: 9568-9572.
- Vreede, FT, Fodor, E (2010).** The role of the influenza virus RNA polymerase in host shut-off. *Virulence* **1**: 436-439.
- Watson, SJ, Langat, P, Reid, SM, Tsan-Yuk Lam, T, Cotten, M, Kelly, M, Van Reeth, K, Qiu, Y, Simon, G, Bonin, E, Foni, E, Chiapponi, C, Larsen, L, Hjulsager, C, Markowska.Danial, I, Urbanik, K, Dürrwald, R, Schlegel, M, Huovilainen, A, Davidson, I, Dán, A, Loeffen, W, Edwards, S, Bublot, M, Vila, T, Maldonado, J, Valls, L, ESNIP3 Consortium, Brown, IH, Pybus, OG, Kellam, P (2015).** Molecular Epidemiology and Evolution of Influenza Viruses Circulating within European Swine between 2009 and 2013. *J Virol* **89**: 9920-9931.
- Webby, RJ, Webster, RG (2001).** Emergence of influenza A viruses. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* **356**: 1817-1828.
- Webster, RG, Beau, WJ (1978).** Genetics of influenza virus. *Ann Rev Genet* **12**: 415-431.
- Webster, RG, Beau, WJ, Gorman, OT, Chambers, TM, Kawaoka, Y (1992).** Evolution and Ecology of Influenza A Viruses. *Microbiol Rev* **56**: 152-179.
- Webster, RG (2002).** The importance of animal influenza for human disease. *Vaccine* **20**: 16-20.
- White, J, Kartenbeck, J, Helenius, A (1982).** Membrane fusion activity of influenza virus. *EMBO* **1**: 217-222.

- Wise, HM, Foeglein, A, Sun, J, Dalton, RM, Patel, S, Howard, W, Anderson, EC, Barclay, WS, Digard, P (2009).** A complicated message: Identification of a Novel PB1-Related Protein Translated from Influenza A Virus Segment 2 mRNA. *J Virol* **83**: 8021-8031.
- Wise, HM, Hutchinson, EC, Jagger, BW, Stuart, AD, Kang, ZH, Robb, N, Schwartzman, LM, Kash, JC, Fodor, E, Firth, AE, Gog, JR, Taubenberger, JK, Digard, P (2012).** Identification of a Novel Splice Variant Form of the Influenza A Virus M2 Ion Channel with an Antigenically Distinct Ectodomain. *PLoS Pathog* **8**(11): e1002998.
- Witte, KH, Niehoff, H, Ernst, H, Schmidt, U, Prager, D (1981).** Erstmaliges Auftreten einer durch das Schweineinfluenzavirus verursachten Epizootie in Schweinebeständen der Bundesrepublik Deutschland. *Tierärztl Umschau* **36**: 591-606.
- Wu, Y, Wu, Y, Tetsen, B, Shi, Y, Gao, GF (2014).** Bat-derived influenza-like viruses H17N10 and H18N11. *Trends Microbiol* **4**: 183-191.
- Yoon, SW, Webby, RJ, Webster, RG (2014).** Evolution and Ecology of Influenza A viruses. *Curr Top Microbiol Immunol* **385**: 359-375.
- Yu, H, Hua, R-H, Zhang, Q, Liu, T-Q, Liu, H-L, Li, G-X, Tong, G-Z (2008).** Genetic Evolution of Swine Influenza A (H3N2) Viruses in China from 1970 to 2006. *J Clin Microbiol* **46**: 1067-1075.
- Yuanji, G (Yuanchi, K), Fengen, J, Ping, W, Min, W, Jiming, Z (Chinming, C) (1983).** Isolation of Influenza C Virus from Pigs and Experimental Infection of Pigs with Influenza C Virus. *J Gen Virol* **64**: 177-182.
- Zell, R, Scholtissek, C, Ludwig, S (2013).** Genetics, evolution, and the zoonotic capacity of European Swine influenza viruses. *Current topics in microbiology and immunology*, **370**: 29-55.
- Zhang, J, Gauger, PC (2014).** Isolation of swine influenza viruses in cell cultures and embryonated chicken eggs. *Methods Mol Biol* **1161**: 265-276.
- Zhirnov, O, Klenk, H-D (2003).** Human influenza A viruses are proteolytically activated and do not induce apoptosis in CaCo-2 cells. *Virology* **313**: 198-212.
- Zhou, NN, Senne, DA, Landgraf, JS, Swenson, SL, Erickson, G, Rossow, K, Liu, L, Yoon, K, Krauss, S, Webster, RG (1999).** Genetic reassortment of avian, swine and human influenza A viruses in american pigs. *J Virol* **73**: 8851-8856.
- Zimmer, SM, Burke, DS (2009).** Historical perspective – Emergence of influenza A (H1N1) viruses. *N Engl J Med* **361**: 279-285.

## VIII. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich unterstützt und die Entstehung dieser Arbeit ermöglicht haben.

Zuerst möchte ich mich bei Frau Dr. Antonie Neubauer-Juric für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit, die Doktorarbeit in Ihrer Abteilung der Veterinärvirologie am Bayerischen Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit in Oberschleißheim durchzuführen, bedanken. Ohne ihre stetige Unterstützung, ihre endlose Geduld sowie ihre unumstößliche optimistische Motivation wäre diese Arbeit nie entstanden. Herzlichen Dank für die hervorragende Betreuung, sowohl auf fachlicher als auch auf menschlicher Ebene.

Auch Herrn Prof. Dr. Mathias Ritzmann gilt mein Dank für die angenehme und unkomplizierte Zusammenarbeit sowie für die Übernahme der Betreuung meiner Arbeit.

Ich bedanke mich beim Bayerischen Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit für die Bereitstellung der finanziellen Mittel.

Herzlichen Dank an Dr. Robert Fux vom Virologischen Institut der Ludwig-Maximilians-Universität für die Übersendung zahlreicher interessanter Proben.

Weiterhin gilt mein Dank dem Team der Veterinärvirologie am Bayerischen Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit in Oberschleißheim, im Besonderen Isabella Dzijan für ihr stets offenes Ohr zu allen Fragen im Labor, die sie mit viel Geduld und unerschöpflicher guter Laune beantwortet hat. So mancher trister Arbeitstag am PC wurde durch sie erleuchtet und mit Hilfe ihrer Motivation konnte ich immer wieder Kraft tanken. Danke auch an Birgit von Kölln-Braun und Franziska Horvath für ihre tatkräftige Unterstützung bei meiner Laborarbeit.

Liebe Hanna, dir danke ich für deine stete Besorgnis um mein Wohlergehen und für deine guten Ratschläge für meinen Gang durchs Leben. Lieber Gerhard, auch wenn du nun nicht mehr unter uns weilst, wird dich mein Dank für deine Unterstützung und deine unerschütterliche Ruhe erreichen.

Jane, du bist immer so endlos stolz auf mich. An dieser Stelle möchte ich dir sagen, dass ich stolz bin eine Schwester wie dich zu haben.

Liebe Mama, ohne dich wäre ich ganz sicher nicht, was ich heute bin. Du hast mir alles mit auf den Weg gegeben, um mein Leben so zu gestalten wie ich es wollte. Danke für all deine Liebe, die du mir stets entgegen bringst, egal was auch immer kommen mag.

Frank, mein lieber Ehemann, was wäre ich nur ohne dich? Du bist mein Halt in allen Situationen, bringst Farbe und Intensität in mein Leben. Ich danke dir für deine absolut bedingungslose Liebe.