

Untersuchungen zu Infektionen mit dem Influenza A Virus bei
Wildschweinen in Bayern

von Anika Schüle

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

Untersuchungen zu Infektionen mit dem Influenza A Virus bei
Wildschweinen in Bayern

von Anika Schülein
aus Gunzenhausen

München 2022

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 der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Mathias Ritzmann

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Asisa K. Volz

Tag der Promotion: 12.02.2022

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

Folgende wissenschaftliche Arbeit ist in dieser Dissertationsschrift enthalten:

Exposure of wild boar to Influenza A viruses in Bavaria: Analysis of seroprevalences and antibody subtype specificity before and after the panzootic of highly pathogenic avian influenza viruses A (H5N8)

**Anika Schülein¹, Mathias Ritzmann², Jürgen Christian³, Katharina Schneider¹,
Antonie Neubauer-Juric¹**

¹Bavarian Health and Food Safety Authority, Oberschleissheim, Germany

²Clinic for Swine, Ludwig-Maximilians-Universität München, Oberschleissheim, Germany

³Bavarian Health and Food Safety Authority, Erlangen, Germany

Zoonoses and Public Health. 2021; 00:1-13. DOI: 10.1111/zph.12841

Received: 18 August 2020; Accepted: 01 April 2021; First Published: 13 May 2021

Meiner Mutter

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG	1
II.	ERWEITERTE LITERATURÜBERSICHT	3
1.	Influenza A Viren	3
1.1.	Taxonomie und Morphologie.....	3
1.2.	Genetische Variabilität.....	5
1.2.1.	Antigenic drift	5
1.2.2.	Antigenic shift	6
1.3.	Speziesspezifität – das Schwein als „Mixing vessel“	7
1.4.	Zoonotische Bedeutung.....	9
1.5.	Bedeutende Pandemien und Panzootien	9
1.5.1.	H1N1-Pandemie 1918	10
1.5.2.	Pandemien durch Nachkommen des Erregers der „Spanischen Grippe“...11	
1.5.2.1.	H2N2-Pandemie 1957	11
1.5.2.2.	H3N2-Pandemie 1968	11
1.5.2.3.	H1N1-Pandemie 1977	12
1.5.2.4.	H1N1-Pandemie 2009	12
1.5.3.	Ausbruch der hochpathogenen aviären Influenza im November 2016 in Deutschland.....	14
1.6.	Pathogenese und klinisches Bild beim Haus- und Wildschwein	16
1.7.	Aktive und passive humorale Immunität	17
2.	IAV Infektionen beim Wildschwein	19
2.1.	Nachweis einer Infektion	19
2.2.	Seroprävalenz von IAV-Infektionen beim Wildschwein	21
2.2.1.	IAV-Seroprävalenz in deutschem Schwarzwild	21
2.2.2.	IAV-Seroprävalenz in europäischen Wildschweinpopulationen	25
2.2.3.	IAV-Seroprävalenzen in asiatischen Wildschweinen	28
2.2.4.	IAV-Seroprävalenzen in Wildschweinen in den USA und Kanada.....	30
3.	Infektionen mit dem sudan Herpesvirus 1 beim Wildschwein	32
III.	PUBLIKATION	37
IV.	ERWEITERTE METHODEN, ERGEBNISSE UND DISKUSSION.	67

1.	Auswahl geeigneter Stichproben für die Untersuchung der bayerischen Wildschweinpopulation auf IAV-spezifische Antikörper	67
2.	Evaluation der serologischen Nachweisverfahren	68
2.1.	Hierarchischer Einsatz von ELISA, HAH und SNT zur Detektion und Typisierung von IAV-Antikörpern	68
2.2.	Zusammenhang zwischen Ergebnissen im ELISA und im HAH/SNT	71
2.3.	Nachweis von AIV- neutralisierenden Antikörpern in Wildschweinseren	74
3.	IAV Seroprävalenz in der bayerischen Wildschwein-population	78
3.1.	Entwicklung der IAV-Seroprävalenzen bei bayerischen Wildschweinen auf Ebene der Regierungsbezirke während des Untersuchungszeitraums 2014 bis 2019.....	78
3.2.	Einflüsse auf die IAV-Seroprävalenz in der Wildschweinpopulation.....	81
3.2.1.	Wildschweindichte.....	81
3.2.2.	Hausschweindichte	84
3.2.3.	Regionalität.....	89
3.2.4.	Saisonale Verteilung der IAV-Seroprävalenzen.....	92
3.2.5.	Alter der Tiere.....	95
3.2.6.	Ausbruch von HPAIV Ende 2016	97
3.3.	Vergleich der regionalen Verbreitung und der Seroprävalenzen von IAV- mit SuHV-1-Infektionen im Schwarzwild.....	99
3.3.1.	Einfluss von Alter und Geschlecht auf die SuHV-1-Seroprävalenz bayerischer Wildschweine vergleichend mit jenem auf die IAV-Seroprävalenz.....	105
3.3.2.	Einfluss von Wild- und Hausschweindichte auf die SuHV-1 Seroprävalenz bayerischer Wildschweine vergleichend mit jenem auf die IAV-Seroprävalenz.....	106
4.	Untersuchung von Lungengewebe und Nasentupfern erlegter und tot aufgefundener Wildschweine mittels PCR	110
V.	ZUSAMMENFASSUNG	113
VI.	SUMMARY	115
VII.	LITERATURVERZEICHNIS.....	117
VIII.	DANKSAGUNG.....	137

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
Abb.	Abbildung
AGID	Agar gel immunodiffusion assay
AIV	aviäres Influenza A Virus
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CI	confidence interval (Konfidenzintervall)
DNA	deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
et al.	et alii
Fig.	Figure
FMIA	Fluorescent microsphere immunoassay
H1N1pdm2009	Erreger der H1N1-Pandemie 2009
HA	Hämagglutinin
HAH	Hämagglutinationshemmtest
HPAIV	highly pathogenic avian influenza virus (hoch pathogenes aviäres Influenzavirus)
IAV	Influenza A Virus
IgA	Immunglobulin A
IgG	Immunglobulin G
kv	Kilovolt
LPAIV	low pathogenic avian influenza virus (niedrig pathogenes aviäres Influenzavirus)
M1	Matrixprotein 1
M2	Matrixprotein 2
Mio.	Million
n.a.	nicht untersucht
NA	Neuraminidase

NAH	Neuraminidasehemmtest
NEP	Nuclear export protein
nm	Nanometer
NP	Nukleoprotein
NS1	Nichtstrukturprotein 1
NS2	Nichtstrukturprotein 2
OD	optische Dichte
p. i.	post infectionem
P/N Ratio	Verhältnis von optischer Dichte der Probe zu optischer Dichte gepoolter Negativseren
PA	Polymerase acidic protein
PB1	Polymerase basic protein 1
PB2	Polymerase basic protein 2
PCR	polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
pdm	pandemisch
PRRS	porcine reproductive and respiratory syndrome
RNA	ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
RNP	ribonucleoprotein (Ribonukleoproteinkomplex)
RT-PCR	reverse transcription polymerase chain reaction (Reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion)
S-IAV	suides Influenza A Virus
SNT	Serumneutralisationstest
sh.	siehe
SuHV-1	Suides Herpesvirus 1
Tab.	Tabelle
USA	United States of America
z. B.	zum Beispiel

I. EINLEITUNG

Influenza A Viren (IAV) zirkulieren weltweit in Wildvögeln, jedoch auch Wirtschaftsgeflügel, Schweine oder Menschen sind mögliche Wirte (FOUCHIER et al., 2005). Ihre bemerkenswerte genetische Variabilität erlaubt es den Viren regelmäßig, die adaptive Immunantwort eines Wirts zu durchbrechen, ihre Pathogenität zu ändern oder sogar Speziesbarrieren zu überwinden (BOUVIER & PALESE, 2008). Diese Wandlungsfähigkeit basiert einerseits auf der hohen Wahrscheinlichkeit von Punktmutationen während der Replikation (WEBSTER et al., 1992). Andererseits ist die Fähigkeit, im Falle von Koinfektionen ganze RNA-Segmente zwischen distinkten IAV auszutauschen, ein wichtiger Faktor. (MCDONALD et al., 2016). Schweine gelten aufgrund ihrer Empfänglichkeit für humane und aviäre IAV (AIV) als besonders wichtiger Zwischenwirt für die Evolution neuer Reassortanten (MA et al., 2009). Die Entstehung von Varianten mit zoonotischem Potenzial ist spätestens seit der bewusst erlebten SarsCoV-2 Pandemie gefürchtet.

Eine sich ab 2009 sehr schnell weltweit ausbreitende Influenza-Pandemie erhielt die Bezeichnung „Schweinegrippe“, da sie durch eine Mehrfachreassortante vom Subtyp H1N1 mit Elementen suider IAV ausgelöst wurde (VAN REETH et al., 2012). 2016 folgte eine Panzootie von zuvor noch nie beobachtetem Ausmaß mit hochpathogenem AIV (HPAIV) des Subtypen H5N8 (GLOBIG et al., 2018). Angesichts der großen Anzahl verendeter Wildvögel war es Hypothese dieser Arbeit, dass Wildschweine Kontakt mit HPAIV H5N8 hatten und langfristig Auswirkungen auf das IAV-Geschehen im bayerischen Wildschwein resultiert haben könnten. IAV-Prävalenzen waren zu Beginn der Arbeit noch nicht bekannt.

Ziel dieser Arbeit war es daher, zunächst einen Überblick über das IAV-Infektionsgeschehen im bayerischen Schwarzwild zu erhalten. Neben Seroprävalenzen sollte die Subtypspezifität zirkulierender Antikörper bestimmt werden. Die in Hausschweinebeständen schon lange zirkulierenden Viren der Subtypen H1N1, H1N2 und H3N2, aber auch die im Jahr 2010 vom Mensch auf das Schwein rückübertragenen H1pdmN1, resultierende H1pdmN2-Reassortanten und insbesondere AIV des Subtyps H5N8 sollten einbezogen werden. IAV-Seroprävalenzen sollten nicht nur vergleichend auf regionaler Ebene geschätzt,

sondern auch ein Einfluss eines möglichen HPAI H5N8-Eintrags durch gezielte Auswahl von vor und nach der Panzootie gewonnenen Proben beurteilt werden.

II. ERWEITERTE LITERATURÜBERSICHT

1. Influenza A Viren

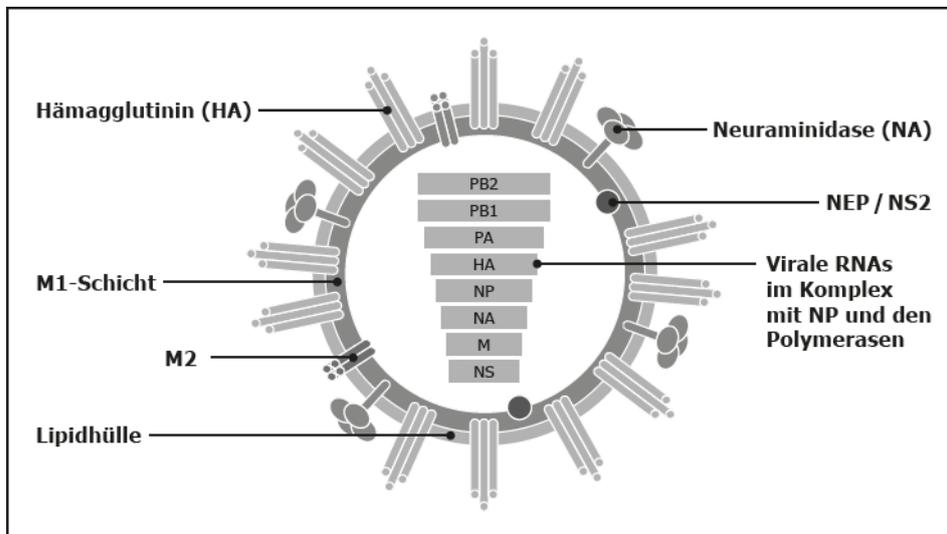
1.1. Taxonomie und Morphologie

Influenza A Viren (IAV) werden in die Virusfamilie *Orthomyxoviridae* (griechisch orthos: gerade, richtig; myxa: Schleim) eingeordnet (INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES, 2019). Eine wichtige Gemeinsamkeit der Mitglieder dieser Familie ist das segmentierte Genom mit negativer Orientierung der RNA (MCDONALD et al., 2016). Die Virusfamilie umfasst die Genera *Alpha-*, *Beta-*, *Gamma-* und *Deltainfluenzavirus* sowie *Isa-*, *Quaranja-* und *Thogotovirus*. IAV bilden die einzige Spezies im Genus *Alphainfluenzavirus* (INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES, 2019). Im Vergleich zu den übrigen derzeit bekannten Influenzaviren, den Beta-, Gamma- und Deltainfluenzaviren, zeichnen sich die IAV durch ihre ausgeprägte genetische Vielfalt, ihr breites Wirtsspektrum sowie das besonders schwere Krankheitsbild aus (ASHA & KUMAR, 2019).

IAV sind behüllte Viren (sh. Abb. 1a), die sphärische (Durchmesser ca. 100 nm) oder nach *in vitro* Passagierung auch filamentöse Gestalt (Länge ca. 300 nm) annehmen können (sh. Abb. 1b; BOUVIER & PALESE, 2008). Die Hülle besteht aus einer Lipiddoppelmembran, welche sich von der Wirtszelle ableitet (WEBSTER et al., 1992). Dort sind die Glykoproteine Hämagglutinin (HA) und Neuraminidase (NA) in Form sogenannter „Spikes“ verankert (WEBSTER et al., 1992; MOSTAFA et al., 2018). Die HA-Trimere bilden ca. 80%, die NA-Tetramere ca. 17% der Oberflächenproteine (MOSTAFA et al., 2018). Das Matrixprotein 2 (M2), das als Ionenkanal dient, ist als integrales Membranprotein ebenfalls in die Virushülle eingelagert (WEBSTER et al., 1992). Nach innen grenzt eine Schicht aus Matrixprotein 1 (M1) an die Hülle. Innerhalb schließt sich das Nuclear export protein (NEP) an, das historisch auch als Nichtstrukturprotein 2 (NS2) bezeichnet wird (WEBSTER et al., 1992). Der Ribonukleoproteinkomplex (RNP) schließlich besteht aus viraler RNA, Nukleoprotein (NP) und RNA-abhängiger RNA-Polymerase (BOUVIER & PALESE, 2008). Letztere besteht aus zwei basischen Untereinheiten, dem Polymerase basic protein 1 (PB1) und dem Polymerase basic protein 2 (PB2), sowie einer sauren Untereinheit, dem Polymerase acidic protein

(PA) (MOSTAFA et al., 2018). Das Genom von IAV besteht aus acht Segmenten, welche der Länge nach nummeriert werden und jeweils für mindestens ein Protein kodieren (NELSON & HOLMES, 2007).

a



b

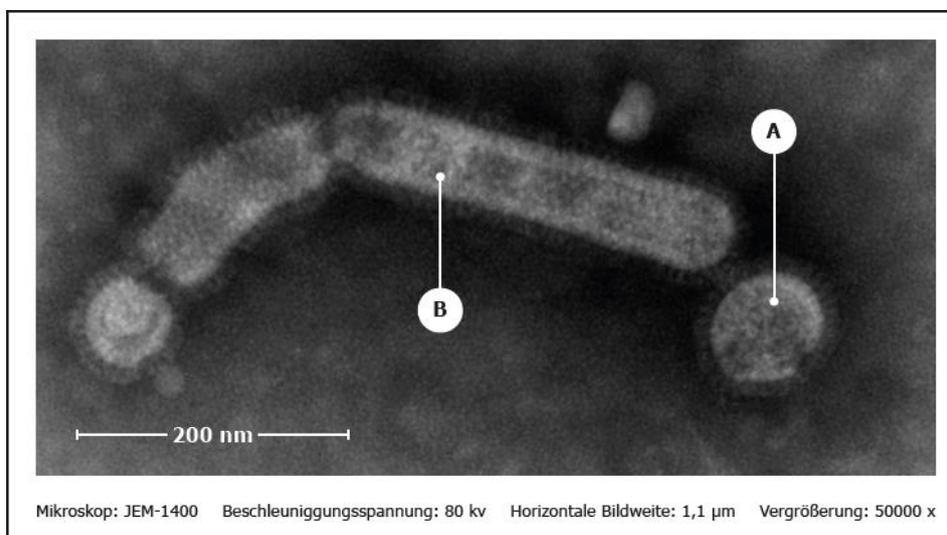


Abb. 1: Struktur eines IA-Virions. a – schematische Darstellung eines IAV-Partikels (modifiziert nach Fields 5. Edition, Abb. 47.2); b – elektronenmikroskopische Darstellung sphärischer (A) und filamentöser (B) IAV-Partikel

Die Oberflächenproteine HA und NA erfüllen während des Replikationszyklus wichtige Aufgaben. Um den Zugang zu den Epithelzellen des Wirts, in denen die Virusvermehrung stattfindet, zu erleichtern, baut die NA die wirtseigene

Mucinschicht durch Spaltung von Sialinsäureresten ab (SHTYRYA et al., 2009). Ein optimales Milieu für die Bindung des HA an die Wirtszellmembran entsteht und die Infektion der Zellen kann initiiert werden (GAYMARD et al., 2016). Nachdem der RNP in den Zellkern gelangt, werden dort die viralen Nukleinsäuren repliziert (BEER, 2015). Nach Zusammenschluss der Virusbestandteile, dem „Assembly“, und der Knospung (Budding) an der äußeren Zellmembran werden die Tochterviren schließlich aus der Wirtszelle entlassen (NAYAK et al., 2004). Um diesen letzten Schritt zu optimieren, verhindert die NA die Bindung des neu gebildeten Virus an die bereits infizierte Wirtszelle (SHTYRYA et al., 2009).

Aufgrund der hohen antigenetischen Vielfalt werden IAV in Subtypen unterteilt, welche anhand der Oberflächenantigene HA und NA bestimmt werden (BOUVIER & PALESE, 2008). Bislang wurden aus Wildvögeln Viren mit 16 unterschiedlichen HA- sowie neun NA-Subtypen identifiziert. Die Nomenklatur von Influenzavirusstämmen folgt einem standardisierten Schema, unter Benennung der Virusspezies, der infizierten Tierart (falls das Virus nicht aus Menschen isoliert wurde), des Ortes des Nachweises, der Labornummer und – im Falle von IAV – des Subtyps (BOUVIER & PALESE, 2008).

1.2. Genetische Variabilität

Das Genom von IAV unterliegt einem ständigen Wandel (HOLLAND et al., 1982). Genetisch neue Virusvarianten können jederzeit entstehen und sich bei entsprechender Kompetenz in der Population durchsetzen. Dies kann unter anderem die Evasion vor der adaptiven Immunantwort des Wirtes, eine Änderung der Pathogenität oder auch der Speziespezifität zur Folge haben (BOUVIER & PALESE, 2008). Für genetische Veränderungen stehen den IAV zwei wesentliche Mechanismen zur Verfügung, die im Folgenden beschrieben sind.

1.2.1. Antigenic drift

Während der Proofreading-Mechanismus von DNA-Polymerasen in der Regel eine sehr exakte Replikation der Nukleinsäuren gewährleistet, besitzt die RNA-Polymerase von IAV keine solche Korrekturlesefunktion. Als Folge davon wird eines von ca. 10.000 Nukleotiden nicht korrekt eingebaut (WEBSTER et al., 1992). Hat eine solche Punkt-Mutation den Austausch einer Aminosäure zur Folge, so sind die entstehenden Viren in den meisten Fällen nicht funktional oder im Wettstreit mit anderen Varianten im Nachteil (WEBSTER et al., 1992). Einige wenige sind

jedoch den zuvor zirkulierenden Stämmen überlegen (BOUVIER & PALESE, 2008). Sind relevante Epitope betroffen, können sich antigenetisch neue Viren durchsetzen und so der Wirt für eine Infektion wieder empfänglich sein (BOUVIER & PALESE, 2008). Zudem können sich Mutationen in z. B. HA, NA oder NP auf die Speziespezifität des Virus auswirken (SCHOLTISSEK et al., 1985; LONG et al., 2019). Insbesondere von aviären Influenzaviren (AIV, sh. auch Kapitel II.1.5.3) ist bekannt, dass geringe Abweichungen im Genom einen erheblichen Einfluss auf die Pathogenität des Virus haben können (ABDELWHAB et al., 2013).

Die Divergenz von Isolaten aus einem räumlich begrenzten Infektionsgeschehen demonstriert klar die Kontinuität des Prozesses. Nukleotidsequenzen von Viren, die im Zuge eines lokalen Infektionsgeschehens etwa gleichzeitig aus unterschiedlichen Individuen isoliert werden, sind einander sehr ähnlich bis nahezu identisch. Die genetischen Unterschiede nehmen mit wachsendem zeitlichen Abstand der Virusisolation zum ursprünglichen Ausbruchsgeschehen zu (HOLLAND et al., 1982). Bei Wasservögeln vollzieht sich die Evolution der Viren allerdings erheblich langsamer als bei anderen Spezies (WEBSTER et al., 1992; MOSTAFA et al., 2018). Dieses Phänomen wird auf die Tatsache zurückgeführt, dass es sich um den originären Wirt, den Reservoirwirt, des Virus handelt und in Folge einer bereits optimalen Adaptation der weitere Selektionsdruck vergleichsweise gering ist (GORMAN et al., 1990).

1.2.2. Antigenic shift

Während der Replikation des Virusgenoms im Zellkern liegen die entstandenen acht Genomsegmente zunächst als einzelne RNP vor. Diese werden im Rahmen des sogenannten „Assortments“ vereint, um im weiteren Verlauf Virionen mit vollständigen Genomen bilden zu können (MCDONALD et al., 2016). Oft replizieren IAV jedoch nicht alle Segmente des gesamten Erbgutes im exakt gleichen Verhältnis. Fehlende RNA-Abschnitte können unter Umständen durch die Segmente eines genetisch distinkten Virus ersetzt werden. Grundvoraussetzung ist sowohl, dass dieselbe Wirtszelle koinfiziert ist (LOWEN, 2018), als auch eine ausreichend nahe genetische Verwandtschaft (MCDONALD et al., 2016). Bereits IAV und Influenza-B-Viren erfüllen diese Verwandtschafts-Bedingung nicht mehr, unter natürlichen Gegebenheiten ist daher kein Genaustausch zwischen diesen Viren möglich (BAKER et al., 2014).

Dieser Vorgang, bei dem mindestens zwei distinkte Viren Teile ihrer RNA untereinander austauschen, wird als „genetic Reassortment“ oder „Genetic shift“ bezeichnet (LOWEN, 2018). Ist hiervon der Abschnitt betroffen, der für das HA und/oder die NA kodiert, so resultiert auch ein „Antigenic shift“ (BOUVIER & PALESE, 2008).

Die Koinfektion einer Zelle mit mehreren verschiedenen IAV kann folglich zu Varianten führen, deren Genom eine Kombination der Segmente aller ursprünglichen Viren darstellt (BOURRET, 2018). Obwohl die meisten so entstehenden Nachkommen den ursprünglichen Viren unterlegen sind, handelt es sich beim Reassortment um einen wichtigen evolutionären Mechanismus: Der Austausch von Segmenten des Genoms führt innerhalb kürzester Zeit zu einer enormen Vielfalt an neuen Virusstämmen mit unter Umständen völlig neuen Eigenschaften (MCDONALD et al., 2016; LOWEN, 2018).

1.3. Speziespezifität – das Schwein als „Mixing vessel“

Das natürliche Reservoir für IAV bilden wildlebende Wasservögel. Daneben erstreckt sich das Wirtsspektrum jedoch auch auf zahlreiche Säugetierarten, darunter Schweine sowie Menschen (FOUCHIER et al., 2005). Erst vor wenigen Jahren wurden zudem IAV-Sequenzen von zwei weiteren HA- und NA-Subtypen, H17 und H18 bzw. N10 und N11 identifiziert, deren Wirtsspektrum nach aktuellem Kenntnisstand ausschließlich auf Fledermäuse beschränkt ist (TONG et al., 2012; TONG et al., 2013).

Entscheidend für die Speziespezifität von IAV ist zunächst die Interaktion von viralen Oberflächenproteinen mit Oberflächenstrukturen der Wirtszellen, die im Allgemeinen als Rezeptoren bezeichnet werden. Aber auch die Effizienz aller weiteren Schritte der Replikation nach erfolgreicher Infektion kann für den Tropismus eine Rolle spielen. Auch hier sind virale Mechanismen, also auch Proteinstrukturen, spezifisch auf die Wirtszelle optimiert (LONG et al., 2019). Die Affinität des HA zu Sialinsäureresten an Glykoproteinen der Wirtszellmembran ist ein wichtiger Faktor (BOURRET, 2018). Beim Menschen sind im oberen Respirationstrakt, dem Ort, an dem IAV in aller Regel repliziert werden, diese Sialinsäurereste α -2,6-glykosidisch an Galaktose gebunden (NEUMANN et al., 2009; TORREMORELL et al., 2012). Folglich weisen an den Menschen adaptierte IAV eine Affinität für diese Rezeptorstrukturen auf. AIV dagegen binden effizient

an α -2,3-verknüpfte Sialinsäurereste, die im Epithel des aviären Intestinaltraktes vorkommen (NEUMANN et al., 2009).

Der gelegentlichen und zufälligen Infektion von Menschen durch an andere Spezies adaptierte IAV kann nur dann eine rasche Ausbreitung innerhalb der menschlichen Population folgen, wenn der speziesfremde Erreger aufgrund genetischer Anpassung schnell effizient von Mensch zu Mensch übertragen wird, also eine Speziesbarriere überwindet (LONG et al., 2019).

Diese genetische Anpassung kann durch die Bildung von Reassortanten deutlich beschleunigt werden. Ein Reassortment zwischen aviären und humanen IAV kann auch aus einer Infektion eines für beide Varianten empfänglichen „Zwischenwirts“ resultieren (CASTRUCCI et al., 1993). Für diese Rolle wird das Schwein seit langem diskutiert, da die Tiere im Respirationstrakt sowohl α -2,6- als auch α -2,3-glykosidisch an Galaktose gebundene Sialinsäurereste haben, wenn auch letztere in geringerer Menge (BOURRET, 2018). Dementsprechend können sowohl α -2,6- als auch α -2,3-Sialinsäurerezeptor-affine IAV diese Tierart infizieren und bei gleichzeitiger Infektion anschließend reassortieren, was dem Schwein die Bezeichnung „Mixing vessel“ (Mischgefäß) eingebracht hat (MA et al., 2009). Die Koinfektion von Schweinen mit aviären und humanen IAV ist ebenso bewiesen wie die Tatsache, dass infolgedessen Reassortments stattfinden (CASTRUCCI et al., 1993). Daneben ist eine Koinfektion und ein solches Reassortment grundsätzlich auch direkt im Mensch möglich: α -2,3-gebundene Sialinsäurereste sind in der menschlichen Konjunktiva sowie im tiefen menschlichen Respirationstrakt präsent (KUMLIN et al., 2008). Auch verschiedene Geflügelspezies, z. B. Wachteln besitzen beide Arten von Rezeptoren und auch α -2,6-Sialinsäurerezeptor-affine AIV zirkulieren (WAN & PEREZ, 2006).

Ein IAV, das infolge eines Reassortments in einem Zwischenwirt entsteht, muss nicht zwingend eine Bedrohung für die menschliche Population darstellen. Gerade bei Kombinationen aus an unterschiedliche Wirte adaptierten Viren können jedoch auch Viren entstehen, die bereits an den menschlichen Wirt adaptiert sind, dabei jedoch eine für diesen völlig neuartige Antigenstruktur besitzen, gegen die in der Humanpopulation immunologische Naivität besteht (MCDONALD et al., 2016; LOWEN, 2018).

1.4. Zoonotische Bedeutung

Obwohl eine Infektion von Menschen durch nicht humane IAV eher selten stattfindet, ist das Durchbrechen der Speziesbarriere für IAV per se nicht außergewöhnlich (NEUMANN & KAWAOKA, 2015). Phylogenetische Untersuchungen implizieren sogar, dass sich sämtliche Stämme von IAV, die in Säugetieren zirkulieren, ursprünglich aus AIV entwickelt haben, die Speziesbarriere in diesen Fällen also erfolgreich überwunden wurde und eine Anpassung an den neuen Wirt stattgefunden hat (REPERANT et al., 2009).

In der Regel sind Menschen mit engem Kontakt zu Hausgeflügel oder Schweinen als erstes von einer Infektion mit nicht-humanen IAV betroffen (MOSTAFA et al., 2018). Weltweit wachsende Kontaktmöglichkeiten zwischen Nutztieren und Wildvögeln erhöhen die Risiken weiter (REPERANT et al., 2012a). Eine ungehinderte Zirkulation von IAV in betroffenen Beständen steigert dann noch die Wahrscheinlichkeit von Drift-Mutationen während der Replikation (MOSTAFA et al., 2018). Diese können sich je nach betroffener Position im Virusgenom sehr unterschiedlich auswirken. Nur wenige bieten den Virusmutanten einen evolutionären Vorteil. So führt der Austausch bestimmter Aminosäuren im Bereich des NS1 zu einer effizienteren Replikation und erhöhten Virulenz von AIV in Säugetieren. Mutationen des PB2 dagegen können eine verbesserte Replikation, Übertragbarkeit sowie erhöhte Pathogenität von AIV in Säugetieren zur Folge haben. Änderungen der Aminosäuresequenz des HA können sich neben der Sialinsäurerezeptor-Affinität auch auf die Antigenität, das Wirtsspektrum, die Replikationseffizienz sowie die Pathogenität auswirken (MOSTAFA et al., 2018). Darüber hinaus sind die Konsequenzen eines Antigenic shifts umso gravierender, wenn die entstehende Reassortante überlebensfähig ist, je deutlicher sich die Genetik der koinfizierenden IAV voneinander unterscheidet (LOWEN, 2018).

1.5. Bedeutende Pandemien und Panzootien

In den meisten Fällen werden IAV, die ursprünglich an einen anderen Wirt adaptiert waren, nicht effektiv von Mensch zu Mensch übertragen. So führt auch die zunächst erfolgreiche Infektion eines neuen Wirts nur in wenigen Fällen zur Etablierung einer effizienten Infektionskette (MOSTAFA et al., 2018). Seit Beginn des 20. Jahrhunderts sind nur wenige Fälle bekannt, in denen diese Hürde überwunden wurde und eine anhaltende Zirkulation in der menschlichen Population resultierte (OZAWA & KAWAOKA, 2013). Die besondere Bedeutung dieser

Infektionsgeschehen, die allesamt infolge eines solchen Überschreitens der Speziesbarriere oder durch neue Virusreassortanten entstanden sind, zeigen jedoch, dass den Anpassungsmechanismen und dem zoonotischen Potential von IAV kontinuierlich besondere Aufmerksamkeit geschenkt werden muss.

1.5.1. H1N1-Pandemie 1918

Im Jahr 1918 verursachte ein hoch virulentes H1N1 mit Genen aviären Ursprungs die verheerendste Influenza A-Pandemie des 20. Jahrhunderts. Fast ein Drittel der gesamten damaligen Weltbevölkerung erkrankte an der „Spanischen Grippe“ (TAUBENBERGER, 2005). Mit einer Mortalität von 2,5%, die um ein Vielfaches höher war als dies bei Influenza A normalerweise der Fall ist, offenbarte sich die ausgeprägte Pathogenität der Viren, wie z. B. des frühen amerikanischen Isolates *A/South Carolina/1/18* (TAUBENBERGER et al., 1997). Die Anzahl der Todesopfer wird heute auf mindestens 50 Mio. geschätzt. Ungewöhnlich war auch, dass bei gesunden, jungen Erwachsenen, die bei einem Ausbruch von Influenza für gewöhnlich die niedrigste Sterberate aufweisen, die meisten Todesfälle auftraten (TAUBENBERGER et al., 1997).

Wie es zur Entstehung des Virus und Etablierung in der menschlichen Population kam, ist bis heute umstritten. Die direkte Adaptation eines aviären Stammes an den Menschen wird postuliert (WOROBAY et al., 2002; TAUBENBERGER et al., 2005; TUMPEY et al., 2005; TAUBENBERGER & MORENS, 2006). Dieser Annahme stehen Hypothesen gegenüber, dass sich der Erreger durch Reassortment entwickelt hat (GIBBS et al., 2001; GIBBS & GIBBS, 2006). Als Vorfahre diente dann ein humaner IAV-Stamm, der infolge zufälliger Infektion von Vögeln mehrere aviäre Segmente erhalten hat und anschließend nach Reinfektion von Menschen zum Ausbruch der Pandemie geführt hat (HE et al., 2019).

Abkömmlinge und Reassortanten des Virus sind noch heute in der menschlichen Population endemisch (TAUBENBERGER & MORENS, 2006). Dem Erreger der Spanischen Grippe gelang jedoch nicht nur im Menschen die Etablierung: Phylogenetische Analysen deuten auch auf eine enge Verwandtschaft des pandemischen Virus von 1918 mit *A/Sw/Iowa/30*, dem ältesten bekannten Vertreter der porzinen enzootischen H1N1-Linie („klassische Schweinegrippe“), hin (REID et al., 1999; VAN REETH et al., 2012).

1.5.2. Pandemien durch Nachkommen des Erregers der „Spanischen Grippe“

1.5.2.1. H2N2-Pandemie 1957

Das Auftreten eines H2N2 im Jahre 1957 führte vorerst zum vollständigen Verschwinden des Subtyps H1N1 aus der menschlichen Population (TAUBENBERGER & MORENS, 2006). Viren wie das Isolat *A/Singapore/1/57* lösten die „Asiatische Grippe“ aus und hatten sich durch Reassortment aus dem Erreger der „Spanischen Grippe“ entwickelt. Das Genom enthielt sowohl Segmente von humanen IAV als auch von AIV (KAWAOKA et al., 1989; MOSTAFA et al., 2018). Gegen die neuen Oberflächenantigene existierte zu diesem Zeitpunkt innerhalb der menschlichen Population wenig Schutz durch das adaptive Immunsystem (PALESE, 2004; MCDONALD et al., 2016). Dennoch erwies sich die Pandemie mit ca. 1,1 Mio. Todesopfern als deutlich weniger fatal als die „Spanische Grippe“ 1918 (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2019).

1.5.2.2. H3N2-Pandemie 1968

1968 wurde der Erreger der „Asiatischen Grippe“ wieder durch ein neues IAV verdrängt (KILBOURNE, 2006). Beim Auslöser der „Hongkong-Grippe“ handelt es sich um Viren wie das Isolat *A/Hong Kong/1/68*, eine Reassortante aus Viren der H2N2-Pandemie 1957 mit HA- und PB1-Sequenzen eines aviären IAV (MOSTAFA et al., 2018). Aus diesem Antigenic shift entstanden Viren, die erneut eine hohe Morbidität und Mortalität auslösten, wenn auch die Konservierung der NA des Erregers der H2N2-Pandemie von 1957 für den Teil der Bevölkerung, der elf Jahre zuvor der Asiatischen Grippe ausgesetzt war, einen gewissen Schutz gewährleistete (PALESE, 2004). Die Anzahl der Todesopfer wird auf ca. 1 Mio. geschätzt (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2019). Seit ihrer Einführung in die menschliche Population sind IAV vom Subtyp H3N2 aufgrund des ständigen Selektionsdruckes und der Notwendigkeit der Immunevasion einer rasanten Evolution unterworfen (sh. Kapitel II.1.2.), deren Folge das regelmäßige Auftreten antigenetisch neuer Stämme ist (ALLEN & ROSS, 2018). Die bis heute weltweit auftretenden, saisonalen H3N2-Grippewellen werden mit besonders schweren Krankheitsverläufen assoziiert (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2019; ALLEN & ROSS, 2018).

1.5.2.3. H1N1-Pandemie 1977

Im Jahre 1977 führten IAV wie *A/USSR/1/77* zum Ausbruch der sogenannten „Russischen Grippe“ (KENDAL et al., 1978; ROZO & GRONVALL, 2015). Damit fand der Subtyp H1N1, der bis zu diesem Zeitpunkt nur noch in Schweinen zirkulierte, seinen Weg zurück in die menschliche Population (TAUBENBERGER & MORENS, 2006). Bemerkenswert ist die ausgeprägte genetische Ähnlichkeit der Erreger zu den humanen H1N1-Stämmen, die bereits 20 Jahre zuvor verschwunden waren. Die HA-Sequenz weist eine Identität von mehr als 93% mit Isolaten auf, die in den 1950er Jahren zirkulierten (ROZO & GRONVALL, 2015). Entsprechend ungewöhnlich verlief diese Pandemie, da beinahe ausschließlich Menschen betroffen waren, die nach 1950 geboren waren – eine Altersgruppe, die wahrscheinlich niemals zuvor in Kontakt mit diesem Subtyp getreten war (KILBOURNE, 2006). Als RNA-Viren sind IAV besonders anfällig für spontan auftretende Mutationen, die mit fortschreitender Zeit zu immer deutlicheren antigenetischen Abweichungen zwischen einem ursprünglichen Erreger und dessen Nachkommen führen (sh. Kapitel II.1.2.1.). Ein über mehr als 20 Jahre hinweg nahezu konserviertes HA steht also in grundsätzlichem Widerspruch zu den Eigenschaften von IAV (KENDAL et al., 1978). Daher wird spekuliert, dass der Erreger der „Russischen Grippe“ nicht auf natürlichem Wege in die menschliche Population gelangte, sondern dem Gefrierfach eines Labors entstammen könnte (WEBSTER et al., 1992).

1.5.2.4. H1N1-Pandemie 2009

Die Nachfahren des Erregers der H1N1-Pandemie 1918 veränderten sich in den Wirten Schwein und Mensch mit unterschiedlicher Geschwindigkeit. Vom Auftreten in der menschlichen Population bis zum Verschwinden des Subtyps H1N1 im Jahr 1957 (TAUBENBERGER & MORENS, 2006) durchlief das Genom der Viren infolge von Driftmutationen (sh. Kapitel II.1.2.1.) wesentliche Veränderungen, die nach der Reemergence als „Russische Grippe“ im Jahr 1977 (KENDAL et al., 1978) weiter fortschritten (GARTEN et al., 2009). Die Evolution der „klassischen“, enzootischen H1N1-Linie in Schweinen erlebte im Vergleich dazu einen gewissen Stillstand. Die so entstandene, antigenetische Kluft machte Schweine zum Reservoir von H1-Linien mit dem Potential, bedeutende Ausbrüche bei Menschen zu verursachen (GARTEN et al., 2009).

Das Genom der porzinen H1N1-Linie erlebte 1998 infolge eines Reassortments mit

einem humanen H3N2-Virus und einem AIV unbekanntem Subtyps einen deutlichen Wandel. Die entstandenen Viren und deren Nachkommen breiteten sich rasant in nordamerikanischen Schweinebeständen aus (GARTEN et al., 2009). Während es sich bei den bis zu diesem Zeitpunkt in dieser Population endemischen H1N1-Viren um Nachfahren des Erregers der „klassischen Schweinegrippe“, der mit dem Erreger der Pandemie von 1918 verwandt ist (sh. Kapitel II.1.5.1.), handelt, verschwanden diese Viren in Europa bereits 1979, als ein AIV von Wildenten in die Schweinepopulation eingetragen wurde (VAN REETH et al., 2012).

Die 2009 aufgetretene, humane Pandemie wird aufgrund der Genetik ihres Auslösers (H1N1pdm2009) allgemein als „Schweinegrippe“ bezeichnet. Der Erreger entstand durch Reassortment zwischen der in europäischen Schweinen verbreiteten „avian-like“ H1N1-Linie und einer in nordamerikanischen Schweinen zirkulierenden H1N2-Dreifach-Reassortante, die bereits Gene des „klassischen“ H1N1, eines aviären sowie eines humanen Stammes enthielt (VAN REETH et al., 2012; PIPPIG et al., 2016). Obwohl der Subtyp H1N1 bereits in der menschlichen Population zirkulierte, differierte die neue Reassortante antigenetisch so deutlich, dass die saisonale Impfung nicht schützte. Die Pandemie breitete sich demzufolge extrem schnell weltweit aus, klinisch verlief sie aber deutlich milder als zunächst erwartet und kostete weltweit weniger als 1 Mio. Menschen das Leben (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2019). Der Spezies-Übertritt von H1N1pdm2009 aus der Schweinepopulation auf den Menschen wurde bislang nicht eindeutig zurückverfolgt, in vielen Fällen aber fand weltweit im Laufe der Pandemie eine Übertragung der Infektion von Menschen auf Schweine statt. Das Virus hat sich seitdem in vielen Schweinepopulationen weltweit etabliert und spielt nun eine Rolle als weitere Komponenten in den Infektionsketten, woraus bereits wieder neue Reassortanten resultierten (VIJAYKRISHNA et al., 2010). Die bis dahin als relativ stabil eingeschätzte Kozirkulation von drei IAV Subtypen in der Schweinepopulation in Europa war damit aufgebrochen und seitdem ist die Variabilität der nachgewiesenen Viren um ein Vielfaches gestiegen (HARDER et al., 2013; PIPPIG et al., 2016). Durch dieses Ereignis wurde weltweit deutlich, wie wichtig die Intensivierung der Überwachung der zirkulierenden sviden IAV (S-IAV) geworden ist.

1.5.3. Ausbruch der hochpathogenen aviären Influenza im November 2016 in Deutschland

IAV lösen nicht nur in Säugern wichtige Infektionsgeschehen aus. Auch Wildvogelpopulationen sowie Hausgeflügelbestände waren in der Vergangenheit mehrfach Pandemien bzw. Panzootien ausgesetzt (DHINGRA et al., 2018). Infolge der massenhaften Replikation der Viren im Laufe einer Panzootie steigt die Wahrscheinlichkeit, dass neue Varianten entstehen und sich durchsetzen. Solche neuartigen Stämme besitzen im Falle des Überschreitens der Speziesbarriere (sh. Kapitel II.1.4.) wiederum das Potential, in immunologisch naiven Wirtsspezies wie dem Menschen schwere Infektionsgeschehen auszulösen.

AIV des H5-Subtyps sind in der Lage von niedrig pathogenen (LPAIV) zu hoch pathogenen AIV (HPAIV) zu mutieren und in dieser Form die anzeigepflichtige Tierseuche Geflügelpest auszulösen. Die Tierseuche kann allein aufgrund ihrer dramatischen Klinik hohe wirtschaftliche Einbußen für Hühnervögel haltende Betriebe nach sich ziehen (GLOBIG et al., 2018).

Zwischen Mai und Juni 2016 fiel bei Wildvögeln am Uws Nuur See an der Russisch-Mongolischen Grenze ein HPAIV einer asiatischen H5N8-Linie vermehrt auf (POHLMANN et al., 2017; NAPP et al., 2018). Im Oktober desselben Jahres meldeten Ungarn und Polen erste Fälle der offenbar durch Zugvögel mitgebrachten Infektion bei tot aufgefundenen Wildenten, Möwen und einem Schwan (GLOBIG et al., 2018; NAPP et al., 2018). Im darauffolgenden Monat wurde schließlich eine hohe Mortalität bei Wildvögeln, insbesondere Reiherenten, am großen Plöner See, Schleswig-Holstein, sowie am Bodensee, Baden-Württemberg, auf H5N8-Infektionen zurückgeführt (POHLMANN et al., 2017; GLOBIG et al., 2018; POHLMANN et al., 2018). Das Virus breitete sich innerhalb der Wildvogelpopulation in das Landesinnere Deutschlands aus (sh. Abb. 2; POHLMANN et al., 2017; GLOBIG et al., 2018). Betroffen waren besonders Reiherenten, aber auch zahlreiche weitere Vogelarten, darunter Schwäne und Möwen ebenso wie Krähen und Seeadler (GLOBIG et al., 2018; POHLMANN et al., 2018). Schließlich wurde die Infektion auch in Deutschland in Geflügelbestände eingetragen. In betroffenen Betrieben verendeten, abhängig von der Spezies, bis zu 90% der empfänglichen Tiere bereits vor der angeordneten Tötung (POHLMANN et al., 2017; GLOBIG et al., 2018).

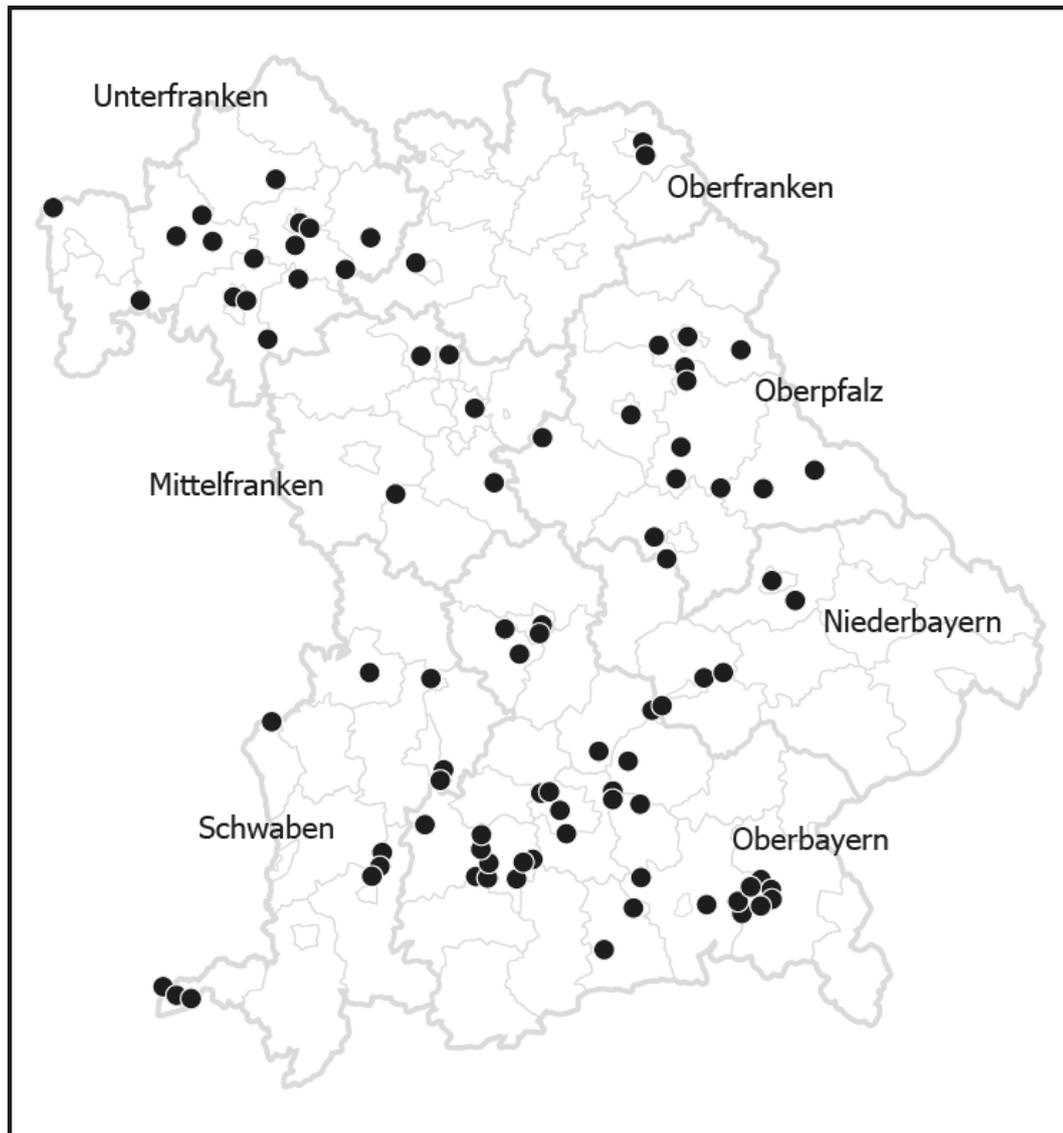


Abb. 2: Übersicht über die Fundorte (auf Ebene der Gemeinden) von während der Panzootie 2016/2017 als HPAIV-infiziert angezeigten Wildvögel in Bayern: Die Daten entstammen dem Wildvogelmonitoring des Bayerischen Landesamts für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit und die Karte wurde unter Verwendung der Softwarepakete GfK RegioGraph und Adobe Indesign CC 2018 sowie Illustrator CC 2019 generiert. Da im Laufe dieser Panzootie nur ausgewählte Stichproben zur Anzeige kamen, stellt diese Karte nur die Spitze des Eisberges dar.

Verantwortlich für diese erste Welle der HPAI-Panzootie, deren Höhepunkt auf Mitte November 2016 datiert wird, war ein H5N8, das sich genetisch durch zwei neue Segmente zwar klar von den HPAIV, die an der Russisch-Mongolischen Grenze detektiert worden waren, abgrenzen lässt, jedoch eindeutig mit diesen eng verwandt ist (POHLMANN et al., 2017; GLOBIG et al., 2018). Diese genetische Information legt nahe, dass in Deutschland aufgetretene H5N8-IAV, wie *A/tufted duck/Germany-SH/AR8444/2016*, durch mindestens ein Reassortment entstanden sind, das zwischen Juni und November auf dem Weg von Asien nach Europa

stattgefunden hat (POHLMANN et al., 2017; POHLMANN et al., 2018). Während der zweiten Infektionswelle, die ihren Höhepunkt Mitte Februar 2017 erreichte, wurden weitere Varianten von HPAIV nachgewiesen, die sich genetisch deutlich von den bis dahin an der Epidemie beteiligten Viren unterscheiden (GLOBIG et al., 2018). Unter mindestens vier weiteren Varianten befinden sich H5N8-Linien mit genetischer Ähnlichkeit zu aus Südeuropa isolierten Stämmen, sowie AIV des Subtyps H5N5, der auch in Tschechien und Polen gefunden wurde (POHLMANN et al., 2018). Diese Beobachtungen suggerieren den gleichzeitigen, voneinander unabhängigen Eintrag unterschiedlicher Reassortanten des HPAIV nach Deutschland (GLOBIG et al., 2018; POHLMANN et al., 2018).

Diese Epidemie, von der deutschlandweit unzählige Wildvögel sowie mehr als 100 Geflügel haltende Betriebe betroffen waren, gilt bislang als verheerendster je dokumentierter Ausbruch von HPAIV-Infektionen in Deutschland (GLOBIG et al., 2018; POHLMANN et al., 2018): Ca. 1,2 Mio. gehaltene Vögel verendeten oder mussten getötet werden, der wirtschaftliche Verlust beläuft sich auf ca. 17 Mio. Euro (GLOBIG et al., 2018). Während die Bedeutung dieser H5-Viren für Hausgeflügel sowie auch Wildvögel unbestritten ist, wurde in Rahmen dieser Panzootie keine Übertragung auf den Menschen nachgewiesen (GLOBIG et al., 2018; NAPP et al., 2018). Auch auf eine Infektion anderer Säugetiere durch diese Linie gibt es bislang keine Hinweise (POHLMANN et al., 2017).

1.6. Pathogenese und klinisches Bild beim Haus- und Wildschwein

Nicht nur in Wildvögeln zirkulieren kontinuierlich IAV und entstehen neue Virusvarianten, sondern auch im Schwein. Der Wirt Schwein stellt ein wichtiges Reservoir für den Menschen gefährlicher IAV dar (sh. Kapitel II.1.5.2.4.) und fungiert zudem auch als potentielles „Mixing vessel“ (sh. Kapitel II.1.3.) für neuartige, potentiell humanpathogene, pandemische IAV-Reassortanten. Die als „Schweinegrippe“ bekannte Pandemie (sh. Kapitel II.1.5.2.4.) veranschaulichte diese besondere Rolle.

Im Gegensatz zum Hausschwein liegen bislang keine publizierten Daten über Pathogenese, Pathologie oder Klinik einer IAV-Infektion beim Wildschwein vor. Aufgrund der engen Verwandtschaft dieser Wirtsspezies kann jedoch angenommen werden, dass IAV-Infektionen vergleichbar verlaufen und sich auch entsprechend klinisch manifestieren (WEYAND, 2017).

IAV gelangen aerogen und insbesondere über Aerosole, aber auch direkten Kontakt, in den Nasopharynx und infizieren nach lokaler Ausbreitung im weiteren Verlauf das Epithel von Trachea und Bronchien (HEINRITZI, 2006). Die Replikation findet ausschließlich in Zellen des oberen und unteren Respirationstraktes statt und beschränkt sich in aller Regel auch auf dieses Organsystem (VAN REETH et al., 2012). Im Laufe der Infektion verursacht das Virus Läsionen des Lungengewebes, welche sowohl mikro- als auch makroskopisch erkennbar sind (SRETA et al., 2009). Infektionsdosis und Infektionsweg spielen eine entscheidende Rolle für die Ausprägung der Entzündungsprozesse und der Klinik (VAN REETH et al., 2012).

Entscheidend für den Verlauf der Infektion ist auch die aktive Immunantwort des Wirtes. In immunologisch naiven Beständen folgt nach einer Inkubationszeit von ca. zwei Tagen typischerweise ein schlagartiges Auftreten der Symptome. Charakteristisch ist eine hohe Morbidität bei geringer Letalität (HEINRITZI, 2006). Betroffene Tiere können innerhalb weniger Tage eine Körpertemperatur von bis zu 42 °C erreichen (SHOPE, 1931). Die Infektion kann auch Konjunktivitis, Anorexie, Erschöpfung, Muskelschmerzen, Niesen, anfallsartigen Husten sowie schwerste Dyspnoe mit Maulatmung verursachen (SHOPE, 1931; WEBSTER et al., 1992; JUNG et al., 2005; HEINRITZI, 2006; SRETA et al., 2009; BEER, 2015).

Ökonomische Relevanz erlangen Infektionen mit IAV in Folge der resultierenden verringerten Gewichtszunahmen der Mastschweine sowie des Rückgangs der Reproduktionsleistung von Zuchtsauen (HEINRITZI, 2006; VAN REETH et al., 2012). Virologische Koinfektionen und bakteriell bedingte Sekundärinfektionen können den Verlauf der Erkrankung deutlich erschweren. Am „Porcine respiratory disease complex“, der bei zehn bis 22 Wochen alten Hausschweinen häufig beobachtet wird, sind neben IAV vor allem das *PRRS-Virus* sowie *Mycoplasma hyopneumoniae* beteiligt (VAN REETH et al., 2012). In der Regel erfolgt die Genesung jedoch spätestens sechs Tage nach Krankheitsbeginn fast ebenso unvermittelt wie der Ausbruch (SHOPE, 1931).

1.7 Aktive und passive humorale Immunität

Die spezifische Immunantwort auf S-IAV umfasst neben der Antikörperproduktion die zellvermittelte Immunität (VAN REETH et al., 2012). Tiere, die sich von einer IAV-Infektion erholt haben, sind gegen eine Neuinfektion mit demselben und

antigenetisch ausreichend verwandten Stämmen geschützt (LARSEN et al., 2000; VAN REETH et al., 2012). Die genaue Dauer dieser Immunität ist beim Schwein nicht bekannt. Ausgehend von Erkenntnissen beim Mensch wird jedoch von einigen Jahren ausgegangen (VAN REETH et al., 2012).

Antikörper, welche infolge einer Infektion gebildet werden, sind vorwiegend gegen Epitope der Hauptstrukturproteine HA, NA, M1, M2 und NP gerichtet. Nur HA-spezifische Antikörper sind in der Lage, die Bindung des Virus an die Wirtszelle zu verhindern und gelten als Äquivalent für eine Immunität (VAN REETH et al., 2012), daher werden sie meist bestimmt, wenn eine Aussage über einen Schutz vor IAV-Infektionen quantitativ getroffen werden soll. Sie sind ab dem siebten bis zehnten Tag *post infectionem* (p. i.) nachweisbar (POMORSKA-MOL et al., 2014). Im Hämagglutinationshemmtest (HAH) erreicht der Antikörpertiter zwei bis drei Wochen p. i. seinen Höhepunkt (LARSEN et al., 2000) und beginnt acht bis zehn Wochen p. i., wieder abzusinken (VAN REETH et al., 2012). Gegen andere Proteine des Virus gerichtete Antikörper interagieren erst mit dem Immunsystem des Wirtes, nachdem die Wirtszelle bereits infiziert wurde: Während NA-spezifische Antikörper im Wesentlichen die Freisetzung der Tochterviren aus infizierten Zellen hemmen, sind andere Antikörper entscheidend in der Vermittlung der Antikörper abhängigen zellvermittelten Zytotoxizität (VAN REETH et al., 2012).

Im Respirationstrakt stellen Antikörper vom Typ Immunglobulin A (IgA) eine wirksame erste Immunbarriere. Da IAV die Nasenschleimhaut als Eintrittspforte nutzen, bildet eine deutliche IgA-Reaktion die effektivste Abwehr gegen das Eindringen des Erregers in den Wirtsorganismus. Im Serum überwiegen dagegen anfänglich Antikörper vom Typ Immunglobulin M (VAN REETH et al., 2012), die zumindest im Mausmodell acht bis zehn Tage p. i. ihren Titerhöhepunkt erreichen und daraufhin durch solche vom Typ Immunglobulin G (IgG) ersetzt werden (MIAO et al., 2010).

IgG bilden zudem den wesentlichen Immunglobulintyp der maternalen Antikörper. Nach Aufnahme mit dem Kolostrum unmittelbar nach der Geburt (LOEFFEN et al., 2003; DEBLANC et al., 2018) bleiben sie im Ferkel für zwei bis vier Monate nachweisbar (HEINRITZI, 2006). Sie schützen – abhängig vom Titer der Muttersau – vor den klinischen Folgen einer Infektion mit einem homologen Stamm, nicht jedoch vor einer Infektion, Virusvermehrung und Ausscheidung. Ein Schutz vor

Infektionen mit heterologen Stämmen besteht generell nicht (LOEFFEN et al., 2003; VAN REETH et al., 2012; DEBLANC et al., 2018). Die Anwesenheit maternaler Antikörper beeinträchtigt zunächst die Entwicklung einer aktiven Immunantwort – eine immunologische Lücke kann resultieren. Neben einer besonderen Empfänglichkeit betroffener Ferkel in der Periode des nachlassenden Schutzes durch die maternalen Antikörper behindert deren Anwesenheit sogar die Ausbildung einer aktiven Immunantwort im Falle einer Infektion (LOEFFEN et al., 2003).

2. IAV Infektionen beim Wildschwein

2.1. Nachweis einer Infektion

Ein direkter IAV-Genomnachweis aus Nasentupfern und Lungengewebe von Hausschweinen ist mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) ab Tag eins p. i. bis maximal Tag sieben p. i. möglich (POMORSKA-MOL et al., 2014). Aufgrund dieser in der Regel nur kurzen Virusausscheidungsphase bei Schweinen gelingt der Nachweis eher selten (DETMER et al., 2013). Bei gesunden Wildschweinen ohne Hinweise auf eine Infektion ist die Wahrscheinlichkeit eine Virusausscheidung zu detektieren entsprechend sehr niedrig. Eine sinnvolle Alternative für die Untersuchung auf eine vorangegangene Infektion mit IAV in Hausschweinepopulationen und in Wildbeständen bieten serologische Nachweisverfahren. Die Interpretation der resultierenden Ergebnisse und einer Subtyp-Bestimmung wird allerdings durch den unbekanntem Infektionsstatus eines Wildtieres und in Konsequenz durch mögliche Mehrfach- und Kreuzreaktionen erschwert (VAN REETH et al., 2004).

Für den prinzipiellen Nachweis von IAV-spezifischen Antikörpern in Proben von Wildschweinen stehen zurzeit verschiedene Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)- Systeme, die auf blocking oder kompetitiven ELISA-Techniken beruhen, kommerziell zur Verfügung. Auf den Nachweis von HA-Subtypen ausgerichtete Sandwich-ELISAs wie z. B. das Influenza A Haemagglutinin H1N1 ELISA Kit (Novus Bio) und Nachweissysteme wie der HAH und der Serumneutralisationstest (SNT) erlauben dagegen eine subtypspezifischere Diagnose. In diesen Systemen werden nur die Antikörper nachgewiesen, die spezifisch gegen die im Test

verwendeten Subtyp-Antigene gerichtet sind. Eine allgemeine Aussage über die Präsenz von IAV-Antikörpern ist so nicht möglich.

Das NP der IAV ist im Vergleich zu anderen viralen Proteinen hochkonserviert und dient daher häufig als Testantigen für die indirekte, subtypunabhängige Diagnostik mittels ELISA (JANKE, 2014). Solche Assays sind die Methode der Wahl, wenn große Mengen an Proben in kurzer Zeit auf das prinzipielle Vorhandensein von Antikörpern gegen IAV untersucht werden sollen (DE BOER et al., 1990; JANKE, 2014). Für eine Subtypisierung müssen nachfolgend weitere Testverfahren eingesetzt werden (DE BOER et al., 1990).

Der HAH erlaubt den Nachweis von Antikörpern, die durch spezifische Bindung an ein HA die Virusbindung an Puten- oder Hühnererythrozyten und somit auch die Virus-induzierte Agglutination dieser Zellen verhindern (DETMER et al., 2013). Beim Hausschwein lassen sich gegen das HA gerichtete Antikörper ab dem fünften bis siebten Tag p. i. nachweisen. Ihre Konzentration im Serum erreicht zwei bis drei Wochen p. i. ihren Höhepunkt, um anschließend langsam abzusinken. Maternale Antikörper sind nach ca. sechs Wochen nicht mehr mittels HAH nachweisbar (JANKE, 2000). Das Ergebnis des Tests kann quantitativ als Titer der im untersuchten Serum vorhandenen, die Hämagglutination eines Antigens hemmenden Antikörper angegeben werden (JANKE, 2000). Die Methode gilt als ausreichend spezifisch, um zwischen Subtypen zu unterscheiden (VAN REETH et al., 2004). Kreuzreaktionen sind allerdings nicht grundsätzlich auszuschließen und werden anhand vergleichender Quantifizierung der Hemmung interpretiert (VAN REETH et al., 2004). Die Zuverlässigkeit der Antikörpererkennung ist primär abhängig von der antigenetischen Verwandtschaft des im Test verwendeten Virus zu dem Feldvirus, das zur Produktion von Antikörpern geführt hat (JANKE, 2000). Eine weiterführende Identifizierung des Virus, welchem das untersuchte Tier ausgesetzt war, ist durch das Verfahren nicht möglich (DETMER et al., 2013).

Ein weiteres, hochempfindliches und hochspezifisches, jedoch im Vergleich zum HAH deutlich aufwändigeres Nachweisverfahren ist der SNT (DETMER et al., 2013). Antikörper im untersuchten Serum verhindern durch die Bindung an das Testantigen die Infektion von bzw. Replikation in permissiven Zellen und damit das Entstehen eines beurteilbaren, zytopathischen Effekts (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010; DETMER et al., 2013). Da insbesondere Antikörper, die gegen das HA gerichtet sind, hoch spezifisch neutralisierende Eigenschaften

aufweisen, eignet sich der Assay ebenfalls für die Subtypisierung und zudem eine Quantifizierung (TRUELOVE et al., 2016). Kreuzreaktionen lassen sich, ähnlich wie beim HAH, mittels quantitativer Auswertung beurteilen (VAN REETH et al., 2004).

In Serumproben experimentell mit IAV infizierter bzw. geimpfter Tiere sind Antikörper gegen NP bereits am Tag der zweiten Vakzination, 21 nach der ersten, nachweisbar, solche gegen das HA dagegen erst ab Tag 31. An Tag 38 haben alle Tiere Antikörper gegen das NP, wohingegen gegen das HA gerichtete Antikörper nicht mehr bei allen detektierbar sind. Ab der achten Woche post partum sind keine maternalen, gegen HA-gerichteten Antikörper mehr aus untersuchten Ferkeln zu detektieren, während NP-Antikörper bei allen Tieren noch messbar sind. Auch nach experimenteller Infektion treten Antikörper gegen verschiedene IAV Proteine zeitlich versetzt auf, wenn auch weniger deutlich (DE BOER et al., 1990).

2.2. Seroprävalenz von IAV-Infektionen beim Wildschwein

Wildschweine gehören wie Hausschweine der Spezies „*Sus scrofa*“ an und sind daher prinzipiell auch für dieselben Krankheitserreger empfänglich (MEIER & RYSER-DEGIORGIS, 2018).

Da die Übertragung von IAV bei Säugetieren durch direkten Kontakt erfolgt, korreliert die Seroprävalenz mit der Wildschweindichte in einer Region: Während das Virus in wenig dicht besiedelten Gebieten kaum zirkuliert oder sogar vollständig verschwindet, kann es innerhalb von Populationen, die in Gefangenschaft gehalten werden, endemisch werden (RUIZ-FONS et al., 2008).

Seroprävalenzen von IAV in Wildschweinpopulationen wurden bereits in verschiedenen Studien weltweit analysiert. Die Ergebnisse der im Folgenden ausgewerteten Studien sind in den Tabellen 1a bis 4b zusammengefasst.

2.2.1. IAV-Seroprävalenz in deutschem Schwarzwild

In Deutschland wurden in verschiedenen Wildschweinpopulationen Antikörper gegen die Subtypen H1N1, H1N2 und H3N2 nachgewiesen. Diese Subtypen zirkulieren auch in Hausschweinbeständen, daher wird auf eine gegenseitige Infektionskette geschlossen. Schwarzwild gilt somit als mögliches Reservoir für S-IAV und sollte auch deshalb von kommerziell gehaltenen Tieren strikt isoliert werden (REPERANT et al., 2012b). Die Ergebnisse der im Folgenden

beschriebenen Untersuchungen zu Antikörpern gegen IAV in deutschen Wildschweinen sind in Tab. 1a und 1b zusammengefasst.

Kaden et al. untersuchten im Rahmen zweier Studien zur Seroprävalenz ausgewählter Pathogene beim Wildschwein 561 bzw. 1.245 Serumproben von Tieren, welche zwischen 1997 und 2006 in den Bundesländern Mecklenburg-Vorpommern, Brandenburg, Sachsen-Anhalt, Rheinland-Pfalz und Baden-Württemberg erlegt worden waren, auf das Vorkommen von Antikörpern gegen IAV. Ein HAH gegen Antigene der Subtypen H1N1, H1N2 und H3N2 wurde verwendet. Für die Zeiträume 1997 bis 2006 bzw. 1997 bis 2005 wurden Prävalenzen zwischen 5,2% und 7,84% ermittelt (KADEN et al., 2008; KADEN et al., 2009). Die Prävalenzen variieren zum einen zwischen den Altersgruppen und sind bei adulten Tieren mit 14,1% (10 von 71 Tieren) deutlich höher als bei Frischlingen (4,2%) und Überläufern (5,5%) (KADEN et al., 2008). Zum anderen gibt es zeitlich sowie regional erhebliche Unterschiede: so wurden je nach Bundesland und Zeitraum in 0% bis 25,9% der untersuchten Proben Antikörper gegen IAV festgestellt (KADEN et al., 2008; KADEN et al., 2009).

Der in diesen Analysen beim Wildschwein vorherrschende Subtyp H1N1 dominiert auch in europäischen Hausschweinbeständen (VAN REETH, 2007; KADEN et al., 2008; KADEN et al., 2009).

94 Seren von Wildschweinen, die zwischen September und Dezember 2010 in den Bundesländern Bayern, Rheinland-Pfalz und Baden-Württemberg erlegt worden waren, wurden mittels eines H1N1-ELISA untersucht. Je eine Probe aus Rheinland-Pfalz und Baden-Württemberg reagierte, was insgesamt einer Seroprävalenz von 2,1% entspricht (SATTLETER et al., 2012).

Für ein weiteres Projekt wurden 1.936 Wildschweinseren, die zwischen 2011 und 2014 in Rheinland-Pfalz gesammelt worden waren, mittels Subtyp unabhängigen ELISA auf IAV-spezifische Antikörper untersucht. Insgesamt waren 99 Tiere positiv (5,1%). Der Anteil seropositiver Tiere bewegte sich zwischen 3,1% in der Jagdsaison 2012/13 und 6,4% in der Saison 2011/12. In den untersuchten Landkreisen lag der Anteil zwischen 0% und 12,7%. Mit 7,3% war die Seroprävalenz der Überläufer zwar höher als die der adulten Tiere (4,9%) und Frischlinge (4,5%), statistisch signifikant war der Einfluss des Lebensalters aber nicht. Der Unterschied des Anteils seropositiver männlicher und weiblicher Tiere

hatte statistische Signifikanz, diese war jedoch gering: Weibliche Tiere waren mit einem Anteil von 5,6% stärker betroffen als männliche (4,6% Anteil). Die Proben wurden mittels HAH unter Verwendung von Antigenen der Subtypen H1N1, H1N2 und H3N2 weiter differenziert (WEYAND, 2017).

Antikörper gegen den Subtyp H1N2 wurden bisher nur bei Wildschweinen gefunden, die zwischen 2003 und 2004 in Baden-Württemberg erlegt worden waren. Bei 26 der 70 IAV-seropositiven Tiere wurde der Subtyp nachgewiesen und war damit in dieser Studie häufiger vertreten als H1N1, der nur bei neun Tieren diagnostiziert wurde, aber weniger dominant als H3N2, der bei 35 Tieren zur Antikörperbildung geführt hatte (POLLEY et al., 2007).

Tab. 1a: Ergebnisse in Deutschland durchgeführter Untersuchungen zu IAV-Antikörperprävalenzen im Wildschwein

Bundesland	Zeitraum	untersuchte Tiere	Methode	positiv in %	Quelle	Subtypisierung
Mecklenburg-Vorpommern	1997-1998	120	HAH	0	(Kaden et al., 2008; Kaden et al., 2009)	
Mecklenburg-Vorpommern	2005-2006	684	HAH	3,1	(Kaden et al., 2008)	1
Brandenburg	2004-2005	120	HAH	2,5	(Kaden et al., 2008; Kaden et al., 2009)	2
Sachsen-Anhalt	2001-2002	120	HAH	8,3	(Kaden et al., 2008; Kaden et al., 2009)	3
Rheinland-Pfalz	2005	120	HAH	8,3	(Kaden et al., 2008; Kaden et al., 2009)	4
Baden-Württemberg	2001-2002	81	HAH	25,9	(Kaden et al., 2008; Kaden et al., 2009)	5
Baden-Württemberg	2003-2004	262	HAH	26,7	(Polley et al., 2007)	6
Bayern	2010	20	ELISA (H1N1)	0	(Sattler et al., 2012)	
Rheinland-Pfalz	2010	63	ELISA (H1N1)	1,6	(Sattler et al., 2012)	
Baden-Württemberg	2010	11	ELISA (H1N1)	9,1	(Sattler et al., 2012)	
Rheinland-Pfalz	2011-2014	1.936	ELISA	5,1	(Weyand, 2017)	7

Tab. 1b: Ergebnisse von Subtypisierungssassays der Studien aus Tab. 1a, falls durchgeführt

	Anzahl Proben	Testsystem	H1N1*	H1pdmN1*	H1N2*	H3N2*	Quelle
1	21	HAH	43%	n.a.	0%	71%	(Kaden et al., 2008)
2	3	HAH	100%	n.a.	0%	0%	(Kaden et al., 2008)
3	10	HAH	100%	n.a.	0%	0%	(Kaden et al., 2008)
4	10	HAH	90%	n.a.	0%	10%	(Kaden et al., 2008)
5	21	HAH	86%	n.a.	0%	14%	(Kaden et al., 2008)
6	70	HAH	13%	n.a.	37%	50%	(Polley et al., 2007)
7	99	HAH	32%	n.a.	0%	15%	(Weyand, 2017)

*Anteil an Proben, die die Agglutination des genannten Antigens hemmten, in Relation zur Anzahl der im HAH untersuchten, als IAV-Antikörper positiv eingestuften Proben. Einzelne Proben inhibierten die Agglutination von mehreren Antigenen, für andere war kein Subtyp bestimmbar.

Die Daten zeigen, dass Antikörper gegen IAV in deutschen Wildschweinbeständen nachgewiesen werden. Der Subtyp H1N1 ist dominant, die Subtypen H3N2 und H1N2 werden aber auch gefunden. Statistisch valide Daten wurden bisher jedoch nur für wenige Bundesländer und definierte Zeiträume erhoben. Aussagen über die tatsächliche Seroprävalenz und Verteilung der Subtypen, oder Änderungen in der Prävalenz oder Verteilung können nur sehr eingeschränkt gemacht werden. Der Notwendigkeit eines kontinuierlichen, flächendeckenden IAV-Monitorings deutscher Wildschweine muss daher mehr Beachtung geschenkt werden.

2.2.2. IAV-Seroprävalenz in europäischen Wildschweinpopulationen

Die Ergebnisse von Untersuchungen zu S-IAV-Antikörperprävalenzen im Wildschwein aus anderen Ländern Europas sind in Tab. 2a zusammengefasst. Die in die Studien einbezogenen Probenzahlen sowie die verwendeten Testsysteme unterscheiden sich deutlich und erlauben daher nur eine eingeschränkte vergleichende Interpretation der Ergebnisse; der Anteil als Antikörper positiv bewerteter Proben lag insgesamt zwischen 0% und 22,5%.

Tab. 2a: Ergebnisse in Europa durchgeführter Untersuchungen zu IAV-Antikörperprävalenzen im Wildschwein (außer Deutschland)

Land	Zeitraum	untersuchte Tiere	Methode	positiv in %	Quelle	Subtypisierung
Finnland	2005-2008	272	ELISA	0	(Hälli et al., 2012)	
Schweden	2013-2014	286	ELISA	3,8	(Malmsten et al., 2018)	
Spanien	2004-2007	267	ELISA	6,4	(Closa-Sebastià et al., 2011)	
Spanien	2002-2009	1.102	HAH	13,9	(Cano-Manuel et al., 2014)	
Frankreich	2009-2010	19	ELISA	0	(Vittecoq et al., 2012)	
Frankreich	2009-2014	279	ELISA	1,4	(Grech-Angelini et al., 2018)	8
Italien	2012	1.977	ELISA	3,9	(Foni et al., 2013)	9
Italien	2012	388	ELISA	5,2	(Delogu et al., 2019)	10
Italien	2012	35	ELISA	0	(Delogu et al., 2019)	
Griechenland	2006-2010	94	ELISA	1,1	(Touloudi et al., 2015)	
Slowenien	2003-2004	178	ELISA (H1N1)	0	(Vengust et al., 2006)	
Kroatien	2005-2010	556	ELISA (H1N1)	9,7	(Roic et al., 2012)	
Ukraine	2014	120	ELISA	22,5	(Kovalenko et al., 2017)	

Tab. 2b: Ergebnisse von Subtypisierungsassays der Studien aus Tab. 2a, falls durchgeführt

Anzahl Proben	Testsystem	H1N1*	H1pdmN1*	H1N2*	H3N2*	Quelle	
8	4	HAH	50%	25%	25%	0%	(Grech-Angelini et al., 2018)
9	78	HAH	87,2%	0%	0%	1%	(Foni et al., 2013)
10	20	HAH	5%	0%	50%	5%	(Delogu et al., 2019)

*Anteil an Proben, die die Agglutination des genannten Antigens hemmten, in Relation zur Anzahl der im HAH untersuchten, als IAV-Antikörper positiv eingestuften Proben. Einzelne Proben inhibierten die Agglutination von mehreren Antigenen, für andere war kein Subtyp bestimmbar.

In einigen Studien wurde das Verhältnis zwischen Alter und Präsenz S-IAV-spezifischer Antikörper analysiert. Malmsten et al. berichten bei zwischen 2013 und 2014 in Schweden beprobten Wildschweinen von einer besonders hohen Seroprävalenz bei Frischlingen, die mit ca. 11% mehr als dreimal so hoch war als bei den adulten Tieren (ca. 3%). Im Rahmen dieser Studie wurden keine S-IAV-Antikörper bei Überläufern detektiert (MALMSTEN et al., 2018). Im Gegensatz dazu waren von den Wildschweinen, die zwischen 2004 und 2007 im Nordosten Spaniens erlegt worden waren, ausschließlich die Tiere, die älter als zwölf Monaten waren, IAV-seropositiv. Die Autoren klassifizieren allerdings alle Tiere ab diesem Alter als adult, sodass keine weitere Unterscheidung zwischen Überläufern und adulten Tieren möglich ist (CLOSA-SEBASTIÀ et al., 2011). Im Rahmen eines zweiten in Spanien durchgeführten Überwachungsprogrammes wurden Seren von Tieren untersucht, die zwischen 2002 und 2009 im südlicher gelegenen Nationalpark Sierra Nevada erlegt worden waren. Unterschiede zwischen Altersgruppen wurden nicht festgestellt (CANO-MANUEL et al., 2014). Delogu et al. verglichen die Altersverteilung von gegen IAV-gerichteten Antikörpern bei 2012 in Italien beprobten Tieren. Frischlinge unter vier Monaten waren mit 7,1% häufiger seropositiv als Frischlinge ab fünf Monaten (5,5%) und Überläufer (5,7%). Nur 1,9% der adulten Tiere hatten Antikörper (DELOGU et al., 2019). Die Ergebnisse machen die Abhängigkeit von Testsystem, Beprobungszeitraum und Beprobungsort deutlich und lassen daher keinen pauschalen Rückschluss auf einen Zusammenhang zwischen Alter und Wahrscheinlichkeit einer S-IAV Seroprävalenz zu. Cano-Manuel et al. und Delogu et al. verglichen darüber hinaus die Seroprävalenz zwischen männlichen und weiblichen Tieren und stellten keine Geschlechtsabhängigkeit fest (CANO-MANUEL et al., 2014; DELOGU et al., 2019).

Die Ergebnisse der für europäische Wildschweine durchgeführten Subtypisierungen sind in Tab. 2b zusammengefasst. Foni et al. nutzten für die Subtyp Bestimmung in 78 IAV-Antikörper positiven Proben aus dem Jahr 2012 HAHs. Als H1N1-Testantigene dienten drei verschiedene Stämme: das „avian-like“ (sh. Kapitel II.1.5.2.4.) *A/swine/Italy/267505/2010*, das Wildschweinisolat *A/wild boar/Italy/291320/2012* sowie *A/swine/Italy/290271/2009*, ein H1N1pdm2009 Isolat. Von den 68 Serumproben, deren Antikörper gegen das Wildschweinisolat gerichtet waren, hemmten 58 gleichzeitig die Hämagglutination

von „avian-like“ H1N1. Reaktionen auf den pdm09 Stamm wurden als Kreuzreaktionen interpretiert, da Proben bei gleichzeitiger Reaktion auf verschiedene Antigene dem Subtyp zugeordnet wurden, für den ein mindestens doppelt so hoher Titer ermittelt wurde (FONI et al., 2013). Ähnlich den bisher aus Deutschland vorliegenden Ergebnissen, wurden auch in Europa neben Antikörpern gegen den Subtyp H1N1 auch Reaktionen gegen H1N2 und H3N2 gezeigt. Dem Subtyp H1pdmN1 wurden die Antikörper einer Probe aus Frankreich zugeordnet (GRECH-ANGELINI et al., 2018).

2.2.3. IAV-Seroprävalenzen in asiatischen Wildschweinen

Die Ergebnisse von Untersuchungen aus China und Japan zu Antikörpern gegen IAV bei Wildschweinen sind in Tab. 3a und 3b dargestellt.

Luo et al. verwendeten für die Untersuchung von 31 Proben, die 2009 in China gewonnen wurden, neben dem HAH und dem SNT auch den Neuraminidasehemmer (NAH). Mit diesem Assay werden spezifische Antikörper gegen die IAV-NA nachgewiesen (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2011). H1, H3, H5, H9, N1 und N2 wurden als Testantigen verwendet, repräsentiert durch *NYMCX-179A conventional reassortant virus (H1N1)*, *A/Swine/Guangdong/7/2005 (H3N2)*, *A/environment/Qinghai/1/2008 (H5N1)* und *A/black-billed magpie/Guangxi/29/2005 (H9N2)*. Der SNT wurde in dieser Studie nur eingesetzt, um die H5- und H9-negativen Ergebnisse zu bestätigen. Da für die eigentliche Subtypisierung zwei unterschiedliche Testsysteme verwendet wurden, die ohne Bezug zueinander jeweils nur auf HA- bzw. nur den NA-Subtyp abzielen, und da bei 14 Proben Antikörper sowohl gegen H1 als auch H3 sowie bei fünf Proben gegen beide NA-Antigene detektiert wurden, ist eine eindeutige Subtyp-Zuordnung problematisch (LUO et al., 2013). Shimoda et al. verwendeten zur Differenzierung von acht ELISA-positiven Wildschweinseren, die zwischen 2010 und 2013 in Japan gesammelt wurden, den SNT und detektierten unter Verwendung von Testantigenen der Subtypen H1N1, H1pdmN1, H1N2 und H3N2 in vier Seren Antikörper gegen H1N1 sowie in drei weiteren Antikörper gegen H1pdmN1 (SHIMODA et al., 2017).

Obwohl einige Studien von der Empfänglichkeit von Schweinen für AIV berichten (KIDA et al., 1994; NINOMIYA et al., 2002), lieferte keines der mittels HAH oder SNT auf Antikörper gegen Antigene der aviären Subtypen H5N1, H7N1 und H9N2

untersuchten Wildschweinseren einen Hinweis auf eine vorausgegangene AIV-Infektion (LUO et al., 2013; CHO et al., 2015; WEI et al., 2016).

Tab. 3a: Ergebnisse in Asien durchgeführter Untersuchungen zu IAV-Antikörperprävalenzen im Wildschwein

Land	Zeitraum	untersuchte Tiere	Methode	positiv in %	Quelle	Subtypisierung
China	2009	31	HAH, NAH, SNT	74,2	(Luo et al., 2013)	11
China	2009-2013	14	ELISA, HAH	0	(Wei et al., 2016)	
Japan	2010-2013	185	ELISA	3,4	(Shimoda et al., 2017)	12

Tab. 3b: Ergebnisse von Subtypisierungsassays der Studien aus Tab. 3a, falls durchgeführt

Anzahl Proben	Test-system	H1N1*	H1pdmN1*	H1N2*	H3N2*	weitere	Quelle
11	23	HAH, NAH, SNT	21,7%	n.a.	39,1%	100%	H5/H9: 0% (Luo et al., 2013)
12	8	SNT	50%	37,5%	0%	0%	n.a. (Shimoda et al., 2017)

*Anteil an Proben, die das untersuchte Antigen hemmten, in Relation zur Anzahl der im jeweiligen Assay untersuchten, IAV-Antikörper positiv eingestuften Proben. Einzelne Proben inhibierten mehrere Antigene, für andere war kein Subtyp bestimmbar.

2.2.4. IAV-Seroprävalenzen in Wildschweinen in den USA und Kanada

In den USA und Kanada werden in sechs unterschiedlichen Studien zwischen 1996 und 2015 IAV-Seroprävalenzen zwischen 0% und 14,4% berichtet (sh. Tab. 4a; SALIKI et al., 1998; HALL et al., 2008; FENG et al., 2014; MCGREGOR et al., 2015; STEPHENSON et al., 2015; CLEVELAND et al., 2017). Die angewendeten Testsysteme variieren sehr deutlich sowohl in der Sensitivität als auch in der Ausrichtung auf Zielantikörper. Mittels Agar gel immunodiffusion assay (AGID) wurden z. B. Antikörper gegen das NP von AIV und mittels NAH Subtypen auf NA-Ebene bestimmt (HALL et al., 2008). Ein Fluorescent microsphere immunoassay (FMIA) dagegen wurde für den gleichzeitigen Nachweis von Antikörpern gegen IAV, *Porcines Circovirus 2* und *PRRS-Virus* eingesetzt (STEPHENSON et al., 2015). Die Ergebnisse durchgeführter Subtypisierungsassays sind in Tab. 4b dargestellt.

Tab. 4a: Ergebnisse in den USA und Kanada durchgeführter Untersuchungen zu IAV-Antikörperprävalenzen im Wildschwein

Land/Bundesstaat	Zeitraum	untersuchte Tiere	Methode	positiv in %	Quelle	Subtypisierung
Oklahoma	1996	117	HAH (H1N1)	11	(Saliki et al., 1998)	
Guam	2015	47	ELISA	0	(Cleveland et al., 2017)	
Oklahoma, Florida, Missouri	2005-2006	215	AGID	0	(Hall et al., 2008)	
Kalifornien	2005-2006	94	AGID	5,3	(Hall et al., 2008)	13
Mississippi	2005-2006	99	AGID	1	(Hall et al., 2008)	14
Texas	2005-2006	472	AGID	14,4	(Hall et al., 2008)	15
31 Bundesstaaten der USA	2011-2012	1.989	ELISA	9,2	(Feng et al., 2014)	16
Hawaii, Oahu	2007-2010	344	FMIA	7,8	(Stephenson et al., 2015)	
Kanada	2013-2014	22	ELISA (H1N1, H3N2)	0	(McGregor et al., 2015)	

Tab. 4b: Ergebnisse von Subtypisierungsassays der Studien aus Tab. 4a, falls durchgeführt

	Anzahl Proben	Test-system	H1N1*	H1pdmN1*	H1N2*	H3N2*	weitere	Quelle
13	5	HAH, NAH	n.a.	n.a.	n.a.	100%	***	(Hall et al., 2008)
14	1	HAH, NAH	n.a.	n.a.	n.a.	100%	***	(Hall et al., 2008)
15	68	HAH, NAH	n.a.	n.a.	n.a.	100%	***	(Hall et al., 2008)
16	76	HAH, NAH	6,6%	6,6%	n.a.	60,5%	n.a.	(Feng et al., 2014)

*Anteil an Proben, die das untersuchte Antigen hemmten, in Relation zur Anzahl der im jeweiligen Assay untersuchten, IAV-Antikörper positiv eingestuft Proben. Einzelne Proben inhibierten mehrere Antigene, für andere war kein Subtyp bestimmbar.

***H1N7, H2N9, H3N8, H4N8, H5N9, H6N8, H7N3, H8N4, H9N5, H10N7, H11N9, H11N6, H12N5, H13N6, H14N5, H15N9: 0%

Unter 1.989 Wildschweinseren, die zwischen 2011 und 2012 aus 31 Bundesstaaten der USA gesammelt und mittels ELISA auf IAV-spezifische Antikörper untersucht wurden, stellten Tiere im Alter von mehr als zwölf Monaten mit einer Seroprävalenz von 11,1% die am stärksten betroffene Altersgruppe dar, gefolgt von Frischlingen ab einem Alter von zwei Monaten und schließlich den noch jüngeren Tieren (5,1% bzw. 3,8%). Zwischen männlichen und weiblichen Tieren ist dagegen wie auch in Europa (sh. Kapitel II.2.2.2.) kein Unterschied erkennbar (FENG et al., 2014).

Über die Untersuchung auf Subtypen mittels S-IAV-Antigenen hinaus wurden Proben aus Kalifornien, Mississippi und Texas auch auf Antikörper gegen die AIV-Subtypen H1N7, H2N9, H3N8, H4N8, H5N9, H6N8, H7N3, H8N4, H9N5, H10N7, H11N9, H11N6, H12N5, H13N6, H14N5 und H15N9 untersucht. Es wurden keine Antikörper gegen diese AIV detektiert (HALL et al., 2008). Seit 1998 neue Reassortanten des bis dahin in den Vereinigten Staaten eher selten aus gehaltenen Schweinen isolierten Subtyps H3N2 auftauchten, hat sich dieser dort rasch etabliert und H1N1 in seiner Rolle als vorherrschender Erreger der Influenza in Hausschweinbeständen ersetzt (WEBBY et al., 2000; HALL et al., 2008). Auch in der Wildschweinpopulation wurden dann neben Antikörpern gegen H1N1 in elf von 68 positiven Proben aus Texas und Antikörpern gegen H1pdmN1 in fünf von 76 positiven Serumproben, die in den gesamten USA gesammelt wurden, hauptsächlich Antikörper gegen den Subtyp H3N2 nachgewiesen. In keiner der Studien wurden Testantigene aller in Wildschweinen zirkulierenden Subtypen verwendet, daher sind weitere, möglicherweise ebenfalls frequente Subtypen nicht berücksichtigt (HALL et al., 2008; FENG et al., 2014). Bemerkenswert ist, dass die Prävalenz von Antikörpern gegen den IAV-Subtyp H3N2 nach Auftreten in der Hausschweinpopulation auch in der Wildschweinpopulation stark gestiegen ist.

3. Infektionen mit dem suiden Herpesvirus 1 beim Wildschwein

Neben den S-IAV-Infektionen sind weitere Infektionsgeschehen aus den Wildschweinpopulationen weltweit bekannt, die als Zoonosen oder in Folge einer Übertragungsgefahr auf Hausschweinbestände sowie andere Tierarten besonders aufmerksam beobachtet werden. Eine wichtige Rolle spielt die anzeigepflichtige

Tierseuche Aujeszky'sche Krankheit, die durch das *suidae Herpesvirus 1* (SuHV-1) verursacht wird. Den natürlichen Wirt dieses Erregers stellen Vertreter der echten Schweine (Suidae) dar. Möglich ist aber auch die Übertragung auf andere Säugetiere wie Rinder, Schafe, Hunde, Katzen und Ratten. Die Infektion eines solchen Endwirts endet in allen Fällen tödlich und ist beim Rind und Hund mit schwerstem Juckreiz und Automutilation verbunden. Charakteristisch ist bei diesen Tierarten eine Tollwut-ähnliche Symptomatik, welche der Erkrankung ihre umgangssprachliche Bezeichnung „Pseudowut“ verleiht (BARTHOLD et al., 2011). Über Enzephalitiden bei Menschen, die auf eine Infektion mit SuHV-1 zurückgeführt werden, wurde erst kürzlich berichtet (YANG et al., 2019), allgemein gelten höhere Primaten jedoch als nicht empfänglich (METTENLEITER, 2000). Beim Schwein ist die klinische Manifestation stark abhängig vom Alter der betroffenen Tiere: Während bei empfänglichen, trächtigen Sauen embryonaler Fruchttod sowie Aborte vorherrschen und bei Saugferkeln die Mortalität bei bis zu 100% liegt, treten bei heranwachsenden und adulten Tieren in erster Linie zentralnervöse Symptome auf. Mit zunehmendem Alter nimmt die Letalität ab (BARTHOLD et al., 2011). In Wildschweinpopulationen zirkulierende Stämme sind nach Adaptation an die Population attenuiert (MÜLLER et al., 1998). Experimentelle Infektionen mit Isolaten von in den USA lebenden Wildschweinen, den Razorbacks, und aus Tieren, die mutmaßlichen Kontakt zu Razorbacks hatten, rufen sowohl bei diesen als auch bei Hausschweinen eine lediglich milde Symptomatik hervor (HAHN et al., 1997).

Als klassisches *Alphaherpesvirus* verursacht das SuHV-1 latente Infektionen, die nach Erstinfektion nie vollständig „gecleared“ werden. Nach Erstinfektion und Etablierung der Latenz muss jederzeit mit einer Reaktivierung der Infektion mit Virusreplikation und Virusausscheidung gerechnet werden. Daher stellt ein einmal infizierter Hauptwirt dauerhaft ein potenzielles Risiko für empfängliche Tiere dar (BARTHOLD et al., 2011).

Infolge staatlicher Bekämpfungsmaßnahmen gilt Deutschland seit 2003 offiziell als frei von der Aujeszky'schen Krankheit in Hausschweinebeständen (PANNWITZ et al., 2012). In Wildschweinpopulationen ist die Infektion jedoch nach wie vor endemisch und breitet sich möglicherweise sogar regional aus. Obwohl auch die Wildschweindichte in Deutschland kontinuierlich zunimmt, ist bislang nicht ein Fall aus Deutschland bekannt, in dem die Übertragung auf Hausschweine

stattgefunden hat (MÜLLER et al., 2000; PANNWITZ et al., 2012). Dass dies prinzipiell eine Gefahr darstellt, zeigen jedoch Erfahrungen aus anderen Ländern, z. B. Frankreich. Hier wurden wiederholt einzelne Einträge des Virus in Betriebe, die nicht ausreichend durch Biosicherheitsmaßnahmen geschützt waren, beobachtet (ANIMAL HEALTH ONLINE, 2020).

Das Virus wird hauptsächlich über Nasenausfluss und Speichel weitergegeben, auch die venerische und orale Übertragung werden als wichtige Infektionswege diskutiert (MÜLLER et al., 2000; BARTHOLD et al., 2011; PANNWITZ et al., 2012). Zwischen der Wildschweindichte oder der Altersgruppe der untersuchten Tiere und der Seroprävalenz wurden in der Vergangenheit positive Korrelationen beobachtet. Bei 8.006 Wildschweinen, die zwischen 1991 und 2008 in Mecklenburg-Vorpommern und Brandenburg untersucht wurden, war die SuHV-1-Seroprävalenz adulter Tiere mit 16,7% am höchsten, gefolgt von der der Überläufer mit 10,1%, während die der Frischlinge mit 4,7% am niedrigsten war (PANNWITZ et al., 2012). Endwirte infizieren sich hauptsächlich durch die Aufnahme von kontaminiertem Fleisch oder direkten Kontakt mit Schweinen und spielen keine Rolle in der Virus-Weiterverbreitung (BARTHOLD et al., 2011; SEHL & TEIFKE, 2020).

Pannwitz et al. werteten Daten von insgesamt 102.387 Wildschweinen aus, die zwischen 1985 und 2008 in den ostdeutschen Bundesländern Mecklenburg-Vorpommern, Brandenburg, Sachsen-Anhalt, Sachsen, Thüringen und Berlin erlegt und deren Serumproben entweder mittels ELISA oder mittels SNT auf Antikörper gegen das SuHV-1 untersucht wurden. Bei den ersten Tieren, aus deren Proben Antikörper nachgewiesen wurden, handelte es sich um Wildschweine, die 1985 in Mecklenburg-Vorpommern erlegt worden waren. 1987 wurden dann auch erstmals Antikörper aus Proben von Tieren aus Brandenburg oder Sachsen nachgewiesen. In den darauffolgenden Jahren zeigte sich eine deutliche Ausbreitung nach Westen, wobei natürliche Barrieren (insbesondere Flüsse) den Fortschritt beeinflussten. Mit der Zeit stieg die Seroprävalenz von 0,4% auf ca. 16% (PANNWITZ et al., 2012). Denzin et al. werteten die Daten der Analysen von 108.748 weiteren Wildschweinseren aus, die zwischen 2010 und 2016 in 14 deutschen Bundesländern gesammelt und in den zuständigen Landesuntersuchungsbehörden mittels ELISA auf SuHV1-Antikörper untersucht wurden. Die Gesamtseroprävalenz liegt bei 14,1%, variiert jedoch je nach Bundesland zwischen 0,14% und 31,4%. In

Ostdeutschland, wo ein Vergleich zu den Vorjahren möglich ist, ist ein deutlicher Anstieg der Seroprävalenz um fast 10% zu erkennen. Erste Untersuchungen zu einer SuHV-1-Seroprävalenz in Bayern stammen aus dem Jahr 2012. In diesem Jahr wurden in 5,15% von 1.575 Serumproben Antikörper diagnostiziert, seit 2013 liegt die Rate konstant bei 10-12%, wobei regional deutliche Unterschiede auftreten. Während in Unterfranken, der Oberpfalz und Niederbayern jeweils ca. 20% der untersuchten Wildschweine betroffen sind, wurden in Schwaben bislang keine Antikörper gegen SuHV-1 nachgewiesen (DENZIN et al., 2020).

III. PUBLIKATION

Exposure of wild boar to Influenza A viruses in Bavaria: Analysis of seroprevalences and antibody subtype specificity before and after the panzootic of highly pathogenic avian influenza viruses A (H5N8)

Anika Schüle¹, Mathias Ritzmann², Jürgen Christian³, Katharina Schneider¹, Antonie Neubauer-Juric¹

¹Bavarian Health and Food Safety Authority, Oberschleissheim, Germany

²Clinic for Swine, Ludwig-Maximilians-Universität München, Oberschleissheim, Germany

³Bavarian Health and Food Safety Authority, Erlangen, Germany

Correspondence: Antonie Neubauer-Juric, Institute for Animal Health II, Bavarian Health and Food Safety Authority, Veterinärstr. 2, 85764 Oberschleißheim, Germany. Email: antonie.neubauer-juric@lgl.bayern.de

Abstract

Swine influenza A viruses (S-IAV) circulate in wild boar populations worldwide. Subtypes primarily reflect those actually present within the respective pig industry. Accordingly, infections with swine H1N1, H1N2 and H3N2 have been reported for several regions of Germany. As pigs are susceptible not only to S-IAV but also to avian and human influenza A viruses, it is necessary to consider the possibility that new reassortant viruses with pandemic potential may arise in these new hosts. Therefore, in this study the impact of recent IAV epidemics on antibody prevalences in Bavarian wild boar was assessed. Important events considered were the H1N1pdm09 pandemic, which affected humans and swine, and the highly pathogenic avian influenza (HPAI) H5N8 panzootic in 2016 and 2017, affecting wild and domestic birds. IAV seroprevalences were determined analysing 1,396 samples from before and after the H5N8 panzootic, from various regions in Bavaria, a large administrative region in the South of Germany. Taken together, seroprevalences varied markedly from 1.44% to 12.59%, relative to region and time. However, no discrete correlation was found to population density either in wild boar or in pigs. Antibodies against H1N1 were the most prevalent. In addition, antibodies were detected reacting against H1N2 and against H1pdmNx reassortant viruses, already known to circulate in domestic pigs in Bavaria and notably also against the avian influenza A virus H5N8; the latter in samples taken in 2017. These results confirm the exposure of wild boar to IAV of diverse origin and the increasing variability of S-IAV present in the field. The necessity for continuous IAV surveillance not only of domestic swine but also of wildlife is emphasized.

Keywords

AIV, H5N8, Influenza A virus, seroprevalence, swine, wild boar

Impacts

- Samples from wild boar taken in Bavaria between February 2014 and February 2019 were analysed for Influenza A virus-specific antibodies using a hierarchical test regime.
- Antibodies against H1pdmN1 and H1pdmN2 reassortant viruses were found in several independent samples, but those against H1N1 were still predominant.
- In samples taken in 2017, antibodies neutralizing highly pathogenic avian influenza virus A (H5N8) were detected highlighting the importance of ongoing surveillance.

Introduction

Influenza A viruses (IAV) are classified into the genus *Alphainfluenzavirus*, belonging to the family *Orthomyxoviridae*, in the order *Articulavirales* (International Committee on Taxonomy of Viruses, 2019). There is a multitude of subtypes and variants of these viruses with diverging characteristics, such as antigenicity, species specificity or pathogenicity. Subtypes are defined on the basis of the major surface antigens, hemagglutinin (HA) and neuraminidase (NA) (Webster et al., 1992). In addition, avian influenza A viruses (AIV) are categorized into low and highly pathogenic avian influenza viruses (LPAIV and HPAIV), the latter of which mainly belong to HA subtypes H5 or H7, with polybasic cleavage sites within the HA sequences (Mostafa et al., 2018). In 2016, novel HPAIV H5N8 emerged in Asia reaching Germany in late autumn (Globig et al., 2018). In Bavaria, the first wild bird diagnosed as H5N8 infected was reported on 11 November 2016. Following the spread of H5N8 all over Germany, large numbers of wild birds from countless species were found dead, mostly until spring 2017 (Globig et al., 2018; World Organisation For Animal Health, 2017). The divergence of isolates revealed a high potential for reassortment (Pohlmann et al., 2018, 2019). However, despite the widespread occurrence of H5N8 and the shedding of high viral loads by affected birds (Pohlmann et al., 2018), the viruses appear poorly adapted to replication in mammals (Grund et al., 2018).

Besides aquatic wild birds other avian species as well as mammals, such as humans and pigs, are also susceptible to IAV infections (Webster et al., 1992). Few IAV

establish stable infection chains within a particular mammalian host (Zell et al., 2012). Swine, avian and human IAVs are, however, able to replicate in the respiratory tract of pigs (Ma et al., 2009). Consequently, coinfection could lead to the emergence of novel reassortant viruses that then would be both easily transmittable from human to human and also highly pathogenic at the same time. So far, most IAV found to infect swine belong to the HA subtypes H1 or H3 (Zell et al., 2012). The classical H1swN1 vanished in Europe following the introduction of the ‘avian-like’ avH1N1 from wild birds in 1979 (Van Reeth et al., 2012). The reassortment of the latter with human IAV resulted in the emergence of the ‘human-like’ H1N2 and the ‘human-like’ H3N2 (Simon et al., 2014). Although the ‘human-like’ H3N2 is still present, there are indications that ‘human-like’ H1N2 is slowly being displaced by new H1N2 clades (Pippig et al., 2016; Zell et al., 2020). In 2009, H1N1pdm09, a complex reassortant of North American triple recombinants and avH1N1, was introduced into pig populations worldwide (Neumann et al., 2009). The genome of diverse H1pdmN2 reassortants, which emerged rapidly, originated from H1N1pdm09 but the gene encoding NA was obtained from other lineages (Harder et al., 2013; Starick et al., 2012). These viruses subsequently became established in the pig industry across Europe (Lange et al., 2013).

In European countries, IAV antibodies have been diagnosed in free-roaming wild boar. Deduced seroprevalences are variable and depend on the study design, ranging from 0% in France and Slovenia to 22.5% in Ukraine. The subtype H1N1 is predominant, but antibodies against H1N1pdm09, H1N2 and H3N2 are also found (Cano-Manuel et al., 2014; Closa-Sebastià et al., 2011; Delogu et al., 2019; Foni et al., 2013; Grech-Angelini et al., 2018; Kovalenko et al., 2017; Malmsten et al., 2018; Roic et al., 2012; Touloudi et al., 2015; Vengust et al., 2006; Vittecoq et al., 2012). Information about the actual situation in Germany is limited. Samples from several federal states have been analysed in previous studies, including the south-western federal state Baden-Wuerttemberg, the north-eastern states Brandenburg and Mecklenburg-Western-Pomerania, as well as Saxony-Anhalt and Rhineland Palatinate. IAV-specific antibodies were detected in 0% to 26.7% of the samples analysed and were directed as anticipated against H1N1, H1N2 and H3N2 (Kaden et al., 2008, 2009; Polley et al., 2007; Weyand, 2017).

It is known that wild boar occasionally prey on carrion (Vittecoq et al., 2012) and genetic as well as serologic evidence indicates the transmission of IAV from wild

birds to pigs (Martin et al., 2017; Meseko et al., 2018; Ninomiya et al., 2002). However, several studies suggest that HPAIV H5Nx can infect swine but are not easily transmittable to other swine (Kaplan et al., 2017; Reperant et al., 2009).

The adaptation of a ‘newly’ transmitted IAV into the wild boar population might take many years and depend on regional circumstances such as wild boar density and hunting activity. In consequence, careful surveillance of circulating viruses and putative novel reassortants is important for several years after an introduction. Therefore, in the current study we have acquired statistically valid data concerning the seroprevalence of IAV in the Bavarian wild boar population as a first step. Moreover, the correlation of antibodies to specific subtypes and the spatial distribution within Bavaria were of particular interest. Finally, changes concerning the occurrence of subtypes before and after the H5N8 AIV panzootic in 2016/2017 were assessed.

Materials and Methods

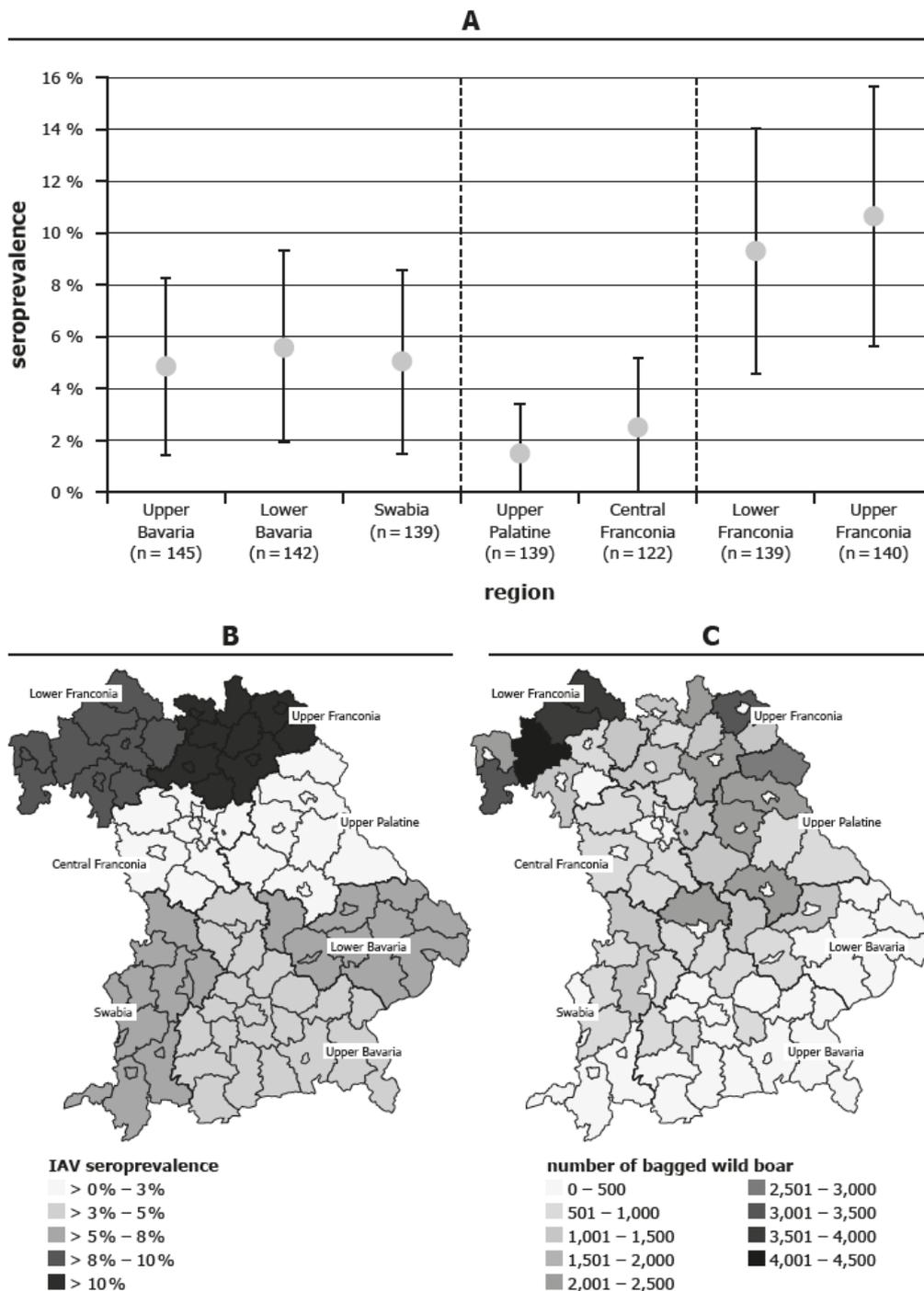
Samples and statistical methods

Post mortem serum samples taken from wild boar were sent to the Bavarian Health and Food Safety Authority, according to national regulations (Bundesministerium der Justiz und für Verbraucherschutz; Bundesamt für Justiz, 2016). From this large pool, samples were selected randomly to fulfil the following sampling plan.

Influenza A viruses seroprevalences were to be determined with a statistical certainty of 95% at an accuracy of at least 5%. Confidence intervals (CI) were set to cover the true seroprevalence with a certainty of 95%. Based on initial data, a putative seroprevalence of approximately 10% was assumed. In consequence, samples of at least 139 animals per aspect considered, namely administrative region, period, sex or age group, had to be analysed (Conraths et al., 2015). Wherever possible, the distribution of samples was adapted to the regional density of wild boar, which was deduced from the 2018 records of wild boar hunting kills (Wildtierportal Bayern). Selecting more than one sample from the same time and location was avoided, if possible.

To assess the potential impact of the HPAI H5N8 panzootic 2016/17 on the IAV seroprevalence, results of two different sampling periods were compared. Period 1

dated from February 2014 to September 2016 and period 2 from October 2016 to February 2019. Bavaria comprises seven administrative regions (Figure 1). The southern administrative regions were represented by samples taken in sampling period 1, namely 143 samples from Upper Bavaria, 144 samples from Lower Bavaria and 143 samples from Swabia, and sampling period 2, namely 145, 142 and 139, respectively. To compare regional seroprevalences, additional samples from the northern administrative districts Lower Franconia (n = 139), Central Franconia (n = 122), Upper Franconia (n = 140) and Upper Palatine (n = 139), taken



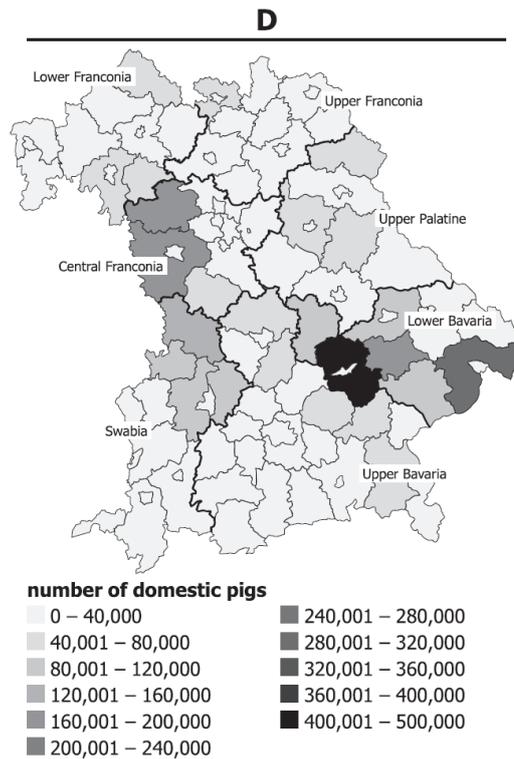


Figure 1 Regional IAV antibody prevalences for Bavarian wild boar. Data are given for the results of sera taken in sampling period 2 ($n = 966$). (A) CI to cover the true seroprevalences with a certainty of 95% are given. The chart was generated using Excel and graphically edited using Adobe Indesign CC 2018 and Illustrator CC 2019 (B) Map of Bavaria geographically indicating IAV seroprevalences in wild boar. The seven administrative regions are shown. Finer borderlines within regions indicate administrative districts. (C) Map of Bavaria giving the hunting bag data of 2018 on the administrative district level. (D) Map of Bavaria giving the number of domestic pigs of 2016 on the administrative district level. All maps were generated using the software package GfK RegioGraph and graphically edited using Adobe Indesign CC 2018 and Illustrator CC 2019

at sampling period 2, were used.

A subset of 1,217 samples was accompanied by the respective information that allowed for classification as young boar ($n = 463$; <12 months), subadults ($n = 508$; 12-23 months) and adults ($n = 246$; 24 months and older). Accordingly, the sex information available enabled the categorisation of 504 female and 489 male animals.

For statistical analyses, the chi-squared test was applied. Values of $p < .05$ were regarded as statistically significant.

In addition, to consider infection ratios and subtype distribution within a sounder of boar, 361 samples originating from 35 driven hunts were analysed. To confirm the presence of antibodies reacting against the AIV H5N8, another independent set

of 265 samples taken in southern Bavaria in sampling period 2 was used.

Serological analysis

To determine IAV seroprevalences and subtype specificity, a hierarchical test regime was applied. Samples were tested by IAV antibody ELISA first, then all sera, but the clearly negative ones, by hemagglutination inhibition assay (HI), and finally, a serum neutralization test (SNT) was used. By SNT, all sera showing unspecific agglutination effects on chicken erythrocytes were analysed and HI results of other sera corroborated. Sera were classified as IAV antibody positive when clearly positive in any of the three test systems. If SNT data were produced, it was decisive. For sera that neutralized more than one subtype, a single subtype was assigned if differences in neutralization titres exceeded a factor of two. By HI, a single subtype was appointed if its titre exceeded those of the other subtypes at least by a factor of four. Results are described as ‘no subtype determined’ for all samples classified as IAV positive, as mentioned above, but either not clearly reactive in HI and/or SNT or if the sample volume available did not suffice to conduct the subtyping assays.

ELISA detecting IAV antibodies

The ‘ID Screen® Influenza A Antibody Competition Multispecies’ ELISA kit (ID VET), a competitive ELISA for the detection of anti-nucleoprotein (NP) antibodies, was used following the manufacturer's instructions. Using the cut-off values given by the manufacturer (positive for a sample to negative control ratio (S/N%) below 45%; doubtful for a S/N% between 45% and 50%; negative for ratios above 50%), a specificity of 100% and analytic sensitivity superior to HI was determined for swine sera (ID VET internal validation report, available upon request). In the present study, all sera reacting with ratios between 50% and 70% were additionally tested for subtype-specific antibodies. To ensure the comparability between individual ELISA test runs, the same defined weak positive field serum was used in every assay as a reference.

Hemagglutination inhibition assay (HI)

Sera were pre-treated with receptor destroying enzyme (Cholera filtrate lyophilized powder, Sigma-Aldrich) following standard procedures (Weyand, 2017). Unspecific agglutinins were removed by incubating with a 50% chicken erythrocyte suspension and using the resulting supernatant.

S-IAV isolates A/swine/Bavaria/Z886/2015/H1N1; A/swine/Bavaria/1803/2013/H3N2; A/swine/Bavaria/5702/2013/H1N1 (H1pdmN1) and A/swine/Bavaria/4201/2014/H1N2 (H1pdmN2) had been isolated on Mardin Darby Canine Kidney (MDCK) cells (ATCC; Nr. CCL-34) (Pippig et al., 2016). A/swine/Germany/R856/2010/ H1N2 was kindly provided by Dr. Timm Harder, Friedrich-Loeffler- Institute, Insel Riems, Germany, and propagated on MDCK cells. The AIV A/tufted duck/Bavaria/61101/2016/H5N8 was isolated via SPF embryonated chicken eggs from a tufted duck found dead in the south of Bavaria in 2016. Sera from domestic pigs with defined HI titre against the respective antigens were used as controls. HI was conducted following standard procedures (World Organisation for Animal Health, 2012). HI titres 20 and above were considered positive for IAV antibodies.

Serum neutralization test (SNT) and immunoperoxidase staining

The assay was performed according to standard procedures (World Health Organization, 2010). Sera were heat inactivated for 30 min at 56°C before being tested. IAV described for HI, A/Turkey/Germany/R1612/2008H5N3LP that was kindly provided by Dr. Timm Harder, Friedrich-Loeffler-Institute, Insel Riems, Germany, and corresponding control sera were used.

Infection was visualized by immunoperoxidase staining using an anti-IAV nucleoprotein antibody (clone 1331, Bio-Rad). A replicate was considered infected when at least one cell expressed IAV nucleoprotein. Neutralization titres of at least six were rated positive.

Results

IAV seroprevalences in Bavarian wild boar

For seroprevalence calculations, altogether 1,396 sera were used following the sampling plan given in the Section 2. Results are summarized in Table 1.

Interestingly, the IAV seroprevalence calculated for the combined southern Bavarian wild boar population declined from 9.53% (CI: 6.76%-12.31%) before to 5.16% (CI: 3.06%-7.27%) after the H5N8 panzootic. This difference was statistically significant (p-value <.05).

Regional seroprevalences were compared for sampling period 2 and administrative regions (Figure 1). The lowest seroprevalences were found in the middle regions of Bavaria. However, at least on this level, this spatial distribution depends neither on the deduced wild boar nor on the domestic pig density (Figure 1.). Considering the fact that only 2.46% (CI: 0-5.21%) of the sera from Central Franconia contained antibodies against IAV, the reduced number of 122 samples still complied with the initially required accuracy.

A subset of 1,217 samples, irrespective of the sampling period, could be classified into age groups. As demonstrated in Figure 2, the seroprevalence calculated for samples from adult boar (12.20%; CI: 8.11%-16.28%) was higher than that for the group of the subadults (6.30%; CI: 4.19%-8.41%) and young boar (4.97%; CI: 2.99%-6.95%). This difference was statistically significant (p-value <.05).

Furthermore, 504 samples were identified as deriving from female and 489 from male animals. However, no marked difference between the sexes was found, with IAV seroprevalence in male boar being 9.82% (CI: 7.18-12.45%) and in females 8.73% (CI: 6.27-11.19%).

Table 1 IAV antibody seroprevalence in samples from Bavarian wild boar separately analysed by administrative region and sampling period^a

	region	samples tested	IAV seropositive	IAV seroprevalence (CI95%)	Odds ratio (CI95%)	p-value
sampling period 1	Upper Bavaria	143	14	9.79% (4.92-14.66%)	1.63 (0.68-3.89)	> .05
	Lower Bavaria	144	9	6.25% (2.30-10.20%)	1.00	-
	Swabia	143	18	12.59% (7.15-18.02%)	2.16 (0.94-4.98)	> .05
sampling period 2	Upper Bavaria	145	7	4.83% (1.34-8.32%)	3.47 (0.71-17.02)	> .05
	Lower Bavaria	142	8	5.63% (1.84-9.43%)	4.09 (0.85-19.61)	> .05
	Swabia	139	7	5.04% (1.40-8.67%)	3.63 (0.74-17.81)	> .05
	Upper Palatine	139	2	1.44% (0-3.42%)	1.00	-
	Central Franconia	122	3	2.46% (0-5.21%)	1.73 (0.28-10.51)	> .05
	Lower Franconia	139	13	9.35% (4.51-14.19%)	7.07 (1.56-31.94)	< .05 ^b
	Upper Franconia	140	15	10.71% (5.59-15.84%)	8.22 (1.84-36.66)	< .05 ^b

^aPeriod 1: February 2014 to September 2016; period 2: October 2016 to February 2019

^bValues of $p < .05$ were regarded as statistically significant.

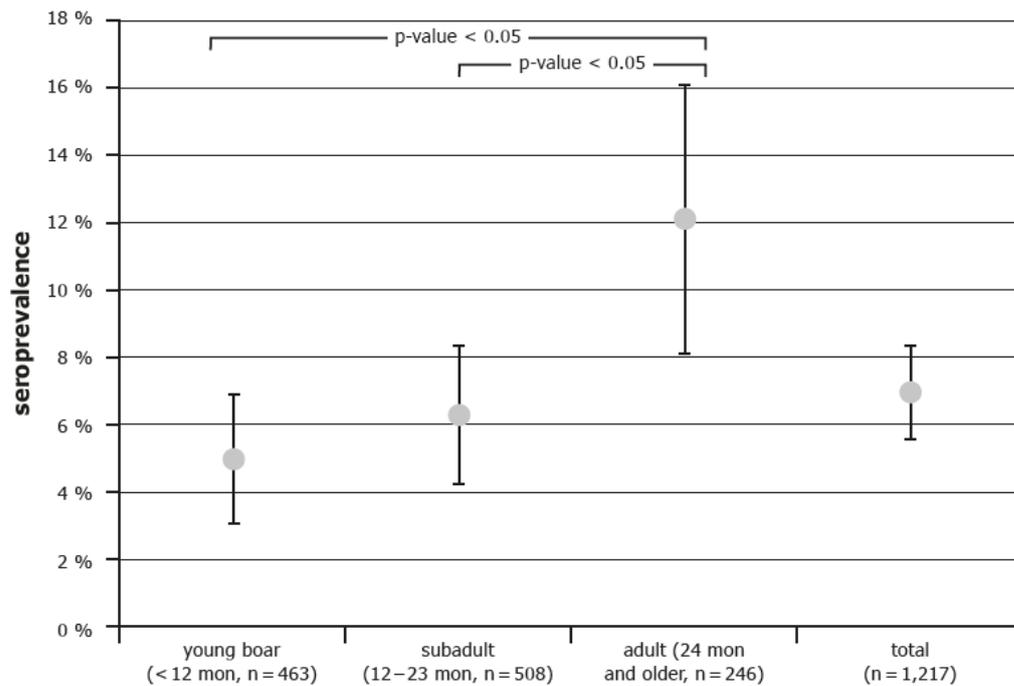


Figure 2 IAV seroprevalences relative to the age group. Seroprevalences were calculated separately for each age group. The CI were set to cover the true seroprevalence with a certainty of 95% and are depicted, respectively. The statistical significance of differences between age groups is indicated above bars. P-values $< .05$ were regarded as statistically significant. The data are based on the analyses of 1,217 sera. The chart was generated using Excel and graphically edited using Adobe Indesign CC 2018 and Illustrator CC 2019

Subtype specificity

Using the test regime described in the Section 2, of 1,396 samples analysed for seroprevalence analyses 96 samples were categorized as seropositive. 45 of these were clearly assignable to one subtype (Table 2; Figure 3), another 29 reactive to several antigens, and the remaining samples ranked as ‘no subtype determined’ as defined in the Section 2. Combined reactivity against H1N1 and H1pdmN2 was found frequently ($n = 18$), but a number of other patterns against the tested H1Nx and H1pdmNx antigens were also seen. However, antibodies against A/swine/Bavaria/1803/2013/H3N2 were not detected. Subtypes and the geographical origin on the level of postal code areas of these samples are shown in Figure 3.

The total number of sera reactive against an individual subtype is summarized in Table 3, irrespective whether diagnosed as single reactivity or whether in combination with other subtypes.

Table 2 Number of samples selected for seroprevalence calculations assigned to one particular subtype.

Region/ sampling period	H1N1	H1N2	H1pdmN1	H1pdmN2	H5N8	>1 ^a	No subtype ^b determined	Σ
Southern Bavaria – sampling period 1	8	5	-	8	-	12	8	41
Southern Bavaria – sampling period 2	6	2	-	1	1	5	7	22
Northern Bavaria – sampling period 2	6	1	3	4	-	12	7	33
Σ	20	8	3	13	1	29	22	96

^aIf more than one subtype specific reactivity was diagnosed results are indicated as '>1'.

^bas defined in the Material and Methods section

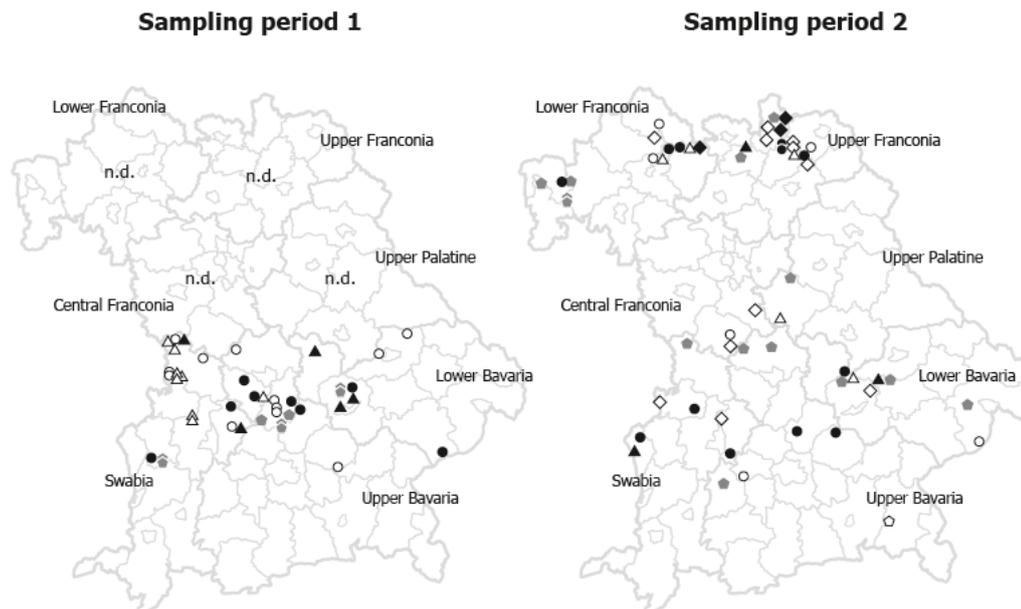


Figure 3 Map of Bavaria indicating the origin of subtyped samples. Data are shown for samples chosen for seroprevalence calculations. Icons indicate postal code areas from which the respective sample originated. The seven administrative regions are given. The detected IAVs were classified into subtypes H1N1 (●), H1pdmN1 (◆), H1N2 (▲), H1pdmN2 (△), and H5N8 (◑), as well as combinations of H1N1 and H1pdmN2 (○), other combinations (◈), and not subtypable (◉). N.d. – no samples from these northern administrative regions were analysed in period 1. Both maps were generated using the software package GfK RegioGraph and graphically edited using Adobe Indesign CC 2018 and Illustrator CC 2019

Table 3 Number of samples selected for seroprevalence calculations reactive against a given subtype, irrespective whether diagnosed exclusively or in combination

Region/sampling period		H1N1	H1N2	H1pdmN1	H1pdmN2	H5N8
Southern	Bavaria sampling period 1	– 20	5	–	20	–
Southern	Bavaria sampling period 2	– 11	4	1	4	1
Northern	Bavaria sampling period 2	– 17	4	9	15	–
Σ^a		48	13	10	39	1

^aSince 29 of the 96 IAV seropositive samples reacted against more than one subtype the total sum of subtypes exceeds the number of sera tested.

Next, altogether 110 sera were selected for an SNT against H5N8, although no indication for H5 specific antibodies had been seen by HI. Interestingly, one sample, which had been clearly classified as positive by ELISA, did not inhibit hemagglutination in any of the HIs, not even using H5N8 as antigen, but did specifically neutralize A/tufted duck/ Bavaria/61101/2016/H5N8 up to a titre of 64. The specificity of the reaction was corroborated by testing the same serum in SNT not only against all other viruses used in this study but also against the LPAIV A/Turkey/Germany/R1612/2008H5N3LP, representing LPAIV H5N3 commonly found in wild birds in Bavaria. However, no neutralization other than against the H5N8 virus was detected.

To assess whether this kind of exposure to H5N8 was a rare exception, another 265 sera from Bavarian regions where a high impact of the H5N8 panzootic had been noted, were selected and tested for IAV antibodies by ELISA and, if reactive, additionally tested for neutralization against H5N8. Another three sera were shown to specifically neutralize H5N8 infectivity but not that of H5N3.

Analyses of IAV seroprevalences within sounders of wild boar

The aim of this part of the study was assessing the seroprevalence within sounders

or rather among boar sharing a territory and, if possible, the transmission of individual subtypes. Samples originating from 20 driven hunts (P1 up to P20) were selected because at least one individual had been diagnosed as IAV seropositive in the seroprevalence analyses described above. Another 15 driven hunts were chosen at random (R1 up to R15). Altogether, samples from 21 driven hunts included seropositive samples. In 15 cases, at least one more seropositive animal was identified. Antibody prevalences within these sounders varied between 4.55% and 100% (Table 4). In a next step, subtypes were determined. Results are summarized in Table 5.

Comparative analysis between HI and SNT

None of the samples tested against H3N2 specifically neutralized in the SNT. Conversely, no sample did inhibit the agglutination of H5N8 in the HI. Therefore, the following comparison of results between test systems focused on H1 subtypes.

131 of all samples chosen for follow-up analyses by SNT were reactive against one or more of the H1Nx antigens by HI (n H1N1 = 119; n H1N2 = 67; n H1pdmN1 = 61; n H1pdmN2 = 85). Results therefore were compared looking at the individual subtypes, no matter whether the serum was considered specific for one subtype or reacted against more than one. Taken together, 87 out of 186 HI results (46.77%) at a titre of 10 were corroborated by SNT. 76 out of 88 HI results (86.36%) at a titre of 20 and 42 of the samples with HI titres of 40 (n = 44) were confirmed by specific neutralization (95.45%). Finally, the correlation was 100% for HI titres 80 and above (n = 14). The relation between HI and SNT titre is depicted in Figure 4.

Table 4 Intrasouder seroprevalences deduced from samples obtained at individual driven hunts. Data are shown for sample pools including at least one IAV seropositive sample

sample pool	Number of samples tested	Number of IAV seropositive samples	Relative number of IAV seropositive samples in percent
P1	11	8	72.73
P2	8	1	12.50
P3	3	2	66.67
P4	12	12	100.00
P5	3	3	100.00
P6	2	2	100.00
P7	20	6	30.00
P8	16	8	50.00
P9	13	7	53.85
P10	13	1	7.69
P11	10	1	10.00
P12	5	2	40.00
P13	6	3	50.00
P14	22	1	4.55
P15	4	2	50.00
P16	5	1	20.00
P17	10	3	30.00
P18	4	1	25.00
P19	9	2	22.22
P20	8	4	50.00
R10	12	3	25.00

Table 5 Subtype specificity among driven hunts with more than one IAV seropositive sample

sample pool	number of samples - similar subtype patterns (subtypes)	number of samples – divergent antibody patterns	number of samples – no subtype determined
P1	2 (H1N1)	/	6
P3	2 (H1N1)	/	/
P4	/	2	10
P5	/	1	2
P6	2 (H1pdmN2)	/	/
P7	2 (H1N1)	4	/
P8	3 (H1N1/H1pdmN2)	4	1
P9	4 (2 x H1N1/H1pdmN2, 2 x H1pdmN2)	3	/
P12	2 (H1N1)	/	/
P13	/	/	3
P15	2 (H1pdmN1)	/	/
P17	/	1	2
P19	/	2	/
P20	2 (H1N1)	2	/
R10	/	3	/

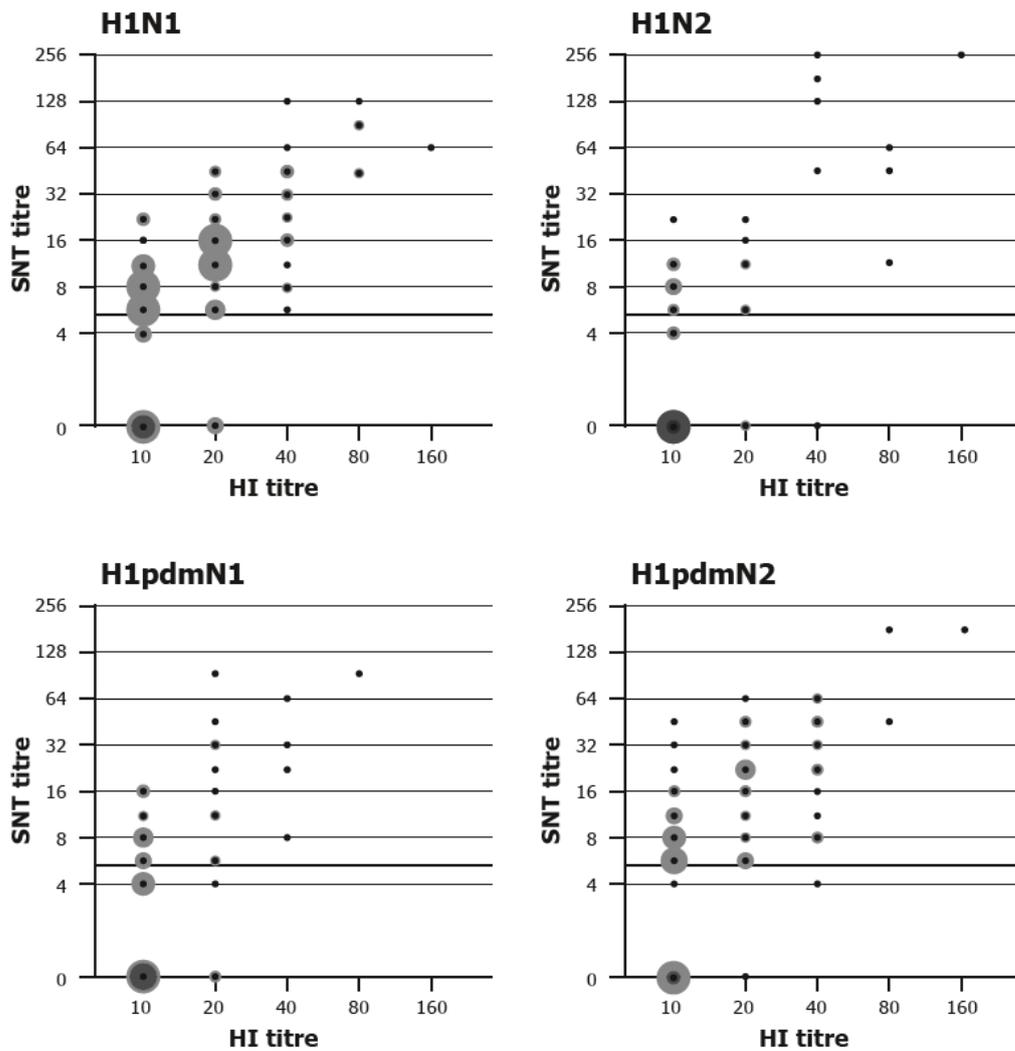


Figure 4 Comparison of results in HI to those in SNT. Test results for sera subtyped in both assays are plotted. The colour intensity of dots reflects the number of results included, ranging between 1 and 33. Results below the horizontal cut off line were considered negative in the SNT. The chart was generated using Excel and graphically edited using Adobe Indesign CC 2018 and Illustrator CC 2019

Discussion

This study was designed to determine IAV seroprevalences in Bavarian wild boar, thereby considering various aspects, such as age, sex or a regional distribution. To this end, three diagnostic systems were used. As the detectability of IAV antibodies is known to decrease with time, if not boosted, the sensitivity of the ELISA used was expanded by subjecting all 71 samples with negative but elevated ELISA results, namely with values between 50% and 70% (S/N%), to further testing. Interestingly, subtype-specific antibodies could be assigned to 28 of these samples.

In contrast, 15 samples which had been clearly rated positive by ELISA showed no inhibition at all in the different HI tests. Possible explanations for this result could either be that the antibodies were specific for other IAV not used in these subtyping assays, such as an S-IAV antigenically too distinct or even any of the multitude of AIVs circulating in wild birds, or that HI per se was not a suitable method for the kind of antibodies present, or that antibodies against NP were still detectable, whereas those against the HA had declined below the detection limit. Similar observations have been reported for pigs in several artificial IAV exposure scenarios, using an NP-based ELISA system, suggesting that antibodies to NP and HA develop and decline in different rates (de Boer et al., 1990).

To examine samples that could not be evaluated by HI, SNT was used and for three of 18 samples, an H1Nx subtype was determined. Furthermore, SNT was useful to corroborate the HI H1 subtyping data, especially for low titre samples. This situation, however, was different for the H5 seroreactivity.

The H5N8 panzootic in 2016/2017 affected not only wild waterfowl greatly but also scavenging birds that had apparently fed on infected carcasses (Globig et al., 2018). As the transmission of AIV to pigs has been previously demonstrated both under natural and experimental conditions (De Vleeschauwer et al., 2009; Meseko et al., 2018), it was of special interest to assess whether an exposure of wild boar to the HPAIV H5N8 could be retraced. However, HI did not indicate the presence of respective antibodies. Then again, as HI might not be the suitable method to detect AIV-specific antibodies in swine (Kida et al., 1994; Ninomiya et al., 2002), a subset of 110 samples was in addition analysed by SNT. In fact, one of these sera, which did not react in any of the HIs or SNTs using H1, H1pdm, H3, or an LPAIV H5N3, specifically neutralized the infectivity of an H5N8 isolated in Bavaria in 2016. Interestingly, this serum originated from a wild boar shot in the district of Traunstein (Figure 3), where wild boar density is low (Figure 1), and where a particularly large number of waterfowl had succumbed to H5N8 infection in 2016 (Globig et al., 2018). To assess the question whether this reactivity was an unusual exception, 265 additional sera from similar locations in the South of Bavaria were selected, in a first step submitted to ELISA, and 17 reactive samples then further tested. The fact that again three samples, originating from the district of Starnberg in Upper Bavaria, clearly neutralized H5N8, corroborated the hypothesis that on several occasions wild boar in Bavaria must have experienced intense contact with

H5Nx, likely H5N8 viruses in 2016/17. The presence of antibodies explicitly targeted against HPAIV H5N8 has not been formally proven in this study. Other, closely related H5Nx viruses could have been the cause. However, using a typical LPAIV H5N3, as frequently detected in wild birds in Bavaria, an overall (cross)reactivity against H5Nx was excluded, and, to our knowledge, the presence of H5 specific antibodies was demonstrated for the first time in a European wild boar population. Transmission among wild boar, however, has not yet been proven and – if occurring at all – might not be very efficient, as the overall prevalence of H5N8 neutralizing antibodies within the samples additionally evaluated was low (1.13% of $n = 265$).

A dependency of IAV circulation in wild boar on the population's density (Ruiz-Fons et al., 2008) was presumed. Interestingly, whereas for Upper and Lower Franconia a high wild boar density corresponds to a relatively high IAV seroprevalence (10.71% and 9.35%, respectively), in another region with high wild boar density, Upper Palatine, the IAV seroprevalence (1.44%) was low (Figures 1, 3). Furthermore, as the subtypes that were found in wild boar populations were in most cases the same as those actually present within the respective pig industry, we tested the hypothesis that variations in the wild boar IAV prevalence between regions might be due to a mutual dependence on the pig population density. However, no clear correlation between the pig population density (Bayerisches Landesamt für Statistik, 2020) and regional seroprevalences could be demonstrated (Figures 1 and 3).

In southern Bavaria, seroprevalences were compared between two different periods. After the H5N8 panzootic 2016/17, samples from the neighbouring regions Upper Bavaria, Lower Bavaria and Swabia indicated comparable IAV seroprevalences ranging between 4.83% and 5.63%. However, looking at period 1 (February 2014 to September 2016), differences became eminent, as for both Upper Bavaria and Swabia seroprevalences were clearly about twice as high as in period 2 (October 2016 to February 2019), namely 9.79% and 12.59%, respectively.

As the detectability of IAV-specific antibodies decreases with time after initial infection (Van Reeth et al., 2012), a similar seroprevalence would have been expected for any age group. However, repeated infection should have a boosting effect, resulting in stabilization of antibody levels. Hence, we hypothesized that the probability of a sample to be seropositive increases with age. The higher IAV

seroprevalence in adult boar (12.20%; CI: 8.11%-16.28%) compared to that in subadults (6.30%; CI: 4.19%-8.41%) and young boar (4.97%; CI: 2.99%-6.95%) supports this hypothesis and corroborates previous data (Feng et al., 2014; Kaden et al., 2008). As several IAV subtypes circulate in the Bavarian wild boar population, repeated infection is not necessarily caused by the same subtype. In consequence, the probability of a seroreactivity against several subtypes should increase with age. However, no correlation between the age group of IAV seropositive wild boars and a reactivity against several subtypes was observed (data not shown). The reason for this observation might be technical, as clearly defining a subtype of a past infection might depend on the chronological relation between different infections. Subtypes of the more recent infections might simply dominate in the diagnostic systems.

Summarizing the temporal and regional aspects of this study, neither a constant seroprevalence over the regions of Bavaria nor over time was found. Discrete correlations between aspects such as wild boar or domestic pig densities and seroprevalences could not be identified. However, it is possible that an initial S-IAV introduction from domestic pigs to wild boar occurs only occasionally and then results in an independent circulation of the viruses within the wild boar population. In addition, the probability of a transmission from domestic pigs is likely dependent on herd management and vaccination strategies. Moreover, incidental and yet not identified infections with AIV might also play a role. Finally, analysing seroprevalences at the level of administrative regions might not be precise enough to reveal the reasons for the regionality of S-IAV infection in Bavarian wild boar; this will be addressed in further studies including these aspects. Taken together, IAV infections tend to occur in a highly dynamic matter and all of the factors considered above might together influence the data in a complex interdependency. Seroprevalence depended on age in this study, indicating that repeated infections of an individual might occur and stabilize antibody levels. This does not exclude the possibility that other animals might have experienced IAV infection but were not identified due to the decreasing immune response. Therefore, these data might mirror a high variability of IAV infections in the wild boar population – according to regionally and temporally limited outbreaks.

Antibodies to H3N2 have been reported for wild boar of several German federal states in various sampling periods between 2001 and 2014 (Kaden et al., 2008;

Polley et al., 2007; Weyand, 2017). However, in the present study no evidence of an H3N2 infection was detected, at least not using the S-IAV strain A/swine/Bavaria/1803/2013/H3N2, which genetically represents a currently circulating S-IAV (Pippig et al., 2016). H3N2 infections in Bavarian domestic pigs appear to be comparatively rare (Pippig et al., 2016) and infections with H3N2 in wild boar might be similarly restricted.

To our knowledge, samples taken from German wild boar had not been tested for antibodies against H1pdmN1 or H1pdmN2 prior to this study, although stable circulation of such reassortant viruses has been shown in the domestic pig population of Germany (Harder et al., 2013; Pippig et al., 2016; Zell et al., 2020). While it is not surprising that antibodies to IAV subtype H1N1 dominate within the seropositive samples, it is, however, noteworthy that the number of samples with antibodies to H1pdmN2 is comparable. Several samples that were considered H1pdmN2 antibody positive were also reactive to H1N1, in both the HI and the SNT, and vice versa, and therefore, a crossreactivity between these antigens might obscure these data. Nonetheless, in two occasions sera originating from animals shot at driven hunts were clearly classified as H1pdmN2 singly reactive, indicating that a transmission of this relatively new reassortant virus had taken place between wild boar. Whereas in Italy antibodies to the IAV H1pdmN1 have not yet been detected (Delogu et al., 2019; Foni et al., 2013), data from Corsica, Japan and the United States indicated a circulation of H1pdmN1 viruses, respectively (Feng et al., 2014; Grech-Angelini et al., 2018; Shimoda et al., 2017). Overall, these results are in accordance with the data of the present study, reporting a clear reactivity against H1pdmN1 in 10.42% of the seropositive samples selected for seroprevalence estimation.

The objective of the study was a serological survey for IAV exposure to wild boar in Bavaria. Statistically valid seroprevalences were calculated for all administrative regions as well as for two sampling periods, indicating a high degree of variability not only regionally but also between sampling periods. Both the H1N1pdm09 pandemic and the H5N8 panzootic considered in this study had an impact as not only circulation of known S-IAV lineages was shown in Bavarian wild boar but also the contact and possibly transmission of H1pdmNx viruses and furthermore seroreactivity against HPAI H5N8 viruses. The importance of an IAV monitoring of swine, wild and domestic, in Germany and Europe is again underlined by the

data presented. It will be the aim of further studies to analyse the future impact of H5Nx as well as H1pdmNx viruses and reassortants on the epidemiological situation in the wild boar population in Bavaria.

Acknowledgements

We are grateful to Dr. Timm Harder, FLI, for providing IAV subtypes H1N2 and H5N3 and to Dr. Sebastian Fröhlich for supplying control sera. In addition, we thank our colleagues from Erlangen, especially Britta Knöllinger for the support with thousands of valuable samples. Special thanks to Lorena Herman for her enthusiasm and her assistance and to Johannes Thum for the kind support in designing the figures. Finally, we are much obliged to Dr. Dawn Bowles, Dr. Gabriele Margos, and Dr. Stuart Reynolds for the great and spontaneous help in language editing.

Conflict of Interest Statement

The authors declare that there is no conflict of interest regarding the publication of this article.

Ethical Approval

The need for ethical approval was waived off as all wild boar samples used in this study were sent in to the Bavarian Health and Food safety authority to monitor epidemic diseases according to national regulations.

Data Availability Statement

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

References

- Bayerisches Landesamt für Statistik. (2020). Agrarstrukturerhebung (Viehzählung). Retrieved from http://www1.bayern.landtag.de/www/ElanTextAblage_WP18/Drucksachen/Schriftliche%20Anfragen/18_0007813.pdf
- Bundesministerium der Justiz und für Verbraucherschutz; Bundesamt für Justiz. (2016). Verordnung zur Durchführung eines Monitorings auf das Virus der Klassischen und der Afrikanischen Schweinepest bei Wild- und Hausschweinen (Schweinepest-Monitoring-Verordnung SchwPestMonV). Retrieved from <https://www.gesetze-im-internet.de/schwpestmov/BJNR251800016.html>
- Cano-Manuel, F. J., Lopez-Olvera, J., Fandos, P., Soriguer, R. C., Perez, J. M., & Granados, J. E. (2014). Long-term monitoring of 10 selected pathogens in wild boar (*Sus scrofa*) in Sierra Nevada National Park, southern Spain. *Veterinary Microbiology*, *174*, 148-154. doi:10.1016/j.vetmic.2014.06.017
- Closa-Sebastià, F., Casas-Díaz, E., Cuenca, R., Lavín, S., Mentaberre, G., & Marco, I. (2011). Antibodies to selected pathogens in wild boar (*Sus scrofa*) from Catalonia (NE Spain). *European journal of wildlife research*, *57*, 977-981. doi:10.1007/s10344-010-0491-9
- Conraths, F. J., Fröhlich, A., Gethmann, J., & Ziller, M. (2015). Epidemiologische Untersuchungen in Tierpopulationen: Ein Leitfaden zur Bestimmung von Stichprobenumfängen. *Friedrich-Loeffler-Institut, Wusterhausen und Greifswald-Insel Riems*.
- de Boer, G. F., Back, W., & Osterhaus, A. D. (1990). An ELISA for detection of antibodies against influenza A nucleoprotein in humans and various animal species. *Archives of virology*, *115*, 47-61. doi:10.1007/bf01310622
- De Vleeschauwer, A., Atanasova, K., Van Borm, S., Van Den Berg, T., Rasmussen, T. B., Uttenthal, Å., & Van Reeth, K. (2009). Comparative pathogenesis of an avian H5N2 and a swine H1N1 influenza virus in pigs. *PloS one*, *4*, e6662. doi:10.1371/journal.pone.0006662
- Delogu, M., Cotti, C., Vaccari, G., Raffini, E., Frasnelli, M., Nicoloso, S., . . . De Marco, M. A. (2019). Serologic and Virologic Evidence of Influenza A Viruses in Wild Boars (*Sus scrofa*) from Two Different Locations in Italy. *Journal of wildlife diseases*, *55*, 158-163. doi:10.7589/2017-11-285

- Feng, Z., Baroch, J. A., Long, L. P., Xu, Y., Cunningham, F. L., Pedersen, K., . . . Wan, X. F. (2014). Influenza A subtype H3 viruses in feral swine, United States, 2011-2012. *Emerging infectious diseases*, 20, 843-846. doi:10.3201/eid2005.131578
- Foni, E., Garbarino, C., Chiapponi, C., Baioni, L., Zanni, I., & Cordioli, P. (2013). Epidemiological survey of swine influenza A virus in the wild boar population of two Italian provinces. *Influenza and other respiratory viruses*, 7 Suppl 4, 16-20. doi:10.1111/irv.12198
- Globig, A., Staubach, C., Sauter-Louis, C., Dietze, K., Homeier-Bachmann, T., Probst, C., . . . Harder, T. C. (2018). Highly pathogenic avian influenza H5N8 clade 2.3. 4.4 b in Germany in 2016/2017. *Frontiers in veterinary science*, 4, 240. doi:10.3389/fvets.2017.00240
- Grech-Angelini, S., Herve, S., Rose, N., Barbier, N., Casabianca, F., Maestrini, O., . . . Simon, G. (2018). Serological survey of influenza A viruses in domestic and wild Suidae in Corsica (France), a Mediterranean island environment. *Preventive veterinary medicine*, 157, 94-98. doi:10.1016/j.prevetmed.2018.06.004
- Grund, C., Hoffmann, D., Ulrich, R., Naguib, M., Schinkothe, J., Hoffmann, B., . . . Beer, M. (2018). A novel European H5N8 influenza A virus has increased virulence in ducks but low zoonotic potential. *Emerging microbes & infections*, 7, 132. doi:10.1038/s41426-018-0130-1
- Harder, T. C., Grosse Beilage, E., Lange, E., Meiners, C., Dohring, S., Pesch, S., . . . Starick, E. (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. doi:10.1128/JVI.00381-13
- International Committee on Taxonomy of Viruses. (2019). Virus Taxonomy: 2019 Release. Retrieved from <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>
- Kaden, V., Lange, E., Hänel, A., Hlinak, A., Mewes, L., Hergarten, G., . . . Bruer, W. (2009). Retrospective serological survey on selected viral pathogens in wild boar populations in Germany. *European journal of wildlife research*, 55, 153-159. doi:10.1007/s10344-008-0229-0
- Kaden, V., Lange, E., Starick, E., Bruer, W., Krakowski, W., & Klopries, M. (2008). Epidemiological survey of swine influenza A virus in selected wild boar populations in Germany. *Veterinary Microbiology*, 131, 123-132.

- doi:10.1016/j.vetmic.2008.03.006
- Kaplan, B. S., Torchetti, M. K., Lager, K. M., Webby, R. J., & Vincent, A. L. (2017). Absence of clinical disease and contact transmission of HPAI H5NX clade 2.3. 4.4 from North America in experimentally infected pigs. *Influenza and other respiratory viruses, 11*, 464-470. doi:10.1111/irv.12463
- Kida, H., Ito, T., Yasuda, J., Shimizu, Y., Itakura, C., Shortridge, K. F., . . . Webster, R. G. (1994). Potential for transmission of avian influenza viruses to pigs. *Journal of general virology, 75 (Pt 9)*, 2183-2188. doi:10.1099/0022-1317-75-9-2183
- Kovalenko, G., Molozhanova, A., Halka, I., & Nychyk, S. (2017). Antibody Prevalence to Influenza Type A in Wild Boar of Northern Ukraine. *Vector-borne and zoonotic diseases, 17*, 836-839. doi:10.1089/vbz.2017.2118
- Lange, J., Groth, M., Schlegel, M., Krumbholz, A., Wiczorek, K., Ulrich, R., . . . Durrwald, R. (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. doi:10.1016/j.vetmic.2013.09.024
- Ma, W., Kahn, R. E., & Richt, J. A. (2009). The pig as a mixing vessel for influenza viruses: human and veterinary implications. *Journal of molecular and genetic medicine: an international journal of biomedical research, 3*, 158-166. doi:10.4172/1747-0862.1000028
- Malmsten, A., Magnusson, U., Ruiz-Fons, F., González-Barrio, D., & Dalin, A.-M. (2018). A serologic survey of pathogens in wild boar (*Sus scrofa*) in Sweden. *Journal of wildlife diseases, 54*, 229-237. doi:10.7589/2017-05-120
- Martin, B. E., Sun, H., Carrel, M., Cunningham, F. L., Baroch, J. A., Hanson-Dorr, K. C., . . . Wan, X. F. (2017). Feral Swine in the United States Have Been Exposed to both Avian and Swine Influenza A Viruses. *Applied and environmental microbiology, 83*. doi:10.1128/AEM.01346-17
- Meseko, C., Globig, A., Ijomanta, J., Joannis, T., Nwosuh, C., Shamaki, D., . . . Beer, M. (2018). Evidence of exposure of domestic pigs to Highly Pathogenic Avian Influenza H5N1 in Nigeria. *Scientific reports, 8*, 1-9. doi:10.1038/s41598-018-24371-6
- Mostafa, A., Abdelwhab, E., Mettenleiter, T., & Pleschka, S. (2018). Zoonotic potential of influenza A viruses: a comprehensive overview. *Viruses, 10*, 497. doi:10.3390/v10090497

- Neumann, G., Noda, T., & Kawaoka, Y. (2009). Emergence and pandemic potential of swine-origin H1N1 influenza virus. *Nature*, *459*, 931-939. doi:10.1038/nature08157
- Ninomiya, A., Takada, A., Okazaki, K., Shortridge, K. F., & Kida, H. (2002). Seroepidemiological evidence of avian H4, H5, and H9 influenza A virus transmission to pigs in southeastern China. *Veterinary Microbiology*, *88*, 107-114. doi:10.1016/s0378-1135(02)00105-0
- Pippig, J., Ritzmann, M., Buttner, M., & Neubauer-Juric, A. (2016). Influenza A Viruses Detected in Swine in Southern Germany after the H1N1 Pandemic in 2009. *Zoonoses and public health*, *63*, 555-568. doi:10.1111/zph.12264
- Pohlmann, A., Hoffmann, D., Grund, C., Koethe, S., Hüsey, D., Meier, S. M., . . . Harder, T. (2019). Genetic Characterization and Zoonotic Potential of Highly Pathogenic Avian Influenza Virus A (H5N6/H5N5), Germany, 2017–2018. *Emerging infectious diseases*, *25*, 1973-1976. doi:10.3201/eid2510.181931
- Pohlmann, A., Starick, E., Grund, C., Hoper, D., Strebelow, G., Globig, A., . . . Beer, M. (2018). Swarm incursions of reassortants of highly pathogenic avian influenza virus strains H5N8 and H5N5, clade 2.3.4.4b, Germany, winter 2016/17. *Scientific reports*, *8*, 15. doi:10.1038/s41598-017-16936-8
- Polley, B., Akimkin, V., Hänel, A., Hoferer, M., & Sting, R. (2007). Zum Vorkommen von Antikörpern gegen verschiedene Influenza-A-Subtypen bei Haus-und Wildschweinen in Baden-Württemberg. *Tierärztliche Umschau*, *62*, 134-140.
- Reperant, L. A., Rimmelzwaan, G. F., & Kuiken, T. (2009). Avian influenza viruses in mammals. *Revue scientifique et technique*, *28*, 137-159. doi:10.20506/rst.28.1.1876
- Roic, B., Jemersic, L., Terzic, S., Keros, T., Balatinec, J., & Florijancic, T. (2012). Prevalence of antibodies to selected viral pathogens in wild boars (*Sus scrofa*) in Croatia in 2005-06 and 2009-10. *Journal of wildlife diseases*, *48*, 131-137. doi:10.7589/0090-3558-48.1.131
- Ruiz-Fons, F., Segales, J., & Gortazar, C. (2008). A review of viral diseases of the European wild boar: effects of population dynamics and reservoir role. *The Veterinary Journal*, *176*, 158-169. doi:10.1016/j.tvjl.2007.02.017
- Shimoda, H., D, V. A. N. N., Yonemitsu, K., Minami, S., Nagata, N., Hara, N., . . . Maeda, K. (2017). Influenza A virus infection in Japanese wild boars (*Sus*

- scrofa leucomystax). *The Journal of Veterinary Medical Science*, 79, 848-851. doi:10.1292/jvms.17-0052
- Simon, G., Larsen, L. E., Dürrwald, R., Foni, E., Harder, T., Van Reeth, K., . . . Maldonado, J. (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. doi:10.1371/journal.pone.0115815
- Starick, E., Lange, E., Grund, C., Grosse Beilage, E., Dohring, S., Maas, A., . . . Harder, T. C. (2012). Reassortants of pandemic influenza A virus H1N1/2009 and endemic porcine HxN2 viruses emerge in swine populations in Germany. *Journal of general virology*, 93, 1658-1663. doi:10.1099/vir.0.042648-0
- Touloudi, A., Valiakos, G., Athanasiou, L. V., Birtsas, P., Giannakopoulos, A., Papaspyropoulos, K., . . . Billinis, C. (2015). A serosurvey for selected pathogens in Greek European wild boar. *Veterinary record open*, 2, e000077. doi:10.1136/vetreco-2014-000077
- Van Reeth, K., Brown, I. H., & Olsen, W. (2012). Influenza Virus. In J. J. Zimmerman, L. A. Karriker, A. Ramirez, K. J. Schwartz, & G. W. Stevenson (Eds.), *Diseases of swine* (10 ed., pp. 557-571): Wiley-Blackwell.
- Vengust, G., Valencak, Z., & Bidovec, A. (2006). A serological survey of selected pathogens in wild boar in Slovenia. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*, 53, 24-27. doi:10.1111/j.1439-0450.2006.00899.x
- Vittecoq, M., Grandhomme, V., Simon, G., Herve, S., Blanchon, T., Renaud, F., . . . van der Werf, S. (2012). Study of influenza A virus in wild boars living in a major duck wintering site. *Infections, genetics and evolution*, 12, 483-486. doi:10.1016/j.meegid.2011.12.003
- Webster, R. G., Bean, W. J., Gorman, O. T., Chambers, T. M., & Kawaoka, Y. (1992). Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiology and molecular biology reviews*, 56, 152-179.
- Weyand, C. D. (2017). *Epidemiologische Studie zur Seroprävalenz von Antikörpern gegen die Erreger von Aujeszky'scher Krankheit, Hepatitis E, Influenza A, Brucellose und Salmonellose bei Wildschweinen in Rheinland Pfalz*: VVB Laufersweiler Verlag.
- Wildtierportal Bayern. "Zahlen, Daten, Fakten" zum Schwarzwild in Bayern.

- Retrieved from
https://www.wildtierportal.bayern.de/wildtiere_bayern/084682/index.php
- World Health Organization. (2010). Serological Diagnosis Of Influenza By Microneutralization Assay. Retrieved from
https://www.who.int/influenza/gisrs_laboratory/2010_12_06_serological_diagnosis_of_influenza_by_microneutralization_assay.pdf
- World Organisation for Animal Health. (2012). OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Retrieved from
<https://www.oie.int/doc/ged/D12009.PDF>
- World Organisation For Animal Health. (2017). Follow-up report No. 31 (Final report). Retrieved from
https://www.oie.int/wahis_2/temp/reports/en_fup_0000024543_20170811_152020.pdf
- Zell, R., Groth, M., Krumbholz, A., Lange, J., Philipps, A., & Durrwald, R. (2020). Displacement of the Gent/1999 human-like swine H1N2 influenza A virus lineage by novel H1N2 reassortants in Germany. *Archives of virology*, 165, 55-67. doi:10.1007/s00705-019-04457-w
- Zell, R., Scholtissek, C., & Ludwig, S. (2012). Genetics, evolution, and the zoonotic capacity of European swine influenza viruses. *Swine influenza* (pp. 29-55): Springer.

IV. ERWEITERTE METHODEN, ERGEBNISSE UND DISKUSSION

In der bayerischen Wildschweinpopulation zirkulieren Pathogene, die auch andere Wirte infizieren können. Ein Eintrag von viralen Erregern, wie z. B. IAV oder sogar SuHV-1, in Nutztierbestände hätte erhebliche Leiden bei den infizierten Tieren und wirtschaftliche Verluste zur Folge (HEINRITZI, 2006; BARTHOLD et al., 2011). Für Infektionen mit IAV sind neben Schweinen und Vögeln unter anderem auch Menschen empfänglich (FOUCHIER et al., 2005). Zirkulierende Viren sollten daher kontinuierlich unter zoonotischen Gesichtspunkten bewertet werden. IAV müssen zwar für die Adaptation an eine neue Wirtsspezies Barrieren überwinden, ihre hohe genetische Variationsfähigkeit ermöglicht dies aber immer wieder (BOUVIER & PALESE, 2008). Ziel dieser Arbeit war es daher, Daten zu IAV-Infektionen in der bayerischen Wildschweinpopulation zu erhalten. Stichproben wurden so gewählt, dass sie unter verschiedenen epidemiologischen Aspekten statistisch valide Aussagen zur Seroprävalenz zuließen. Durch den Einsatz unterschiedlicher serologischer Nachweisverfahren sollte nicht nur die Seroprävalenz bestimmt werden, sondern auch ein erster Überblick über derzeit in Bayern zirkulierende Subtypen gewonnen werden. Auf einen Einfluss der H1N1-Pandemie 2009 und der HPAI-Panzootie 2016/2017 auf die Etablierung neuer Subtypen in der Wildschweinpopulation sollte ein besonderes Augenmerk liegen.

1. Auswahl geeigneter Stichproben für die Untersuchung der bayerischen Wildschweinpopulation auf IAV-spezifische Antikörper

1.1. Diskussion

Die Verordnung zur Durchführung eines Monitorings auf das Virus der Klassischen und der Afrikanischen Schweinepest bei Wild- und Hausschweinen (BUNDESMINISTERIUM DER JUSTIZ UND FÜR VERBRAUCHERSCHUTZ; BUNDESAMT FÜR JUSTIZ, 2016) sieht serologische Untersuchungen zum Ausschluss der Klassischen Schweinepest im Schwarzwild vor. In Bayern werden diese Proben seit 2012 außerdem für ein SuHV-1-Monitoring genutzt sowie im

Rahmen dieser Arbeit zur Bestimmung der IAV-Seroprävalenz.

Um den für valide Aussagen notwendigen Stichprobenumfang (SCHÜLEIN et al., 2021) zu ermitteln, wurden bereits bekannte Daten zur IAV-Seroprävalenz bei Wildschweinen in Deutschland und speziell in Bayern genutzt. In einer statistisch repräsentativen Untersuchung zur IAV-Seroprävalenz bei Wildschweinen aus verschiedenen deutschen Bundesländern wurde eine Gesamt-Seroprävalenz in den untersuchten Proben von 5,2% errechnet. Der Anteil seropositiver Tiere variierte allerdings sowohl regional als auch mit dem Zeitraum der Probennahme deutlich und lag zwischen 0% und 25,9% (KADEN et al., 2008). Von 144 Wildschweinseren aus Bayern, die im Jahr 2014 zufällig ausgewählt und untersucht wurden, reagierten 11,8% im IAV-NP-ELISA (NEUBAUER-JURIC, persönliche Kommunikation). Auf Basis dieser initialen Daten wurde von einer Seroprävalenz von ca. 10% ausgegangen. Daraus resultiert bei einer als unendlich angenommenen Anzahl an Individuen ein Stichprobenumfang von 139 Proben pro epidemiologischen Aspekt (CONRATHS et al., 2015).

Alle IAV-Antikörper-positiven Proben wurden im weiteren Verlauf auf Subtyp-Spezifität getestet. Diese Untersuchungen erlauben eine prinzipielle Aussage über die IAV-Antigenspezifität der in der bayerischen Wildschweinpopulation detektierten Antikörper. Für eine statistisch valide Aussage über Subtyp-Prävalenzen und -Verteilung müsste die benötigte Stichprobenmenge jedoch auf Basis aller IAV-Antikörper-Nachweise in der Population erneut berechnet und entsprechend groß gewählt werden.

2. Evaluation der serologischen Nachweisverfahren

2.1. Hierarchischer Einsatz von ELISA, HAH und SNT zur Detektion und Typisierung von IAV-Antikörpern

2.1.1. Methoden und Ergebnisse

Für die Untersuchung von Schweineseren auf Antikörper gegen IAV stehen grundsätzlich verschiedene Methoden zur Verfügung. Dies sind zum einen kommerziell erhältliche, durch die Hersteller validierte ELISAs und zum anderen kontinuierlich an aktuelle Subtypen adaptierbare Systeme, wie HAH oder SNT. Die

im Rahmen der vorgelegten Arbeit verwendeten Testsysteme wurden zunächst sorgfältig validiert, bevor ein Testregime festgelegt wurde. 1.696 Serumproben von Wildschweinen wurden in einem ersten Screening auf die Präsenz von IAV-Antikörpern mit dem kommerziell erhältlichen „ID Screen® Influenza A Antibody Competition Multispecies“ Antikörper-ELISA der Firma ID Vet untersucht (SCHÜLEIN et al., 2021). Ein alternativer Test der Firma IDEXX (Influenza A Virus Antibody Test Kit) wurde zunächst für 409 Proben parallel eingesetzt. Da in diesem Assay aber häufig eine fehlende Reproduzierbarkeit der Reaktivitäten beobachtet wurde, wurde er als ungeeignet für die Untersuchungen im Rahmen der vorliegenden Arbeit bewertet.

Der Test der Firma ID Vet basiert auf einem kompetitiven Verfahren. Wie in der Publikation Schülein et al. bereits beschrieben, sind Proben gemäß Herstellerangaben bei einem ELISA-Value (optische Dichte (OD) der Probe/OD der Negativkontrolle) $\leq 45\%$ als positiv zu bewerten. Proben mit einem ELISA-Value zwischen 45% und 50% sind als fraglich einzustufen, alle übrigen Proben als negativ. Die Sensitivität des Testsystems sollte erhöht werden, um auch länger zurückliegende Infektionen zu detektieren. Daher wurden Seren mit einem ELISA-Value $< 70\%$ als „verdächtig“ definiert und ebenso wie positive und fragliche Proben weiteren Untersuchungen unterzogen (SCHÜLEIN et al., 2021).

Um gleichzeitig die Rate falsch positiver Seren nicht zu erhöhen, wurden fragliche und „verdächtige“ Seren nur dann final als IAV-Antikörper positiv gewertet, wenn auch eine entsprechende Reaktion in einem HAH oder SNT beobachtet wurde.

Um darüber hinaus die Wahrscheinlichkeit zu beurteilen, ob bei einem ELISA-Value $\geq 70\%$ Antikörper in geringen Serum-Konzentrationen noch übersehen würden, wurden zehn zufällig ausgewählte Proben mit einem ELISA-Value $\geq 70\%$ mittels HAH gegen alle ausgewählten Antigene (sh. SCHÜLEIN et al., 2021) nachuntersucht. Da keine der Proben eine Reaktivität im HAH zeigte, wurde die im Rahmen dieser Arbeit gewählte Klassifizierung nach ELISA Ergebnissen auch für diesen Value-Bereich bestätigt.

Proben, die im ELISA als positiv, fraglich oder verdächtig eingestuft wurden, wurden mittels HAH bzw. SNT weitergehend analysiert. Lediglich wenn das Probenmaterial nicht für alle Assays reichte, konnten nicht alle Untersuchungen durchgeführt werden, in diesen Fällen wurde anhand der ersten Ergebnisse

gewichtet und nur ein Teil der weiteren Tests angeschlossen.

Um in einem nächsten Schritt die Vergleichbarkeit der Testsysteme HAH und SNT für die Untersuchung von Wildschweinseren zu evaluieren, wurden die quantitativen, H1-subtypspezifischen Ergebnisse gegenübergestellt. 131 Proben hemmten die Agglutination von mindestens einem H1-Subtyp im HAH. Diese Ergebnisse wurden im SNT überprüft und, wie in der Publikation Schülein et al. dargestellt, ist eine Parallelität zwischen der Höhe der Titer im HAH und im SNT erkennbar.

Der statistische Zusammenhang zwischen den beiden Variablen sollte über die grafische Darstellung in der Publikation Schülein et al. hinaus mittels Berechnung des Korrelationskoeffizienten quantifiziert werden. Da der Titerbestimmung in beiden Testsystemen die geometrische Verdünnung der jeweils untersuchten Probe zugrunde liegt, resultieren nicht intervallskalierte Variablen. Daher wurde der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman berechnet. Dieser betrug für die 332 in Korrelation gesetzten Werte (einige der 131 H1-reaktiven Proben reagierten gegen mehr als ein Antigen) 0,65, was den gleichsinnigen Zusammenhang zwischen den Titern in den beiden Assays bestätigt.

Um in einem letzten Validierungsschritt die Sensitivität und Spezifität der HAHs, bei denen S-IAV als Antigen verwendet wurden, für Proben von Wildschweinen zu bestätigen, wurden 63 Seren, die keine Agglutination gegen H1-Antigene gezeigt hatten, auch im SNT auf die Neutralisation der H1Nx-Viren überprüft. Keines der Seren wies eine neutralisierende Aktivität auf.

2.1.2. Diskussion

Mit dem verwendeten ELISA werden Antikörper gegen das hochkonservierte NP von IAV detektiert. Da das Testsystem somit subtypunabhängig ist, eignet es sich für ein erstes Screening, um die aktuelle Situation in einer Population mit unbekanntem Antikörper-Status zu ermitteln. Eine weitere Spezifizierung und Subtypisierung kann dann in Subtypen-spezifischen Testsystemen erfolgen. Während der HAH als Goldstandard in der IAV-Diagnostik für Subtypisierungen von Serumproben gilt, ist der SNT aufgrund des erhöhten Aufwandes seltener im Einsatz (HAUSE et al., 2010). Dafür ist ein SNT besonders sensitiv und spezifisch (TRUELOVE et al., 2016). Die hier vorgelegten Daten zeigen eine gute Korrelation zwischen den Ergebnissen in den beiden Testsystemen für die verwendeten Proben

und Fragestellungen. Da der HAH schneller und mit geringem Aufwand durchzuführen ist, wurde er als erster Assay zur Subtypisierung in der vorliegenden Arbeit eingesetzt. Der SNT wurde nur bei nicht eindeutigen Ergebnissen oder unspezifischer Agglutination im HAH ergänzend durchgeführt.

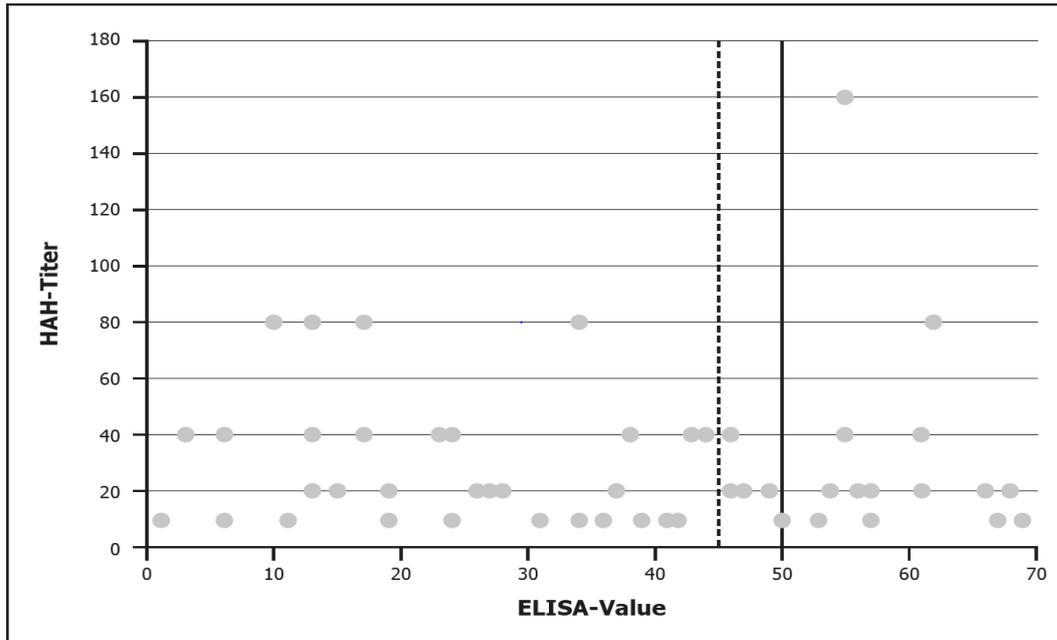
2.2. Zusammenhang zwischen Ergebnissen im ELISA und im HAH/SNT

Aus dem Einsatz unterschiedlicher Testprinzipien resultiert, dass nicht immer die gleichen Antikörper-Spezies nachgewiesen werden. Um zu evaluieren, ob zwischen den im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Ergebnissen in ELISA und HAH bzw. SNT dennoch ein quantitativer Zusammenhang besteht, sollten diese korreliert werden.

2.2.1. Ergebnisse

„Quantitative“ Ergebnisse im ELISA, ausgedrückt als ELISA-Value, wurden zu diesem Zweck mit den Titern im HAH- bzw. SNT verglichen. Eine Grundannahme für die Auswertungen der Subtyp-spezifischen Tests in der vorliegenden Arbeit war, dass im Falle von Kreuzreaktionen im HAH oder SNT der Titer von Antikörpern gegen Viren, die nicht an der aktuell zu beurteilenden IAV-Infektion beteiligt waren, in beiden Subtypisierungs-Testsystemen niedriger ist als der von Antikörpern gegen den ursächlichen Subtyp (VAN REETH et al., 2004). Daher wurden für den Vergleich der Tests nur die Ergebnisse der Proben herangezogen, deren weitere Differenzierung eindeutig auf eine vorangegangene Infektion mit nur einem Subtyp schließen ließ. Diesen Kriterien entsprachen 60 Proben. Da die Reaktionen von drei Proben im HAH nicht auswertbar waren, wurde für diese nur der Zusammenhang zwischen ELISA-Value und SNT-Titer ausgewertet. In Abb. 3 sind die Ergebnisse für 60 Proben, subtypunabhängig für den HAH (a) bzw. SNT (b) verglichen mit dem ELISA dargestellt. Der Korrelationskoeffizient von ELISA-Value und Titer im HAH bzw. SNT wurde aufgrund der nicht intervallskalierten Variablen HAH-/SNT-Titer als Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman berechnet und lag lediglich bei - 0,12 bzw. - 0,15. Auf einen direkten, quantitativen Zusammenhang zwischen diesen Parametern kann somit aus diesen Daten nicht geschlossen werden.

a



b

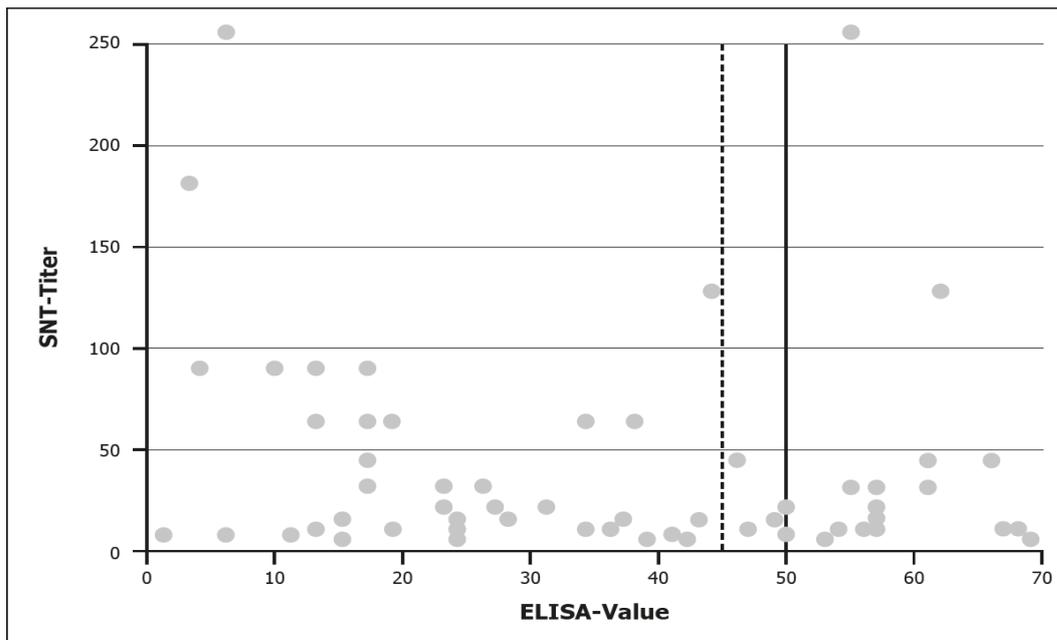


Abb. 3: Relation zwischen ELISA-Value und HAH-Titer (a, $n = 57$) bzw. SNT-Titer (b, $n = 60$) für alle H1-Subtyp-spezifischen Proben. Der ELISA-Value sowie der Titer in der jeweiligen Subtypisierungsmethode ist für jede Probe durch einen Punkt dargestellt. Einbezogen sind Ergebnisse für die Subtypen H1N1 ($n = 32$), H1N2 (HAH $n = 8$, SNT $n = 9$), H1pdmN1 ($n = 4$) und H1pdmN2 (HAH $n = 13$, SNT $n = 15$). X-Achse – ELISA Values: Proben links der gestrichelten Linie sind vom Hersteller als „positiv“ definiert, Proben zwischen der gestrichelten und der durchgezogenen Linie als „fraglich“. Proben rechts der durchgezogenen Linie, also mit einem ELISA-Value zwischen 50 und 70%, werden nach Herstelleranweisung als „negativ“, in der vorliegenden Arbeit jedoch als „verdächtig“ eingestuft und ebenfalls weiteren Analysen unterzogen. Die Grafik wurde unter Verwendung der Softwarepakete Adobe Indesign CC 2018 und Illustrator CC 2019 erstellt.

2.2.2. Diskussion

Interessanterweise sind Korrelationen zwischen „Titern“ in einem Vollvirus- bzw. NP-ELISA und im HAH publiziert. Als „ELISA-Titer“ wird die Verdünnung einer Probe gewertet, die entweder gerade noch zu einer detektierbaren Reaktivität im Assay führt (JENNINGS et al., 1981) oder bei der das Verhältnis der OD der Probe zur OD gepoolter Negativseren (P/N Ratio) 2,1 beträgt (WU et al., 2007). Obwohl ein ELISA prinzipiell kein quantitatives Testsystem ist und in der vorliegenden Arbeit Antikörpertiter ausschließlich anhand HAH und SNT bestimmt wurden, war dennoch ein indirekt proportionaler Zusammenhang zwischen dem ELISA-Value und dem Antikörpertiter in den zur Subtypisierung verwendeten Assays erwartet worden. Diese Annahme basierte auf den Daten von Wu et al., die den Zusammenhang zwischen P/N Ratio bei einer Verdünnung von 1:80 und einem ELISA-Titer, wie weiter oben definiert, zeigen. Eine signifikante Korrelation zwischen Titer und P/N Ratio wurde festgestellt (WU et al., 2007). Eine mögliche Erklärung dafür, dass in der vorliegenden Arbeit dagegen keine Korrelation zwischen den ELISA-Werten und den HAH- bzw. SNT-Titern gefunden wurde, könnte im prinzipiellen Studiendesign liegen. Jennings et al. analysierten Proben von Menschen, Wu et al. von Hühnern, in beiden Fällen wurden geimpfte Individuen untersucht. Der IAV-Subtyp war daher bereits präzise bekannt. In der vorliegenden Arbeit wurden dagegen Serumproben mit unbekannter Spezifität der vorhandenen Antikörper mittels HAH bzw. SNT subtypisiert. Deutlich positiv zu bewertende ELISA-Values bei niedrigem HAH- und SNT-Titer können auch auf Unterschiede zwischen zur Subtypisierung verwendetem und ursprünglich infizierendem Antigen bzw. Virus zurückzuführen sein. Ein Unterschied, der sich in der subtypenspezifischen ELISA-Reaktion nicht zeigt, in der hochspezifischen Subtypisierungsanalyse aber essentiell ist. Wu et al. geben nur für zehn Tiere ELISA- und HAH-Titer an, demonstrieren aber bereits in dieser geringen Analyse-Zahl, dass das Verhältnis ELISA-/HAH-Titer deutlichen Schwankungen, nämlich zwischen 3,3 und 20,6, unterliegt (WU et al., 2007). Das Antigen, das in der Studie von Jennings et al. für das ELISA verwendet wurde, hatte hämagglutinierende Eigenschaften, sodass davon auszugehen ist, dass beide Assays im Vergleich auf HA basierten (JENNINGS et al., 1981). Damit wäre die deutliche Korrelation zwischen ELISA- und HAH-Titer selbstverständlich. De Boer et al. zeigen ergänzend, dass Antikörpertiter gegen unterschiedliche Proteine von IAV einen

unterschiedlichen Verlauf haben (DE BOER et al., 1990).

Die Hypothese, dass ELISA-Ergebnisse „quantitativ“ mit den Titern im HAH bzw. SNT korrelieren, hat sich unter Einsatz der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Proben nicht bestätigt. Neben der fehlenden quantitativen Aussagekraft des ELISAs ist sicher entscheidend, dass der ursprüngliche Erreger und der Zeitpunkt der stattgefundenen Infektion unbekannt waren. Da Antikörpertiter gegen unterschiedliche Antigene von IAV nicht zur selben Zeit ihren Höhepunkt erreichen und da bei Reinfektionen mit abweichenden Subtypen variable Boosteffekte zu erwarten sind, sind die beobachteten Diskrepanzen zwischen den Assays sogar logische Konsequenz.

2.3. Nachweis von AIV- neutralisierenden Antikörpern in Wildschweinseren

Die heute in europäischen Schweinebeständen zirkulierende „avian-like“ Variante von H1N1 wird auf einen Eintrag aus der Wildenten- in die Schweinepopulation zurückgeführt (VAN REETH et al., 2012). Der Nachweis von Antikörpern gegen unterschiedliche Subtypen von AIV in Seren von Hausschweinen aus China und Vietnam sowie von Wildschweinen aus den USA, den Razorbacks, ist publiziert (NINOMIYA et al., 2002; CHOI et al., 2005; MARTIN et al., 2017). Berichte über AIV-Antikörper bei Hausschweinen stammen also häufig aus Ländern, in denen die Anforderungen an die betriebliche Biosicherheit von Schweinehaltungen nicht den Standards in Mitteleuropa bzw. Deutschlands entsprechen. Daher ist ein Kontakt der Tiere mit Wildvögeln wahrscheinlich. Wildschweine sind omnivor und für ihre Fähigkeit bekannt, sich an ein breites Spektrum von Ernährungsweisen anzupassen. Eine mögliche Nahrungsquelle bildet auch Aas (SOLAYMANI-MOHAMMADI et al., 2003). Die große Zahl an Wildvögeln, die im Zuge der HPAI-Panzootie 2016/2017 an der AIV-Infektion verendeten (GLOBIG et al., 2018), und der harte Winter zu Beginn des Jahres 2017 (BAYERISCHE LANDESANSTALT FÜR WALD UND FORSTWIRTSCHAFT, 2017) führten zu der Hypothese, dass auch bayerische Wildschweine Kontakt mit HPAIV H5N8 gehabt haben könnten. Daher wurde dieses Virus gezielt in die Untersuchungen einbezogen (SCHÜLEIN et al., 2021).

2.3.1. Ergebnisse

Seren, die im ELISA reaktiv waren, wurden zunächst mittels HAH auf Antikörper

gegen die Antigene von Interesse untersucht (sh. Kapitel IV.2.1). Jedoch wurden, wie in der Publikation Schülein et al. bereits ausführlich dargelegt, in keiner der untersuchten Proben Antikörper nachgewiesen, die die Hämagglutination von A/tufted duck/Bavaria/61101/2016/H5N8 hemmten. Da die Zuverlässigkeit des HAH beim Nachweis AIV-spezifischer Antikörper aus den Serumproben von Menschen und Schweinen an ihre Grenzen stößt (KIDA et al., 1994; NINOMIYA et al., 2002; TRUELOVE et al., 2016), wurden 110 Proben, von denen nach Abschluss der sonstigen Subtypisierungsassays (sh. Kapitel IV.2.1.) noch genug Material vorhanden war, zusätzlich auch auf die Neutralisation von H5N8-Virus untersucht (SCHÜLEIN et al., 2021). Tatsächlich neutralisierte ein Serum aus dem Landkreis Traunstein spezifisch H5N8. Um, wie in der Publikation Schülein et al. dargestellt, in Folge zu überprüfen, ob es sich um einen Einzelfall handelte, wurden 265 weitere Wildschweinseren untersucht, die nicht vor September 2016 gewonnen waren und aus Landkreisen im Süden Bayerns stammten, in denen während des HPAI-Ausbruchs besonders viele an der HPAI verendete Wildvögel aufgefunden worden waren (sh. Kapitel II.1.5.3.: Abb. 2). Dies waren die Landkreise Traunstein (n = 9), Altötting (n = 24), Mühldorf am Inn (n = 16), Rosenheim (n = 63), Landsberg am Lech (n = 33), Starnberg (n = 110) und Dingolfing-Landau (n = 10). 17 im ELISA reaktive Seren wurden mittels HAH und SNT unter Verwendung der Antigene H5N8 und H5N3 differenziert. Drei Proben reagierten ausschließlich im H5N8-SNT (SCHÜLEIN et al., 2021). Die betroffenen Wildschweine waren zwischen Februar und Oktober 2017 im Landkreis Starnberg erlegt worden (sh. Abb. 4).

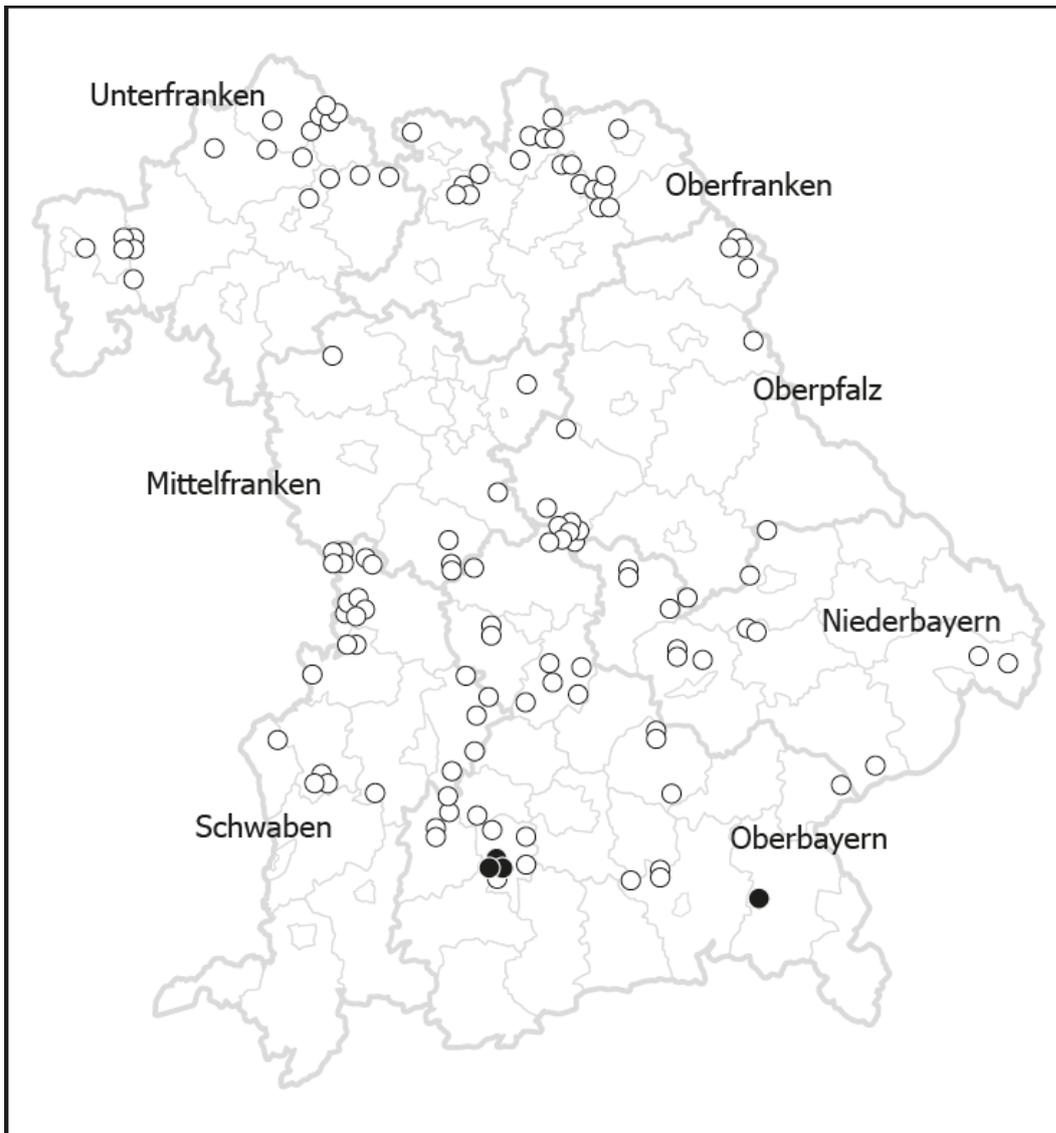


Abb. 4: Übersicht über die Herkunft der Proben, die im SNT auf H5N8-Antikörper untersucht wurden. In der Karte sind auf Postleitzahlenebene die Herkunftsorte aller im ELISA-reaktiven, im SNT auf Antikörper gegen H5N8 HPAIV untersuchten Proben ($n = 127$) dargestellt. Weiße Punkte stehen für H5N8-Antikörper-negative Proben, schwarze Punkte für H5N8-positive Proben. Die Karte wurde unter Verwendung der Softwarepakete GfK RegioGraph und Adobe Indesign CC 2018 sowie Illustrator CC 2019 generiert.

2.3.2. Diskussion

Mit diesen Ergebnissen wurde bestätigt, dass der Nachweis von AIV-spezifischen Antikörpern aus den Serumproben von Wildschweinen mittels HAH nicht zuverlässig ist und im Zweifelsfall eine entsprechend erweiterte Methodik angewendet werden sollte.

Die IAV-vermittelte Agglutination von Hühnererythrozyten wird durch die Interaktion des viralen HA mit Oberflächenmolekülen der Erythrozyten bewirkt (PEDERSEN, 2008). Mittels HAH werden also Antikörper nachgewiesen, die ein für die Labordiagnostik genutztes Artefakt hemmen, welches *in vivo* jedoch keine Bedeutung hat. Im Gegensatz dazu werden mittels SNT Antikörper nachgewiesen, die die Infektion von Zellen durch ein Virus verhindern (HAUSE et al., 2010). Auch für diese Interaktion spielen gegen das HA-gerichtete Antikörper die Hauptrolle (VAN REETH et al., 2012). Warum Säuger zwar HA-Subtyp-spezifische, neutralisierende Antikörper gegen AIV bilden, diese jedoch nicht in der Lage sind, die Hämagglutination in den genutzten Testsystemen zu hemmen (NINOMIYA et al., 2002), ist bislang nicht detailliert bekannt. Offensichtlich binden die im Säuger gebildeten Antikörper anders an das AIV-HA als entsprechende im Vogel gebildete Antikörper. Antikörper gegen das HA binden zunächst hauptsächlich an die Kopfregion des Antigens, in geringerer Menge jedoch auch an Epitope der Stielregion (PICA et al., 2012). Eine Hypothese wäre also, dass die Priorisierung distinkter Epitope bewirkt, dass die Bindung des Vogel-Antikörpers sowohl die Infektion von Zellen als auch die Agglutination sterisch oder funktional verhindert, während der Säugerantikörper nur gezielt auf die Infektion Einfluss nimmt. Kida et al. und Luo et al. vertreten die Hypothese, dass Antikörper, die die Hämagglutination von IAV nicht hemmen, am hydrophoben Ende der HA-Moleküle binden und somit die Bindungsstelle für Erythrozyten nicht blockieren, aber dennoch in der Lage sind, entweder die Zellbindung oder die Replikation zu verhindern (KIDA et al., 1982; LUO et al., 2013). Die Neutralisation von AIV durch Säugerantikörper könnte dementsprechend zu verschiedenen Zeitpunkten in der Virusreplikation, also auch im Anschluss an die ersten HA-vermittelten Schritte Adsorption und Penetration, wirksam werden. In weiteren Untersuchungen soll daher der Schritt der Replikation, der gehemmt ist, näher bestimmt werden. Das Phänomen könnte a priori daraus resultieren, dass Säuger-IAV im Säugewirt hauptsächlich im Respirationstrakt replizieren, AIV im Reservoirwirt dagegen als

primäres Zielorgan den Intestinaltrakt haben (NEUMANN et al., 2009) und HPAIV sogar pantrop infizieren (WEBSTER et al., 1992). Ursache dieses Tropismus ist unter anderem auch die jeweilige Rezeptorpräferenz des HA (sh. Kapitel II.1.3.). Die weiter oben bereits erwähnten, sterischen Unterschiede könnten auch auf dieser Präferenz basieren. Zukünftige Studien sollen diesen Hypothesen nachgehen.

3. IAV Seroprävalenz in der bayerischen Wildschweinpopulation

3.1. Entwicklung der IAV-Seroprävalenzen bei bayerischen Wildschweinen auf Ebene der Regierungsbezirke während des Untersuchungszeitraums 2014 bis 2019

Wie in der Publikation Schülein et al. beschrieben, wurden IAV-Seroprävalenzen in der bayerischen Wildschweinpopulation für die Zeiträume eins „Februar 2014 bis September 2016“ und zwei „Oktober 2016 bis Februar 2019“ bestimmt. Um darüber hinaus einen Überblick über die Dynamik der IAV-Seroprävalenzen in den Jahren 2014 bis 2019 zu gewinnen, sollte der Anteil seropositiver Tiere pro Jahr verglichen werden.

3.1.1. Ergebnisse

Die Proben, die nach dem in der Publikation Schülein et al. sowie in Kapitel IV.1 beschriebenen Stichprobenplan ausgewählt wurden ($n = 1.396$), kamen aus den Regionen Südbayerns (Oberbayern, Niederbayern, Schwaben) und Nordbayerns (Oberfranken, Mittelfranken, Unterfranken, Oberpfalz). Sie stammten aus den Jahren 2014 (Südbayern $n = 117$, Nordbayern $n = 0$), 2015 (Südbayern $n = 209$, Nordbayern $n = 0$), 2016 (Südbayern $n = 177$, Nordbayern $n = 0$), 2017 (Südbayern $n = 264$, Nordbayern $n = 38$), 2018 (Südbayern $n = 82$, Nordbayern $n = 385$) und 2019 (Südbayern $n = 2$, Nordbayern $n = 117$). Die Verteilung der IAV-seropositiven Proben über die Jahre und relativ zur Region ist in Abb. 5 dargestellt.

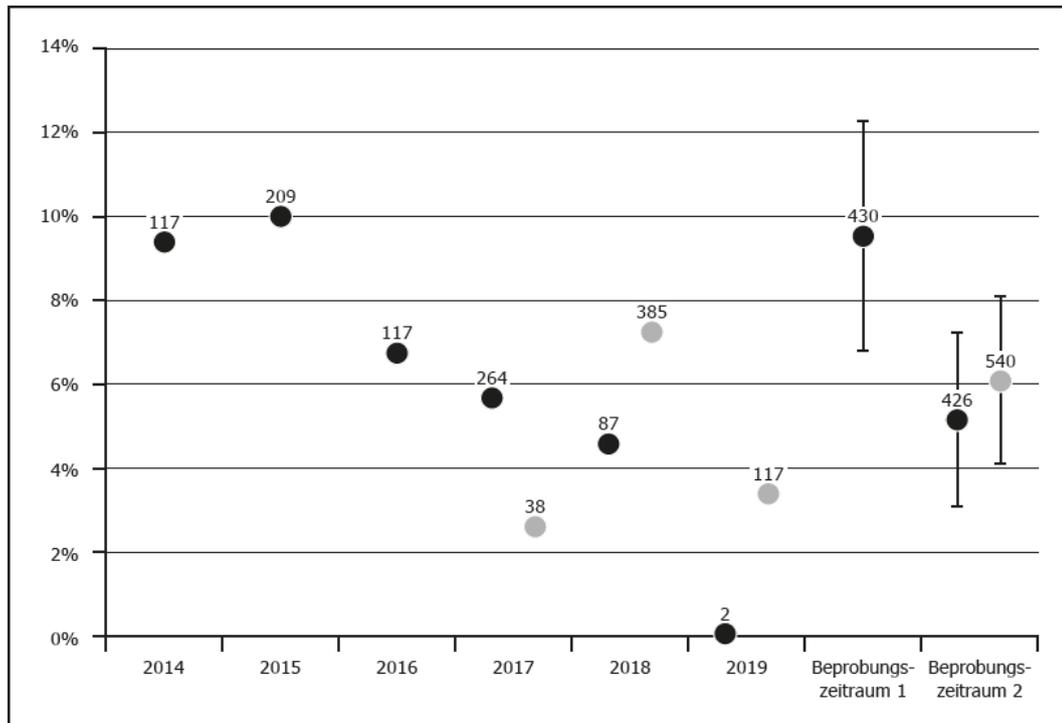


Abb. 5: Darstellung des Anteils an IAV-seropositiven Proben über die Jahre 2014 bis 2019: Der relative Anteil IAV-seropositiver Tiere in Prozent ist für Südbayern als schwarzer (●) und für Nordbayern als grauer Punkt (●) dargestellt. Die zugrundeliegende Anzahl an Proben ist jeweils über dem Punkt angegeben. Berücksichtigt werden die Ergebnisse der Proben, die zur Schätzung der Seroprävalenz untersucht wurden. Für die zusammengefassten Beprobungszeiträume eins und zwei sind CI angegeben, die die wahre IAV-Seroprävalenz mit einer Sicherheit von 95% einschließen. Die Grafik wurde unter Verwendung der Softwarepakete Adobe Indesign CC 2018 und Illustrator CC 2019 erstellt.

Nur für Wildschweinsereen aus Südbayern wurde der Anteil IAV-seropositiver Proben über den gesamten Zeitraum von fünf Jahren verglichen. Wie in der Publikation Schüle in et al. dargestellt, besteht in dieser Region ein signifikanter Unterschied in der Seroprävalenz zwischen den Zeiträumen eins (9,53%; CI 6,76-12,31%) und zwei (5,16%; CI 3,06-7,27%). Dieser spiegelt sich in einer sinkenden Seroprävalenz über die einzelnen Jahre wider. Interessanterweise sinkt der Anteil seropositiver Tiere besonders deutlich zwischen den Jahren 2015 und 2016. Über Ursachen hierfür kann nur spekuliert werden. Möglich sind viele verschiedene Einflussfaktoren, die von akuten S-IAV Infektionsgeschehen in vorausgegangenen Jahren bis zu einer stärkeren Bejagung einzelner Altersklassen in einzelnen Jahren und Regionen reichen. Da Stichproben in den einzelnen Beprobungsjahren aufgrund der Zielsetzung der Arbeit nicht repräsentativ ausgewählt wurden, lassen sie einen statistisch validen Vergleich der IAV-Seroprävalenzen Südbayerns auf Ebene einzelner Jahre nicht zu.

Die IAV-Seroprävalenz von Wildschweinen aus Nordbayern betrug für den Zeitraum „Oktober 2016 bis Februar 2019“ 6,11% (CI: 4,09-8,13%) (SCHÜLEIN et al., 2021). In dieser Region wurden nur die Jahre 2017 bis 2019 analysiert. Da zudem aus 2017 nur 38 Proben untersucht wurden, wurde für Nordbayern keine Aussage über den Verlauf der IAV-Seroprävalenzen getroffen.

3.1.2. Diskussion

In einer Seroprävalenzstudie von Kaden et al. wurde der Anteil IAV-seropositiver Wildschweine aus Mecklenburg-Vorpommern für die Beprobungszeiträume 1997 bis 1998 und 2005 bis 2006 miteinander verglichen (sh. auch Kapitel II.2.2.1). Auch in Mecklenburg-Vorpommern wurden Seroprävalenz-Schwankungen mit der Zeit beobachtet: Von 120 zwischen 1997 und 1998 gewonnenen Serumproben reagierte keine im HAH. Für die 684 Tiere aus den Jahren 2005 bis 2006 wurde dagegen eine Seroprävalenz von 3,1% festgestellt, da 21 Seren Antikörper enthielten (KADEN et al., 2008). Auch die Studie von Roic et al. (sh. auch Kapitel II.2.2.2) erlaubt den Vergleich zweier Zeiträume: Von den 359 zwischen 2005 und 2006 beprobten Tieren reagierten 31 Tiere im H1N1-spezifischen ELISA, was einer Seroprävalenz von 8,6% entspricht. Zwischen 2009 und 2010 waren es 23 von 197 Tieren, also eine Seroprävalenz von 11,7% (ROIC et al., 2012). In beiden Studien wurden zwischen den ausgewerteten Zeiträumen über mehrere Jahre hinweg keine Proben untersucht. Zudem berücksichtigen Roic et al. allein den Subtyp H1N1, was nur eine unvollständige Darstellung der tatsächlichen IAV-Seroprävalenz sowie deren zeitlichen Verlauf erlaubt. Nichtsdestotrotz wurde in beiden Studien eine Varianz festgestellt, was auf ein dynamisches Verhalten hinweist. Dieses scheint aus mehreren Gründen plausibel: Aufgrund der ausgeprägten genetischen Variabilität von IAV (sh. Kapitel II.1.2.) können zu jedem Zeitpunkt neue Viren entstehen oder in die Population eingetragen werden. Mögliche Folge kann eine erhöhte Ausbreitungsfähigkeit neuer Viren in der dann naiven Population sein und in Konsequenz über einen Zeitraum von mehreren Monaten eine erhöhte Seroprävalenz induziert werden. Wie in der Publikation Schülein et al. beschrieben, wurden zudem in einigen Teilen Bayerns IAV-spezifische Antikörper (z. B. gegen H5N8) in Wildschweinseren detektiert, deren Verbreitung dort zuvor nicht bekannt war.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Unterschiede der IAV-Seroprävalenzen zwischen Proben aus Süd- und Nordbayern der Jahre 2014 bis

2019 festgestellt. Auch wenn die Probenzahl eine Aussage über die statistische Signifikanz dieser Unterschiede nur für Südbayern und nur zwischen Zeitraum eins und Zeitraum zwei erlaubt, wurde dennoch gezeigt, dass sich die tatsächlichen IAV-Seroprävalenzen regelmäßig ändern. Mögliche Ursachen werden in den folgenden Kapiteln im Detail diskutiert.

3.2. Einflüsse auf die IAV-Seroprävalenz in der Wildschweinpopulation

3.2.1. Wildschweindichte

Die Übertragung von IAV erfolgt beim Schwein über Aerosole sowie durch direkten Kontakt (HEINRITZI, 2006). Da diese Übertragungswege an engen Kontakt gebunden sind, ist davon auszugehen, dass die Virusausbreitung in weniger dicht von Wildschweinen besiedelten Regionen weniger effizient ist als in solchen mit hoher Wildschweindichte (RUIZ-FONS et al., 2008). Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit die Wildschweindichte Bayerns als ein möglicher Einflussfaktor auf die IAV-Seroprävalenz in der bayerischen Wildschweinpopulation untersucht.

3.2.1.1. Ergebnisse

Die Wildschweindichte wurde anhand der durch das Bayerische Staatsministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten publizierten Schwarzwildstrecke 2018 (WILDTIERPORTAL BAYERN) geschätzt (SCHÜLEIN et al., 2021). Eine Korrelation mit der IAV-Seroprävalenz wurde auf Ebene der bayerischen Regierungsbezirke bestimmt. Da es sich sowohl bei der jeweils geschätzten Wildschweindichte als auch bei den für jeden Regierungsbezirk ermittelten IAV-Seroprävalenzen um metrische Variablen handelte, wurde der Korrelationskoeffizient nach Pearson berechnet (FAHRMEIR et al., 2010). Der Zusammenhang zwischen den beiden Parametern für die einzelnen Regierungsbezirke ist in Tab. 5 und Abb. 6 dargestellt.

Tab. 5: Gegenüberstellung der Schwarzwildstrecke des Jahres 2018* und der IAV-Seroprävalenz** bei Wildschweinen

Regierungsbezirk	Schwarzwildstrecke 2018*	IAV-Seroprävalenz**
Oberbayern	7.647	4,83%
Niederbayern	4.452	5,63%
Schwaben	5.990	5,04%
Oberpfalz	10.731	1,44%
Mittelfranken	5.518	2,46%
Unterfranken	18.804	9,35%
Oberfranken	12.313	10,71%

* WILDTIERPORTAL BAYERN

**für den Beprobungszeitraum „Oktober 2016 bis Februar 2019“

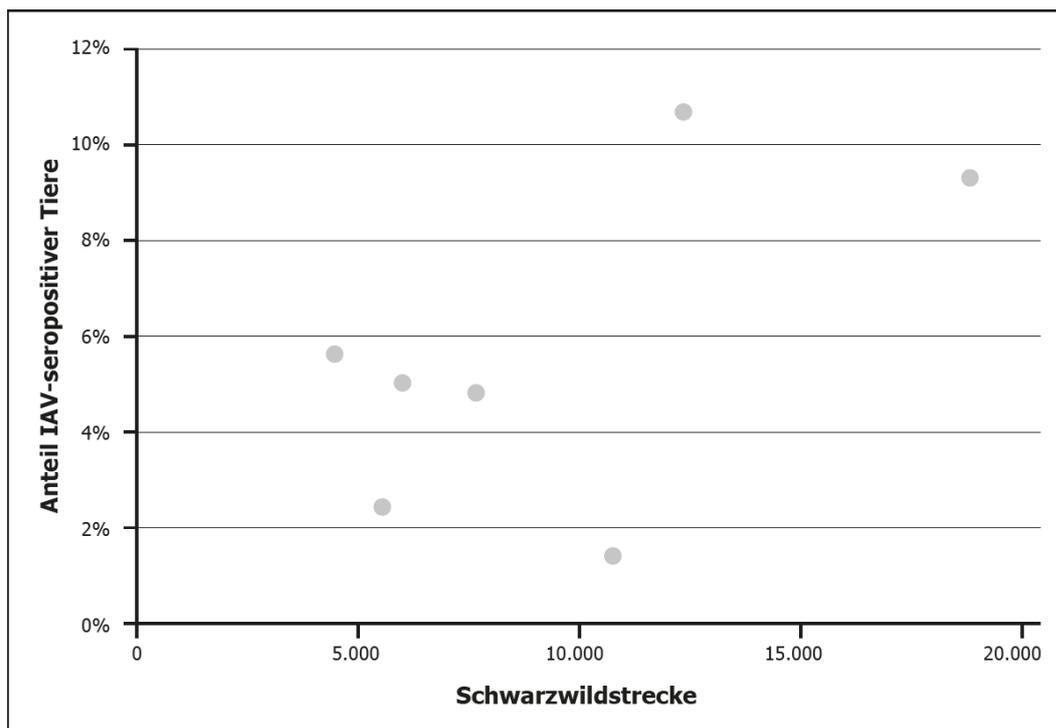


Abb. 6: Zusammenhang zwischen der Schwarzwildstrecke 2018 (WILDTIERPORTAL BAYERN) und der IAV-Seroprävalenz: Die Daten sind für den Zeitraum Oktober 2016 bis Februar 2019 (SCHÜLEIN et al., 2021) dargestellt. Jeder Punkt repräsentiert die Daten eines Regierungsbezirkes. Die Grafik wurde unter Verwendung der Softwarepakete Adobe Indesign CC 2018 und Illustrator CC 2019 erstellt.

Zwischen den beiden Faktoren besteht kein offensichtlicher Zusammenhang. Rechnerisch resultiert ein positiver Korrelationskoeffizient von 0,59, aber die Daten aus der Oberpfalz mit 10.731 erlegten Tieren bei einer IAV-Seroprävalenz von 1,44% (CI 0-3,42%) weichen deutlich von z. B. denen Oberfrankens ab, wo die IAV-Seroprävalenz 10,71% (CI 5,59-15,84%) bei einer Schwarzwildstrecke von 12.313 betrug. Auch in Niederbayern, wo mit 4.452 Tieren zwar relativ wenig Wildschweine erlegt wurden, war die IAV-Seroprävalenz mit 5,63% (CI 1,84-9,43%) im mittleren Bereich.

3.2.1.2. Diskussion

Aus den dargestellten Ergebnissen wird gefolgert, dass neben der Wildschweindichte weitere Faktoren Einfluss nehmen. Innerhalb von Hausschweinebeständen und bei gehaltenen Wildschweinen verläuft ein IAV-Infektionsgeschehen ausbruchsartig und betrifft alle Tiere eines Betriebs (VAN REETH et al., 2012). Hier stehen die Tiere eng beieinander und können sich der Infektion nicht entziehen. Diese Bedingungen sind selbst bei einer sehr hohen lokalen Wildschweindichte nicht erfüllt. Auch wenn in solchen Gebieten die Wahrscheinlichkeit, dass Rotten aufeinandertreffen, höher ist als in Regionen mit sehr geringer Wildschweindichte, wird also zu keinem Zeitpunkt eine Schwelle erreicht, bei der die Infektion weniger Wildschweine auf eine große Anzahl benachbarter Tiere übergeht, die nicht direkt der eigenen Rotte angehören.

Möglich ist auch, dass auf Ebene der Regierungsbezirke die Daten zu großer Regionen gegenübergestellt werden. Die Auswertung der Wildschweindichte auf Landkreisebene zeigt, wie in der Publikation Schüle et al. dargestellt, jedoch bereits innerhalb der Regierungsbezirke teils erhebliche Variationen, sodass beispielsweise die Wildschweindichte Unterfrankens hauptsächlich durch die sehr hohe Anzahl erlegter Tiere in den Landkreisen Main-Spessart, Bad Kissingen und Rhön-Grabfeld bedingt ist. Aufgrund der Zielsetzung der vorliegenden Arbeit wurde die Verteilung der IAV-Seroprävalenzen nicht auf Landkreisebene bestimmt, jedoch zeigen auch schon die Daten zu IAV-Seroprävalenzen innerhalb mehrerer Rotten erhebliche Unterschiede innerhalb dieser sehr kleinen Populationen. Zukünftige Arbeiten sollten die Daten kleinerer Regionen gegenüberstellen, um ein geographisches Bias zu vermeiden.

Während die Wildschweinverteilung und -dichte über Bayern zwischen 2013 und

2018 nicht wesentlich variiert (WILDTIERPORTAL BAYERN), sanken die IAV-Seroprävalenzen in Schwaben von 12,59% (CI 7,15-18,02%) in Beprobungszeitraum eins auf 5,04% (CI 1,40-8,67%) in Beprobungszeitraum zwei deutlich (SCHÜLEIN et al., 2021). Die Wildschweindichte wäre demnach allenfalls einer von vielen weiteren Faktoren, die Einfluss auf die IAV-Seroprävalenz nehmen.

Obwohl der Infektionsdruck mit steigender Populationsdichte erhöht wird (RUIZ-FONS et al., 2008), wurde in der vorliegenden Arbeit kein für ganz Bayern gültiger Zusammenhang zwischen der Wildschweindichte und der IAV-Seroprävalenz im bayerischen Schwarzwild festgestellt. Ein Grund hierfür könnten sehr große Reviere einzelner Rotten und daraus folgend geringen Kontakte zu Tieren außerhalb der eigenen Familie sein. Schwankungen des jeweiligen Anteils IAV-seropositiver Proben zwischen verschiedenen Untersuchungszeitpunkten (sh. Kapitel IV.3.1.) liefern zudem einen Anhaltspunkt dafür, dass verschiedene Faktoren zusammenspielen und andere Umweltbedingungen zusätzlich, möglicherweise regional unterschiedlich, eine Rolle spielen. Um zu evaluieren, ob ein Zusammenhang auf detaillierterer, regionaler Ebene besteht, sollen weitere Arbeiten eine Auswertung auf Landkreisebene erlauben.

3.2.2. Hausschweindichte

Nach 1998 wurden in der nordamerikanischen Wildschweinpopulation nahezu ausschließlich Antikörper gegen den Subtyp H3N2 gefunden, was nahelegt, dass die neuen, seit damals in Hausschweinbeständen aufgetretenen H3N2-Varianten die Infektionen in der Wildschwein- wie auch der Hausschweinpopulation dominierten (SALIKI et al., 1998; WEBBY et al., 2000; HALL et al., 2008; FENG et al., 2014). Um den Einfluss der Hausschweindichte in einer Region auf die IAV-Seroprävalenz im Schwarzwild zu analysieren, wurden auch diese Daten in Korrelation gesetzt.

3.2.2.1. Ergebnisse

Die Hausschweindichte Bayerns wurde den Erhebungen des Bayerischen Landesamtes für Statistik zum Stichtag 01.03.2016 entnommen (sh. Abb. 7, Tab. 6; BAYERISCHES LANDESAMT FÜR STATISTIK, 2020). Ein Vergleich der IAV-Seroprävalenzen über alle Regionen Bayerns erfolgte für den Zeitraum „Oktober 2016 bis Februar 2019“ (n = 966) auf Ebene der Regierungsbezirke. Daher wurde

auch die Korrelation zwischen Hausschweindichte und regionaler IAV-Seroprävalenz (SCHÜLEIN et al., 2021) auf Ebene der Regierungsbezirke berechnet. Die Berechnung des Korrelationskoeffizients wurde nach Pearson durchgeführt. Der Zusammenhang zwischen der Hausschweindichte zum Stichtag 01.03.2016 (BAYERISCHES LANDESAMT FÜR STATISTIK, 2020) und der IAV-Seroprävalenzen der Wildschweinpopulation für Zeitraum zwei für die einzelnen Regierungsbezirke Bayerns ist in Abb. 8 dargestellt.

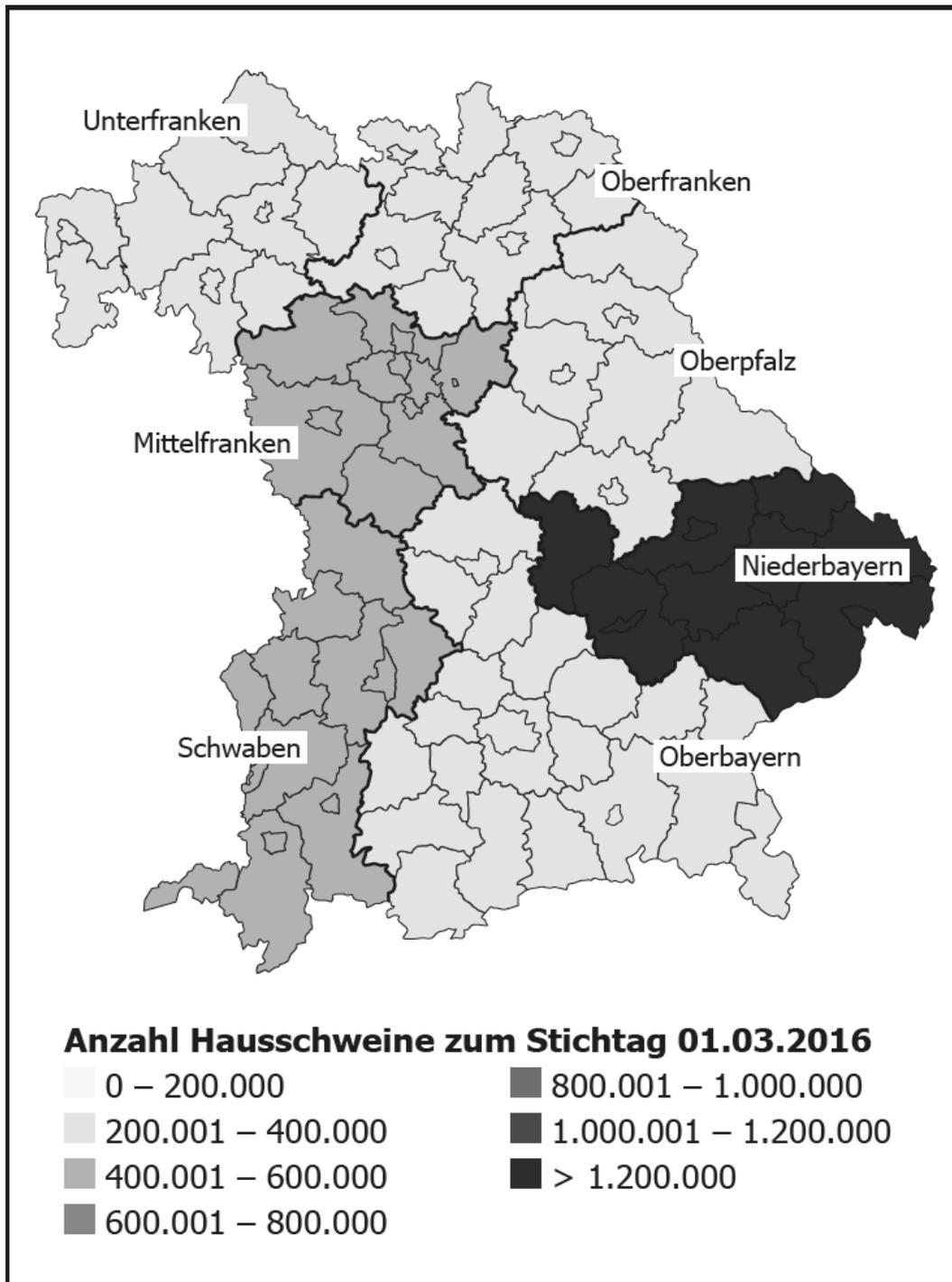


Abb. 7: Grafische Darstellung der Hausschweindichte innerhalb Bayerns zum Stichtag 01.03.2016 auf Ebene der Regierungsbezirke. Die Karte wurde anhand der 2020 durch das Bayerische Landesamt für Statistik zur Verfügung gestellten Daten zur Hausschweindichte (BAYERISCHES LANDESAMT FÜR STATISTIK, 2020) und unter Verwendung der Softwarepakete GfK RegioGraph und Adobe Indesign CC 2018 sowie Illustrator CC 2019 generiert.

Tab. 6: Gegenüberstellung der Hausschweindichte des Jahres 2016* und der IAV-Seroprävalenz bei Wildschweinen**

Regierungsbezirk	Hausschweindichte 2016*	IAV-Seroprävalenz**
Oberbayern	388.233	4,83%
Niederbayern	1.233.212	5,63%
Schwaben	530.603	5,04%
Oberpfalz	270.941	1,44%
Mittelfranken	469.499	2,46%
Unterfranken	335.424	9,35%
Oberfranken	228.381	10,71%

* BAYERISCHES LANDESAMT FÜR STATISTIK, 2020

**für den Beprobungszeitraum „Oktober 2016 bis Februar 2019“

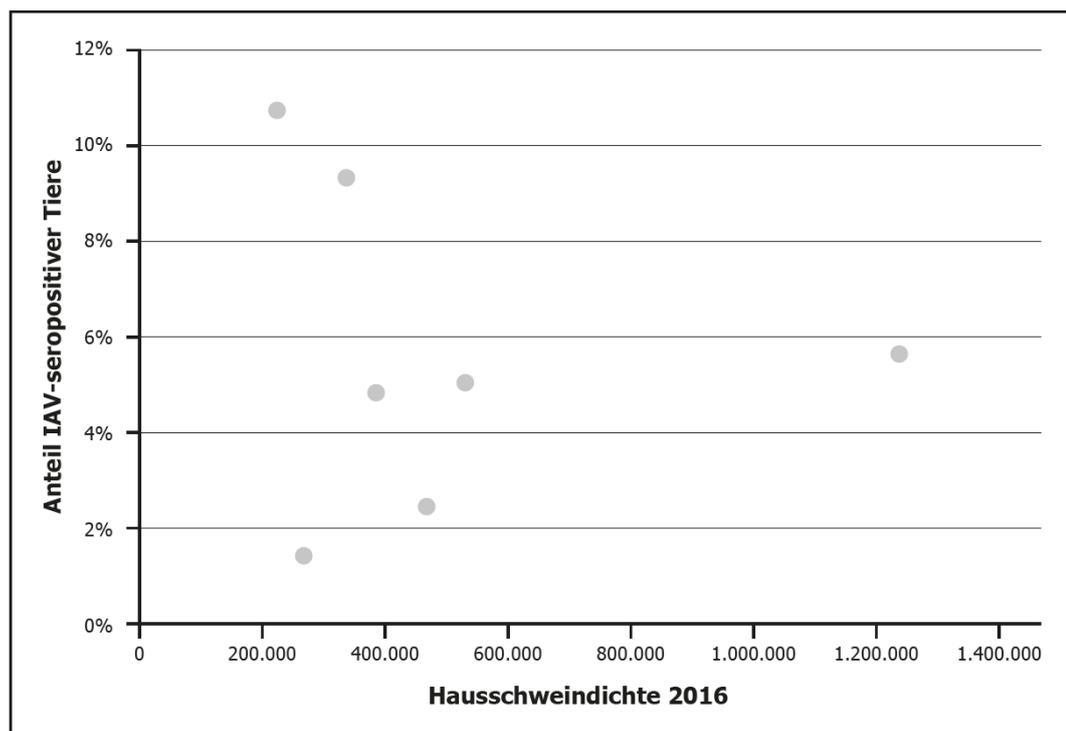


Abb. 8: grafische Darstellung der Korrelation zwischen der Hausschweindichte des Jahres 2016 und regionalen IAV-Seroprävalenz für die Regierungsbezirke Bayerns für den Beprobungszeitraum „Oktober 2016 bis Februar 2019“. Jeder Punkt stellt die Daten eines Regierungsbezirkes dar. Die Grafik wurde unter Verwendung der 2020 durch das Bayerische Landesamt für Statistik zur Verfügung gestellten Daten zur Hausschweindichte (BAYERISCHES LANDESAMT FÜR STATISTIK, 2020) sowie der Softwarepakete Adobe Indesign CC 2018 und Illustrator CC 2019 erstellt.

Zwischen der Hausschweindichte und der IAV-Seroprävalenz in der Wildschweinpopulation besteht auf Ebene der Regierungsbezirke ein schwacher gegensinniger linearer Zusammenhang (Korrelationskoeffizient = -0,124). Oberfranken, der Regierungsbezirk, in dem für den Zeitraum „Oktober 2016 bis Februar 2019“ mit 10,71% (CI 5,59-15,84%) die höchste IAV-Seroprävalenz festgestellt wurde, war gleichzeitig mit 228.381 Tieren der Regierungsbezirk, in dem 2016 die geringste Anzahl an Hausschweinen gehalten wurde. Niederbayern, wo die Anzahl an Hausschweinen mit 1.233.212 Tieren um ein Vielfaches höher war als in den übrigen Regierungsbezirken, befand sich mit einer IAV-Seroprävalenz von 5,63% (CI 1,84-9,43%) im Durchschnitt. Die Hausschweinzahlen der übrigen Regierungsbezirke Mittelfranken, Oberbayern, Oberpfalz, Schwaben und Unterfranken bewegten sich zwischen 270.941 und 530.603 Tieren, während die IAV-Seroprävalenzen dort deutlich, zwischen 1,44% (CI 0-3,42%) und 9,35% (CI 4,51-14,19%), schwankten.

3.2.2.2. Diskussion

Die vorliegende Arbeit liefert Hinweise darauf, dass in Hausschweinbeständen und der bayerischen Wildschweinpopulation dieselben Subtypen zirkulieren, da sowohl Antikörper gegen den Subtyp H1pdmN1, der seit der H1N1-Pandemie 2009 weltweit in Hausschweinbeständen zirkuliert, als auch gegen die daraus entstandenen Reassortante H1pdmN2 detektiert wurden (SCHÜLEIN et al., 2021). Bayerische Wildschweinseren wurden in der Vergangenheit nicht auf Antikörper gegen diese Viren untersucht. Epidemiologische Daten legen jedoch nahe, dass H1pdmN1 erstmals 2009 in Mexiko aufgetaucht ist und sich von dort aus weltweit ausgebreitet hat (FRASER et al., 2009). Es ist also wahrscheinlich, dass die Zirkulation der neuen Subtypen in der deutschen Haus- und Wildschweinpopulation etwa zur gleichen Zeit begann.

Eine Analyse der Verteilung der Hausschweindichte über die einzelnen Landkreise (SCHÜLEIN et al., 2021: Fig. 1d) zeigt, dass die Verteilung innerhalb der Regierungsbezirke sehr inhomogen sein kann. Bei weitem die meisten Tiere stehen in Niederbayern im Landkreis Landshut. Möglicherweise müssen daher kleinere geographische Einheiten verglichen werden, um Aussagen über den Einfluss der Hausschweindichte auf die IAV-Seroprävalenz von Wildschweinen zu treffen.

Auch ein Einfluss der Hausschweindichte auf das IAV-Infektionsgeschehen im

bayerischen Schwarzwild kann auf Grund der vorgelegten Daten nicht grundsätzlich ausgeschlossen werden. Prinzipiell wurden in dieser Arbeit Antikörper gegen wesentliche in den Hausschweinebeständen zirkulierende Subtypen detektiert, nicht nur gegen die seit langem stabil zirkulierenden Subtypen, sondern auch gegen neue, in den letzten zehn Jahren beobachtete, wie H1pdmN1 und H1pdmN2. Eine gegenseitige Interaktion wurde damit erneut belegt (SCHÜLEIN et al., 2021). Eine mögliche Erklärung dafür, dass diese S-IAV auch in bayerischen Wildschweinen zirkulieren, ohne dass ein quantitativ nachvollziehbarer Zusammenhang zwischen IAV-Seroprävalenz und Hausschweindichte besteht, könnten singuläre Einträge sein. Unter Berücksichtigung der hohen Biosicherheitsstandards deutscher Schweinebetriebe ist es am wahrscheinlichsten, dass IAV vom Haus- auf das Wildschwein übertragen wird und nicht umgekehrt.

Zusammenfassend wurde ein prinzipieller Zusammenhang zwischen S-IAV-Infektionen in Hausschweinebeständen und bayerischen Wildschweinpopulationen gezeigt, eine quantitativ darstellbare Korrelation zwischen Hausschweindichte und Infektionen im Schwarzwild zeigen die Daten dieser Arbeit aber nicht. Um präzise Aussagen über eine Korrelation zwischen Hausschweindichte und IAV-Seroprävalenz im Wildschwein treffen zu können, soll in anschließenden Arbeiten ein regionaler Vergleich auf Ebene der Landkreise durchgeführt werden.

3.2.3. Regionalität

Aus welchen Gründen in einigen Gebieten der Anteil an Individuen mit Antikörpern gegen einen bestimmten Erreger größer ist als in anderen, wird offensichtlich durch eine Vielzahl von Faktoren bestimmt. Vor diesem Hintergrund wurde, wie in den Kapiteln IV.3.2.1. und IV.3.2.2. dargelegt, ein besonderer Fokus auf Zusammenhänge zwischen der Haus- bzw. Wildschweindichte und der IAV-Seroprävalenz in den Regierungsbezirken gelegt. Im Folgenden werden weitere mögliche Ursachen für beobachtete regionale Unterschiede in die Überlegungen einbezogen und diskutiert.

3.2.3.1. Ergebnisse

Neben dem Pearson-Chi²-Test oder Chi²-Unabhängigkeitstest, der die statistische Signifikanz des Unterschiedes zwischen den IAV-Seroprävalenzen in den Regierungsbezirken Ober- bzw. Unterfranken und der IAV-Seroprävalenz der

Oberpfalz für den Zeitraum „Oktober 2016 bis Februar 2019“ durch einen p-Wert $< 0,05$ belegt, wurde auch die Richtung des Zusammenhangs zwischen Regierungsbezirk und IAV-Seroprävalenz mittels Odds Ratios oder relativen Chancen quantifiziert (FAHRMEIR et al., 2010, sh. Publikation SCHÜLEIN et al., 2021): Die Wahrscheinlichkeit, in einer aus Unterfranken stammenden Probe Antikörper gegen IAV zu detektieren, war im Vergleich zu einer Probe, die im gleichen Zeitraum in der Oberpfalz genommen wurde, 7,07-fach erhöht (CI 1,56-31,94). Für eine Probe aus Oberfranken war diese Wahrscheinlichkeit sogar 8,22-fach erhöht (CI 1,84-36,66). Grundsätzlich gab es also innerhalb Bayerns teils sehr starke Unterschiede. Abb. 9 stellt auf Ebene der Postleitzahl alle Orte dar, an denen Proben S-IAV-seropositiver Tiere gewonnen wurden.

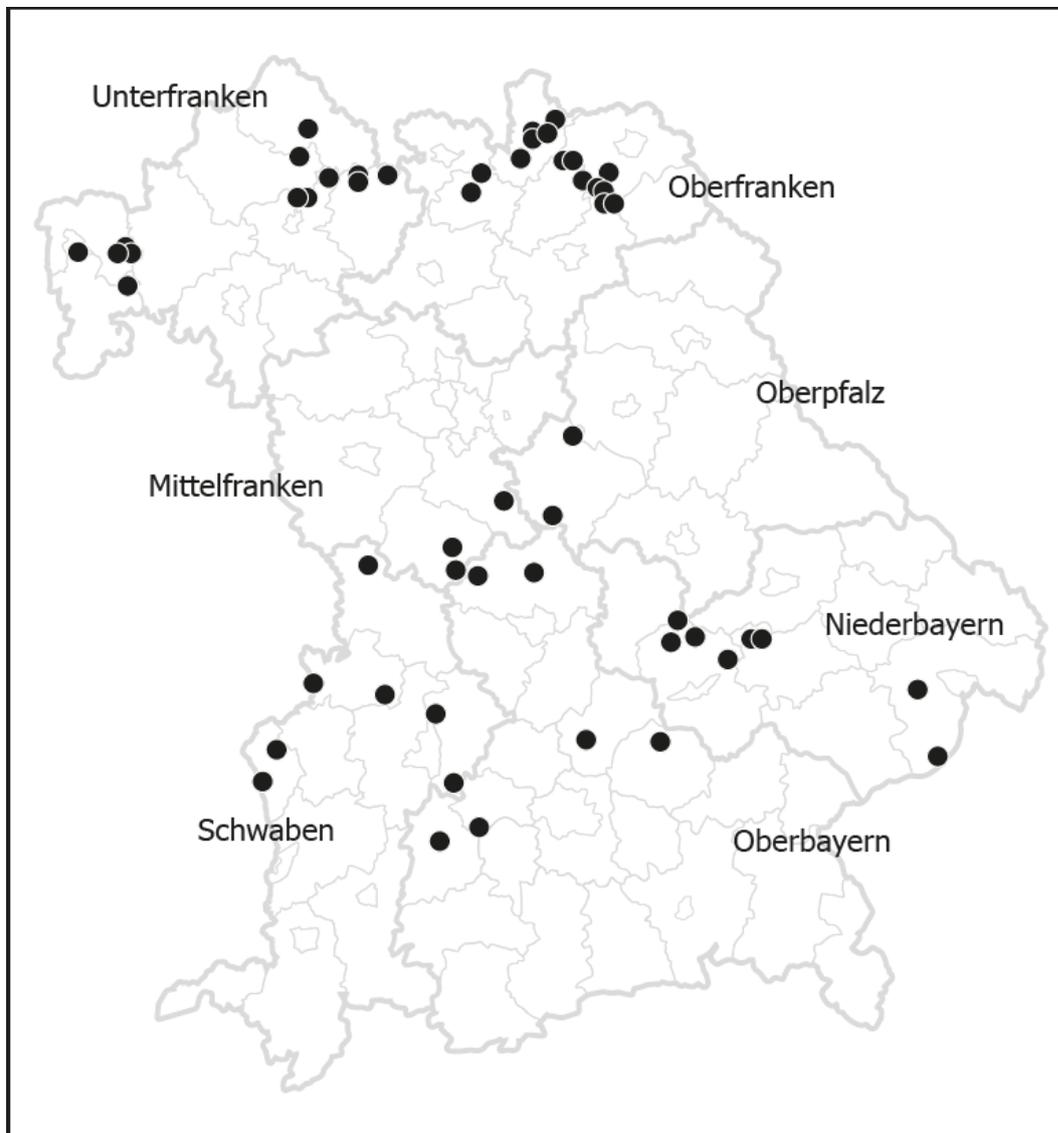


Abb. 9: Herkunft aller S-IAV-seropositiven Proben des Zeitraums „Februar Oktober 2016 bis Februar 2019“ (n = 54). Die Karte wurde unter Verwendung der Softwarepakete GfK RegioGraph und Adobe Indesign CC 2018 sowie Illustrator CC 2019 generiert.

Auf eine Verteilung auf Landkreisebene kann hieraus nicht geschlossen werden, da im Zuge der möglichst unvoreingenommenen Verteilung der Proben über Bayern aus Landkreisen mit höherer Wildschweindichte auch mehr Proben untersucht wurden als in solchen mit niedrigerer Wildschweindichte. Jedoch spiegelt diese Darstellung die sehr geringe Anzahl IAV-seropositiver Tiere wider, die aus Mittelfranken und der Oberpfalz stammten: Von insgesamt 261 Wildschweinen konnten nur bei fünf Antikörper gegen IAV detektiert werden. Vier der Tiere stammten aus Landkreisen, die bereits südlich an andere Regierungsbezirke angrenzen. In den größten Teilen Mittelfrankens und der Oberpfalz wurden also keine Antikörper gegen IAV gefunden. Im Süden Oberbayerns und Schwabens, mit Gesamt-IAV-Seroprävalenzen von 4,83% (CI 1,34-8,32%) und 5,04% (CI 1,40-8,67%) im mittleren Bereich (SCHÜLEIN et al., 2021), wurden ebenfalls weniger Tiere mit Antikörpern gegen IAV gefunden. Da die Wildschweindichte in diesem Süden Bayerns relativ gering ist (sh. SCHÜLEIN et al., 2021: Fig. 1c) wurden auch weniger Proben aus diesen Regionen untersucht.

3.2.3.2. Diskussion

Die sehr geringe Wildschweindichte in Alpennähe und daraus folgend die geringere Wahrscheinlichkeit, dass Rotten oder sogar Einzeltiere einander begegnen und sich mit IAV zu infizieren, dürfte per se die niedrigen IAV-Seroprävalenzen im Süden der beiden Regierungsbezirke bedingen. Die Faktoren Wildschwein- und Hausschweindichte können grundsätzlich aber nur dann Einfluss auf die IAV-Prävalenz der Wildschweine nehmen, wenn das Virus sich auch in der Population ausbreiten kann. Ist beispielsweise der größte Teil der Hausschweine gegen IAV geimpft oder hat zu für die Untersuchung relevanten Zeitpunkten keine Virusinfektion stattgefunden, so geht auch von einer sehr großen Population keine Infektionsgefahr aus. Gleiches gilt für die Wildschweindichte. Die hohe Wildschweindichte der Oberpfalz (WILDTIERPORTAL BAYERN; sh. Kapitel IV.3.2.1.) kann nur dann die Ausbreitung des Erregers begünstigen, wenn dieser sich auch in der Population befindet.

Im Norden Bayerns könnten in der nahen Vergangenheit S-IAV Infektionen aufgetreten sein und die sehr hohen IAV-Seroprävalenzen sind auf eine rasante Verbreitung, begünstigt durch die hohe Wildschweindichte, zurückzuführen. Für die südbayerischen Regierungsbezirke Oberbayern, Niederbayern und Schwaben ist zudem der dynamische Charakter der IAV-Epidemiologie zu erkennen: Obwohl

sich die Verteilung der Wildschweine innerhalb Bayerns nicht wesentlich geändert hat (WILDTIERPORTAL BAYERN), ist bei den Seroprävalenzen der einzelnen Regionen keine klare Kontinuität über die Jahre zu erkennen (sh. Kapitel IV.3.1.).

Die Aspekte Wildschwein- und Hausschweindichte sind nur zwei Faktoren, die möglicherweise einen Einfluss auf die IAV-Seroprävalenz der bayerischen Wildschweine haben. Sie spielen nur dann eine Rolle, wenn der Erreger sich in der Population befindet und können dann möglicherweise eine schnelle oder langsame Ausbreitung bedingen.

3.2.4. Saisonale Verteilung der IAV-Seroprävalenzen

Beim Menschen treten in gemäßigten Zonen, zu denen auch Deutschland gehört, IAV-Infektionen saisonal auf. Die IAV-Prävalenz steigt während der Wintermonate binnen weniger Wochen deutlich an, um dann im Frühjahr auf das übliche niedrige Niveau zurückzufallen (LOFGREN et al., 2007). Im Rahmen einer Studie, bei der die IAV-Prävalenz von Saugferkeln in Minnesota, Iowa, und South Dakota auf Bestandsebene ermittelt wurde, wurden jeweils für die Jahre 2011 bis 2016 ebenfalls zu Beginn des Winters, aber auch gegen Ende des Frühjahrs Peaks festgestellt (CHAMBA PARDO et al., 2017). In deutschen Hausschweinbeständen wurde dagegen bislang keine derartige Saisonalität beobachtet (PIPPIG et al., 2016). Die Daten der vorliegenden Arbeiten wurden daher auch nach Saison der Probennahme ausgewertet. Es wurde davon ausgegangen, dass IAV-Antikörperspiegel beim Wildschwein bei Ausbleiben einer Reinfektion nach einigen Monaten unterhalb die Nachweisgrenzen der verwendeten Tests fallen (SCHÜLEIN et al., 2021), sowie, dass die Dichte und Dynamik der Schwarzwildpopulation in Bayern nicht grundsätzlich eine ständige Reinfektion aller Tiere gewährleisten und somit eine gewisse, wenn auch verzögerte, Saisonalität darstellbar wäre.

3.2.4.1. Ergebnisse

Serumproben von insgesamt 1.396 Wildschweinen waren nach den in der Publikation Schülein et al. ausgeführten statistischen Gesichtspunkten ausgewählt worden. Anhand des Datums, an dem eine solche Probe am Bayerischen Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit zur Untersuchung einging, erfolgte eine Einteilung in die Monate Januar (n = 200), Februar (n = 82), März (n = 62), April (n = 55), Mai (n = 92), Juni (n = 75), Juli (n = 72), August (n = 49), September

(n = 48), Oktober (n = 135), November (n = 349) und Dezember (n = 177).

Obwohl Schwarzwild ganzjährig bejagt werden darf (BUNDESMINISTERIUM DER JUSTIZ UND FÜR VERBRAUCHERSCHUTZ; BUNDESAMT FÜR JUSTIZ, 1977), sind die im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchten Proben nicht gleichmäßig über alle Monate eines Jahres verteilt. Die Bejagung findet verstärkt in den Wintermonaten, z. B. auch durch Drückjagden, statt. Die im Kapitel IV.1. sowie in der Publikation Schülein et al. beschriebene Auswahl der Stichproben zielte auf die Erfüllung der Vorgaben für die vergleichende Analyse regionaler Aspekte, eine Auswertung nach Saison wurde also erst im Nachhinein einbezogen. Somit wird die für eine Schätzung der IAV-Seroprävalenz benötigte Stichprobenzahl von 139 nicht für jeden Monat erreicht. Um dennoch statistisch valide Aussagen über eine saisonale Verteilung der IAV-Seroprävalenz in Proben von bayerischen Wildschweinen zu treffen, wurden die Monate Januar und Februar zum Zeitrahmen „später Winter“ (n = 282), März bis Mai zum Zeitrahmen „Frühling“ (n = 209), Juni bis August zum Zeitrahmen „Sommer“ (n = 196), September und Oktober zum Zeitrahmen „Beginn Herbst“ (n = 183) und November und Dezember zum Zeitrahmen „später Herbst/Beginn Winter“ (n = 526) zusammengefasst. Daraufhin wurden die IAV-Seroprävalenzen der einzelnen Zeitrahmen berechnet sowie Unterschiede zwischen den jeweiligen Zeitrahmen mittels Pearson-Chi²-Test auf statistische Signifikanz untersucht. Zusätzlich wurde die Richtung des Zusammenhanges mittels Odds Ratios überprüft. Die Ergebnisse sind in Tab. 7 und Abb. 10 dargestellt.

Tab. 7: Verhältnis zwischen IAV-Seroprävalenzen und Saison der im Rahmen des Stichprobenplans untersuchten Serumproben

Zeitraum	Proben untersucht*	Davon IAV-seropositiv	IAV-Seroprävalenz (CI95%)	Odds Ratio (CI95%)	p-Wert
Später Winter	282	24	8,51% (5,25-11,77%)	1,56 (0,75-3,27)	> 0,05
Frühling	209	14	6,70% (3,31-10,09%)	1,21 (0,53-2,73)	> 0,05
Sommer	196	11	5,61% (2,39-8,83%)	1,00	-
Beginn Herbst	183	11	6,01% (2,57-9,45%)	1,08 (0,45-2,54)	> 0,05
Später Herbst/Beginn Winter	526	36	6,84% (4,69-9,00%)	1,24 (0,62-2,48)	> 0,05

*Daten der im Rahmen des Stichprobenplans untersuchten Serumproben wurden ausgewertet.

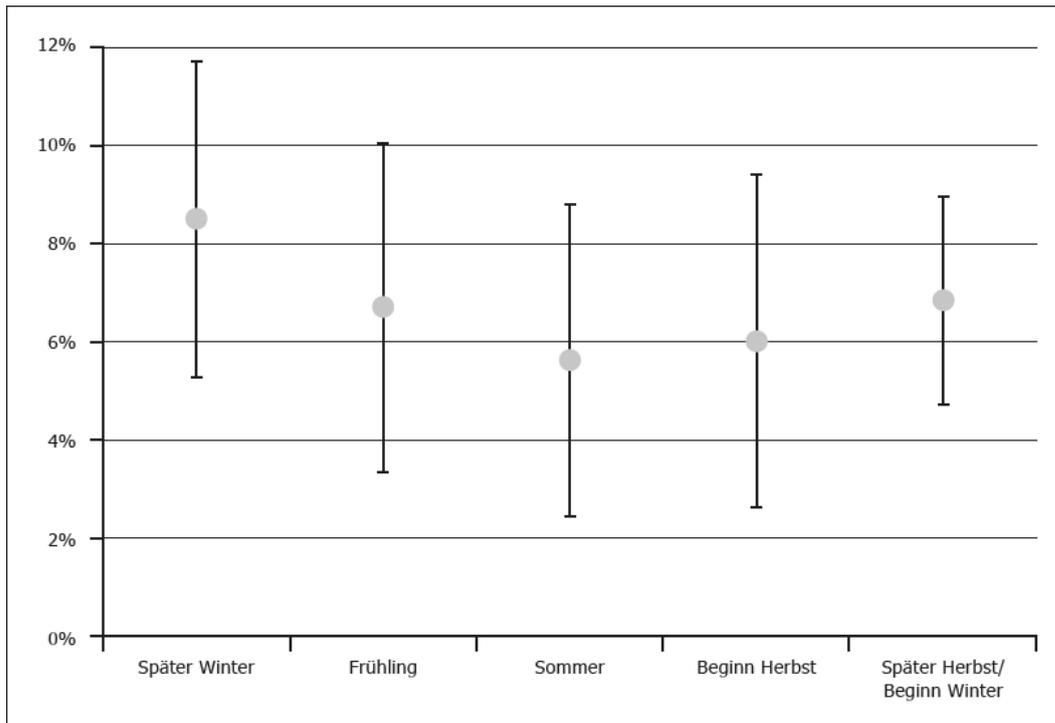


Abb. 10 Verhältnis zwischen der IAV-Seroprävalenz bei bayerischen Wildschweinen und der Saison der Probennahme. Die Daten der Beprobungsjahre 2014 bis 2019 wurden ausgewertet. Konfidenzintervalle, die die tatsächliche Seroprävalenz mit einer Sicherheit von 95% wiedergeben, sind angegeben. Die Grafik wurde unter Verwendung der Softwarepakete Adobe Indesign CC 2018 und Illustrator CC 2019 erstellt.

Der Anteil IAV-seropositiver Seren war im Sommer am geringsten, stieg zu Beginn des Herbstes leicht an und erreichte im späten Herbst einen Höhepunkt. Allerdings lagen die berechneten Prävalenzen sehr nahe beieinander, nämlich zwischen 5,61% (CI 2,39-8,83%) und 8,51% (CI 5,25-11,77%), und die Unterschiede waren nicht statistisch signifikant, so dass aus den vorliegenden Daten nicht auf eine klare Saisonalität geschlossen wird.

3.2.4.2. Diskussion

Obwohl Unterschiede allenfalls marginal festgestellt wurden, wären sie beim Wildschwein eher zu erwarten als beim Hausschwein, da die Tiere jahreszeitlich bedingten Schwankungen von Temperatur und Luftfeuchtigkeit ausgesetzt sind, die auch beim Menschen in den kalten Monaten eine effektivere Verbreitung von IAV begünstigen (LOFGREN et al., 2007). Die nur sehr geringe saisonale Schwankung der IAV-Seroprävalenz zwischen 5,61% und 8,51% könnte dann darauf hinweisen, dass Antikörper gegen IAV beim größten Teil der Tiere über einen längeren Zeitraum persistieren und somit ganzjährig auf einem relativ stabilen Niveau liegen.

Dass IAV-Seroprävalenzen in der Wildschweinpopulation grundsätzlichen Schwankungen, auch innerhalb eines Jahres, unterliegen, wurde bei Razorbacks beobachtet, deren Serumproben zwischen 2011 und 2012 in den USA gewonnen wurden (FENG et al., 2014). Auch wenn sich in dieser Studie ebenfalls kein klares Muster abzeichnete, wurde der größte Anteil IAV-seropositiver Tiere im Sommer beobachtet. Delogu et al. geben zudem für 388 aus der Toskana stammende Wildschweinseren den Beprobungsmonat des Jahres 2012 an und mit Ausnahme von zwei im Juni erlegten Tieren wurden Antikörper gegen IAV ausschließlich bei Tieren detektiert, die zwischen September und November beprobt wurden (DELOGU et al., 2019).

Zusammengefasst gibt es Hinweise auf saisonale Unterschiede in den IAV-Seroprävalenzen in Wildschweinpopulationen, wenn auch die in dieser Arbeit beobachteten Variationen statistisch nicht signifikant sind. Ein Einfluss einer längeren Persistenz von Antikörpern, insbesondere nach Reinfektionen ist wahrscheinlich. Es resultiert dennoch, dass der Beprobungszeitpunkt innerhalb eines Kalenderjahres Einfluss auf die Wahrscheinlichkeit der Detektion von IAV-Antikörpern haben könnte. Um die Repräsentativität von Stichproben zu optimieren und ein eventuell bestehendes Bias zu vermeiden, sollten Stichprobenpläne zukünftiger Arbeiten, die sich mit der Schätzung von IAV-Seroprävalenzen von Wildschweinen befassen, eine gleichmäßige Verteilung der Proben über das gesamte Jahr anstreben.

3.2.5. Alter der Tiere

Der Zeitraum, über den IAV-spezifische Antikörper beim Wildschwein mit einem bestimmten Testprinzip tatsächlich detektierbar sind, ist bislang nicht bekannt. Hausschweine allerdings bilden nach einer IAV-Infektion eine nachweisbare Immunität, die für mehrere Jahre besteht (VAN REETH et al., 2012) und die Lebenserwartung von Wildschweinen wird je nach Bejagungsintensität auf zwei bis sechs Jahre geschätzt (SERVANTY et al., 2011). Daher wurde zunächst die Hypothese zugrunde gelegt, dass ein einmal infiziertes Wildschwein über einen längeren Zeitraum Antikörper besitzt. Folglich müsste die Wahrscheinlichkeit, Antikörper gegen IAV nachzuweisen, mit zunehmendem Alter der untersuchten Tiere ansteigen.

Bei Hausschweinen werden bis zu einem Alter von bis zu vier Monaten maternale

Antikörper nachgewiesen (HEINRITZI, 2006). Entsprechend wurde angenommen, dass Antikörper, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit aus Proben von entsprechend jungen Frischlingen nachgewiesen wurden, auch maternalen Natur gewesen sein können. Dann wäre zu erwarten, dass der IAV-Antikörperspiegel und somit die Seroprävalenz in Proben von Frischlingen über einem Alter von vier Monaten zunächst abfällt und erst nach eigenem Kontakt mit dem Virus und dem nachfolgenden Aufbau einer eigenen Immunantwort wieder ansteigt. Entsprechend berichten Delogu et al. bei Proben von Tieren bis zu einem Alter von vier Monaten mit 7,1% eine geringfügig höhere Seroprävalenz als in der Altersgruppe zwischen fünf und zwölf Monaten, mit 5,5% (DELOGU et al., 2019).

3.2.5.1. Ergebnisse

Wie in der Publikation Schüle et al. bereits ausführlich beschrieben, ist die IAV-Seroprävalenz in der bayerischen Wildschweinepopulation bei Tieren mit einem Alter über 24 Monate mit 12,20% (n = 246; CI 8,11-16,28%) höher als in den jüngeren Altersgruppen und auch in der Gruppe der Überläufer ist die Seroprävalenz (6,30%; n = 508; CI 4,19-8,41%) höher als bei Frischlingen (4,97%; n = 463; CI 2,99-6,95%). Diese Unterschiede sind statistisch signifikant (p-Wert < 0,05).

Frischlinge wurden darüber hinaus in Abhängigkeit von ihrem Alter in die beiden Gruppen „null bis einschließlich vier Monate“ und „fünf bis einschließlich elf Monate“ eingeteilt, sofern die entsprechenden Angaben zur Verfügung standen. Von Proben der jüngeren Altersgruppe waren 8,11% (n = 37; CI 0-16,90%) seropositiv, bei den älteren Frischlingen dagegen 6,14% (n = 228; CI 3,02-9,26%). Der Pearson-Chi²-Test auf Unterschiede zwischen diesen beiden Gruppen lieferte kein statistisch signifikantes Ergebnis (p-Wert > 0,05).

3.2.5.2. Diskussion

Die Kategorisierung nach Alter basiert auf den Altersschätzungen der einsendenden Jäger. Eine Fehleinschätzung kann daher für den Einzelfall nicht ausgeschlossen werden, in der Regel sind die Jäger aber gut ausgebildet und verzichten bei Unsicherheit auf eine Angabe.

Eine Relation zwischen Altersgruppe und Seroprävalenz ist aus anderen Regionen Deutschlands bereits bekannt: Wie in Kapitel 2.2.1. beschrieben, ermittelten Kaden et al. in der Vergangenheit IAV-Seroprävalenzen von 14,1%, 5,5% und 4,2% bei

adulten Tieren, Überläufern und Frischlingen in den Bundesländern Mecklenburg-Vorpommern, Brandenburg, Sachsen-Anhalt, Rheinland-Pfalz und Baden-Württemberg (KADEN et al., 2008). In weiteren Arbeiten wird zwar keine Differenzierung zwischen Überläufern und Adulten vorgenommen, dennoch aber im Vergleich zu den jüngeren Tieren mit 9,9% gegenüber 0% in Spanien (CLOSA-SEBASTIÀ et al., 2011) und 11,1% gegenüber 5,1% bzw. 3,8% in den USA (FENG et al., 2014) der größte Anteil an infizierten Tieren in der Altersgruppe ab zwölf Monaten nachgewiesen.

Der im Rahmen dieser Arbeit festgestellte Unterschied in der IAV-Seroprävalenz zwischen den beiden Frischling-Altersgruppen ist aufgrund fehlender statistischer Signifikanz nur eingeschränkt aussagekräftig. Die Annahme, dass zunächst maternale Antikörper detektiert werden, die innerhalb der ersten Lebensmonate abgebaut werden und dass viele dieser sehr jungen Tiere noch keine aktive Immunantwort nach Kontakt zum Erreger ausgebildet haben, wäre aber nachvollziehbar und würden die Beobachtungen von Delogu et al. bestätigen.

Zusammenfassend wurde im Rahmen dieser Arbeit gezeigt, dass zum einen die Wahrscheinlichkeit, Antikörper gegen IAV bei einer aus einem Wildschwein gewonnenen Serumprobe nachzuweisen, mit zunehmendem Alter des Tieres ansteigt. Zum anderen, dass die wahrscheinliche Präsenz maternaler Antikörper in den Seren sehr junger Tiere die Ergebnisse beeinflussen könnten.

3.2.6. Ausbruch von HPAIV Ende 2016

Die HPAI-Panzootie 2016/2017 gilt bislang als der verheerendste je für Deutschland dokumentierte Ausbruch der Geflügelpest (GLOBIG et al., 2018; POHLMANN et al., 2018). Die zahlreichen an HPAI verendeten Wildvögel, die im ganzen Land tot aufgefunden wurden (GLOBIG et al., 2018), bilden nur die Spitze des Eisberges der unzähligen Vögel, die der Seuche tatsächlich zum Opfer gefallen sind. Der besonders harte Winter zu Beginn der Jahres 2017 (BAYERISCHE LANDESANSTALT FÜR WALD UND FORSTWIRTSCHAFT, 2017) hatte auf der einen Seite sicher zur Folge, dass zunächst nur sehr wenige tote Wildvögel bemerkt wurden. Zum anderen ist aufgrund der erhöhten Tenazität von IAV bei niedrigen Temperaturen (STALLKNECHT et al., 2010) davon auszugehen, dass das Virus in den gefrorenen Kadavern länger infektiös blieb. Zusätzlich dürfte die Witterung auch den meisten Wildschweinen die Nahrungssuche erschwert haben,

wodurch diese möglicherweise vermehrt auf das Fressen von Aas angewiesen waren. Auch an HPAI verendete, noch infektiöses Virus beherbergende Wildvögel könnten als Nahrungsquelle gedient haben. Es resultierte die Hypothese, dass IAV vom Subtyp H5N8 ab Zeitraum zwei (sh. Kapitel IV.3.1.) auch in bayerischen Wildschweinen zirkulierten, möglicherweise sogar zu einem Anstieg der IAV-Seroprävalenz führten.

3.2.6.1. Ergebnisse

Tatsächlich neutralisierten vier von 127 Seren, die mittels spezifischem SNT untersucht wurden, A/tufted duck/Bavaria/61101/2016/H5N8 (sh. Kapitel IV.2.3.). Sie alle waren zwischen Februar und Oktober 2017 gewonnen worden. Der höchste H5N8-SNT-Titer lag bei 64 und war im Vergleich aller im Rahmen dieser Arbeit bestimmten Titer relativ hoch. Drei der vier positiven Seren wurden von Tieren gewonnen, die im Bereich der Gemeinde Pöcking erlegt wurden (sh. Kapitel IV.2.3.1.: Abb. 4). Die IAV-Gesamtseroprävalenz Südbayerns dagegen nahm interessanterweise nach der Panzootie ab (sh. Kapitel IV.3.1.; SCHÜLEIN et al., 2021). Der Anteil H5N8-seropositiver Tiere war mit 3,15% aller aufgrund ihrer Reaktivität im ELISA bereits vorselektierten Proben zwar relativ gering, aber wie oben dargelegt deutlich regional.

3.2.6.2. Diskussion

Viren wie A/tufted duck/Bavaria/61101/2016/H5N8 haben ein geringes Potential andere Tierarten zu infizieren. Bis Abschluss dieser Arbeit lagen auch keine Hinweise auf humane Infektionen vor (POHLMANN et al., 2017; GLOBIG et al., 2018). Angesichts der Tatsache, dass im Rahmen der eigenen Untersuchungen nur in Einzelfällen H5N8-seropositive Proben gefunden wurden, scheinen Infektionen von Wildschweinen mit AIV vom Subtyp H5N8 nur selten, wenn auch vielleicht regional gehäuft, vorzukommen. Anhand solitärer Antikörperreaktionen ist auch nicht zu klären, ob das Virus tatsächlich effizient in den Tieren replizierte, ob sogar eine Infektionskette im Wildschwein etabliert werden konnte oder ob nur eine minimale, vielleicht abortive Infektion stattgefunden hat. Die Tatsache, dass drei von vier H5N8-SNT-positiven Tieren aus der gleichen Gemeinde stammten, liefert möglicherweise einen Hinweis auf eine lokale Ausbreitung, also eine Infektion von Wildschwein zu Wildschwein. Vielleicht dienten aber auch nur auf Grund lokaler Gegebenheiten in dieser Region IAV-positive Wildvögel vermehrt als

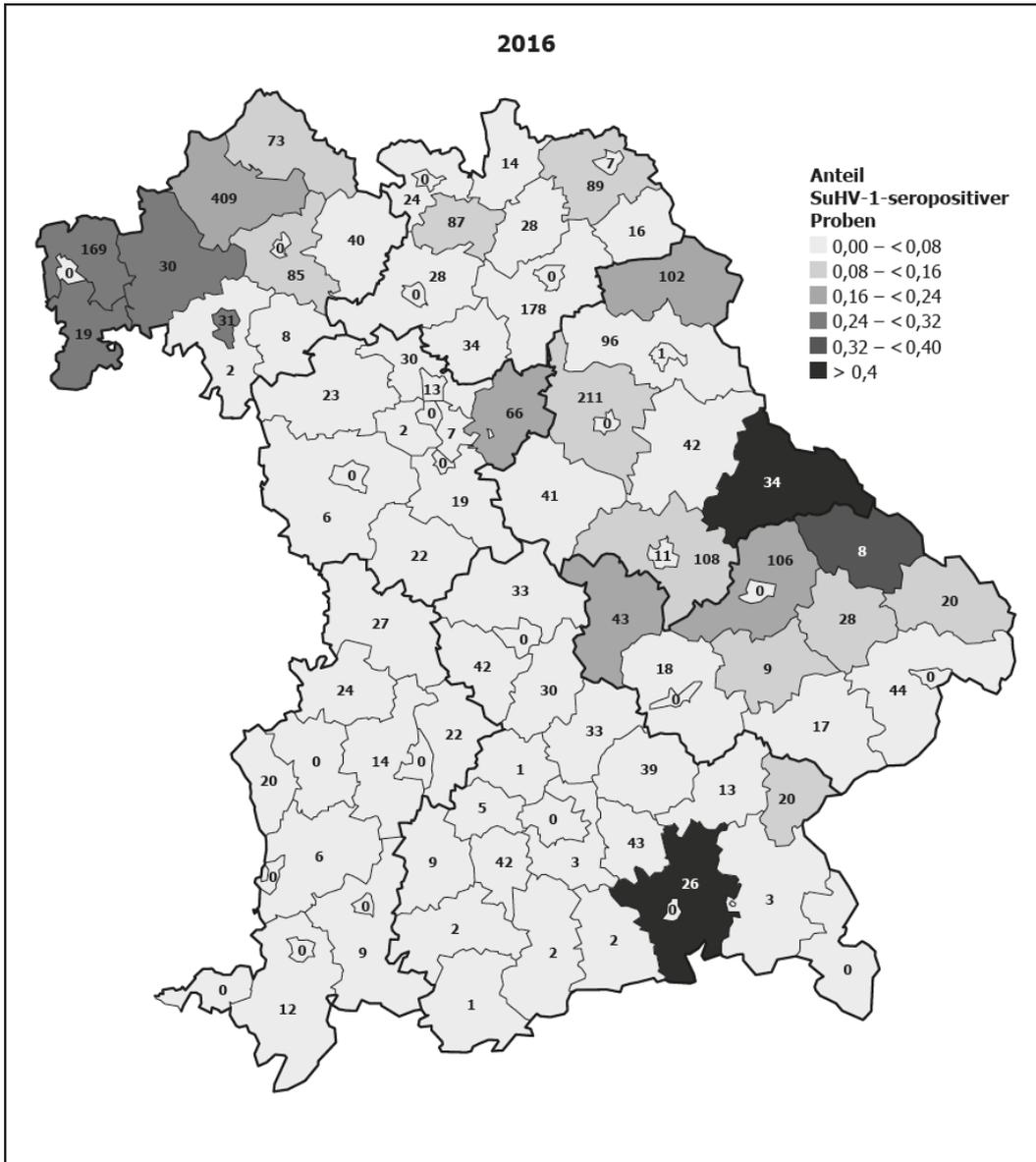
Nahrungsquelle. Die Tiere hätten dann unabhängig voneinander Kontakt zu H5N8 gehabt.

Obwohl bayerische Wildschweine im Winter 2016/2017 zahlreiche Kontaktmöglichkeiten zu Kadavern von aufgrund der HPAI-Panzootie verendeter Vögel hatten, fand eine Infektion der Tiere mit IAV vom Subtyp H5N8 nicht in einem solchen Maße statt, dass direkt ein Einfluss auf die IAV-Gesamtprävalenz resultierte. Im Gegenteil, die Prävalenz sank in Südbayern sogar. Die Frage, ob der Subtyp H5N8 sich in der Population etablieren konnte oder ob neue Reassortanten entstanden, muss Gegenstand weiterer Arbeiten sein. Wichtiges Ergebnis der Arbeit bleibt jedoch, dass es zu einem intensiven Kontakt zwischen Wildschwein und HPAIV kam und dass somit jederzeit die Gefahr besteht, dass Speziesbarrieren in der bayerischen Wildschweinpopulation überwunden werden und auch neue Viren, vielleicht sogar mit erheblichem zoonotischen Potential, entstehen. Die Notwendigkeit einer kontinuierlichen Überwachung wird durch diese Daten bestärkt.

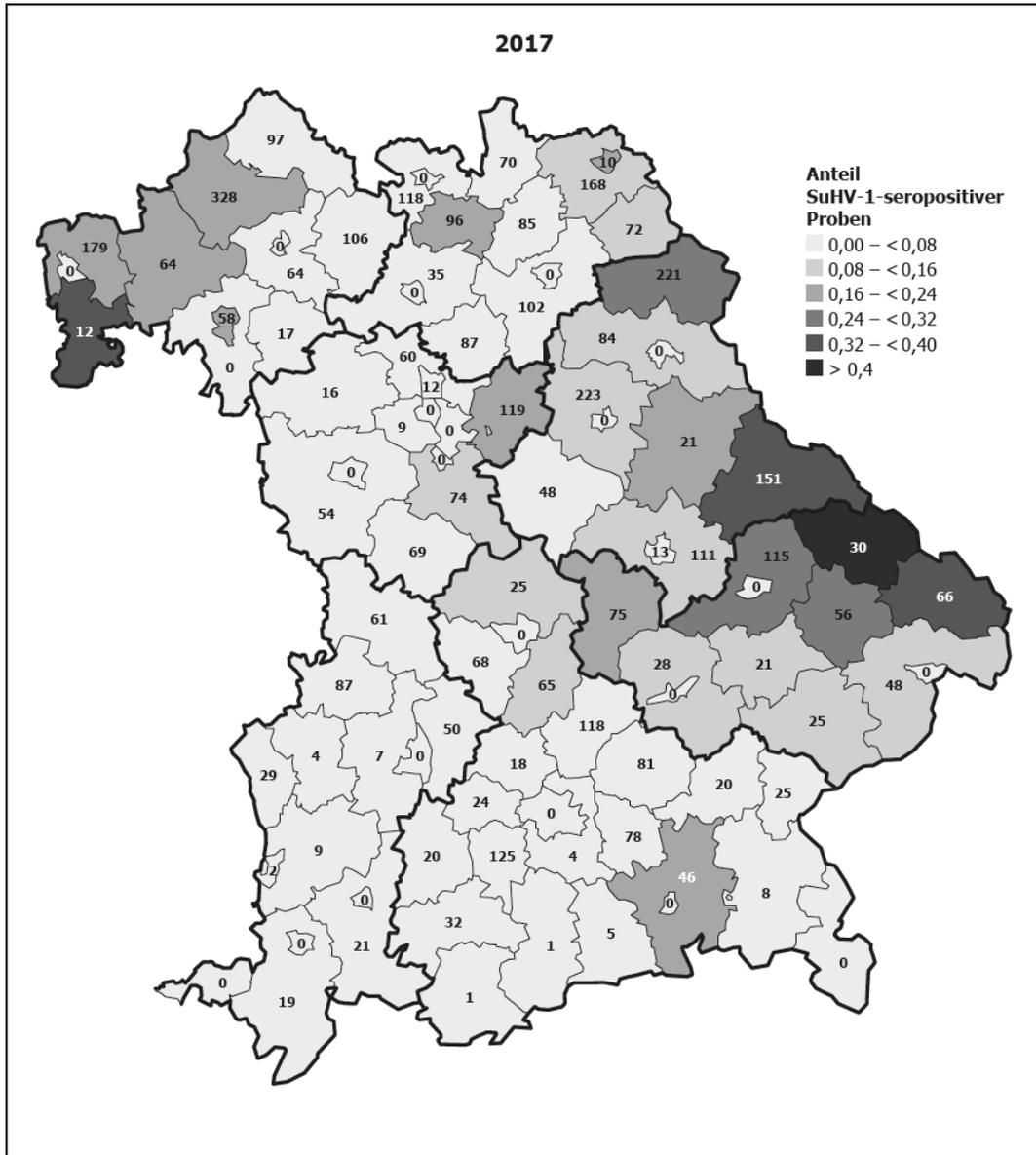
3.3. Vergleich der regionalen Verbreitung und der Seroprävalenzen von IAV- mit SuHV-1-Infektionen im Schwarzwild

Eine Wildtierart, innerhalb der ein Pathogen eine stabile Zirkulation etabliert, sodass stets die Gefahr der Übertragung auf domestizierte Tierarten besteht, bildet ein Reservoir (RUIZ-FONS et al., 2008). Wildschweine gelten als potenzielles Reservoir nicht nur für IAV, sondern auch für zahlreiche weitere Krankheitserreger, darunter *Brucella spp.*, *Salmonella spp.*, *porcine Parvoviren* oder SuHV-1 (RUIZ-FONS et al., 2008; MONTAGNARO et al., 2010). Zwei groß angelegte Monitoringstudien zwischen 1985 und 2015 zeigen die Ausbreitung von SuHV-1 Infektionen innerhalb Deutschlands (PANNWITZ et al., 2012; DENZIN et al., 2020). Das Bayerische Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit führt seit 2012 ein bayernweites serologisches SuHV-1 Monitoring im Schwarzwild durch (LANDESAMT FÜR GESUNDHEIT UND LEBENSMITTELSICHERHEIT, 2019). Ein Teil der Daten des bayerischen Landesamtes für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit, nämlich Daten der Jahre 2012 bis 2015 wurde durch Denzin et al. bereits publiziert. Die kompletten Untersuchungsdaten der Jahre 2014 bis 2018 wurden im Rahmen dieser Arbeit erstmalig im Detail ausgewertet und die Ergebnisse sind in Abb. 11a-e dargestellt.

c



d



e

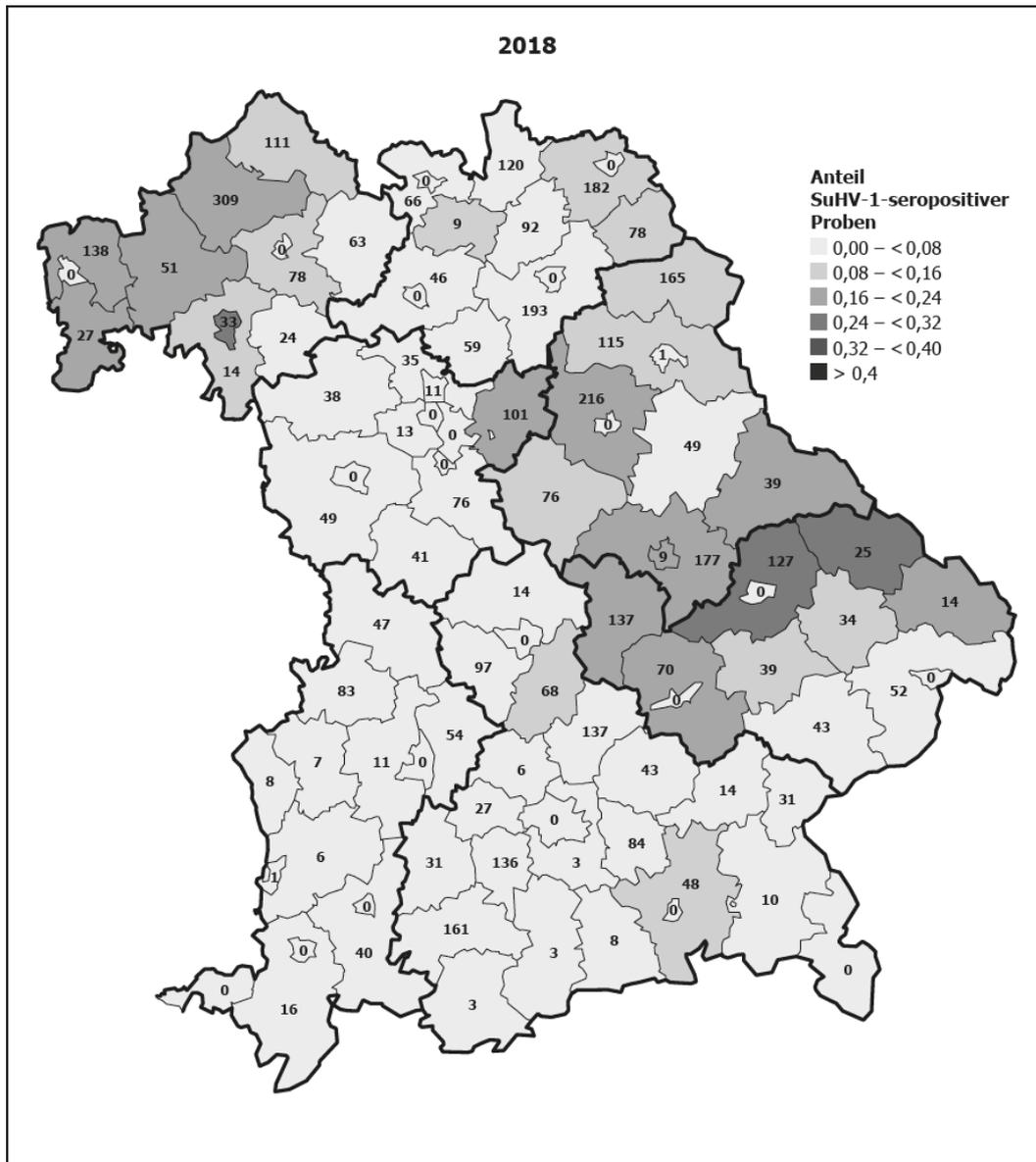


Abb. 11: Regionale Verteilung der in den Jahren 2014 – 2018 (a-e) im Rahmen des bayerischen Wildschwein-Monitorings detektierten SuHV-1 Infektionen im Schwarzwild: Die Daten des am Bayerischen Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit durchgeführten Monitorings wurden für diese Darstellung ausgewertet. Der relative Anteil SuHV-1-Antikörper positiver Proben ist, wie den Legenden zu entnehmen ist, auf Landkreisebene dargestellt. Die Anzahl der pro Landkreis untersuchten Proben ist jeweils angegeben. Karten wurden unter Verwendung der Softwarepakete GfK RegioGraph und Adobe Indesign CC 2018 sowie Illustrator CC 2019 generiert.

3.3.1. Einfluss von Alter und Geschlecht auf die SuHV-1-Seroprävalenz bayerischer Wildschweine vergleichend mit jenem auf die IAV-Seroprävalenz

Ebenso wie IAV werden auch SuHV-1 im Wesentlichen über die oronasale Route übertragen (BARTHOLD et al., 2011), was einen engen Körperkontakt voraussetzt. Das Virus wird allerdings unter günstigen Bedingungen auch mehrere Kilometer weit mit der Luft getragen (STÄRK, 1999). Bedingung hierfür sind jedoch relativ hohe Viruslasten, wie sie z. B. durch einen infizierten Bestand generiert werden. Männliche Wildschweine leben ab dem Erreichen des Überläuferalters im Wesentlichen als Einzelgänger, entsprechend wurden bei ihnen in der Vergangenheit niedrigere SuHV-1-Seroprävalenzen festgestellt (JRIDI et al., 1996; VICENTE et al., 2005). Der Zusammenhang zwischen Geschlecht und/oder Alter zur SuHV-1-Seroprävalenz in Bayern sollte in der vorliegenden Arbeit ausgewertet werden und mit den entsprechenden epidemiologischen Aspekten der IAV-Infektionen verglichen werden.

3.3.1.1. Ergebnisse

Das Geschlecht des zugehörigen Tieres war für 993 der im Rahmen dieser Arbeit analysierten Wildschweinseren bekannt (SCHÜLEIN et al., 2021). 9,82% der männlichen Tiere (n = 489; CI 7,18-12,45%) sowie 7,14% der weiblichen Tiere (n = 504; CI 4,89-9,39%) hatten Antikörper gegen SuHV-1 gebildet (Daten aus dem Wildschweinmonitoring des Bayerischen Landesamts für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit). Der Pearson-Chi²-Test auf Unterschiede lieferte kein statistisch signifikantes Ergebnis (p-Wert > 0,05).

Von insgesamt 486 männlichen Wildschweinen war die Altersgruppe bekannt. 12,99% (CI 9,37-16,61%; n = 331) der Tiere ab zwölf Monaten, aber nur 3,23% (CI 0,44-6,01%; n = 155) aller männlichen Frischlinge hatten Antikörper gegen IAV (Daten aus dem Wildschweinmonitoring des Bayerischen Landesamts für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit). Dieser Unterschied ist statistisch signifikant (p < 0,05).

3.3.1.2. Diskussion

Die Verteilung der SuHV-1-Seroprävalenzen zwischen den Geschlechtern entspricht interessanterweise den Ergebnissen der IAV-Arbeiten. Wie in der Publikation Schülein et al. dargelegt wird, wurden ebenfalls insgesamt bei 9,82%

(CI 7,18-12,45%) der bekannt männlichen Tiere sowie bei 8,73% (CI 6,27-11,19%) der weiblichen Tiere Antikörper gegen IAV detektiert. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung ist, dass die wesentliche Eintrittspforte für beide Infektionen im Respirationstrakt liegt und dass die Übertragung dieser Infektionen vor allem bei engem Kontakt effektiv stattfinden.

Eine geringere SuHV-1-Seroprävalenz bei männlichen Wildschweinen ab einem Alter von zwölf Monaten, wie aus der Literatur bekannt (JRIDI et al., 1996; VICENTE et al., 2005) konnte in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht beobachtet werden. Möglicherweise spielt hierfür auch die Dynamik der lokalen Populationen in den besonders betroffenen nördlichen und östlichen bayerischen Landkreisen (sh. Abb. 11) eine Rolle. Ein einmal mit SuHV-1 infiziertes Tier bleibt lebenslang infiziert und das Virus kann jederzeit zu einer akuten Infektion reaktivieren. Eine sichere Folge dieser Eigenschaft ist eine erhöhte Seroprävalenz mit steigendem Alter. Über die Ursachen für die im ausgewerteten Analysezeitraum in Bayern nachgewiesenen, für ein Alphaherpesvirus dennoch eher moderat erscheinenden Seroprävalenzen und Ausbreitungstendenzen kann bislang nur spekuliert werden. Möglich wäre, dass die Reaktivierung der zirkulierenden SuHV-1-Isolate ein eher seltenes Ereignis ist, oder dass der Kontakt der innerhalb und zwischen den Wildschweinpopulationen besteht, nicht eng genug ist und Infektionsketten so abreißen. Denkbar ist auch, dass der Eintrag der SuHV-1 Infektionen von Osten und Norden nach Bayern noch relativ neu ist (PANNWITZ et al., 2012) und erst nach weiterer, langsamer Etablierung der Infektionen in der Population eine weitere Ausbreitung folgen wird. Die kontinuierliche Analyse der Daten des Wildschweinmonitorings wird hierüber Aufschluss geben.

3.3.2. Einfluss von Wild- und Hausschweindichte auf die SuHV-1 Seroprävalenz bayerischer Wildschweine vergleichend mit jenem auf die IAV-Seroprävalenz

Wie in Kapitel IV.3.2.1. ausgeführt, wurde bereits ein möglicher Einfluss der Wildschweindichte auf die IAV-Seroprävalenzen bayerischer Wildschweine auf Ebene der Regierungsbezirke untersucht. Trotz eines positiven Korrelationskoeffizients von 0,59 wurde kein offensichtlicher Zusammenhang zwischen diesen beiden Parametern festgestellt. Als ein weiterer Aspekt der Epidemiologie von SuHV-1-Infektionen sollte daher auch der Einfluss der Wildschweindichte auf die SuHV-1-Seroprävalenz bayerischer Wildschweine auf

Ebene der Regierungsbezirke untersucht und mit dem auf die IAV-Seroprävalenz verglichen werden.

Gleichzeitig sollte evaluiert werden, ob mit einem Einfluss der Präsenz und Dichte von Hausschweinen auf das SuHV-1-Infektionsgeschehen bayerischer Wildschweine zu rechnen ist. Auch dieser sollte dem Einfluss dieser Faktoren auf die IAV-Seroprävalenz bayerischer Wildschweine gegenübergestellt werden.

3.3.2.1. Ergebnisse

Die Wildschweindichte wurde anhand der durch das Bayerische Staatsministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten publizierten Schwarzwildstrecke 2018 (WILDTIERPORTAL BAYERN) geschätzt. Der Zusammenhang zwischen der Wildschweindichte und der SuHV-1-Seroprävalenz der einzelnen Regierungsbezirke ist in Tab. 8 und Abb. 12 dargestellt.

Tab. 8: Gegenüberstellung der Schwarzwildstrecke 2018* und der SuHV-1-Seroprävalenz** bei 2018 erlegten Wildschweinen

Regierungsbezirk	Schwarzwildstrecke 2018*	SuHV-1-Seroprävalenz**
Oberbayern	7.647	1,62%
Niederbayern	4.452	19,96%
Schwaben	5.990	0%
Oberpfalz	10.731	17,36%
Mittelfranken	5.518	5,49%
Unterfranken	18.804	16,63%
Oberfranken	12.313	6,47%

* WILDTIERPORTAL BAYERN

** Die Ergebnisse der im Rahmen des serologischen SuHV-1-Monitorings durch das Bayerische Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit durchgeführten SuHV-1-ELISAs standen für die Analysen dieser Arbeit zur Verfügung.

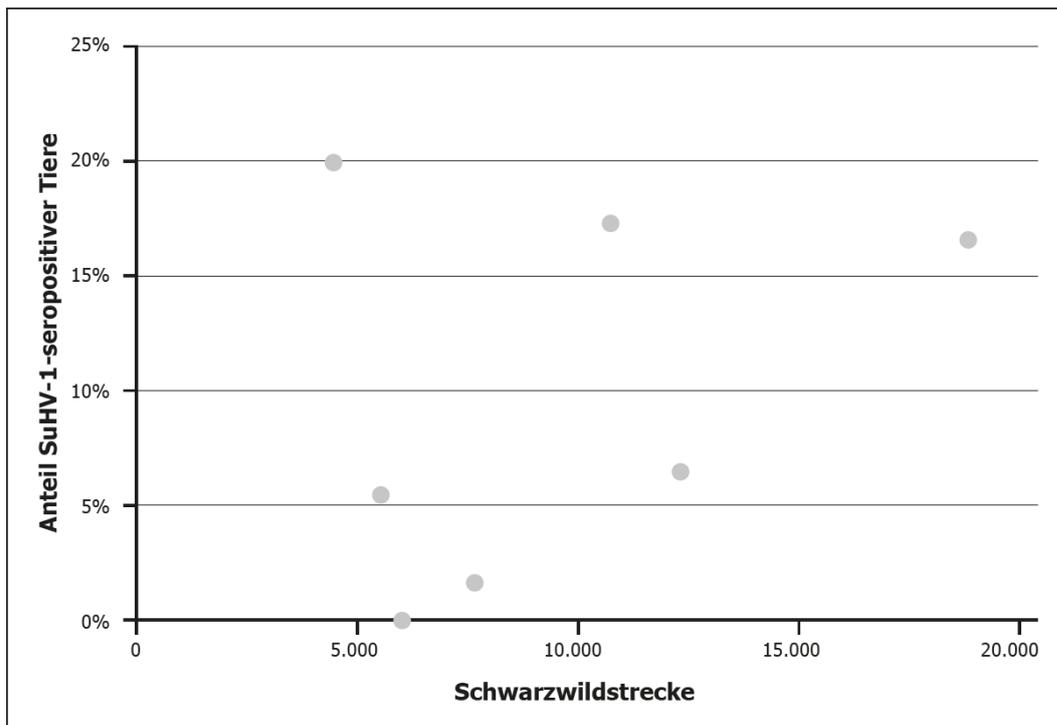


Abb. 12: Zusammenhang zwischen der Schwarzwildstrecke 2018 und der SuHV-1-Seroprävalenz. Die X-Achse stellt die Schwarzwildstrecke in den Regierungsbezirken dar, die Y-Achse den Anteil SuHV-1-seropositiver Tiere. Ein Datenpunkt repräsentiert die Ergebnisse für einen Regierungsbezirk. Die Grafik wurde unter Verwendung der durch das Bayerische Staatsministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten publizierten Schwarzwildstrecke 2018 (WILDTIERPORTAL BAYERN) sowie der am Bayerische Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit erhobenen Daten zur SuHV-1-Seroprävalenz und unter Verwendung der Softwarepakete Adobe Indesign CC 2018 sowie Illustrator CC 2019 generiert.

Die Korrelation nach Pearson zwischen der SuHV-1-Seroprävalenz und der Wildschweindichte einer Region wurde ebenso wie zwischen der IAV-Seroprävalenz und der Wildschweindichte (sh. Kapitel IV.3.2.1.) bestimmt. Zwischen der für das Jahr 2018 festgestellten SuHV-1-Seroprävalenz auf Ebene der bayerischen Regierungsbezirke (Daten aus dem Wildschweinmonitoring des Bayerischen Landesamts für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit) und der geschätzten Wildschweindichte besteht rechnerisch ein positiver linearer Zusammenhang (Korrelationskoeffizient = 0,32). Wie aus der Abb. 12 zu ersehen, ist der Zusammenhang aber nicht für alle Regierungsbezirke darstellbar, gerade in den Regierungsbezirken mit einer Schwarzwildstrecke von bis zu 10.000 Tieren schwankt der Anteil SuHV-1-seropositiver Tiere zwischen 0% und 19,96% (sh. auch Tab. 8). Vergleicht man mit diesen Daten den Zusammenhang zwischen der IAV-Seroprävalenz in bayerischen Regierungsbezirken und der Wildschweindichte (Korrelationskoeffizient = 0,59 (sh. Kapitel IV.3.2.1)), so ist die Korrelation dort

zwar rechnerisch geringfügig stärker ausgeprägt, aber genauso wenig über alle Regionen Bayerns nachzuvollziehen. Im Gegensatz zu den IAV- ist für SuHV-1-Infektionen jedoch eine regionale Ausbreitung und Verteilung in der Literatur beschrieben (PANNWITZ et al., 2012; DENZIN et al., 2020) und auch für Bayern klar nachzuvollziehen (sh. Abb. 11).

3.3.2.2. Diskussion

In Deutschland wurde zwischen 1985 und 2008 eine kontinuierliche, wenn auch langsame Ausbreitung der Prävalenz SuHV-1-spezifischer Antikörper innerhalb der Wildschweinpopulation von Ost- nach Westdeutschland beobachtet, gleichzeitig stieg die Gesamtseroprävalenz deutlich (PANNWITZ et al., 2012). In den Jahren 2014 bis 2018 wurde dagegen bayernweit (Daten aus dem Wildschweinmonitoring des Bayerischen Landesamts für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit; Abb. 11) und deutschlandweit (DENZIN et al., 2020) deutlich, dass sich die SuHV-1-Seroprävalenzen bezogen auf Gebiet und Zeitraum nur geringfügig ändern. Im Gegensatz dazu ist bei der IAV-Seroprävalenz keine solche Konstanz zu erkennen: Seroprävalenzen können zwischen einzelnen Beprobungszeiträumen starken Schwankungen unterliegen (sh. Kapitel IV.3.1.; SCHÜLEIN et al., 2021) und auch darüber, in welchen Gebieten besonders viele seropositive Tiere zu erwarten sind, lässt sich nicht auf Grundlage vergangener Daten eine sichere Aussage treffen (sh. Kapitel IV.3.2.3.). Dies kann, zumindest im Falle neu in der Population auftretender IAV-Subtypen, auch daran liegen, dass IAV auch Zugvögel und Menschen infizieren können, wodurch das Virus über weite Strecken getragen werden kann (WEBSTER et al., 1992). Voraussetzung für die Infektion von Wildschweinen durch diese IAV ist die Anpassung der Viren an den neuen Wirt. So kam es im letzten Jahrhundert zur Etablierung der „avian-like“ Variante des Subtyps H1N1 innerhalb der Haus- und Wildschweinpopulation, nachdem die Infektion durch ein „Wildenten-Virus“ erfolgte (PENSAERT et al., 1981), und auch die in der vorliegenden Arbeit detektierten Antikörper gegen den Subtyp H5N8 (SCHÜLEIN et al., 2021) sind auf Zugvögel aus Osteuropa zurückzuführen (NAPP et al., 2018). Gleichzeitig unterscheidet sich die Tenazität von IAV von der von SuHV-1: Während IAV in organischem Material gerade bei höheren Umgebungstemperaturen nur für wenige Tage infektiös bleiben (NAZIR et al., 2011), halten sich SuHV-1 dort mehrere Wochen (CZYZEWSKA & POMORSKA-MOL, 2017). Ein wichtiger epidemiologischer Unterschied folgt aus

der bereits in Kapitel II.3. erwähnten Latenz der Herpesviren: Nach einer SuHV-1 Erstinfektion bleibt der Wirt lebenslang infiziert und kann jederzeit wieder Virus ausscheiden und innerhalb der Population übertragen, ein Neueintrag von außen ist nicht nötig (BARTHOLD et al., 2011). IAV dagegen ist bereits nach wenigen Tagen im Wirt nicht mehr nachweisbar (HEINRITZI, 2006). Auch ein mit IAV infiziertes Individuum kann das Virus auf seine Rotte übertragen, innerhalb der Rotte kann die Infektiosität auch einige Tage bestehen, aber nach Abschluss bricht die Infektionskette ab.

Deutsche Hausschweinbestände gelten seit 2003 als frei von der Aujeszky'schen Krankheit. Ein Ausbruch, der auf eine Einschleppung durch Wildschweine zurückgeführt werden kann, wurde darüber hinaus nie für Deutschland dokumentiert (MÜLLER et al., 2003). Stattdessen deutet die Vielfalt an zirkulierenden Stämmen in europäischen Wildschweinpopulationen eher auf mehrere Ereignisse hin, bei denen SuHV-1 von Hausschweinen auf Wildschweine übertragen wurden (MÜLLER et al., 1998; MÜLLER et al., 2010). Entsprechendes wurde für IAV beobachtet: zum einen scheinen IAV vom Subtyp H3N2 in der nordamerikanischen Razorbackpopulation etwa zur selben Zeit H1N1 in seiner Rolle als dominierender Subtyp ersetzt zu haben wie es in Hausschweinbeständen der Fall war (sh. Kapitel II.2.2.4.). Zum anderen wurden in der bayerischen Wildschweinpopulation Antikörper gegen nahezu alle Subtypen von IAV detektiert, die auch in europäischen Hausschweinbeständen vorkommen (SCHÜLEIN et al., 2021).

4. Untersuchung von Lungengewebe und Nasentupfern erlegter und tot aufgefundener Wildschweine mittels PCR

Um derzeit in bayerischen Wildschweinpopulationen zirkulierende IAV exakt zu charakterisieren, sollte auch versucht werden, IAV in Proben tot aufgefundener Tiere zu detektieren. Infektionen durch IAV beschränken sich beim Säuger in aller Regel auf den Respirationstrakt (sh. Kapitel II.1.6.). Daher wird der Genomnachweis beim Hausschwein aus Nasentupfern erkrankter bzw. aus dem Lungengewebe toter Tiere durchgeführt (ZHANG & HARMON, 2014).

4.1. Methoden und Ergebnisse

Für die molekularvirologischen Arbeiten wurde in der vorliegenden Arbeit eine Echtzeit-Reverse-Transkriptase-PCR (RT-PCR) der Firma QIAGEN Leipzig GmbH (später INDICAL BIOSCIENCE) nach Herstelleranweisung verwendet. Das Kit amplifiziert konservierte Genombereiche, sodass nach Herstellerangaben ein breites Spektrum von IAV Genotypen detektiert werden kann. Als interne Kontrolle für die Extraktion und die PCR dient die Amplifikation von im Probenmaterial vorhandenen Sequenzen eines zellulären Gens. Zuvor erfolgte die Extraktion mittels QIAamp Viral RNA Mini Kit bzw. RNeasy® Fibrous Tissue Mini Kit nach Herstelleranweisung. Nach Vorgabe der Verordnung zur Durchführung eines Monitorings auf das Virus der Klassischen und der Afrikanischen Schweinepest bei Wild- und Hausschweinen (BUNDESMINISTERIUM DER JUSTIZ UND FÜR VERBRAUCHERSCHUTZ; BUNDESAMT FÜR JUSTIZ, 2016) sind auch Proben verwendet aufgefundener oder auffällig erlegter Wildschweine zu untersuchen. Von 35 solcher Tiere stand Material, Lungengewebe oder Nasentupfer, für die Untersuchungen auf S-IAV zur Verfügung. Es handelte sich um Tiere, die zwischen 2018 und 2021 in den bayerischen Landkreisen Cham (n = 1), Eichstätt (n = 4), Donau-Ries (n = 2), Neumarkt in der Oberpfalz (n = 9), Ebersberg (n = 2), Straubing-Bogen (n = 1), München (n = 3), Neu-Ulm (n = 1), Starnberg (n = 3), Freising (n = 1), Ostallgäu (n = 3), Neuburg-Schrobenhausen (n = 2), Pfaffenhofen (n = 1), Dillingen an der Donau (n = 1) und Fürstenfeldbruck (n = 1) erlegt oder tot aufgefunden worden waren. Lediglich in einer der insgesamt 35 Proben wurde IAV-Genom detektiert. Die Genomlast in der Probe eines Wildschweines aus Seefeld (Landkreis Starnberg) war jedoch für weitere Untersuchungen und eine Subtypbestimmung zu gering, erst nach 39 Zyklen überschritt die Fluoreszenz den Schwellenwert. Das Ergebnis zeigt aber, dass prinzipiell der Nachweis von IAV aus Lungengewebe verwendeter Wildschweine in Bayern gelingen kann.

4.2. Diskussion

In vorangegangenen Studien wurde aus Nasentupfern (VITTECOQ et al., 2012; FENG et al., 2014; DELOGU et al., 2019) bzw. Lungen (KADEN et al., 2008; FONI et al., 2013) erlegter Wildschweine und Razorbacks mittels RT-PCR IAV-Genom in 0% bis 3,39% der untersuchten Proben detektiert. Bei einer zufälligen Auswahl von Wildschweinen ist der Anteil an zu diesem Zeitpunkt akut IAV-

infizierten Tieren gering. Von Schweinen ist bekannt, dass sie nach einer IAV-Infektion das Virus nur für maximal acht bis zehn Tage ausscheiden (HEINRITZI, 2006; POMORSKA-MOL et al., 2014). Zudem kann die Möglichkeit, dass das zu untersuchende Probenmaterial Substanzen enthält, welche die Nukleinsäureamplifikation inhibieren, nicht ausgeschlossen werden. So wurden bei mehr als der Hälfte der von Kaden et al. mittels RT-PCR untersuchten Proben die zugegebenen Amplifikations-Kontrollsequenzen nicht nachgewiesen (KADEN et al., 2008). Generell führt eine Infektion mit IAV trotz des dramatischen Krankheitsbildes beim Hausschwein nur bei sehr wenigen Tieren zum Tod (VAN REETH et al., 2012). Somit resultiert aus der Untersuchung tot aufgefunder Wildschweine keine positive Selektion – andere Todesursachen sind wahrscheinlicher.

Zusammenfassend gelang aus keiner der in der vorliegenden Arbeit mittels RT-PCR untersuchten Proben eine Subtyp-Bestimmung, wenn auch Genom detektiert wurde. Weitere Arbeiten werden darauf ausgerichtet sein Material vom oberen Respirationstrakt, insbesondere im Winter und von wenig autolytischen Tieren, zu untersuchen. Von besonderem Interesse werden Proben von Tieren sein, die in Regionen gefunden wurden, in denen viele Wildvögel vorkommen und verenden.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Die bedeutendsten Influenza A-Pandemien des letzten Jahrhunderts lassen sich auf eine Überschreitung von Speziesbarrieren zurückführen. Influenza A Viren (IAV), die ursprünglich an Vögel oder Schweine adaptiert waren, replizierten dann effizient im Mensch. Gerade Schweine werden als wichtiger Zwischenwirt, in dem humane und aviäre IAV (AIV) zu neuen Viren reassortieren können, diskutiert. Während erwiesen ist, dass in bayerischen Hausschweinbeständen nach der H1N1-Pandemie 2009 neue Reassortanten entstanden und aktuell zirkulieren, war über die IAV-Situation in der Wildschweinpopulation vor Beginn dieser Arbeit wenig bekannt. Im Gegensatz zu den Hausschweinen in Bayern haben Wildschweine ungehindert Kontakt zu anderen Wildtieren, darunter Wildvögeln, so dass eine Übertragung von AIV denkbar wäre. Zwar werden AIV-Infektionen weltweit sehr selten bei Wildschweinen nachgewiesen, die Panzootie mit dem HPAI H5N8 2016/2017 betraf jedoch sehr viele Vögel nahezu gleichzeitig und die Sterblichkeit und Viruslasten waren sehr hoch. Damit war die Wahrscheinlichkeit eines Kontaktes von Wildschweinen zu HPAIV H5N8 deutlich gestiegen. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, in einem ersten Schritt einen allgemeinen Überblick über die Verbreitung von IAV-Infektionen in der bayerischen Wildschweinpopulation zu erhalten. Zusätzlich sollte ein Einfluss der H1N1-Pandemie 2009 und der HPAI-Panzootie 2016/2017 auf zirkulierende Subtypen untersucht werden.

Um statistisch valide Aussagen treffen zu können, wurde ein Stichprobenplan erstellt und die ausgewählten Proben anhand von Herkunft und Probenahmedatum so unterteilt, dass IAV-Seroprävalenzen auf Ebene der Regierungsbezirke und zudem für die südlichen Regierungsbezirke zwischen den Jahren vor und nach dem Ausbruch der HPAI-Panzootie 2016/2017 verglichen werden konnten. Um Antikörper gegen IAV zu bestimmen, wurde ein hierarchisches Testregime aus Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA), Hämagglutinationshemmtest (HAH) und Serumneutralisationstest (SNT) angewendet. Die für die Subtypisierung verwendeten Antigene repräsentierten gegenwärtig in der Hausschweinpopulation zirkulierende sowie IAV der Subtypen H1N1, H1N2, H3N2, H1pdmN1, H1pdmN2, sowie HPAIV der H5N8 Panzootie und niedrigpathogene AIV vom Subtyp H5N3.

Die in dieser Arbeit in der bayerischen Wildschweinpopulation bestimmten IAV-Seroprävalenzen variierten je nach Regierungsbezirk und Untersuchungszeitraum zwischen 1,44% (CI 0-3,42%) und 12,59% (CI 7,15-18,02%). Antikörper gegen alle aus den bayerischen Hausschweinebeständen bekannten Subtypen wurden nachgewiesen, mit Ausnahme von H3N2. Auch Antikörper gegen neue und rekombinante Viren der Subtypen H1pdmN1 und H1pdmN2 wurden diagnostiziert und somit eine parallele Entwicklung zwischen Haus- und Wildschweinbeständen gezeigt. Interessanterweise wurden zum ersten Mal Antikörper gegen HPAIV vom Subtyp H5N8 bei Wildschweinen aus Oberbayern festgestellt. Ob es sich hierbei um singuläre Infektionen oder Kontakte handelte oder ob sich der Subtyp H5N8 bzw. neue Reassortanten nun in der Population etablieren, wird in weiteren Arbeiten geklärt. Verschiedene epidemiologische Aspekte der IAV-Infektionen wurden im Laufe der Arbeit analysiert. Den deutlichsten Einfluss auf die Wahrscheinlichkeit, in einer Serumprobe Antikörper gegen IAV zu detektieren, hatte das Lebensalter. Die IAV-Seroprävalenz war in den Proben von adulten Wildschweinen mit 12,20% (CI 8,11-16,28%) höher als in denen von Überläufern (6,30%; CI 4,19-8,41%) oder Frischlingen (4,97%; CI 2,99-6,95%). Dieser Unterschied war statistisch signifikant.

Es konnte gezeigt werden, dass die HPAI-Panzootie nicht zu einem prinzipiellen Anstieg der IAV-Seroprävalenz in der bayerischen Wildschweinpopulation führte. Stattdessen sank in den Regierungsbezirken Oberbayern, Niederbayern und Schwaben die IAV-Gesamtseroprävalenz sogar von 9,53% (CI: 6,76-12,31%) in den Jahren vor der HPAI-Panzootie 2016/2017 auf 5,16% (CI: 3,06-7,27%) in den Jahren danach. Jedoch konnte erstmals belegt werden, dass sich bayerische Wildschweine sowohl mit den Subtypen und resultierenden Reassortanten der H1N1-Pandemie 2009 als auch mit AIV der HPAI-Panzootie 2016/2017 in Wildvögeln auseinandersetzen. Dies spricht für eine deutliche Zunahme der Diversität an IAV-Subtypen und Reassortanten in der Population.

Ein Zuwachs an Diversität zirkulierender IAV-Subtypen in einer Wirtspopulation steigert die Wahrscheinlichkeit, dass neue Reassortanten und Mutanten entstehen. Vor dem Hintergrund des zoonotischen Potenzials von IAV unterstreichen diese wichtigen Ergebnisse der vorgelegten Arbeit die Notwendigkeit eines kontinuierlichen Monitorings gerade auch bei Wildtieren, die ohne Biosicherheitsmaßnahmen im Kontakt zu anderen wichtigen IAV-Wirten stehen.

VI. SUMMARY

The most devastating Influenza A pandemics of the past century were caused by Influenza A viruses (IAV) crossing species barriers. Viruses originally adapted to replication in birds and swine were then transmitted from human to human with the new host being immunologically naïve. Apart from spontaneous point mutations, another important mechanism leading to genetic changes is the reassortment, an exchange of RNA-segments between genetically distinct, coinfecting viruses. As swine are susceptible not only to swine IAV (S-IAV) but also human and avian IAV (AIV), they are considered as “mixing vessels” in which reassortment might be facilitated, thus causing the emergence of novel viruses that easily replicate in humans and are highly pathogenic at the same time. It is well known that following the spread of H1N1pdm2009, the genetic variability of S-IAV in domestic swine increased worldwide, including Bavaria. Prior to this study, the IAV-situation in Bavarian wild boar remained largely unknown. As this population shares its habitat with wild birds, the transmission of AIV to wild boar seems possible, although the establishment of stable infection chains in swine are extremely rare events. Considering the great impact the highly pathogenic AIV (HPAIV) H5N8 panzootic of 2016/17 had on birds of countless species worldwide, including a wide spread also in Bavaria, the threat posed by these infections should however not be completely neglected. Therefore, the aim of this study was to provide initial information regarding IAV-infections in Bavarian wild boar. Additionally, the impact of the recent pandemic and panzootic on seroprevalences and subtype specificity was assessed.

IAV-seroprevalences were determined for each of the seven administrative districts of Bavaria. For the southern administrative districts, seroprevalences before and after the HPAI panzootic were compared. To determine and differentiate IAV specific antibodies, a hierarchical test regime was applied, comprising enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), hemagglutination inhibition assay (HI) and serum neutralization test (SNT). The antigens used for subtyping represented currently circulating S-IAV subtypes H1N1, H1N2, H3N2, H1pdmN1, H1pdmN2 as well as HPAIV H5N8, circulating during the panzootic 2016/17, and low pathogenic AIV subtype H5N3.

Relative to administrative district and time period, IAV-seroprevalences varied markedly from 1.44% (CI 0-3.42%) to 12.59% (CI 7.15-18.02%). Antibodies to all subtypes already known to circulate in Bavarian domestic pigs but H3N2 were detected. This also includes the novel subtypes H1pdmN1 and H1pdmN2 which had been introduced into swine herds recently, suggesting a transmission between wild boars and domestic pigs. Interestingly, for the first time the presence of H5N8 specific antibodies was demonstrated in wild boar originating from Upper Bavaria. It will be the aim of further studies to analyse the future impact of these viruses on the epidemiological situation in the wild boar population in Bavaria. Various epidemiologic aspects of IAV-infections were analysed. Of all aspects considered, the age had the greatest impact on the probability of a sample to be seropositive. The seroprevalence calculated for samples from adult boar (12.20%; CI: 8.11-16.28%) was higher than that for the group of the sub adults (6.30%; CI: 4.19-8.41%) and the young boar (4.97%; CI: 2.99-6.95%). This difference was statistically significant (p -value < 0.05).

The HPAIV H5N8 panzootic did not result in an increased IAV-seroprevalence in Bavarian wild boar. On the contrary, the overall seroprevalence in the southern administrative districts Upper Bavaria, Lower Bavaria and Swabia decreased from 9.53% (CI 6.76-12.31%) during the years before the outbreak to 5.16% (CI 3.06-7.27%) in the years following the panzootic. However, it was shown for the first time that Bavarian wild boar were confronted not only with novel S-IAV subtypes arising from the H1N1-pandemic 2009 but also with AIV from the HPAIV H5N8 panzootic 2016/17. These results suggest a definite increase of the genetic diversity of IAV-subtypes in this population, leading to a higher probability of the emergence of novel reassortants and mutant viruses. Considering the zoonotic potential of IAV, the important data acquired in the framework of this study once again underline the necessity of a constant IAV monitoring in swine populations, be it wild or domestic.

VII. LITERATURVERZEICHNIS

Abdelwhab E-SM, Veits J, Mettenleiter TC. Genetic changes that accompanied shifts of low pathogenic avian influenza viruses toward higher pathogenicity in poultry. *Virulence* 2013; 4: 441-52.

Allen JD, Ross TM. H3N2 influenza viruses in humans: Viral mechanisms, evolution, and evaluation. *Human vaccines & immunotherapeutics* 2018; 14: 1840-7.

Animal Health Online. Frankreich meldet AK. 2020: <http://www.animal-health-online.de/gross/2020/12/01/frankreich-meldet-ak/34454/>. 17.12.2020.

Asha K, Kumar B. Emerging influenza D virus threat: What we know so far! *Journal of clinical medicine* 2019; 8: 192.

Baker SF, Nogales A, Finch C, Tuffy KM, Domm W, Perez DR, Topham DJ, Martínez-Sobrido L. Influenza A and B virus intertypic reassortment through compatible viral packaging signals. *Journal of virology* 2014; 88: 10778-91.

Barthold SW, Bowen RA, Hedrick RP, Knowles DP, Lairmore MD, Parrish CR, Saif LJ, Swayne DE. Herpesvirales. In: *Fenner's Veterinary Virology*, 4. edn. MacLachlan NJ, Dubovi EJ, eds. Amsterdam u. a.: Academic Press/Elsevier 2011: 189-215.

Bayerische Landesanstalt für Wald und Forstwirtschaft. Winter 2016/17: Trocken und sonnig. 2017: https://www.lwf.bayern.de/mam/cms04/bodenklima/dateien/a113_wks_winter.pdf. 28.01.2021.

Bayerisches Landesamt für Statistik. Agrarstrukturerhebung (Viehzählung). 2020: http://www1.bayern.landtag.de/www/ElanTextAblage_WP18/Drucksachen/Schriftliche%20Anfragen/18_0007813.pdf . 22.12.2020.

Beer M. Familie Orthomyxoviridae. In: Tiermedizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre. Selbitz H-J, Truyen U, Valentin-Weigand P, eds.: Enke 2015: 546-54.

Bourret V. Avian influenza viruses in pigs: An overview. *The Veterinary Journal* 2018; 239: 7-14.

Bouvier NM, Palese P. The biology of influenza viruses. *Vaccine* 2008; 26: D49-D53.

Bundesministerium der Justiz und für Verbraucherschutz; Bundesamt für Justiz. Verordnung über die Jagdzeiten. 1977: https://www.gesetze-im-internet.de/jagdzeitv_1977/JagdzeitV_1977.pdf. 03.02.2021.

Bundesministerium der Justiz und für Verbraucherschutz; Bundesamt für Justiz. Verordnung zur Durchführung eines Monitorings auf das Virus der Klassischen und der Afrikanischen Schweinepest bei Wildund Hausschweinen (Schweinepest-Monitoring-Verordnung SchwPestMonV) Bundesministerium der Justiz und für Verbraucherschutz, Bundesamt für Justiz, 2016: <https://www.gesetze-im-internet.de/schwpestmonv/BJNR251800016.html>. 12.08.2020.

Cano-Manuel FJ, Lopez-Olvera J, Fandos P, Soriguer RC, Perez JM, Granados JE. Long-term monitoring of 10 selected pathogens in wild boar (*Sus scrofa*) in Sierra Nevada National Park, southern Spain. *Veterinary Microbiology* 2014; 174: 148-54.

Castrucci MR, Donatelli I, Sidoli L, Barigazzi G, Kawaoka Y, Webster RG. Genetic reassortment between avian and human influenza A viruses in Italian pigs. *Virology* 1993; 193: 503-6.

Centers for Disease Control and Prevention. 2009 H1N1 Pandemic (H1N1pdm09 virus). 2019: <https://www.cdc.gov/flu/pandemic-resources/2009-h1n1-pandemic.html>.

Centers for Disease Control and Prevention. 1968 Pandemic (H3N2 virus). 2019: <https://www.cdc.gov/flu/pandemic-resources/1968-pandemic.html>.

Centers for Disease Control and Prevention. 1957-1958 Pandemic (H2N2 virus). 2019: <https://www.cdc.gov/flu/pandemic-resources/1957-1958-pandemic.html>.

Chamba Pardo FO, Alba-Casals A, Nerem J, Morrison RB, Puig P, Torremorell M. Influenza herd-level prevalence and seasonality in breed-to-wean pig farms in the Midwestern United States. *Frontiers in veterinary science* 2017; 4: 167.

Cho YY, Lim SI, Jeoung HY, Kim YK, Song JY, Lee JB, An DJ. Serological evidence for influenza virus infection in Korean wild boars. *J Vet Med Sci* 2015; 77: 109-12.

Choi YK, Nguyen TD, Ozaki H, Webby RJ, Puthavathana P, Buranathal C, Chaisingh A, Auewarakul P, Hanh NT, Ma SK, Hui PY, Guan Y, Peiris JS, Webster RG. Studies of H5N1 influenza virus infection of pigs by using viruses isolated in Vietnam and Thailand in 2004. *Journal of virology* 2005; 79: 10821-5.

Cleveland CA, DeNicola A, Dubey JP, Hill DE, Berghaus RD, Yabsley MJ. Survey for selected pathogens in wild pigs (*Sus scrofa*) from Guam, Marianna Islands, USA. *Vet Microbiol* 2017; 205: 22-5.

Closa-Sebastià F, Casas-Díaz E, Cuenca R, Lavín S, Mentaberre G, Marco I. Antibodies to selected pathogens in wild boar (*Sus scrofa*) from Catalonia (NE Spain). *European journal of wildlife research* 2011; 57: 977-81.

Conraths FJ, Fröhlich A, Gethmann J, Ziller M. Epidemiologische Untersuchungen in Tierpopulationen: Ein Leitfaden zur Bestimmung von Stichprobenumfängen. Friedrich-Loeffler-Institut, Wusterhausen und Greifswald-Insel Riems 2015.

Czyżewska E, Pomorska-Mol M. Aujeszky's Disease. In: *Emerging and Re-emerging Infectious Diseases of Livestock*. Bayry J, ed.: Springer 2017: 251-72.

de Boer GF, Back W, Osterhaus AD. An ELISA for detection of antibodies against influenza A nucleoprotein in humans and various animal species. *Archives of virology* 1990; 115: 47-61.

Deblanc C, Herve S, Gorin S, Cador C, Andraud M, Queguiner S, Barbier N, Paboeuf F, Rose N, Simon G. Maternally-derived antibodies do not inhibit swine influenza virus replication in piglets but decrease excreted virus infectivity and impair post-infectious immune responses. *Vet Microbiol* 2018; 216: 142-52.

Delogu M, Cotti C, Vaccari G, Raffini E, Frasnelli M, Nicoloso S, Biacchessi V, Boni A, Foni E, Castrucci MR, De Marco MA. Serologic and Virologic Evidence of Influenza A Viruses in Wild Boars (*Sus scrofa*) from Two Different Locations in Italy. *Journal of wildlife diseases* 2019; 55: 158-63.

Denzin N, Conraths FJ, Mettenleiter TC, Freuling CM, Muller T. Monitoring of Pseudorabies in Wild Boar of Germany-A Spatiotemporal Analysis. *Pathogens* 2020; 9.

Detmer S, Gramer M, Goyal S, Torremorell M, Torrison J. Diagnostics and surveillance for Swine influenza. *Curr Top Microbiol Immunol* 2013; 370: 85-112.

Dhingra MS, Artois J, Dellicour S, Lemey P, Dauphin G, Von Dobschuetz S, Van Boeckel TP, Castellan DM, Morzaria S, Gilbert M. Geographical and historical patterns in the emergences of novel highly pathogenic avian influenza (HPAI) H5 and H7 viruses in poultry. *Frontiers in veterinary science* 2018; 5: 84.

Fahrmeir L, Künstler R, Pigeot I, Tutz. *Statistik - Der Weg zur Datenanalyse*: Springer Berlin 2010.

Feng Z, Baroch JA, Long LP, Xu Y, Cunningham FL, Pedersen K, Lutman MW, Schmit BS, Bowman AS, Deliberto TJ, Wan XF. Influenza A subtype H3 viruses in feral swine, United States, 2011-2012. *Emerging infectious diseases* 2014; 20: 843-6.

Foni E, Garbarino C, Chiapponi C, Baioni L, Zanni I, Cordioli P. Epidemiological survey of swine influenza A virus in the wild boar population of two Italian provinces. *Influenza and other respiratory viruses* 2013; 7 Suppl 4: 16-20.

Fouchier RA, Munster V, Wallensten A, Bestebroer TM, Herfst S, Smith D, Rimmelzwaan GF, Olsen B, Osterhaus AD. Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls. *Journal of virology* 2005; 79: 2814-22.

Fraser C, Donnelly CA, Cauchemez S, Hanage WP, Van Kerkhove MD, Hollingsworth TD, Griffin J, Baggaley RF, Rambaut A, Pybus OG. Pandemic Potential of a Strain of Influenza A (H1N1): Early Findings. 2009.

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 RA, Pappas C, Alpuche-Aranda CM, Lopez-Gatell H, Olivera H, Lopez I, Myers CA, Faix D, Blair PJ, Yu C, Keene KM, Dotson PD, Jr., 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. Antigenic and genetic characteristics of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza viruses circulating in humans. *Science* 2009; 325: 197-201.

Gaymard A, Le Briand N, Frobert E, Lina B, Escuret V. Functional balance between neuraminidase and haemagglutinin in influenza viruses. *Clinical Microbiology and Infection* 2016; 22: 975-83.

Gibbs MJ, Armstrong JS, Gibbs AJ. The haemagglutinin gene, but not the neuraminidase gene, of 'Spanish flu' was a recombinant. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2001; 356: 1845-55.

Gibbs MJ, Gibbs AJ. Molecular virology: was the 1918 pandemic caused by a bird

flu? Nature 2006; 440: E8; discussion E9-10.

Globig A, Staubach C, Sauter-Louis C, Dietze K, Homeier-Bachmann T, Probst C, Gethmann J, Depner KR, Grund C, Harder TC. Highly pathogenic avian influenza H5N8 clade 2.3. 4.4 b in Germany in 2016/2017. *Frontiers in veterinary science* 2018; 4: 240.

Gorman OT, Bean WJ, Kawaoka Y, Webster RG. Evolution of the nucleoprotein gene of influenza A virus. *J Virol* 1990; 64: 1487-97.

Grech-Angelini S, Herve S, Rose N, Barbier N, Casabianca F, Maestrini O, Falchi A, Simon G. Serological survey of influenza A viruses in domestic and wild Suidae in Corsica (France), a Mediterranean island environment. *Preventive veterinary medicine* 2018; 157: 94-8.

Hahn E, Page G, Hahn P, Gillis K, Romero C, Anelli J, Gibbs E. Mechanisms of transmission of Aujeszky's disease virus originating from feral swine in the USA. *Veterinary Microbiology* 1997; 55: 123-30.

Hall JS, Minnis RB, Campbell TA, Barras S, Deyoung RW, Pabilonia K, Avery ML, Sullivan H, Clark L, McLean RG. Influenza exposure in United States feral swine populations. *J Wildl Dis* 2008; 44: 362-8.

Harder TC, Grosse Beilage E, Lange E, Meiners C, Dohring S, Pesch S, Noe T, Grund C, Beer M, Starick E. Expanded cocirculation of stable subtypes, emerging lineages, and new sporadic reassortants of porcine influenza viruses in swine populations in Northwest Germany. *Journal of virology* 2013; 87: 10460-76.

Hause BM, Oleson TA, Bey RF, Stine DL, Simonson RR. Antigenic categorization of contemporary H3N2 swine influenza virus isolates using a high-throughput serum neutralization assay. *Journal of veterinary diagnostic investigation* 2010; 22: 352-9.

He CQ, He M, He HB, Wang HM, Ding NZ. The matrix segment of the “Spanish flu” virus originated from intragenic recombination between avian and human influenza A viruses. *Transboundary and emerging diseases* 2019; 66: 2188-95.

Heinritzi K. Influenza. In: *Schweinekrankheiten*. Heinritzi K, Gindele HR, Reiner G, Schnurrbusch U, eds. Stuttgart: Eugen Ulmer 2006: 139-40.

Holland J, Spindler K, Horodyski F, Grabau E, Nichol S, VandePol S. Rapid evolution of RNA genomes. *Science* 1982; 215: 1577-85.

International Committee on Taxonomy of Viruses. *Virus Taxonomy: 2019 Release*. International Committee on Taxonomy of Viruses, 2019: <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>. 11.08.2020.

Janke BH. Diagnosis of swine influenza. *Journal of Swine Health and Production* 2000; 8: 79-84.

Janke BH. Influenza A virus infections in swine: pathogenesis and diagnosis. *Vet Pathol* 2014; 51: 410-26.

Jennings R, Smith T, Potter CW. Use of the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the estimation of serum antibodies in an influenza virus vaccine study. *Med Microbiol Immunol* 1981; 169: 247-58.

Jridi M, Bouzghaia H, Toma B. Maladie d'Aujeszky chez le sanglier en Tunisie. *Epidemiologie et Santé Animal* 1996; 30: 99-105.

Jung K, Ha Y, Chae C. Pathogenesis of swine influenza virus subtype H1N2 infection in pigs. *Journal of comparative pathology* 2005; 132: 179-84.

Kaden V, Lange E, Starick E, Bruer W, Krakowski W, Klopries M. Epidemiological survey of swine influenza A virus in selected wild boar populations in Germany. *Veterinary Microbiology* 2008; 131: 123-32.

Kaden V, Lange E, Hänel A, Hlinak A, Mewes L, Hergarten G, Irsch B, Dedek J, Bruer W. Retrospective serological survey on selected viral pathogens in wild boar populations in Germany. *European journal of wildlife research* 2009; 55: 153-59.

Kawaoka Y, Krauss S, Webster RG. Avian-to-human transmission of the PB1 gene of influenza A viruses in the 1957 and 1968 pandemics. *J Virol* 1989; 63: 4603-8.

Kendal AP, Noble GR, Skehel JJ, Dowdle WR. Antigenic similarity of influenza A (H1N1) viruses from epidemics in 1977--1978 to "Scandinavian" strains isolated in epidemics of 1950--1951. *Virology* 1978; 89: 632-6.

Kida H, Brown LE, Webster RG. Biological activity of monoclonal antibodies to operationally defined antigenic regions on the hemagglutinin molecule of A/Seal/Massachusetts/1/80 (H7N7) influenza virus. *Virology* 1982; 122: 38-47.

Kida H, Ito T, Yasuda J, Shimizu Y, Itakura C, Shortridge KF, Kawaoka Y, Webster RG. Potential for transmission of avian influenza viruses to pigs. *Journal of general virology* 1994; 75: 2183-8.

Kilbourne ED. Influenza pandemics of the 20th century. *Emerg Infect Dis* 2006; 12: 9-14.

Kumlin U, Olofsson S, Dimock K, Arnberg N. Sialic acid tissue distribution and influenza virus tropism. *Influenza Other Respir Viruses* 2008; 2: 147-54.

Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit. Aujeszkysche Krankheit (AK; Pseudowut, Pseudorabies) - Untersuchungsergebnisse der Monitoringuntersuchungen bayerischer Wildschweine 2018. 2019: https://www.lgl.bayern.de/tiergesundheit/tierkrankheiten/virusinfektionen/aujeszkysche_krankheit/ue_2018_aujeszkysche_krankheit_monitoring.htm. 30.11.2020.

Larsen DL, Karasin A, Zuckermann F, Olsen CW. Systemic and mucosal immune responses to H1N1 influenza virus infection in pigs. *Vet Microbiol* 2000; 74: 117-

31.

Loeffen WL, Heinen PP, Bianchi AT, Hunneman WA, Verheijden JH. Effect of maternally derived antibodies on the clinical signs and immune response in pigs after primary and secondary infection with an influenza H1N1 virus. *Vet Immunol Immunopathol* 2003; 92: 23-35.

Lofgren E, Fefferman NH, Naumov YN, Gorski J, Naumova EN. Influenza seasonality: underlying causes and modeling theories. *Journal of virology* 2007; 81: 5429-36.

Long JS, Mistry B, Haslam SM, Barclay WS. Publisher Correction: Host and viral determinants of influenza A virus species specificity. *Nat Rev Microbiol* 2019; 17: 124.

Lowen AC. It's in the mix: Reassortment of segmented viral genomes. *PLoS pathogens* 2018; 14: e1007200.

Luo J, Dong G, Li K, Lv Z, Huo X, He H. Exposure to swine H1 and H3 and avian H5 and H9 influenza A viruses among feral swine in Southern China, 2009. *J Wildl Dis* 2013; 49: 375-80.

Ma W, Kahn RE, Richt JA. The pig as a mixing vessel for influenza viruses: human and veterinary implications. *Journal of molecular and genetic medicine: an international journal of biomedical research* 2009; 3: 158-66.

Malmsten A, Magnusson U, Ruiz-Fons F, González-Barrio D, Dalin A-M. A serologic survey of pathogens in wild boar (*Sus scrofa*) in Sweden. *Journal of wildlife diseases* 2018; 54: 229-37.

Martin BE, Sun H, Carrel M, Cunningham FL, Baroch JA, Hanson-Dorr KC, Young SG, Schmit B, Nolting JM, Yoon KJ, Lutman MW, Pedersen K, Lager K, Bowman AS, Slemons RD, Smith DR, DeLiberto T, Wan XF. Feral Swine in the

United States Have Been Exposed to both Avian and Swine Influenza A Viruses. *Applied and environmental microbiology* 2017; 83.

McDonald SM, Nelson MI, Turner PE, Patton JT. Reassortment in segmented RNA viruses: mechanisms and outcomes. *Nature Reviews Microbiology* 2016; 14: 448.

McGregor GF, Gottschalk M, Godson DL, Wilkins W, Bollinger TK. Disease risks associated with free-ranging wild boar in Saskatchewan. *Can Vet J* 2015; 56: 839-44.

Meier R, Ryser-Degiorgis M. Wild boar and infectious diseases: evaluation of the current risk to human and domestic animal health in Switzerland: A review. *Schweiz Arch Tierheilkd* 2018; 160: 443-60.

Mettenleiter TC. Aujeszky's disease (pseudorabies) virus: the virus and molecular pathogenesis-state of the art, June 1999. *Veterinary research* 2000; 31: 99-115.

Miao H, Hollenbaugh JA, Zand MS, Holden-Wiltse J, Mosmann TR, Perelson AS, Wu H, Topham DJ. Quantifying the early immune response and adaptive immune response kinetics in mice infected with influenza A virus. *Journal of virology* 2010; 84: 6687-98.

Montagnaro S, Sasso S, De Martino L, Longo M, Iovane V, Ghiurmino G, Pisanelli G, Nava D, Baldi L, Pagnini U. Prevalence of antibodies to selected viral and bacterial pathogens in wild boar (*Sus scrofa*) in Campania Region, Italy. *Journal of wildlife diseases* 2010; 46: 316-9.

Mostafa A, Abdelwhab E, Mettenleiter T, Pleschka S. Zoonotic potential of influenza A viruses: a comprehensive overview. *Viruses* 2018; 10: 497.

Müller T, Klupp B, Zellmer R, Teuffert J, Ziedler K, Possardt C, Mewes L, Dresenkamp B, Conraths F, Mettenleiter T. Characterisation of pseudorabies virus isolated from wild boar (*Sus scrofa*). *Veterinary record* 1998; 143: 337-40.

Müller T, Conraths FJ, Hahn EC. Pseudorabies virus infection (Aujeszky's disease) in wild swine. *Infectious Disease Review* 2000; 2: 27-34.

Müller T, Bätza HJ, Schlüter H, Conraths F, Mettenleiter T. Eradication of Aujeszky's disease in Germany. *Journal of Veterinary Medicine, Series B* 2003; 50: 207-13.

Müller T, Klupp B, Freuling C, Hoffmann B, Mojczic M, Capua I, Palfi V, Toma B, Lutz W, Ruiz-Fon F. Characterization of pseudorabies virus of wild boar origin from Europe. *Epidemiology & Infection* 2010; 138: 1590-600.

Napp S, Majo N, Sanchez-Gonzalez R, Vergara-Alert J. Emergence and spread of highly pathogenic avian influenza A(H5N8) in Europe in 2016-2017. *Transbound Emerg Dis* 2018; 65: 1217-26.

Nayak DP, Hui EK-W, Barman S. Assembly and budding of influenza virus. *Virus research* 2004; 106: 147-65.

Nazir J, Haumacher R, Ike AC, Marschang RE. Persistence of avian influenza viruses in lake sediment, duck feces, and duck meat. *Applied and environmental microbiology* 2011; 77: 4981-5.

Nelson MI, Holmes EC. The evolution of epidemic influenza. *Nature reviews genetics* 2007; 8: 196.

Neumann G, Noda T, Kawaoka Y. Emergence and pandemic potential of swine-origin H1N1 influenza virus. *Nature* 2009; 459: 931-9.

Neumann G, Kawaoka Y. Transmission of influenza A viruses. *Virology* 2015; 479-480: 234-46.

Ninomiya A, Takada A, Okazaki K, Shortridge KF, Kida H. Seroepidemiological evidence of avian H4, H5, and H9 influenza A virus transmission to pigs in

southeastern China. *Veterinary Microbiology* 2002; 88: 107-14.

Ozawa M, Kawaoka Y. Cross talk between animal and human influenza viruses. *Annu Rev Anim Biosci* 2013; 1: 21-42.

Palese P. Influenza: old and new threats. *Nat Med* 2004; 10: S82-7.

Pannwitz G, Freuling C, Denzin N, Schaarschmidt U, Nieper H, Hlinak A, Burkhardt S, Klopries M, Dedek J, Hoffmann L. A long-term serological survey on Aujeszky's disease virus infections in wild boar in East Germany. *Epidemiology & Infection* 2012; 140: 348-58.

Pedersen JC. Hemagglutination-inhibition test for avian influenza virus subtype identification and the detection and quantitation of serum antibodies to the avian influenza virus. In: *Avian influenza virus*. Spackman E, ed. Totowa, NJ: Springer 2008: 53-66.

Pensaert M, Ottis K, Vandeputte J, Kaplan MM, Bachmann PA. Evidence for the natural transmission of influenza A virus from wild ducks to swine and its potential importance for man. *Bull World Health Organ* 1981; 59: 75-8.

Pica N, Hai R, Krammer F, Wang TT, Maamary J, Eggink D, Tan GS, Krause JC, Moran T, Stein CR. Hemagglutinin stalk antibodies elicited by the 2009 pandemic influenza virus as a mechanism for the extinction of seasonal H1N1 viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2012; 109: 2573-8.

Pippig J, Ritzmann M, Buttner M, Neubauer-Juric A. Influenza A Viruses Detected in Swine in Southern Germany after the H1N1 Pandemic in 2009. *Zoonoses and public health* 2016; 63: 555-68.

Pohlmann A, Starick E, Harder T, Grund C, Hoper D, Globig A, Staubach C, Dietze K, Strebelow G, Ulrich RG, Schinkothe J, Teifke JP, Conraths FJ, Mettenleiter TC, Beer M. Outbreaks among Wild Birds and Domestic Poultry Caused by Reassorted

Influenza A(H5N8) Clade 2.3.4.4 Viruses, Germany, 2016. *Emerg Infect Dis* 2017; 23: 633-6.

Pohlmann A, Starick E, Grund C, Hoper D, Strebelow G, Globig A, Staubach C, Conraths FJ, Mettenleiter TC, Harder T, Beer M. Swarm incursions of reassortants of highly pathogenic avian influenza virus strains H5N8 and H5N5, clade 2.3.4.4b, Germany, winter 2016/17. *Scientific reports* 2018; 8: 15.

Polley B, Akimkin V, Hänel A, Hoferer M, Sting R. Zum Vorkommen von Antikörpern gegen verschiedene Influenza-A-Subtypen bei Haus- und Wildschweinen in Baden-Württemberg. *Tierärztliche Umschau* 2007; 62: 134-40.

Pomorska-Mol M, Markowska-Daniel I, Kwit K, Czyzewska E, Dors A, Rachubik J, Pejsak Z. Immune and inflammatory response in pigs during acute influenza caused by H1N1 swine influenza virus. *Arch Virol* 2014; 159: 2605-14.

Reid AH, Fanning TG, Hultin JV, Taubenberger JK. Origin and evolution of the 1918 "Spanish" influenza virus hemagglutinin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 1651-6.

Reperant LA, Rimmelzwaan GF, Kuiken T. Avian influenza viruses in mammals. *Revue scientifique et technique* 2009; 28: 137-59.

Reperant LA, Kuiken T, Osterhaus AD. Adaptive pathways of zoonotic influenza viruses: from exposure to establishment in humans. *Vaccine* 2012a; 30: 4419-34.

Reperant LA, Osterhaus AD, Kuiken T. Influenza Virus Infections. In: *Infectious diseases of wild mammals and birds in Europe*. Gavier-Widén D, Duff JP, Meredith A, eds.: Wiley-Blackwell 2012b: 37-58.

Roic B, Jemersic L, Terzic S, Keros T, Balatinec J, Florijancic T. Prevalence of antibodies to selected viral pathogens in wild boars (*Sus scrofa*) in Croatia in 2005-06 and 2009-10. *Journal of wildlife diseases* 2012; 48: 131-7.

Rozo M, Gronvall GK. The Reemergent 1977 H1N1 Strain and the Gain-of-Function Debate. *MBio* 2015; 6

Ruiz-Fons F, Segales J, Gortazar C. A review of viral diseases of the European wild boar: effects of population dynamics and reservoir role. *The Veterinary Journal* 2008; 176: 158-69.

Saliki JT, Rodgers SJ, Eskew G. Serosurvey of selected viral and bacterial diseases in wild swine from Oklahoma. *J Wildl Dis* 1998; 34: 834-8.

Sattler T, Sailer E, Wodak E, Schmoll F. [Serological detection of emerging viral infections in wild boars from different hunting regions of Southern Germany]. *Tierarztl Prax Ausg G Grosstiere Nutztiere* 2012; 40: 27-32.

Scholtissek C, Burger H, Kistner O, Shortridge KF. The nucleoprotein as a possible major factor in determining host specificity of influenza H3N2 viruses. *Virology* 1985; 147: 287-94.

Schülein A, Ritzmann M, Christian J, Schneider K, Neubauer-Juric A. Exposure of wild boar to Influenza A viruses in Bavaria: Analysis of seroprevalences and antibody subtype specificity before and after the panzootic of highly pathogenic avian influenza viruses A (H5N8). *Zoonoses Public Health* 2021; 00:1-13.

Sehl J, Teifke JP. Comparative pathology of pseudorabies in different naturally and experimentally infected species—A review. *Pathogens* 2020; 9: 633.

Servanty S, Gaillard JM, Ronchi F, Focardi S, Baubet E, Gimenez O. Influence of harvesting pressure on demographic tactics: implications for wildlife management. *Journal of Applied Ecology* 2011; 48: 835-43.

Shimoda H, D VANN, Yonemitsu K, Minami S, Nagata N, Hara N, Kuwata R, Murakami S, Koderu Y, Takeda T, Yoshikawa Y, Horimoto T, Maeda K. Influenza A virus infection in Japanese wild boars (*Sus scrofa leucomystax*). *The Journal of*

Veterinary Medical Science 2017; 79: 848-51.

Shope RE. Swine influenza: I. Experimental transmission and pathology. Journal of Experimental Medicine 1931; 54: 349-59.

Shtyrya Y, Mochalova L, Bovin N. Influenza Virus Neuraminidase: Structure and Function. Acta Naturae 2009; 1: 26.

Solaymani-Mohammadi S, Mobedi I, Rezaian M, Massoud J, Mohebbali M, Hooshyar H, Ashrafi K, Rokni M. Helminth parasites of the wild boar, *Sus scrofa*, in Luristan province, western Iran and their public health significance. Journal of helminthology 2003; 77: 263-7.

Sreta D, Kedkovid R, Tuamsang S, Kitikoon P, Thanawongnuwech R. Pathogenesis of swine influenza virus (Thai isolates) in weanling pigs: an experimental trial. Virol J 2009; 6: 34.

Stallknecht DE, Goekjian VH, Wilcox BR, Poulson RL, Brown JD. Avian influenza virus in aquatic habitats: what do we need to learn? Avian diseases 2010; 54: 461-5.

Stärk K. The role of infectious aerosols in disease transmission in pigs. The Veterinary Journal 1999; 158: 164-81.

Stephenson RJ, Tribble BR, Wang Y, Kerrigan MA, Goldstein SM, Rowland RR. Multiplex serology for common viral infections in feral pigs (*Sus scrofa*) in Hawaii between 2007 and 2010. J Wildl Dis 2015; 51: 239-43.

Taubenberger JK, Reid AH, Krafft AE, Bijwaard KE, Fanning TG. Initial genetic characterization of the 1918 "Spanish" influenza virus. Science 1997; 275: 1793-6.

Taubenberger JK, Reid AH, Lourens RM, Wang R, Jin G, Fanning TG. Characterization of the 1918 influenza virus polymerase genes. Nature 2005; 437:

889.

Taubenberger JK. The virulence of the 1918 pandemic influenza virus: unraveling the enigma. *Arch Virol Suppl* 2005; 101-15.

Taubenberger JK, Morens DM. 1918 Influenza: the mother of all pandemics. *Emerg Infect Dis* 2006; 12: 15-22.

Tong S, Li Y, Rivaller P, Conrardy C, Castillo DAA, Chen L-M, Recuenco S, Ellison JA, Davis CT, York IA. A distinct lineage of influenza A virus from bats. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2012; 109: 4269-74.

Tong S, Zhu X, Li Y, Shi M, Zhang J, Bourgeois M, Yang H, Chen X, Recuenco S, Gomez J. New world bats harbor diverse influenza A viruses. *PLoS pathogens* 2013; 9: e1003657.

Torremorell M, Allerson M, Corzo C, Diaz A, Gramer M. Transmission of influenza A virus in pigs. *Transboundary and emerging diseases* 2012; 59 Suppl 1: 68-84.

Truelove S, Zhu H, Lessler J, Riley S, Read JM, Wang S, Kwok KO, Guan Y, Jiang CQ, Cummings DA. A comparison of hemagglutination inhibition and neutralization assays for characterizing immunity to seasonal influenza A. *Influenza and other respiratory viruses* 2016; 10: 518-24.

Tumpey TM, Basler CF, Aguilar PV, Zeng H, Solorzano A, Swayne DE, Cox NJ, Katz JM, Taubenberger JK, Palese P, Garcia-Sastre A. Characterization of the reconstructed 1918 Spanish influenza pandemic virus. *Science* 2005; 310: 77-80.

Van Reeth K, Brown I, Essen S, Pensaert M. Genetic relationships, serological cross-reaction and cross-protection between H1N2 and other influenza A virus subtypes endemic in European pigs. *Virus Res* 2004; 103: 115-24.

Van Reeth K. Avian and swine influenza viruses: our current understanding of the zoonotic risk. *Vet Res* 2007; 38: 243-60.

Van Reeth K, Brown IH, Olsen W. Influenza Virus. In: *Diseases of swine*, 10 edn. Zimmerman JJ, Karriker LA, Ramirez A, Schwartz KJ, Stevenson GW, eds. Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell 2012: 557-71.

Vicente J, Ruiz-Fons F, Vidal D, Höfle U, Acevedo P, Villanúa D, Fernández-de-Mera IG, Martín M, Gortázar C. Serosurvey of Aujeszky's disease virus infection in European wild boar in Spain. *Veterinary record* 2005; 156: 408-12.

Vijaykrishna D, Poon LL, Zhu HC, Ma SK, Li OT, Cheung CL, Smith GJ, Peiris JS, Guan Y. Reassortment of pandemic H1N1/2009 influenza A virus in swine. *Science* 2010; 328: 1529.

Vittecoq M, Grandhomme V, Simon G, Herve S, Blanchon T, Renaud F, Thomas F, Gauthier-Clerc M, van der Werf S. Study of influenza A virus in wild boars living in a major duck wintering site. *Infections, genetics and evolution* 2012; 12: 483-6.

Wan H, Perez DR. Quail carry sialic acid receptors compatible with binding of avian and human influenza viruses. *Virology* 2006; 346: 278-86.

Webby RJ, Swenson SL, Krauss SL, Gerrish PJ, Goyal SM, Webster RG. Evolution of swine H3N2 influenza viruses in the United States. *J Virol* 2000; 74: 8243-51.

Webster RG, Bean WJ, Gorman OT, Chambers TM, Kawaoka Y. Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiology and molecular biology reviews* 1992; 56: 152-79.

Wei Y-R, Yang X-Y, Li Y-G, Wei J, Ma W-G, Ren Z-G, Guo H-L, Wang T-C, Mi X-Y, Adili G. Serological survey of avian influenza virus infection in non-avian wildlife in Xinjiang, China. *Arch Virol* 2016; 161: 867-72.

Weyand CD. Epidemiologische Studie zur Seroprävalenz von Antikörpern gegen die Erreger von Aujeszky'scher Krankheit, Hepatitis E, Influenza A, Brucellose und Salmonellose bei Wildschweinen in Rheinland Pfalz. VVB Laufersweiler Verlag 2017.

Wildtierportal Bayern. "Zahlen, Daten, Fakten" zum Schwarzwild in Bayern. Bayerisches Staatsministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten. https://www.wildtierportal.bayern.de/wildtiere_bayern/084682/index.php. 12.08.2020.

World Health Organization. Serological Diagnosis Of Influenza By Microneutralization Assay. World Health Organization, 2010: https://www.who.int/influenza/gisrs_laboratory/2010_12_06_serological_diagnosis_of_influenza_by_microneutralization_assay.pdf. 12.08.2020.

World Health Organization. Manual for the laboratory diagnosis and virological surveillance of influenza. 2011: <http://154.72.196.19/sites/default/files/resources/Manual%20for%20the%20Laboratory%20diagnosis%20and%20virological%20surveillance%20of%20influenza.pdf>.

Worobey M, Rambaut A, Pybus OG, Robertson DL. Questioning the evidence for genetic recombination in the 1918" Spanish flu" virus. *Science* 2002; 296: 211-.

Wu R, Hu S, Xiao Y, Li Z, Shi D, Bi D. Development of indirect enzyme-linked immunosorbent assay with nucleoprotein as antigen for detection and quantification of antibodies against avian influenza virus. *Vet Res Commun* 2007; 31: 631-41.

Yang X, Guan H, Li C, Li Y, Wang S, Zhao X, Zhao Y, Liu Y. Characteristics of human encephalitis caused by pseudorabies virus: A case series study. *Int J Infect Dis* 2019; 87: 92-9.

Zhang J, Harmon KM. RNA extraction from swine samples and detection of influenza A virus in swine by real-time RT-PCR. In: *Animal Influenza Virus*

(Methods in Molecular Biology). Spackman E, ed. New York: Springer 2014: 277-93.

VIII. DANKSAGUNG

Zu allererst möchte ich mich bei Dr. Antonie Neubauer-Juric bedanken, ohne die diese Doktorarbeit nicht zustande gekommen wäre. Danke, Toni, für deine schier grenzenlose Geduld, dein Vertrauen in meine Fähigkeiten und deinen unerschütterlichen Enthusiasmus, nicht nur in der Rolle meiner Betreuerin, sondern auch in der meiner Chefin. Ich könnte mir keine bessere vorstellen. Mit der Möglichkeit, am LGL zu arbeiten, hat sich mir ein großer Traum erfüllt und für diese Chance werde ich dir immer dankbar sein.

Vielen Dank an Herrn Prof. Dr. Mathias Ritzmann für die stets freundliche, unkomplizierte Zusammenarbeit und die Betreuung dieser Arbeit.

Ein besonderer Dank geht an das Team der Veterinärvirologie des LGL Oberschleißheim. Nicht umsonst habe ich schon als Praktikantin beschlossen, hierher zurückzukommen. Danke an Birgit, die mir zuverlässig und oft sehr spontan große Mengen an Zellplatten beschafft und dabei stets meinen Durst nach Medium gestillt hat, an Patricia, die mich mit viel Begeisterung und noch mehr Humor in die Künste von ELISA und SNT eingewiesen hat, an Manu und Petra Panny, die mich bei der Durchführung meiner HAs und HAHs unterstützt und motiviert haben, und an Dani, die nicht nur einmal alles stehen und liegen lassen hat, wenn ich nicht mehr weiterwusste. Danke auch an Isa, Sonja, Simone, Constanze, Silvi, Maria, Niki, Rebekka, Anita, Petra Salevsky, Franziska, Susi und Lisa, dafür, dass ihr mich so herzlich aufgenommen habt, dass ich bei jedem von euch ein offenes Ohr gefunden habe, und dass ihr durch das Backen von Unmengen an Kuchen und Plätzchen stets meine Diätpläne vereitelt habt.

Ein großes Dankeschön geht an meine Mitdotorandin Steffi Singer, deren Ratschläge mir oft den einen oder anderen Irrweg erspart haben, sowie an Steffi Haberl und Eva. Dass ich mich in Zeiten von BTV, ASP und SarsCoV-2 immer auf eure Rückendeckung in der Diagnostik verlassen konnte, ist alles andere als selbstverständlich.

Vielen Dank an Kim Weber, die sich dafür eingesetzt hat, dass ich an meine Wildschweinorgane gekommen bin, an Katharina Schneider, die einen essentiellen Beitrag zur Stichprobenplanung und statistischen Auswertung dieser Doktorarbeit geleistet hat, sowie an das Team der Veterinärvirologie des LGL Erlangen für die

Zusendung zahlreicher Blutproben.

Danke, Julia, Claudi, Gini, Heike, Greta, Frieda, Regina, Sophia und Svenja, für unvergessliche Momente während des Studiums sowie danach und dafür, dass ihr mich immer unterstützt habt. Danke auch dir, Christian, ohne dich wäre meine Zeit in München nicht halb so schön gewesen.

Lieber Hannes, danke für deine Hilfe bei der Erstellung meiner – zuweilen doch sehr unentschlossenen – Figures. Ich bin stolz, dich meinen besten Freund nennen zu dürfen. Ein riesiger Dank geht auch an dich, Martin, dein unermüdlicher Einsatz hat es mir überhaupt erst ermöglicht, Tiermedizin zu studieren. Danke, Pöbel, dafür, dass du mich regelmäßig mit deiner Begeisterung angesteckt und mir mit deinem Wissen weitergeholfen hast. Danke, dass ich mich seit mehr als zehn Jahren zu hundert Prozent auf euch verlassen kann.

Pato, ich danke dir für deine bedingungslose Liebe, dein Verständnis, und dafür, dass ich bei dir stets den Rückhalt finde, den ich brauche, egal, worum es geht. Danke, dass du immer an mich glaubst.

Danke auch an Alex, Stefan, Simon, Jakob, meine Oma und meinen Opa, für euren Zusammenhalt und dafür, dass ihr nie an mir gezweifelt habt.

Mama, du bist der stärkste Mensch, den ich kenne, und mein großes Vorbild. Danke, dass du mir immer zur Seite stehst und mich in jeder nur erdenklichen Form unterstützt.