

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

**Auswirkung von Stabilisatormedien auf den Nachweis des
Influenza-A-Virus bei Schweinen (IAV)
aus Kaustriekproben unter Laborbedingungen**

von Kristin Alexandra Grau

aus Bad Windsheim

München 2025

**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: Priv.-Doz. Dr. Matthias Eddicks

Mitbetreuung durch: Dr. Julia Stadler

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

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

Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Matthias Eddicks

Korreferent: Priv.-Doz. Dr. Astrid Wehner-Fleischberger

Tag der Promotion: 08.02.2025

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:

Effect of stabilizers on the detection of swine influenza A virus (swIAV) in spiked oral fluids over time

K. Grau^a, K. Lillie-Jaschniski^b, A. Graaf-Rau^{c, d}, T. Harder^c, M. Eddicks^a, S. Zöls^a, Y. Zablotski^a, M. Ritzmann^a, J. Stadler^{a*}

^a Clinic for Swine at the Centre for Clinical Veterinary Medicine, Ludwig-Maximilians-Universität München, Oberschleißheim, Germany

^b CEVA Tiergesundheit, Germany

^c Institute of Diagnostic Virology, Friedrich-Loeffler-Institut, Greifswald-Insel Riems, Germany

^d Helmholtz Institute for One Health, Greifswald, Germany

*Corresponding author: j.stadler@vetmed.uni-muenchen.de

Porcine Health Management (2024)

Received:24.08.2024; Accepted: 16.09.2024

Meiner Familie

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG	1
II.	LITERATURÜBERSICHT	3
1.	Influenza	3
1.1.	Ätiologie	3
1.2.	Epidemiologie.....	4
1.3.	Genetische Variabilität	5
1.4.	Pathogenese	7
1.5.	Klinik	8
1.5.1.	Epidemische Verläufe.....	8
1.5.2.	Endemische Verläufe.....	9
1.6.	Diagnostik.....	9
1.6.1.	Nachweismethoden	10
1.6.1.1	Direkte Erregerdetektion	10
1.6.1.1.1.	Virusisolierung	10
1.6.1.1.2.	Polymerase-Kettenreaktion	11
1.6.1.2.	Indirekte Erregerdetektion	12
1.6.1.2.1.	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay	13
1.6.1.2.2.	Hämagglutinationshemmtest.....	14
1.6.2.	Materialien	15
1.6.3.	Stabilisierungsmedien	17
1.6.3.1.	Sigma-Virocult®.....	17
1.6.3.2.	Primestore®	18
1.6.3.3.	NucleoProtect VET Reagent®	19
III.	PUBLIZIERTE STUDIENERGEBNISSE	20
IV.	ERWEITERTE DISKUSSION	48
V.	ZUSAMMENFASSUNG.....	55
VI.	SUMMARY.....	56
VII.	TABELLENVERZEICHNIS	57
VIII.	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	58

IX.	LITERATURVERZEICHNIS	59
X.	DANKSAGUNG.....	89

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

°C	Grad Celsius
AE	Aerosol
AI	Aviäre Influenza
AK	Antikörper
APP	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>
Av	Aviär
BCoV	Bovines Coronavirus
BTV	Blauzungenvirus
C	Kontrolle
cDNA	complementary DNA
CI	Konfidenzintervall
Ct-Wert	Cycle threshold
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ESNIP	European Surveillance Network for Influenza in Pigs
FLI	Friedrich-Loeffler-Institut
FOF	Family Oral Fluids
GTP	Guanosintriphosphat
GWP	Gesäugewischproben
HA	Hämagglutinin
HAH	Hämagglutinationshemmtest
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
HSV	Herpes Simplex Virus
IAV	Influenza-A-Virus
IN	Intranasal
IT	Intratracheal
KSP	Klassische Schweinepest
LMU	Ludwig-Maximilians-Universität
LSDV	Lumpy Skin Disease Virus
M	Matrixprotein

MDCK	Madin-Darby Canine Kidney
MKS	Maul- und Klauenseuche
N	NucleoProtect VET Reagent®
NA	Neuraminidase
NEP	Nuclear Export Protein
NP	Nukleoprotein
NSP 1	Nichtstrukturprotein 1
NSP 2	Nichtstrukturprotein 2
NT	Nasentupfer
NWP	Nasenwischprobe
OD	Optische Dichte
OF	Oral Fluids
P	Primestore®
p.i.	Post infectionem
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PCV	Porzines Circovirus
Pdm	Pandemisch
PRDC	Porcine respiratory disease complex
PRRSV	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus
RDE	Receptor destroying enzyme
RNA	ribonucleinacid
RSV	Respiratorisches Synzytial-Virus
RT	Raumtemperatur
RT-qPCR	Reverse Transkriptase–quantitative Polymerase-Kettenreaktion
SARS-CoV-2	Severe acute respiratory syndrome coronavirus type 2
SN	Serumneutralisationstest
SP	Sample-to-Positive
swIAV	Swine Influenza A Virus
TBT	Tracheobronchialtupfer

V	Virocult®
VI	Virusisolierung
VL	Viruslast
vRNP	Viral Ribonucleinprotein Complex

I. EINLEITUNG

Die von Infektionen mit Influenza-A-Viren (IAV) ausgehende potenzielle Gefährdung der menschlichen Gesundheit und die wirtschaftlichen Verluste für die Tierart Schwein unterstreichen die Notwendigkeit einer schnellen und genauen Identifizierung und Charakterisierung von IAV in Schweinebeständen (Fouchier et al., 2003; Bennett und IJpelaar, 2005; Er et al., 2016; Henritzi et al., 2020).

Durch das gehäufte Auftreten von enzootisch infizierten Herden mit niedriger Intraherdenprävalenz, das Zirkulieren mehrerer IAV-Subtypen in einer Herde (Torremorell et al., 2012; Allerson et al., 2014; Stadler et al., 2024), sowie das unspezifische klinische Erscheinungsbild wird die ohnehin schon komplexe Diagnose von IAV noch weiter verkompliziert (Brown, 2000; Detmer et al., 2013; Simon et al., 2014; Unterweger et al., 2021). Da die Einzeltierdiagnostik sowohl zeitaufwendig als auch kostspielig ist, haben Methoden, mit denen ganze Tiergruppen beprobt werden können, zunehmend an Interesse gewonnen. Eine der gängigsten nicht-invasiven Probenentnahmetechniken ist die Sammlung oraler Flüssigkeiten, sog. Oral Fluids (OFs) (Prickett et al., 2008b; Kittawornrat et al., 2010; Detmer et al., 2011; Garrido-Mantilla et al., 2019), die auch von wenig erfahrenen Personen durchgeführt werden kann. Diese Proben weisen jedoch Nachteile in Bezug auf die nähere Charakterisierung von IAV-Stämmen auf (Detmer et al., 2011; Garrido-Mantilla et al., 2019). Grund dafür ist, dass die Viruslast in aggregierten OFs niedriger ist als in Proben von Einzeltieren wie beispielsweise Nasentupferproben (Garrido-Mantilla et al., 2019; Stadler et al., 2024). Darüber hinaus kann das Vorhandensein von Speichelenzymen, Proteinen (Ochert et al., 1994; Detmer et al., 2011), Zelldetritus (Hartshorn et al., 2003) und hoher bakterieller Belastungen in den OFs sowie nicht optimale Transportbedingungen (Dsa et al., 2023) zu einem weiteren Abbau der viralen RNA beitragen. Um den Abbau des intakten Virus oder der viralen Nukleinsäuren zu verhindern, wurden verschiedene Stabilisatoren für den molekularen Nachweis des Porzinen Reproduktiven und Respiratorischen Syndrom Virus (PRRSV) (Almeida et al., 2018), aviäre Influenza (AI) und

Newcastle Disease Virus (Welch et al., 2024), severe acute respiratory syndrome coronavirus type 2 (SARS-CoV-2) (Lorusso et al., 2020), Herpes-simplex-Viren, Enteroviren und Adenoviren (Jensen und Johnson, 1994) beschrieben. Die Stabilität von IAV in aggregierten Proben ist jedoch kaum erforscht.

Ziel der vorliegenden Studie war es daher zu untersuchen, ob der Nachweis von IAV mittels RT-qPCR aus gespikten Oral Fluids durch den Zusatz von Stabilisatormedien verbessert werden kann.

Hierbei wurden verschiedene Stabilisatormedien verwendet und deren Eignung hinsichtlich des Nachweises sowie der Subtypisierung von IAV unter Laborbedingungen evaluiert und mit Kontrollproben ohne entsprechende Zusätze verglichen.

II. LITERATURÜBERSICHT

1. Influenza

1.1. Ätiologie

Das Influenza-A-Virus (IAV) gehört zur Familie der Orthomyxoviridae, welche neben dem IAV noch acht weitere Genera umfasst (International Committee on Taxonomy of Viruses, 2021). Das IAV stellt ein pleomorphes, behülltes und mit einem Durchmesser von 80-120 nm (Lamb und Choppin, 1983) ein relativ großes Virus dar (Webster et al., 1992). Darüber hinaus weist das IAV eine einzelsträngige Ribonukleinsäure (ribonucleinacid, RNA), die segmentiert und negativ polarisiert ist, auf (Duesberg, 1968; Baltimore, 1971). Im Zentrum befindet sich das Genom, welches von einer Membran umhüllt ist und als Viral Ribonucleinprotein Complex (vRNP) bezeichnet wird, der wiederum in drei Polymerase-Proteine und ein Nukleoprotein unterteilt werden kann (Shaw und Palese 2012).

Die Oberflächenproteine, welche in Schichten in einer doppelten Lipidmembran angeordnet sind und entsprechend die Oberfläche des Virus schützen, können in die beiden Hauptproteine Hämagglutinin (HA) und Neuraminidase (NA) unterteilt werden (Gamblin und Skehel, 2010; McKimm-Breschkin, 2013; Giurgea et al., 2020; Wu und Wilson, 2020). Derzeit sind 18 HA (HA1-HA18) und neun NA (NA1-NA11) bekannt (WHO, 1980; Tong et al., 2013), die in diversen Spezies aufzufinden sind (Webster et al., 1992; Olsen et al., 2006). HA17, HA18 und NA10, NA11 wurden bisher ausschließlich bei Fledermäusen nachgewiesen (Tong et al., 2013). Die beiden Hauptproteinen NA und HA stellen das Ziel neutralisierender Antikörper dar (Gamblin und Skehel, 2010). Daneben wird das HA auch für die Bindung an die Wirtszelle benötigt (Gamblin und Skehel, 2010). Die Funktionen von NA sind unter anderem die Verringerung der Autoagglutination und die Freisetzung von Virionen aus dem Zellinneren (Biswas et al., 1998; Portela und Digard, 2002).

Darüber hinaus sind in der Lipiddoppelmembran Matrixproteine (M) wie

das M2 verankert, welches sowohl als Kanal für positiv geladene Teilchen fungiert (Webster et al., 1992; Pinto und Lamb, 2006), als auch für die Virusreplikation unerlässlich ist (Jalily et al., 2020). Bei dem M1, handelt es sich um das am häufigsten vorkommende Protein, welches an der Innenseite der Membran verankert ist. Dieses ist unter anderem am RNA-Export (Martin und Helenius, 1991) und dem Auf- sowie Abbau von infektiösen Partikeln beteiligt (Chlanda et al., 2015).

Weitere Proteine stellen die beiden Nichtstrukturproteine (NSP) 1 und 2 dar. Das NSP 1 ist beteiligt an der Infektion von IAV (Krug, 2015), hier insbesondere an der Hemmung der Immunantwort des Wirtes (Greenspan et al., 1988; Krug und Fodor, 2013). Das NSP 2 bzw. nuclear export protein (NEP) trägt zur Regulierung der RNA-Polymerase (Robb et al., 2009; Reuther et al., 2014), aber auch zu dem Export von Partikeln aus dem Wirtskern bei (O'Neill et al., 1998; Akarsu et al., 2003).

1.2. Epidemiologie

Das IAV wurde beim Schwein erstmals im Jahr 1918 (Brown, 2000) detektiert und wird seither als einer der bedeutendsten viralen Krankheitserreger des Schweins betrachtet (Harder et al., 2013; Simon et al., 2014; Henritzi et al., 2020). Für das letzte Jahrhundert sind diverse humane IAV Pandemien beschrieben, beispielsweise in Spanien 1918 (Trilla et al., 2008), in Asien 1957 (Fukumi, 1959), in Hongkong 1968 (Chang, 1969), und in Russland im Jahr 1977 (Gregg et al., 1978).

Laut dem in Europa durchgeführten European Surveillance Network for Influenza in Pigs (ESNIP) können vorherrschend drei Subtypen in den europäischen Schweinebeständen detektiert werden: H1N1, H3N2 und H1N2 (Simon et al., 2014). H1N1 ist aviären Ursprungs (H1avN1) (Anderson et al., 2016), H3huN2 entstammt aus der Pandemie in Hong Kong im Jahr 1968 und ist eine Reassortante aus dem aviären H1N1 und dem humanen H3N2 (Haesebrouck et al., 1985). Das H1huN2 ist eine dreifach Reassortante wobei das HA aus einem humanen Stamm, und das NA aus dem H3huN2 stammt (Brown et al., 1998; Anderson et al., 2016). Da sich innerhalb eines Subtyps wiederum die Zusammenstellungen von Aminosäuresequenzen unterscheiden, können sowohl das NA und das

HA nochmals in Untergruppen und Clades aufgeteilt werden (Russell et al., 2008). Seit der letzten IAV Pandemie in 2009 können auch in Schweinebeständen zunehmend Stämme und Reassortanten des für den Ausbruch verantwortlichen Subtypen H1pdmN1 gefunden werden (Starick et al., 2012; Harder et al., 2013; Henritzi et al., 2020; Graaf-Rau et al., 2023). In diversen europäischen Ländern wie Dänemark (Trebbien et al., 2013), Spanien (Sosa Portugal et al., 2021), Italien (Beato et al., 2016), Deutschland (Harder et al., 2013), Belgien und den Niederlanden wird zunehmend der pandemische Stamm nachgewiesen (Chepkwony et al., 2021). Kyriakis et al. (2016) können auch in Griechenland mittels Hämagglutinationshemmtest (HAH) Antikörper gegen den pandemischen Stamm aus dem Jahr 2009 detektieren. Darüber hinaus wird in Norwegen innerhalb eines Jahres der pandemische Stamm in 115 zuvor naiven Schweinebeständen nachgewiesen (Grøntvedt et al., 2011a).

In diversen Studien wird die hohe Prävalenz von IAV bestätigt (Simon-Grifé et al., 2011; Kyriakis et al., 2013). In Belgien, Frankreich, Italien und Spanien kann in einer mittels HAH durchgeführten Prävalenzstudie eine Seroprävalenz von 49 % gegen einen der drei zirkulierenden IAV-Subtypen (H1N1, H3N2, H1N2) festgestellt werden (Kyriakis et al., 2013).

Eine relevante Eintragsquelle für das IAV stellen Arbeiter dar (Dorjee et al., 2016), aber auch symptomlose Trägertiere mit nachfolgender Persistenz des Virus im Betrieb sollten beachtet werden (Kyriakis et al., 2013; Takemae et al., 2016). Darüber hinaus sollte eine Verschleppung über den Luftweg (Castrucci et al., 1993) in Betrachtung gezogen werden.

1.3. Genetische Variabilität

Für eine adäquate Überwachung von IAV empfehlen Experten globale Überwachungsprogramme, ähnlich der für aviäre Influenza existierenden (Harder et al., 2013; Simon et al., 2014; Mena et al., 2016; Henritzi et al., 2020). Durch Interaktionen zwischen Menschen, Schweinen und Vögeln, kann es zum Austausch von IAV kommen, was zur Entstehung neuer Pandemien führen kann. Hierfür sind aus der Evolution der Influenzaviren zwei Mechanismen beschrieben (Zambon, 1999).

Der als Antigen Drift bezeichnete Mechanismus, umfasst den Austausch von Aminosäuresequenzen und Punktmutationen, welche vor allem in den Epitopen des Hämagglutinin zu finden sind (Both et al., 1983). Diese Mutationen entstehen durch fehlende Korrekturmechanismen der RNA-Polymerase (Steinhauer et al., 1992). Von diesem abzugrenzen ist der Antigen Shift, bei welchem nicht nur der Austausch einzelner Sequenzen, sondern der komplette Ersatz von HA- und/oder NA Genen stattfindet (Webster et al., 1982; Truyen und Becher, 2023). Das segmentierte Genom und die Möglichkeit der zeitgleichen Infektion mit mehreren Subtypen eines Virus ermöglicht das Auftreten eines Antigen Shift (Beer, 2023). Dieser Aspekt stellt im Hinblick auf die Entstehung neuer Subtypen (Beer, 2023) ein großes Gefahrenpotenzial dar (Cox und Subbarao, 2000; Lowen, 2017).

Neben diesen für IAV geltenden Mechanismen, gibt es einen weiteren Aspekt, der für das Schwein und diverse andere Spezies von Bedeutung ist. Dieser ist von Bedeutung, da er für die Entstehung von Pandemien von Bedeutung ist. Das Schwein kann als ‚Mixing-Vessel‘ bezeichnet werden, dieser Begriff bezieht sich auf die Fähigkeit eines Organismus sich parallel mit verschiedenen IAV-Subtypen infizieren zu können, so dass die Möglichkeit einer Reassortierung zu neuen IAV-Geno- bzw. Phänotypen erfolgen kann (Scholtissek, 1994). Die Möglichkeit des Schweines als solches zu fungieren liegt unter anderem darin begründet, dass an Epithelzellen der Trachea des Schweines sowohl die humanen Stämme über eine $\alpha 2,6$ -glykosidische Bindung, als auch die aviären Subtypen über eine $\alpha 2,3$ -glykosidische Bindung binden können (Rogers und D'Souza, 1989; Ito et al., 1998). Neben dem Schwein sind aber auch beispielsweise Menschen (Patterson et al., 2009), Frettchen (Patterson et al., 2009; Swenson et al., 2010) und Vögel (Pillai et al., 2010; Swayne et al., 2020) in der Lage, als ‚Mixing-Vessel‘ zu fungieren. In diesen ‚Mixing-Vessels‘ können neue Subtypen entstehen, welche aviäre und/oder humane Sequenzen enthalten können. Mena et al. (2016) zeigen, dass das für den pandemischen Ausbruch im Jahr 2009 verantwortliche H1pdmN1 aus Schweinen in Zentralmexiko stammt und durch die globale Vernetzung des Handels in Europa mit den dort

endemischen Stämmen durch Reassortierungen zu neuen Varianten des pandemischen Subtyps führt. Diese Subtypen, die Einkreuzungen des pandemischen Typs aufweisen, werden heute zunehmend detektiert (Harder et al., 2013; Watson et al., 2015; Henritzi et al., 2020). Obwohl der Ursprung der letzten Pandemie im Jahr 2009 in Schweinen vermutet wird, zeigen Hennig et al. (2022) nochmal, dass die Übertragung vom Schwein auf den Menschen selten vorkommt und Schweine nicht als die einzige Quelle einer solchen Pandemie betrachtet werden sollten (Hennig et al., 2022)

1.4. Pathogenese

Die Infektion von IAV erfolgt aerogen über die Atemwege (Beer, 2023). Die ersten Symptome können bereits 24h post infectionem (p.i.) beobachtet werden (Loeffen et al., 1999; Van Reeth und Vincent, 2019). Die Ausscheidung des Virus beginnt ab dem ersten bis zum dritten Tag nach der Infektion über den oralen, nasalen und okulären Weg und hält in der Regel bis zum siebten Tag an (Brookes et al., 2010; Talker et al., 2016; Pomorska-Mól et al., 2017). Primär werden die Epithelzellen des Respirationstraktes, welche über eine zu überwindende Barrierefunktion verfügen, befallen (Vareille et al., 2011). Die Lungen weisen infolge einer IAV-Infektion eine pulmonale Atelektase der kranio-ventralen Lappen auf und führen je nach Schweregrad der Infektion zu einer bronchio-interstitiellen Pneumonie (Talker et al., 2016; Schwaiger et al., 2019). Hierbei ist das Ausmaß der Läsion unter anderem von der infektiösen Dosis und dem Infektionsweg abhängig (Hemmink et al., 2016). Diese Zusammenhänge werden in diversen experimentellen Studien dargestellt (Landolt et al., 2006; De Vleeschauwer et al., 2009). Selten führt eine IAV-Infektion auch zu einer Rhinitis der Nasenmuscheln (Montoya et al., 2017). Eine zentrale Rolle in der Erregerelimination weisen Zytokine auf (Van Reeth, 2000). Hierbei sind in der Literatur verschiedene Eliminationszeiträume zur Entfernung des Virus aus der Lunge beschrieben, welche von sieben bis elf Tagen reichen (Brown et al., 1993; Duerrwald et al., 2013).

1.5. Klinik

IAV ist am porcine respiratory disease complex (PRDC) beteiligt und stellt einen der bedeutendsten respiratorischen Erreger des Schweines dar (Kyriakis et al., 2011; Corzo et al., 2013). Die in der Vergangenheit dominierenden epidemischen Verlaufsformen werden in zunehmenden Maße von endemischen Verlaufsformen abgelöst (Yoon und Janke, 2002; Simon-Grifé et al., 2012; Kyriakis et al., 2013; Lagan et al., 2024).

1.5.1. Epidemische Verläufe

In älterer Literatur wird dem IAV eine saisonale, epidemische Verlaufsform mit einem ähnlichen klinischen Bild wie in der Humanmedizin zugeschrieben (Janke, 2013). Ein akuter IAV-Ausbruch ist durch plötzlich auftretendes Fieber, Dyspnoe, Anorexie, erhöhter Atemfrequenz und Husten gekennzeichnet (Reiner, 2015). Des Weiteren können Konjunktivitiden, Nasenausfluss und Lethargie beobachtet werden (Reiner, 2015; Van Reeth und Vincent, 2019). Eine Infektion in der Ferkelaufzucht oder der Mast ist neben eben aufgeführten Symptomen auch durch verminderte Leistung gekennzeichnet (Loeffen et al., 1999; Van Reeth, 2007; Nathues et al., 2013; Alvarez et al., 2015b). Menšik et al. (1957) und Pejsak et al. (2005) beobachten eine Beeinträchtigung der Reproduktionsleistung bei Sauen in IAV positiven Betrieben. In experimentellen Studien wird jedoch durch eine Infektion von naiven Sauen kein Einfluss auf die nachfolgende Trächtigkeit und die Geburt beobachtet (Kwit et al., 2013; Kwit et al., 2014, 2015). Im Gegensatz dazu war bei den Untersuchungen von Wesley (2004) nach einer zweiten Infektion (H3N2) seropositiver Sauen die Anzahl der lebend geborenen Ferkel reduziert. GRØNTVEDT et al. (2011b) beschreiben das klinische Erscheinungsbild der Sauen nach Eintrag des pandemischen Stammes in norwegischen Vermehrungsbetrieben. Hier können vermehrt Reproduktionsstörungen wie Aborte und Umrauschen beobachtet werden (Grøntvedt et al., 2011b). Auch Gumbert et al. (2020) können in einer in Deutschland in durchgeführten Studie einen Zusammenhang zwischen der Infektion mit H1pdmN1pdm und Reproduktionsstörungen darstellen. Die Datenerhebung wird unter anderem mit Hilfe eines Fragebogens bezüglich des klinischen Bildes, aber auch durch die Auswertung der

Leistungsparameter sechs Monate vor und nach der Impfung durchgeführt und mit ungeimpften Tieren verglichen. Hierbei wird deutlich, dass die Impfung zu einer Verbesserung der Reproduktionsleistung führt (verringerte Anzahl Abortraten, reduzierte Sterblichkeitsraten, erhöhte Anzahl lebend geborener Ferkel und abgesetzte Ferkel pro Sau) (Gumbert et al., 2020).

Es handelt sich bei IAV um einen Erreger, der in unkomplizierten Fällen ohne Koinfektionen, meist keiner Behandlung bedarf. Die Morbidität ist mit nahezu 100 % sehr hoch, wohingegen die Mortalität deutlich niedriger eingestuft wird ($< 1\%$) (Van Reeth und Vincent, 2019). Die Symptome können selbstlimitierend sein und nach sieben Tagen abklingen (Van Reeth und Vincent, 2019).

1.5.2. Endemische Verläufe

Zunehmend ist in der Literatur von weniger saisonalen Verläufen (Zeller et al., 2018; Henritzi et al., 2020) aber häufiger werdenden endemischen Verlaufsformen von IAV mit niedrigen Intraherdenprävalenzen zu lesen (Simon-Grifé et al., 2012). Simon-Grifé et al. (2012) zeigen, dass sowohl epidemische als auch endemische Verlaufsformen in einem Bestand zeitgleich bestehen können. Letztere zeigen in der Studie neben grippeähnlichen Symptomen ($\leq 4\%$) vor allem erhöhte Sterblichkeitsraten (20,3 %) (Simon-Grifé et al., 2012). Bei Absetzferkeln können reduzierte Zunahmen und erhöhte Ferkelverluste beobachtet werden (Alvarez et al., 2015a; Ryt-Hansen et al., 2019). Daneben existieren auch subklinische Infektionen, bei welchen die Tiere keine offensichtlichen klinischen Erscheinungsbilder aufweisen (Maldonado et al., 2006; Van Reeth et al., 2008; Simon-Grifé et al., 2012). In diesem Zusammenhang werden auch persistierende Infektionen beschrieben (Loeffen et al., 2003; Kyriakis et al., 2013).

1.6. Diagnostik

Da IAV beim Schwein zu keinem pathognomonischen klinischen Erscheinungsbild führt (Spackman et al., 2002), kann die Diagnose nur in Kombination mit labordiagnostischen Untersuchungen gestellt werden (Van Reeth und Vincent, 2019). Aufgrund des zoonotischen Potenzials,

aber auch wegen der wirtschaftlichen Verluste, die mit dem Ausbruch von IAV in einem Schweinebestand verbunden sind, ist die Überwachung dieses viralen Erregers von Bedeutung (Simon et al., 2014). Die Überwachung kann passiv, auf Grundlage des Auftretens klinischer Anzeichen erfolgen (Nsubuga et al., 2006). Bei der aktiven Überwachung hingegen werden die Herden unabhängig von dem Vorhandensein klinischer Anzeichen untersucht (Nsubuga et al., 2006). Um eine möglichst aussagekräftige Diagnose zu erhalten, muss eine große Anzahl von Tieren untersucht werden, wofür sich Gruppenuntersuchungsproben eignen (Garrido-Mantilla et al., 2019; Stadler et al., 2024).

1.6.1. Nachweismethoden

IAV kann mittels verschiedener direkter und indirekter Verfahren nachgewiesen werden.

1.6.1.1 Direkte Erregerdetektion

Mit dem direkten Erregernachweis werden laut Beer et al. (2023) entweder das gesamte Virus, ein Virusfragment oder Nukleinsäure nachgewiesen. Entscheidend für den erfolgreichen Nachweis des Virus ist neben dem richtigen Probenentnahmezeitpunkt auch das geeignete Probenmaterial (Beer et al., 2023).

1.6.1.1.1. Virusisolierung

Bei der Virusisolierung (VI) handelt es sich um ein Verfahren, bei dem die Anzucht des Virus in einem embryonierten Hühnerei (Zhang und Gauger, 2014), oder in den Madin-Darby Canine Kidney (MDCK) Zellen (Meguro et al., 1979; Zhang und Gauger, 2014; Suderman et al., 2021) erfolgt. Die Inkubation findet für 72-96 h bei 38-38,5 °C statt und ist nur erfolgreich, wenn die Ausgangsprobe vermehrungsfähiges Virus enthält (Beer et al., 2023). Diese Methodik gilt als Goldstandard, wird aber weitgehend durch neuere Methoden ersetzt, was hauptsächlich auf die lange Wartezeit bis zum Erhalt des Ergebnisses zurückzuführen ist (Nathues et al., 2013). Die VI stellt jedoch ein geeignetes Mittel für die Detektion neuer Reassortanten dar, wenn die Primer der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) eine diagnostische Lücke aufweisen (Henritzi et al., 2016; Christopher-Hennings et al., 2019). Geeignetes Probenmaterial für

die VI von IAV stellen Nasentupfer (NT) dar, welche innerhalb der Fieberphase der Infektion entnommen werden sollten (Nathues et al., 2013). Darüber hinaus stellen auch OFs, Rachentupfer und Tracheobronchialtupfer (TBT) adäquate Materialien dar (Zhang und Gauger, 2020).

1.6.1.1.2. Polymerase-Kettenreaktion

Seit der Entwicklung der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) vor etwa 40 Jahren, zählt diese nun zu einer der am häufigsten verwendeten Technik für den direkten Nachweis von Krankheitserregern (Saiki et al., 1985; Beer et al., 2023). Laut Beer et al. (2023) handelt es sich hierbei um ein zielsequenzabhängiges Amplifikationsverfahren, in welchem durch wiederholte Durchläufe, Kopien der in der Probe enthaltenen Nukleinsäuresequenzen gefunden werden. Diese Sequenz ist mittels Primer markiert, anhand dieser Markierung beginnt die RNA-Polymerase mit der Herstellung der Kopien (Nathues et al., 2013). Die ursprünglich für den Nachweis von DNA verwendete Methode ist durch die Entdeckung der Reversen Transkriptase (RT) und deren Fähigkeit, RNA in eine complementary DNA (cDNA) umzuschreiben revolutioniert worden (RT-PCR) (Beer et al., 2023).

Die PCR stellt ein probates Mittel dar, um kosteneffizient und schnell eine große Anzahl an Proben mit einer hohen Sensitivität zu untersuchen (Nathues et al., 2013; Beer et al., 2023). Zu beachten ist jedoch, dass es sich um den reinen Genomnachweis handelt und folglich kein Beweis für eine Vermehrungsfähigkeit des Fragments vorhanden ist, welches letztlich die Interpretation unter Umständen erschweren kann (Nathues et al., 2013).

Es können verschiedene Protokolle in der Durchführung der PCR unterschieden werden. Die Unterscheidung in eine Single und eine Nested PCR beruht auf der Verwendung von einem beziehungsweise zwei Primern (Nathues et al., 2013). Neuere Protokolle wie die der Realtime-RT-qPCR ermöglichen neben des Genomnachweises gleichzeitig eine Quantifizierung dessen und weisen folglich eine höhere Sensitivität auf (Nathues et al., 2013). Die Multiplex-PCR enthält mehrere

Primerpaare, kann damit mehrere Zielsequenzen erkennen und stellt ein probates Mittel dar, um mehrere Erreger in den Betrieben zu monitoren (Nathues et al., 2013; Christopher-Hennings et al., 2019). Letztere ermöglicht nach Choi et al. (2002) die Differenzierung in unterschiedliche IAV-Subtypen. Durch Spackman et al. (2002) wird dieses Verfahren weiter optimiert, indem aus einem zuvor aus zwei Schritten bestehenden Verfahren ein one step Real-Time RT-PCR-Protokoll entstanden ist und folglich die Dauer eines Durchgangs, aber auch die Gefahr von Kreuzkontaminationen nochmals reduziert wird (Spackman et al., 2002). Weiter adaptiert wird das Verfahren durch die Etablierung einer Multiplex Real-Time RT-qPCR (Henritzi et al., 2016). Henritzi et al. (2016) untersuchen die in Europa zirkulierenden IAV-Subtypen. Dies erfolgt mittels einer RT-qPCR und einer anschließenden Durchführung einer Tetraplex-HA- und Tetraplex-NA-RT-qPCR. Letztere ermöglicht die Differenzierung von vier HA- und drei NA-Subtypen. Als weiterer Vorteil dieser PCR wird der Subtypisierungserfolg für Proben mit einem Ct-Wert < 35 beschrieben (Henritzi et al., 2016).

Die PCR stellt darüber hinaus die Grundlage für weiterführende Untersuchungen wie beispielsweise die Sequenzierung dar (Beer et al., 2023). Hier wird die Abfolge von Nukleotiden einer genetischen Informationen eines Genoms nachgewiesen (Beer et al., 2023). Durch stetige Weiterentwicklung der ursprünglichen Methodik nach Sanger ist es heute möglich ganze Genome wie das des IAV zu sequenzieren (Starick et al., 2011; Henritzi et al., 2016). Mittels der MinION Technik können inzwischen eine große Bandbreite an bekannten, aber auch unbekannten humanen, aviären und porzinen IAV-Subtypen ermittelt werden (Wang et al., 2015; Graaf-Rau et al., 2023).

Zur Detektion eignen sich unter anderem OFs, aber auch eine in der Fieberphase entnommene Bronchioalveoläre Lavage oder eine Lungengewebsprobe (Van Reeth und Vincent, 2019).

1.6.1.2. Indirekte Erregerdetektion

Bei einem indirekten Erregernachweis werden Antikörper gegen IAV detektiert (Nathues et al., 2013). Es wird folglich ein Abbild des

Immunstatus der untersuchten Tiere dargestellt, da nicht zwischen Antikörper aufgrund einer Infektion oder Impfung unterschieden werden kann (Nathues et al., 2013). Demzufolge können mittels dieser Verfahren Screenings auf Herdenebene durchgeführt werden. Antikörper gegen IAV können etwa sieben Tage p.i. nachgewiesen werden, somit können Erkrankungen deren Infektionszeitpunkt weniger als eine Woche zurück liegt, übersehen werden (Nathues et al., 2013). Für den indirekten Erregernachweis von IAV stehen mehrere Tests zur Verfügung.

1.6.1.2.1. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

Ein Enzyme-Linked Immunosorbent Assay ist ein Test, welcher auf der Bildung eines Antigen-Antikörperkomplexes beruht, der wiederum eine Farbreaktion hervorruft, die Aufschluss über die Menge des vorhandenen Krankheitserregers geben kann (Nathues et al., 2013). Das Verfahren läuft vereinfacht dargestellt wie folgt ab. Die in einer Probe enthaltenen Antikörper können an spezifische, an der Mikrotiterplatte fixierte Antigene binden. Durch wiederholte Waschungen werden alle nicht gebundenen Antikörper ausgewaschen, anschließend wird das Konjugat hinzugefügt. Letzteres beinhaltet Enzym-markierte Antikörper, welche das nachfolgend hinzugefügte Substrat umsetzen. Die Umsetzung des Substrates ist in einer Farbreaktion ersichtlich. Die Aktivität des Enzym-markierten Antikörpers wird über eine Säurelösung gestoppt.

Neben diesem eben geschilderten Verfahren, welches als indirekter ELISA bezeichnet wird, kann dieser von einem kompetitiven differenziert werden. Letzterer zeichnet sich durch die umgekehrt proportionale Intensität der Farbreaktion aus. Dies liegt darin begründet, dass eine initial mit Antikörpern beschichtete Platte von entweder dem in der Probe enthaltenen Antigen, oder einem Enzym markierten Antigen-Antikörperkomplex gebunden wird, welcher für eine Farbintensität sorgt (Nathues et al., 2013; Christopher-Hennings et al., 2019; Beer et al., 2023). Die Farbreaktionen können anschließend mittels Photometer gemessen werden (Detmer et al., 2013). Die gemessene Optische Dichte (OD) gibt die Intensität dieser Farbmessung wieder und kann über mathematische Berechnungen mithilfe einer Positiv- und Negativ-Kontrolle in ein Sample-to-Positive (S/P) - Verhältnis umgerechnet

werden. Die gemessenen S/P-Verhältnisse können nicht als quantitative Werte betrachtet werden (Christopher-Hennings et al., 2019).

Es sind sowohl ELISA Testkits zum Nachweis spezifischer Subtypen, sowie auch Testsysteme erhältlich, die eine subtypübergreifende Detektion erlauben, indem sie das vorhandene Nucleoprotein (NP) detektieren (de Boer et al., 1990; Wu et al., 2007; ElHefnawi et al., 2011). Laut Yoon et al. (2004) haben subtypspezifische Kits eine hohe Spezifität, vergleichbar zur der des HAH, wohingegen ihre Sensitivität sich als unbefriedigend darstellt. Auch Leuwerke et al. (2008) untersuchen in einer Studie verschiedene serologische Tests und zeigen für den subtypspezifischen (H3N2) ELISA vergleichbare Ergebnisse zu dem des HAH. Lediglich Antikörper gegen das H1 des H1N1 Virus können zum Teil nicht nachgewiesen werden (Leuwerke et al., 2008). Auch verdeutlichen die Autoren die vorsichtige Interpretation der Ergebnisse, da S/P Ratios nicht direkt mit im HAH oder Serumneutralisationstest (SN) gemessenen Titer verglichen werden können (Leuwerke et al., 2008).

Vorteile des NP-ELISA sind die Eignung dieser Tests für Überwachungsprogramme, da keine Differenzierung in einzelne Subtypen erfolgt (de Boer et al., 1990; Ciacci-Zanella et al., 2010).

Für die Detektion mittels Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) eignen sich sowohl Serumproben als auch OFs (Panyasing et al., 2014).

1.6.1.2.2. Hämagglutinationshemmtest

Der Hämagglutinationshemmtest wird als Goldstandard für den Nachweis von IAV-Antikörpern angesehen (Pedersen, 2014). Laut Detmer et al. (2013) basiert dieser Test auf einer physiologischen Reaktion der Erythrozyten. Liegen Antikörper gegen IAV vor, bindet das HA des Virus an ein Sialinsäure gebundenes Protein der Wirtszelle (Detmer et al., 2013). Der Test gilt als positiv, wenn keine Agglutination beobachtet wird, also eine Verklumpung durch die in der Probe enthaltenen Antikörper verhindert wird (Nathues et al., 2013; Beer et al., 2023). Die Ergebnisse dieser Methodik werden als HI-Titer angegeben. Dies ist der Umkehrwert der höchsten Verdünnungsreihe, bei welcher noch eine Reaktion sichtbar ist. Der niedrigste Titer liegt bei 1:10, der Höchste ist

mit 1:1280 definiert. (Detmer et al., 2013). Der gemessene Titer spiegelt nicht die Menge des zirkulierenden Virus wider.

Der HAH ermöglicht durch die Verwendung verschiedener Panele die Differenzierung der einzelnen IAV-Subtypen, spiegelt somit die in einer Herde zirkulierenden Typen wider und kann bei der Einführung weiterer prophylaktischer Maßnahmen in einer Herde hilfreich sein (Detmer et al., 2013). Dieser Test kann zirkulierende Subtypen nur anzeigen, wenn geeignete Panele verwendet werden (Nathues et al., 2013). Die Verwendung einer großen Anzahl an Panele ist entsprechend kostspielig und zeigt die Grenzen dieses Verfahrens auf (Nathues et al., 2013). Außerdem ist das Ergebnis dieses Tests von der durchführenden Person abhängig und entsprechend als subjektiv zu bewerten (Nathues et al., 2013). Einen weiteren negativen Aspekt stellt die Kreuzreaktivität, also die Möglichkeit des primären Antikörpers verschiedene Antigene zu binden, dar (Kyriakis et al., 2010). Dieser Test kann nicht als beweisend für ein akutes Geschehen verwendet werden. Hierfür empfiehlt es sich eine gepaarte Serumprobe, also eine erneute Beprobung nach vier Wochen durchzuführen, um einen möglichen Anstieg der gemessenen Titer festzustellen (Christopher-Hennings et al., 2019).

1.6.2. Materialien

Bei Betrachtung geeigneter Materialien für die Diagnostik von IAV kann zwischen Proben, welche an Einzeltieren und solchen, welche sich für die Beprobung von Gruppen eignen differenziert werden. Neben den als Goldstandard erachteten Nasentupfern (NT), zählt auch die Nasenwischprobe (NWP), der TBT und die Entnahme von Lungengewebe zu den Standards in der IAV-Diagnostik (Swenson et al., 2001; Edwards et al., 2014; Van Reeth und Vincent, 2019). Daneben werden zunehmend in diversen Studien die Eignung Gruppenuntersuchungsproben diskutiert, hierzu zählen neben den Gesäugewischproben (GWP) auch Umgebungsproben (Garrido-Mantilla et al., 2019). Letztere eignen sich zur direkten Detektion von IAV-RNA (Neira et al., 2016; Garrido-Mantilla et al., 2019). Garrido-Mantilla et al. (2019) zeigen für Gruppenuntersuchungsproben bessere Nachweisraten von IAV im Vergleich zu Einzeltierproben. Im Folgenden wird auf OFs, einem

Vertreter von Gruppenuntersuchungsmaterialien eingegangen.

Laut Atkinson (1993) bezeichnet der Begriff OFs die Flüssigkeit, die durch das Einführen von Absorptionskollektoren in den Mund gesammelt wird. Diese Flüssigkeit enthält unter anderem Nahrungsbestandteile, Bakterien, Viren und Inhibitoren, welche im Speichel enthalten sind (Ochert et al., 1994; Hartshorn et al., 2003). In der vorliegenden Studie wird als Absorptionskollektor ein Baumwollstrick verwendet, an dem die Schweine aufgrund ihres explorativen Verhaltens spielen oder in ihn beißen und dieser sich so mit Speichel vollsaugen kann (Henao-Diaz et al., 2020). Die Seile können an den Buchtenwänden oder an Spielzeug befestigt werden (Henao-Diaz et al., 2020). Diese Methode nutzt das Erkundungsverhalten der Schweine aus, ist nicht invasiv und zudem kostengünstig (Prickett et al., 2008b; Kittawornrat et al., 2010; Detmer et al., 2011). Es wird empfohlen, das Seil mindestens 20 Minuten lang in der Bucht zu belassen und mit einem Seil maximal 20-25 Tiere zu beproben (Henao-Diaz et al., 2020). Die zu untersuchende Flüssigkeit wird durch Auswringen des Seils in einem Plastikbehälter aufgefangen (Ramirez et al., 2012; Boulbria et al., 2020). Die Herausforderung bei der Diagnostik von Krankheitserregern aus OFs ist die im Vergleich zu Serumproben geringe Menge an Virus, aber auch die Notwendigkeit einer an die Materialien angepasste PCR (Christopher-Hennings et al., 2019).

Bereits seit einigen Jahrzehnten werden in der Humanmedizin OFs zur Detektion von Antikörpern gegen das Humane Immundefizienz Virus (HIV) verwendet (Archibald et al., 1986). In der Tier- bzw. der Schweinemedizin wird diese Methode erfolgreich für den Nachweis des PRRSV (Wills et al., 1997; Prickett et al., 2010), der Maul- und Klauenseuche (MKS) (Archetti et al., 1995; Pacheco et al., 2010), des Porzinen Circovirus 2 (PCV-2) (Woźniak et al., 2019) und der Klassischen Schweinepest (KSP) (Corthier und Aynaud, 1977) verwendet. Darüber hinaus publizieren Garrido-Mantilla et al. (2019) auch die Eignung der OFs für die Detektion von IAV-RNA. Auch wird in Studien der Nachweis von Antikörpern (AK) gegen IAV gezeigt (Panyasing et al., 2013; Decorte et al., 2015). In einer Studie untersuchen Panyasing et al. (2016) 600

Würfe mittels OFs und Serumproben mit verschiedenen serologischen und molekularbiologischen Tests. Hier zeigen die Autoren die Eignung der OFs für die Überwachung von IAV, betonen aber deren Grenzen hinsichtlich der Subtypisierung der in den Proben enthaltenen RNA (Panyasing et al., 2016). Im Gegensatz dazu werden bei Stadler et al. (2024) ähnliche Subtypisierungsraten für OFs und Nasentupfer festgestellt. Auch können Prickett et al. (2008a) zeigen, dass Kaustrickproben für die Detektion von AK gegen PRRSV geeignet sind. Für PCV-2 (Prickett et al., 2011) und *Actinobacillus pleuropneumoniae* (APP) (Loftager et al., 1993) wird ähnliches hinsichtlich des Nachweises von AK beschrieben.

Auch eignen sich OFs, um diese mit einem aus beispielsweise Virusanzucht gewonnenen Virus zu versehen (Dong et al., 2016). Dieses Verfahren, als Spiken bezeichnet, wird unter anderem für diagnostische Vergleiche verwendet, da hier definierte Mengen an Virus zu einer Probe gegeben werden können (Decorte et al., 2015).

1.6.3. Stabilisierungsmedien

Da Proben häufig unter unzureichenden Bedingungen an Diagnostiklabore versendet werden, stellen Stabilisierungsmedien eine Möglichkeit dar, diese Mängel zu reduzieren und damit potenziell die Lebensdauer und die Aussagekraft der Proben zu erhöhen (Henao-Diaz et al., 2020).

1.6.3.1. Sigma-Virocult®

Bei Sigma-Virocult® (V) handelt es sich laut Herstellerangaben um ein virales Transportmedium, bei dem keine Abtötung von Viren erfolgt, so dass beispielsweise eine Virusanzucht weiterhin möglich ist (Medical Wire & Equipment, 2024). Für die Validierung muss das Medium eine Überlebensdauer der Viren von mindestens 96 h bei Raumtemperatur oder unter gekühlten Bedingungen gewährleisten (Medical Wire & Equipment, 2024). Das Medium enthält zudem Enzyme, die das Wachstum von Bakterien und Pilzen hemmen (Medical Wire & Equipment, 2024). Die Wirksamkeit dieses Mediums wird in verschiedenen Studien beschrieben, darunter ein Experiment, in

welchem das Herpes Simplex Virus (HSV), das Adenovirus und das respiratorische Synzytial-Virus (RSV) unter Verwendung verschiedener Virustransportmedien und unterschiedlichen Lagerungsbedingungen verglichen worden sind (Jensen und Johnson, 1994). Auch beschreiben die Autoren den Erhalt der Infektiosität der in der Probe enthaltenen Viren (Jensen und Johnson, 1994). Dennoch empfehlen die Autoren einen gekühlten Versand und den Zeitraum des Transportes auf den kürzest möglichen Zeitraum zu reduzieren (Jensen und Johnson, 1994). Darüber hinaus wird V als Medium verwendet, um eine VI aus entnommenen Proben zu ermöglichen. Hierfür zeigt eine Studie deutlich, welche die Effizienz der VI aus mit Influenza A und B infizierten Proben hinsichtlich der Verwendung eines herkömmlichen Mediums mit V vergleicht, dass durch Zugabe von V zum einen eine effiziente Isolierung möglich ist, aber auch eine langfristige Lagerung dieser Proben zu gekühlten und ungekühlten Bedingungen (Shevchenko et al., 2013).

1.6.3.2. Primestore®

Nach Zugabe des Primestore® (P) Transportmediums wird der infektiöse Inhalt der Probe durch die Aktivität von Proteasen und Nukleasen inaktiviert, die DNA bzw. RNA bleiben jedoch für weitere diagnostische Bearbeitung erhalten (EKF Diagnostics, 2024). Dies ermöglicht eine Verarbeitung von Proben unter niedrigeren Sicherheitsstandards im Labor. Laut Hersteller sind diese Proben für etwa sieben Tage bei Raumtemperatur, sowie bis zu 28 Tage bei einer Lagerung von 2-8 °C verwendbar (EKF Diagnostics, 2024). Auch ein wiederholtes Auftauen nach Gefrieren hat keinen Einfluss auf die Qualität der Probe. Die Eignung dieses Mediums wird in einigen Studien mit verschiedensten Erregern (SARS-Cov-2, *Mycobacterium tuberculosis*, Influenza A H3N2, Adenovirus type 5) dargestellt (Daum et al., 2011; Omar et al., 2015; Dewar et al., 2020; Lorusso et al., 2020). Um unter niedrigeren Laborsicherheitsstandards zu arbeiten, wird dieses Medium unter anderem für hoch infektiöse Viren wie beispielsweise SARS-Cov-2, aber auch für hochpathogene aviäre Influenza Viren verwendet (Welch et al., 2020; Welch et al., 2024).

1.6.3.3. NucleoProtect VET Reagent®

Bei NucleoProtect VET Reagent® (N) handelt es sich laut Herstellerangaben um ein molekulares Transportmedium, welches, wie auch bereits bei P beschrieben, zu einer Inaktivierung des Virus führt (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, 2024). Dieser Prozess der Inaktivierung erfolgt 30 Minuten nach Zugabe des Mediums bei Raumtemperatur. Dieses Medium kann für Tupferproben, aber auch für Vollblut verwendet werden (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, 2024). Laut Herstellerangaben hat der gekühlte Versand keinen positiven Einfluss auf das Testergebnis, daher wird empfohlen die Proben zwischen -20° C bis 37 °C zu lagern (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, 2024). Dieses Medium wird unter anderem für das Blauzungenvirus (BTV-5), das Lumpy Skin Disease Virus (LSDV) und das Bovinen Corona Virus (BCoV) verwendet (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, 2024). Bei den eben aufgeführten viralen Erregern kann durch Reduktion der Virusaktivität auf < 99,99 % das Gefahrenpotenzial für das Laborpersonal deutlich reduziert werden (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, 2024). Daneben kann eine erhöhte Nachweisrate des LSDV bei gespikten Speichelproben unter Zugabe des Mediums und einer gekühlten Lagerung erzielt werden. Zur Aufarbeitung des BTV sind Blutproben (Rinder, Schafe, Ziegen und Schweine) durch Zugabe von N an verschiedene diagnostische Labore verschickt worden (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, 2024). Hier zeigen alle Proben, welche mit einem Medium versetzt sind konsistente Ergebnisse, während die Blutproben ohne Medium variable Ergebnisse zeigen (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, 2024).

III. PUBLIZIERTE STUDIENERGEBNISSE

Effect of stabilizers on the detection of swine influenza A virus (swIAV) in spiked oral fluids over time

K. Grau^a, K. Lillie-Jaschniski^b, A. Graaf-Rau^{c, d}, T. Harder^c, M. Eddicks^a,
S. Zöls^a, Y. Zablotski^a, M. Ritzmann^a, J. Stadler^{a*}

^a Clinic for Swine at the Centre for Clinical Veterinary Medicine, Ludwig-Maximilians-Universität München, Oberschleißheim, Germany

^b CEVA Tiergesundheit, Germany

^c Institute of Diagnostic Virology, Friedrich-Loeffler-Institut, Greifswald-Insel Riems, Germany

^d Helmholtz Institute for One Health, Greifswald, Germany

*Corresponding author: J.Stadler@med.vetmed.uni-muenchen.de

Porcine Health Management (2024)

Received: 24.08.2024; Accepted: 16.09.2024

Abstract

Background

Aggregated samples such as oral fluids (OFs) display an animal friendly and time and cost-efficient sample type for swine Influenza A virus (swIAV) monitoring. However, further molecular and biological characterization of swIAV is of particular significance. The reportedly inferior suitability of aggregated samples for subtyping of swIAV presents a major drawback compared to nasal swabs, still considered the most appropriate sample type for this purpose (1). In addition, the viral load in the original sample, storage conditions and characteristics of different swIAV strains might further compromise the eligibility of aggregated samples for molecular detection and subtyping.

Therefore, the present study aimed to evaluate the suitability of stabilizing media to minimize the degradation of viral RNA and thus increase the detection and subtyping rate of swIAV by RT-qPCR in spiked OFs under different conditions (virus strain, storage temperature and viral load in the original sample) over a time span of 14 days.

Results

The use of stabilizing media in spiked OFs resulted in a significant higher probability to detect swIAV RNA compared to OFs without stabilizers (OR = 46.1, $p < 0.001$). In addition, swIAV degradation over time was significantly reduced in samples suspended with stabilizer (OR = 5.80, $p < 0.001$), in samples stored at 4 °C (OR = 2.53, $p < 0.001$) and in samples spiked with the avian derived H1N2 subtype (OR = 2.26, $p < 0.01$). No significant differences in swIAV RNA detection and degradation of swIAV

RNA in spiked OFs over time were observed between the three different stabilizing media.

Conclusion

Addition of stabilizers and storage of samples under cooled conditions significantly improved detection and subtyping of swIAV in spiked OFs.

Keywords

swine, influenza A virus, subtyping, surveillance, stabilizing media, RT-qPCR

Main text

Background

Economic losses due to swine Influenza A virus (swIAV) impacting the swine industry and their potential threat to human health highlight the need for rapid and accurate identification and subtyping of these viruses (2-4).

Commonly more than one swIAV subtype circulates in one herd (5). Frequent transmissions of human A (H1N1) 2009 pandemic virus into swine populations since 2009 established enzootically infected herds with highly variable clinical signs (6). As a result, the already sophisticated diagnosis of swIAV is further complicated (7-9). Whereas diagnostics for individual animals are both, time-consuming and cost-intensive, sampling techniques assessing groups of pigs have gained increasing interest concerning the detection and monitoring of various pathogens. One common aggregate non-invasive sampling method is the collection of oral

fluids (OFs) (10-12), which can be collected also by staff with little previous experience. However, those specimens have shown shortcomings concerning their suitability for the subtyping of swIAV strains (10) due to lower viral loads in aggregate OF samples compared to individual samples, i.e. nasal swabs (13). In addition, it was hypothesized that the presence of salivary enzymes (14, 15), proteins (10, 16), cellular debris (17) and high bacterial loads in oral fluids as well as inadequate transport conditions (18) can contribute to further degradation of viral RNA. To avoid degradation of intact virus or viral nucleic acids, different stabilizers have been described for the molecular detection of PRRSV (19), avian influenza virus and Newcastle Disease virus (20), SARS-CoV-2 (21), herpes simplex viruses, enteroviruses, and adenoviruses (22). However, the stability of swIAV in aggregated samples is poorly investigated.

Therefore, the aim of the present study was to assess whether the addition of stabilizing media to OFs, spiked with two different swIAV strains, improve the rate of detection and the suitability of subtyping by RT-qPCR under different storage conditions and viral loads in the original sample over a time period of 14 days.

Material and methods

OF sampling was conducted on a research facility housing SPF pigs. The facility was considered negative for swIAV based on monthly monitoring by RT-qPCR, ELISA and hemagglutination inhibition (HI) assays, all with negative results. OFs were collected individually from 24 pigs, six months

of age, by using the IDEXX Oral Fluid Collection Kit (IDEXX Westbrook, USA). Briefly an undyed-cotton 3-strand twisted rope was placed into the pen at the height of the pig's shoulder for 25–30 min, to allow the pig to chew on the rope. For extraction of the sample from the rope the wet end was inserted in the supplied plastic bag with the attached tube and manually squeezed. A total of 50 mL of OFs could be obtained from the 24 pigs. The OF was tested negative for swIAV RNA by RT-qPCR at FLI and stored at -80 °C until further analysis. Before further investigations the samples were then thawed and centrifuged at 2000g for 15 minutes. A total of 128 samples (32 samples per media (n=96) and 32 control samples) were spiked by introducing a known quantity of a swIAV isolate into the oral fluid sample. We either used swIAV isolate A/swine/Germany/2022AI04470/2022 (H1avN2, clade 1C) or A/swine/Germany/2022AI03601/2022 (H1pdmN2, clade 1A), respectively. These virus isolates were propagated in swine testicle cells (FLI Collection of Cell Lines in Veterinary Medicine CCLV-RIE 0606) for two passages and their RNA adjusted beforehand, to achieve by RT-qPCR threshold cycle values (Ct) of 25 and 32, respectively. Afterwards, stabilizing media was added to the spiked OF specimens at a ratio of 3:1 (0.3 mL OF and 0.9 mL stabilizing media). Three different media were used (i) Sigma-Virocult® MW950S (V) (Check Diagnostics GmbH, Westerau, Germany), (ii) PrimeStore® MTM (P) (Longhorn Vaccines & Diagnostics LLC, Bethesda, USA, P) and (iii) NucleoProtect VET Reagent® (N) (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Dueren, Germany, M&N). Aliquots of oral fluids spiked and diluted with stabilizing media were stored at either 4 °C or 22 °C and triplicates of these were used for

analysis at 72 h, 7 days (168 h) and 14 days (336 h). A detailed description of the study design is shown in (figure 1).

RNA was extracted from the supernatants at the indicated time points by using 100 μ L volume within the NucleoMag®VET Kit (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Dueren, Germany) according to the manufacturer's instructions (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Dueren, Germany) and kept frozen at -80 °C until all extractions were finalized. All RNAs were investigated in a modified generic Matrix-protein specific one step RT-qPCR for the detection of Influenza A virus (23). Samples with a Ct-value of < 40 were rated as swIAV positive. Based on previous publications and due to lower detection limits of subtype- and lineage-specific RT-qPCRs (8, 24), samples with Ct-values of ≤ 33 were selected for subtyping as described elsewhere (25).

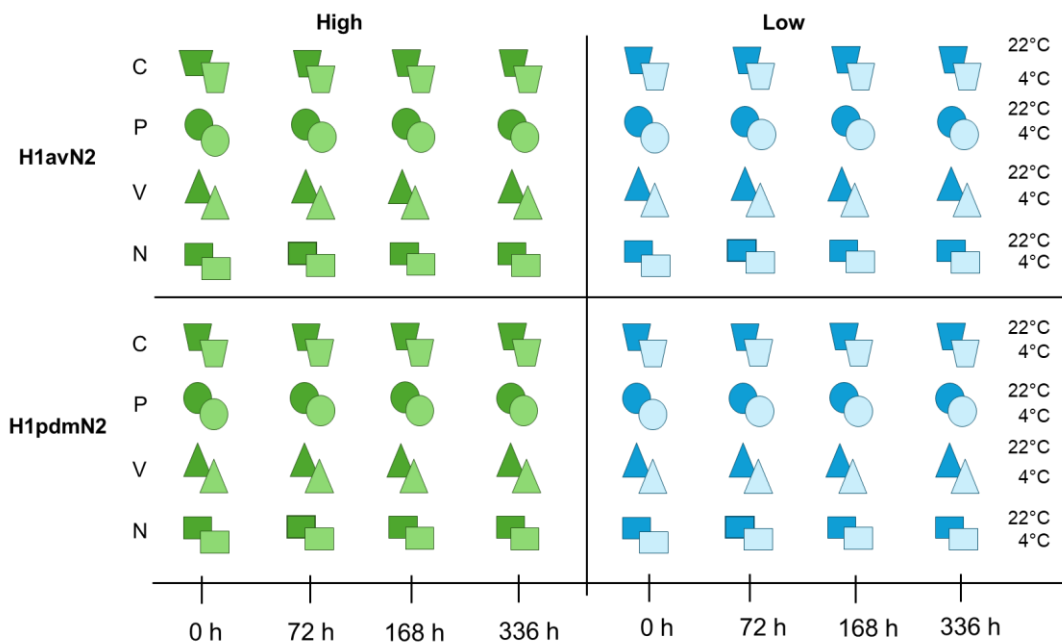


figure 1 Overview of the study design. This graph shows an overall of 128 individual experiments. Oral fluids from swIAV negative pigs were spiked with H1avN2 or H1pdmN2 with either high (Ct-25) or low (Ct-32) viral loads of swIAV and suspended with stabilizing media: Virocult® (V), represented by a triangle, Primestore® (P) by a circle and NucleoProtect VET Reagent® (N) by a rectangle. The untreated control group is represented by a trapezoid. The differentiation between darker and lighter colored shapes is intended to represent the respective storage condition (4 °C / 22 °C).

Statistical analysis

The temperature, viral load, time, subtype, stabilizer (with, without) and stabilizer medium (V, P, N) were considered as potential influential factors (predictors) on swIAV positivity in a multivariable logistic regression. The backwards variable selection was used to reduce the number of predictors to only important ones. The stabilizer (with, without), viral load and time remained in the final model after backwards selection.

The temperature, viral load, time, subtype, stabilizer (with, without) and stabilizer medium (V, P, N) were considered as potential influential factors (predictors) on degradation of viral RNA in a multivariable linear

regression. The backwards variable selection was used to reduce the number of predictors to only important ones. The stabilizer medium (V, P, N), subtype, temperature, and time remained in the final model after backwards selection. The normality of residuals, homogeneity of variance of residuals, linearity of residuals, the existence of influential points and collinearity of the final multivariable linear model were checked visually via the performance R-package. The assumptions were found to be satisfied.

All contrasts (differences) between categories of predictors for both logistic and linear models were assessed after model-fitting by the estimated marginal means (R package - emmeans) with Tukey p-value correction for multiple comparisons. Results with a P-value < 0.05 were considered statistically significant. Data analysis was performed using R 4.3.3 (2024-02-29).

Results

Laboratory investigation

Detection of swIAV RNA in spiked oral fluids

In general, swIAV could be detected by RT-qPCR in 109 out of 128 (85 %) examined samples. Thereof, 76 (70 %) samples could be potentially subtyped (ct-value $\leq$ 33). In detail 94 % of the spiked samples with stabilizing media and 59 % of the control samples were swIAV-RNA positive. Additionally, Ct-values $\leq$ 33 were found in 71 % of the spiked samples with stabilizing media and in 63 % of the control samples. Details on the swIAV detection and subtyping rate (Ct-values $\leq$ 33) in

association with the different stabilizing media, viral loads, storage temperature and time after spiking are displayed in table 1.

table 1 *Number (n) and percentage (%) of swIAV positive (Ct < 40) samples and samples with Ct-values (Ct ≤ 33) by influential factors viral load, swIAV subtype, stabilizer type, time after spiking and temperature.*

Factors	Parameter	swIAV RNA positive	Ct-values ≤ 33
Viral load	High	63/64 (98 %)	53/63 (84 %)
	Low	46/64 (72 %)	23/46 (50 %)
swIAV subtype	H1avN2	56/64 (88 %)	40/56 (71 %)
	H1pdmN2	53/64 (83 %)	36/53 (68 %)
Stabilizer	Yes	90/96 (94 %)	64/90 (71 %)
	No (Control)	19/32 (59 %)	12/19 (63 %)
	NucleoProtect VET Reagent®	29/32 (91 %)	20/29 (69 %)
	Primestore®	29/32 (91 %)	21/29 (72 %)
	Sigma-Virocult®	32/32 (100 %)	23/32 (72 %)
Time after spiking	0 h	32/32 (100 %)	32/32 (100 %)
	72 h	27/32 (84 %)	17/27 (63 %)
	168 h (7 d)	27/32 (84 %)	15/27 (56 %)
	336 h (14 d)	23/32 (72 %)	12/23 (52 %)
Temperature	4 °C	57/64 (89 %)	42/57 (74 %)
	22 °C	52/64 (81 %)	34/52 (65 %)

In table 2 details on swIAV positive samples and potentially subtypeable samples with Ct-values ≤ 33 over the study period for the different stabilizing media and conditions (storage, swIAV subtypes, viral loads)

are presented. Regardless of the treatment and the storage conditions all samples spiked with high viral loads (Ct-25) of H1avN2 yielded RT-qPCR positive results until the end of the study on day 14. However, only samples with stabilizers showed Ct-values ≤ 33 over the entire study period. Samples spiked at lower viral loads (Ct-32) of H1avN2 were only positive until day 14 when stored with Sigma-Virocult® and PrimeStore®. Here, cooling of Sigma-Virocult® suspended samples resulted in Ct-values ≤ 33 until day 7, whereas cooling did not affect the subtyping rate of the other samples spiked at lower viral loads (Ct-32) of H1avN2. All samples spiked with high viral loads of H1pdmN2 were positive until 14 days, when suspended with media. In contrast, only control group samples stored under refrigerated conditions yielded swlAV positive results over the entire study period. Cooling resulted in a longer possibility of potential subtyping for samples suspended with Sigma-Virocult®. In case of low viral loads of H1pdmN2 only samples suspended with media and stored at 4 °C were positive until day 14. Here, cooling also prolonged the period of subtyping for samples suspended with Sigma-Virocult® and PrimeStore®.

table 2 Overview of swlAV detection by RT-qPCR in oral fluids spiked with high or low viral loads (H1avN2 or H1pdmN2) and suspended in three different stabilizer media or without stabilizer media at different storage conditions, detected Ct-values ≥ 40 were evaluated as negative (neg.), Ct-values > 33 were not subtyped. Ct-values ≤ 33 were considered as subtypeable. TP = time after spiking, C = control, V = Sigma-Virocult®, P = Primestore®, N= NucleoProtect VET Reagent®; neg. = negative.

Viral load	Temp.	Medium TP	H1avN2				H1pdmN2			
			C	V	P	N	C	V	P	N
High (Ct-25)	22 °C	0 h	+	+	+	+	+	+	+	+
			≤ 33	≤ 33	≤ 33	≤ 33	≤ 33	≤ 33	≤ 33	≤ 33
		72 h	+	+	+	+	+	+	+	+
			≤ 33	≤ 33	≤ 33	≤ 33	> 33	> 33	≤ 33	≤ 33
	4 °C	168 h (7 d)	+	+	+	+	+	+	+	+
			≤ 33	≤ 33	≤ 33	≤ 33	> 33	> 33	≤ 33	≤ 33
		336 h (14 d)	+	+	+	+	neg.	+	+	+
			> 33	≤ 33	≤ 33	≤ 33	> 33	> 33	≤ 33	≤ 33
Low (Ct-32)	22 °C	0 h	+	+	+	+	+	+	+	+
			≤ 33	≤ 33	≤ 33	≤ 33	≤ 33	≤ 33	≤ 33	≤ 33
		3 d	neg.	+	+	+	neg.	+	neg.	+
				> 33	> 33	> 33		≤ 33		> 33
	4 °C	168 h (7 d)	neg.	+	+	+	neg.	+	neg.	+
				> 33	> 33	> 33		> 33		> 33
		336 h (14 d)	neg.	+	+	neg.	neg.	+	neg.	neg.
				> 33	> 33			> 33		

Probability to detect swlAV RNA in spiked oral fluid samples

The multivariable analysis revealed that the use of stabilizers in the spiked OFs resulted in a significant higher probability to detect swlAV RNA compared to samples without stabilizers (OR = 46.1, $p < 0.001$). In addition, the chance to detect swlAV RNA was significantly lower when OF were spiked at low viral loads (OR = 0.01, $p < 0.001$). Also, long time of storage (336h, 14 d) reduced the probability to detect swlAV compared to immediate analysis (0h) (OR = 0.01, $p = 0.002$) (table 3).

table 3 *Odds Ratio (OR) with 95 % Confidence Interval (CI) and p-value for the detection of swlAV RNA (dependent variable) in spiked OFs in dependency of the independent variables stabilizer, time, and viral load estimated by the multivariable logistic regression.*

Independent variables		Multivariable analysis		
		OR	95 % CI	p-value
Viral load	Low / High	0.01	0.00, 0.11	<0.001
Time after spiking	72 h / 0 h	0.07	0.00, 1.34	0.094
	168 h / 0 h	0.07	0.00, 1.34	0.094
	72 h / 168 h	1.00	0.07, 13.6	>0.999
	336 h / 0 h	0.01	0.00, 0.30	0.002
	336 h / 72 h	0.21	0.02, 2.26	0.330
	336 h / 168 h	0.21	0.02, 2.26	0.330
Stabilizer	Without / With	0.02	0.00, 0.12	<0.001

Bold values represent significant results.

Degradation of swlAV RNA over time

The degradation of swlAV RNA over time was calculated by subtracting the Ct-values measured at the beginning (0h) of the study from the respective subsequently measured Ct-values (Ct0 h-72 h, Ct0 h-168 h, Ct0 h-336 h). The results represented as increase in Ct-values, are depicted in figure 2 for each stabilizer and control group samples with respect to different storage conditions and the viral loads.

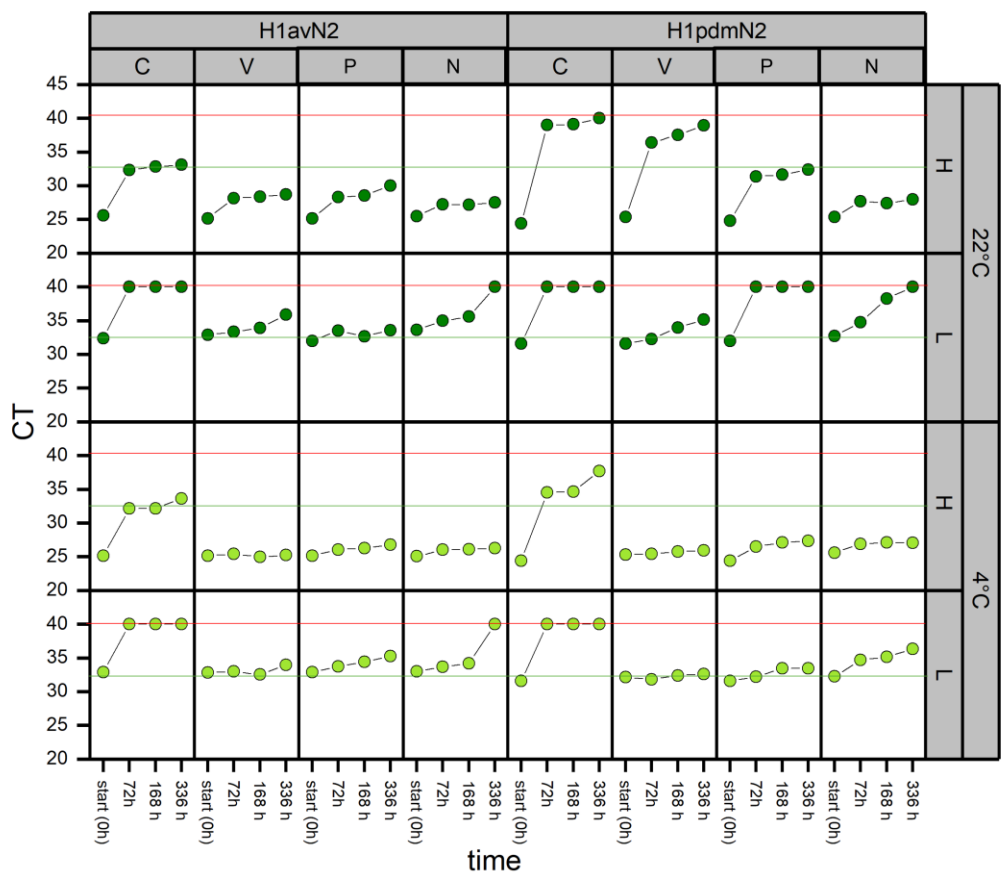


figure 2 Stability of swlAV RNA in spiked oral fluids. Oral fluids from swlAV negative pigs were spiked with H1avN2 or H1pdmN2 with either high (H; Ct=25) or low (L; Ct=32) viral loads of swlAV and stored at different temperatures (room temperature, 22 °C,) or refrigerated (4 °C), with the addition of stabilizers (V = Sigma-Virocult®, P = Primestore®, N = NucleoProtect VET Reagent®) or without (C = Control). Samples were collected at predetermined intervals (start (0), 72 h, 168 h (7 d), and 336 h (14 d) after spiking) and analyzed for swlAV by RT-qPCR. The red line indicates the limit for positive samples (CT < 40) and the green line for subtypeable samples.

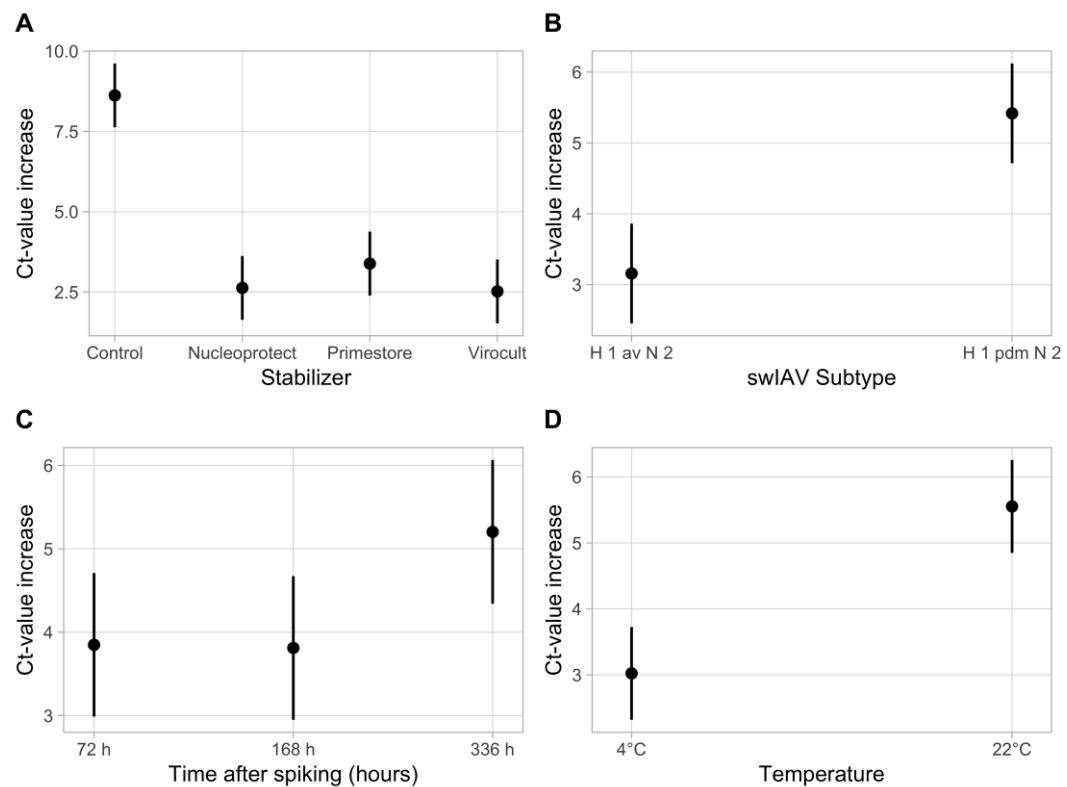


figure 3 The results of the final multivariable linear regression after backwards variable selection showing the degradation of swlAV RNA, depicted as Ct- value Increase by qRT-PCR in spiked oral fluids with the addition of the different stabilizer media or without (A), with either H1avN2 or H1pdmN2 (B), collected at different time points (start (0), 72 h, 168 h (7 d), and 336 h (14 d) after spiking) (C) and stored at either room temperature, (22 °C,) or refrigerated (4 °C) (D).

The degradation of swlAV RNA over time was subsequently measured through a multivariable analysis. Adding Sigma-Virocult®, PrimeStore® or NucleoProtect VET Reagent® to OF samples resulted in a significant lower increase of the Ct-value ($p < 0.001$) compared to samples without medium. In addition, degradation of swlAV RNA over time was significantly lower in samples spiked with H1avN2 compared to samples spiked with H1pdmN2 ($p < 0.001$) and samples kept refrigerated at 4 °C compared to samples stored at 22 °C ($p < 0.001$), respectively (table 4). The degradation of swlAV RNA, depicted as increase of Ct-values, is shown in figure 3.

table 4 Slopes (Beta), Confidence Intervals (CIs) and p-value of the factors (swIAV subtype, stabilizers, time after spiking, and temperature) influencing Ct-values using a multivariable linear analysis (N = NucleoProtect VET Reagent®, C = Control, P = Primestore®, V = Sigma-Virotec®).

Independent variable		Multivariable analysis		
		Beta	95% CI	p-value
swIAV subtype	H1avN2 – H1pdmN2	2.26	1.27, 3.25	<0.001
Stabilizers	C – N	-5.98	-8.27, -3.69	<0.001
	C - P	-5.22	-7.51, -2.94	<0.001
	N - P	0.76	-1.53, 3.05	0.8
	C - V	-6.09	-8.38, -3.80	<0.001
	N - V	-0.11	-2.40, 2.18	>0.9
	P - V	-0.86	-3.15, 1.43	0.8
Time after spiking	72 h – 168 h	-0.04	-1.50, 1.42	0.998
	72 h – 336 h	1.35	-0.10, 2.81	0.074
	168 h – 336 h	1.39	-0.07, 2.85	0.065
Temperature	4 °C –22 °C	2.53	1.54, 3.52	<0.001

Bold values represent significant results.

Discussion

Since swIAV is enzootically circulating in pig populations and new subtypes with prepandemic potential might evolve, surveillance of swIAV in pig herds is of considerable importance (26, 27). However, active surveillance of individual animals using nasal swabs is hampered by (i) the short infectious period enabling virus detection only for a couple of days and (ii) the high costs. Particularly, herds with low prevalence of swIAV require a high sample size (28). Therefore, aggregate samples as

OFs, USW or environmental samples have gained increasing interest as cost-effective and non-invasive animal friendly sampling procedures (1, 29). However, deterioration of virus and viral RNA resulting from degradative bacterial and salivary enzymes and inhibitors (16) such as Glycoprotein-340 and MUC5B (10) might resemble a major drawback of aggregate samples like OFs and USW (30, 31), as low viral loads reduce the probability to characterize swIAV subtypes by multiplex RT-qPCR or sequencing (24, 25). However, the identification of different strains circulating in a pig herd is of particular importance to implement prophylactic measures like vaccination as cross protection between different swIAV strains is limited (32-36). Therefore, the effect of different stabilizers on improving the detection and subtyping rate of aggregate samples was assessed under laboratory conditions as samples with controlled laboratory swIAV contamination may not reflect samples from naturally infected pigs. Due to suitability of spiking, OFs were used for the laboratory study. Currently, three main swIAV subtypes (H1N1, H1N2, and H3N2) with a large abundance of genotypes and variants, that differ genetically and antigenically between regions, are circulating in the European pig population (9, 27, 37). In our experiment, the subtypes H1avN2 and H1pdmN2 (clade 1C and 1A, respectively) were selected. The H1avN2 subtype, which emerged 2003 in Denmark is now predominantly found, in Denmark (9, 38), and has also been detected in e.g. France (39), Sweden, Germany (27), Spain (40), Italy (41), Belgium and the Netherlands (37). Additionally, a pandemic strain was chosen, due to the increasing detection of pandemic strains or reassortants containing internal genes of human pandemic origin in several European

countries (6, 26, 27, 37). Interestingly, in our study degradation of swIAV RNA over 14 days of storage was significantly higher for H1pdmN2 compared to H1avN2, indicating that the real prevalence of pandemic strains is often underestimated. This finding highlights the importance of further improving shipment and storage conditions for adequate swIAV diagnostics.

The results of the laboratory study clearly show that cooled storage (4 °C) of OFs even without a stabilizer medium facilitated swIAV RNA detection up to 14 days, at least at high viral loads. According to Henao-Diaz, Giménez-Lirola (42) the most important aspects in handling of OFs includes immediate cooling of the samples (4 °C) after collection and during storage. Similar recommendations can be obtained from various authors on the management of OFs for the detection of Porcine Reproductive Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) (42-44). However, it should be noted that in case of low viral loads, as often only detected in enzootically infected farms, even at 4 °C the degradation of RNA is high and the detection rate is highly reduced. However, by adding stabilizing media and simultaneous cooling of the samples, swIAV RNA can still be detected even at low viral loads for at least 14 days. According to multivariable analysis the addition of a stabilizer did not only enable prolonged detectability of swIAV by PCR, but also increases the probability to subtype swIAV. Also, for PRRSV, another RNA virus, Decorté (45) highlighted the positive effect of stabilizer medium on the duration of PRRSV detection in oral fluids. However, Oragene RNA stabilizer (Aware Messenger, Saliva Gene Collection Module) was the only one out of three stabilizers which had a positive impact on detection

of PRRSV at room temperature after 168h (45). In addition, other studies showed no significant impact through the addition of GTP or an antimicrobial treatment of oral fluid samples on the detection of PRRSV by RT-qPCR (43, 44).

In our experiments the performance of three different stabilizers was compared. It should be noted that molecular transport media or virus transport media have different characteristics. Whereas molecular transport media inactivates all germs in the collected sample and thus, is not appropriate for cultivation of viruses, but most suitable for the transport of viruses with a high risk of infection as e.g. such as SARS-CoV-2 (46), virus transport media still allows further diagnostics based on virus propagation (18). In the present study, PrimeStore® and NucleoProtect VET Reagent®, were used as example of molecular transport medium. Primestore®, contains guanidine thiocyanate which inactivates germs, but still enables the detection of nucleic acids. According to the manufacturer's instructions, the adding of NucleoProtect VET Reagent® enables the detection of RNA for one week at RT and up to one month at 4 °C. However, in the present study OFs supplemented with NucleoProtect VET Reagent® revealed swIAV negative PCR results as soon as seven days after spiking with low viral for subtype H1avN2 stored at 4 °C. Sigma-Virocult® is a virus transport media which does not inactivate viruses. Consequently, it could be used to enable further diagnostic such as virus isolation in cell culture (18). According to Rudsdale (47), detection of influenza A virus in samples suspended with Sigma-Virocult® is possible up to at least 8 days at both room temperature and under cooled conditions. In the present study,

swlAV RNA was detectable in samples spiked with Sigma-Virocult® after 14 days (22 °C) regardless of the subtype. Based on the conditions of our study no statistically significant differences regarding both detection of swlAV and swlAV degradation over time between the three investigated stabilising media were detected. Finally, the limitations of our study (i.e. low sample size, no repetition of the experiment, limited generalizability) should be highlighted. Nevertheless, the authors believe that this exploratory study has provided important new insights in optimization of storage conditions for OFs that should be further elaborated under field conditions and for different pathogens.

Conclusion

Addition of stabilizers improved both detection and subtyping of swlAV in spiked oral fluids during 14 days of storage. However, it is evident that even with the addition of stabilizing media, molecular swlAV diagnostics can further be improved by refrigerated shipping and storage of the samples. Under the conditions of our study no significant differences between the three tested media were found.

List of abbreviations

av	avian
Ct	Cycle threshold
FLI	Friedrich-Loeffler-Institute
HA	hemagglutinin inhibition
LMU	Ludwig-Maximilians-Universität
OF	oral fluid(s)
RT-qPCR	real-time quantitative PCR
swIAV	swine Influenza A virus
SARS-CoV-2	severe acute respiratory syndrome coronavirus type 2
V	Sigma-Virocult®
R	Primestore®
N	NucleoProtect Vet Reagent®
C	Control
GTP	Guanosin-5-triphosphate

Declaration**Ethics approval and consent to participate**

The sampling protocol and procedures were approved by the Ethic commission of the LMU Munich, accession number 403-27-05-2024.

Consent for publication

Not applicable.

Availability of data and materials

The dataset is available from the corresponding author on reasonable request.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Funding

This study was financially supported by Ceva Tiergesundheit GmbH, Germany.

Authors' Contributions

Conceptualization: JS, TH, KLJ, MR. Data curation: AGR, KG, JS, YZ, ME, SZ. Formal analysis: AGR, JS, ME, KG, SZ. Funding acquisition: JS, KLJ. Project administration: JS, TH, MR. Resources: KLJ. Software: YZ. Supervision: JS, TH, MR. Validation: TH, ME, YZ, SZ. Visualization: JS, YZ, KG, ME, SZ. Writing – original draft: JS, KG, ME. All authors read and approved the final manuscript.

Authors' information

Clinic for Swine at the Centre for Clinical Veterinary Medicine, Ludwig-Maximilians-Universität München, Oberschleißheim, Germany

CEVA Tiergesundheit, Germany

Institute of Diagnostic Virology, Friedrich-Loeffler-Institut, Greifswald-Insel Riems, Germany

Helmholtz Institute for One Health, Greifswald, Germany

References

1. Garrido-Mantilla J, Alvarez J, Culhane M, Nirmala J, Cano JP, Torremorell M. Comparison of individual, group and environmental sampling strategies to conduct influenza surveillance in pigs. *BMC Vet Res.* 2019;15(1):61.
2. Bennett R, Ijpelaar J. Updated Estimates of the Costs Associated with Thirty Four Endemic Livestock Diseases in Great Britain: A Note. *Journal of Agricultural Economics.* 2005;56(1):135-44.
3. Er C, Lium B, Tavoranpanich S, Hofmo PO, Forberg H, Hauge AG, et al. Adverse effects of Influenza A(H1N1)pdm09 virus infection on growth performance of Norwegian pigs - a longitudinal study at a boar testing station. *BMC Vet Res.* 2014;10:284.
4. Fablet C, Rose N, Grasland B, Robert N, Lewandowski E, Gosselin M. Factors associated with the growing-finishing performances of swine herds: an exploratory study on serological and herd level indicators. *Porcine Health Management.* 2018;4:1-11.
5. Torremorell M, Allerson M, Corzo C, Diaz A, Gramer M. Transmission of influenza A virus in pigs. *Transbound Emerg Dis.* 2012;59 Suppl 1:68-84.
6. Starick E, Lange E, Grund C, Grosse Beilage E, Döhring S, Maas A, et al. Reassortants of pandemic influenza A virus H1N1/2009 and endemic porcine HxN2 viruses emerge in swine populations in Germany. *J Gen Virol.* 2012;93:1658-63.
7. Brown IH. The epidemiology and evolution of influenza viruses in pigs. *Vet Microbiol.* 2000;74(1-2):29-46.

8. Detmer S, Gramer M, Goyal S, Torremorell M, Torrison J.
Diagnostics and surveillance for Swine influenza. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2013;370:85-112.
9. Simon G, Larsen LE, Dürrwald R, Foni E, Harder T, Van Reeth K, et al. 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.* 2014;9(12):e115815.
10. Detmer SE, Patnayak DP, Jiang Y, Gramer MR, Goyal SM. Detection of Influenza A virus in porcine oral fluid samples. *J Vet Diagn Invest.* 2011;23(2):241-7.
11. Prickett JR, Simer, R, Yoon KJ, Zimmerman JJ. Oral-fluid samples for surveillance of commercial growing pigs for porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus type 2 infections. *Journal of Swine Health and Production.* 2008;16:86-91.
12. Kittawornrat A, Prickett J, Chittick W, Wang C, Engle M, Johnson J, et al. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in serum and oral fluid samples from individual boars: will oral fluid replace serum for PRRSV surveillance? *Virus Res.* 2010;154(1-2):170-6.
13. Stadler J, Zwickl S, Gumbert S, Ritzmann M, Lillie-Jaschniski K, Harder T, et al. Influenza surveillance in pigs: balancing act between broad diagnostic coverage and specific virus characterization. *Porcine Health Manag.* 2024;10(1):19.
14. Eichel HJ, Conger N, Chernick WS. Acid and alkaline ribonucleases of human parotid, submaxillary, and whole saliva. *Arch Biochem Biophys.* 1964;107:197-208.

15. Gregory RL, Kim DE, Kindle JC, Hobbs LC, Lloyd DR.
Immunoglobulin-degrading enzymes in localized juvenile periodontitis. *J Periodontal Res.* 1992;27(3):176-83.
16. Ochert AS, Boulter AW, Birnbaum W, Johnson NW, Teo CG.
Inhibitory effect of salivary fluids on PCR: potency and removal. *PCR Methods Appl.* 1994;3(6):365-8.
17. Hartshorn KL, White MR, Mogue T, Ligtenberg T, Crouch E, Holmskov U. Lung and salivary scavenger receptor glycoprotein-340 contribute to the host defense against influenza A viruses. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2003;285(5):L1066-76.
18. Dsa OC, Kadni TS, N S. From cold chain to ambient temperature: transport of viral specimens- a review. *Ann Med.* 2023;55(2):2257711.
19. Almeida MN, Zimmerman JJ, Wang C, Linhares DCL. Assessment of abattoir based monitoring of PRRSV using oral fluids. *Prev Vet Med.* 2018;158:137-45.
20. Welch JL, Shrestha R, Hutchings H, Pal N, Levings R, Robbe-Austerman S, et al. Inactivation of highly transmissible livestock and avian viruses including influenza A and Newcastle disease virus for molecular diagnostics. *Front Vet Sci.* 2024;11:1304022.
21. Lorusso A, Calistri P, Mercante MT, Monaco F, Portanti O, Marcacci M, et al. A "One-Health" approach for diagnosis and molecular characterization of SARS-CoV-2 in Italy. *One Health.* 2020;10:100135.
22. Jensen C, Johnson FB. Comparison of various transport media for viability maintenance of herpes simplex virus, respiratory syncytial virus, and adenovirus. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 1994;19(3):137-42.

23. Spackman E. Influenza subtype identification with molecular methods. *Methods Mol Biol.* 2014;1161:119-23.
24. Henritzi D, Zhao N, Starick E, Simon G, Krog JS, Larsen LE, et al. Rapid detection and subtyping of European swine influenza viruses in porcine clinical samples by haemagglutinin- and neuraminidase-specific tetra- and triplex real-time RT-PCRs. *Influenza Other Respir Viruses.* 2016;10(6):504-17.
25. Graaf-Rau A, Hennig C, Lillie-Jaschniski K, Koechling M, Stadler J, Boehmer J, et al. Emergence of swine influenza A virus, porcine respirovirus 1 and swine orthopneumovirus in porcine respiratory disease in Germany. *Emerg Microbes Infect.* 2023;12(2):2239938.
26. Henritzi D, Petric PP, Lewis NS, Graaf A, Pessia A, Starick E, et al. Surveillance of European Domestic Pig Populations Identifies an Emerging Reservoir of Potentially Zoonotic Swine Influenza A Viruses. *Cell Host Microbe.* 2020;28(4):614-27.e6.
27. Harder TC, Grosse Beilage E, Lange E, Meiners C, Döhring S, Pesch S, et al. Expanded cocirculation of stable subtypes, emerging lineages, and new sporadic reassortants of porcine influenza viruses in swine populations in Northwest Germany. *J Virol.* 2013;87(19):10460-76.
28. Lillie-Jaschniski K, Lisgara M, Pileri E, Jardin A, Velazquez E, Köchling M, et al. A New Sampling Approach for the Detection of Swine Influenza a Virus on European Sow Farms. *Vet Sci.* 2022;9(7).
29. Neira V, Rabinowitz P, Rendahl A, Paccha B, Gibbs SG, Torremorell M. Characterization of Viral Load, Viability and Persistence of Influenza A Virus in Air and on Surfaces of Swine Production Facilities. *PLoS One.* 2016;11(1):e0146616.

30. Azeem S, Gauger P, Sato Y, Baoqing G, Wolc A, Carlson J, et al. Environmental Sampling for Avian Influenza Virus Detection in Commercial Layer Facilities. *Avian Dis.* 2021;65(3):391-400.
31. Hood G, Brioudes A, von Dobschuetz S, Fasina FO, Kalpravidh W, Makonnen Y, Lubroth J, Sims L. A literature review of the use of environmental sampling in the surveillance of avian influenza viruses. *Transboundary and Emerging Diseases.* 2020;68(1):110-26.
32. Sandbulte MR, Spickler AR, Zaabel PK, Roth JA. Optimal Use of Vaccines for Control of Influenza A Virus in Swine. *Vaccines (Basel).* 2015;3(1):22-73.
33. Rahn J, Hoffmann D, Harder TC, Beer M. Vaccines against influenza A viruses in poultry and swine: Status and future developments. *Vaccine.* 2015;33(21):2414-24.
34. Deblanc C, Quéguiner S, Gorin S, Chastagner A, Hervé S, Paboeuf F, et al. Evaluation of the Pathogenicity and the Escape from Vaccine Protection of a New Antigenic Variant Derived from the European Human-Like Reassortant Swine H1N2 Influenza Virus. *Viruses.* 2020;12(10).
35. Everett HE, Aramouni M, Coward V, Ramsay A, Kelly M, Morgan S, et al. Vaccine-mediated protection of pigs against infection with pandemic H1N1 2009 swine influenza A virus requires a close antigenic match between the vaccine antigen and challenge virus. *Vaccine.* 2019;37(17):2288-93.
36. Tamura S, Tanimoto T, Kurata T. Mechanisms of broad cross-protection provided by influenza virus infection and their application to vaccines. *Jpn J Infect Dis.* 2005;58(4):195-207.

37. Chepkwony S, Parys A, Vandoorn E, Stadejek W, Xie J, King J, et al. Genetic and antigenic evolution of H1 swine influenza A viruses isolated in Belgium and the Netherlands from 2014 through 2019. *Sci Rep.* 2021;11(1):11276.
38. Trebbien R, Bragstad K, Larsen LE, Nielsen J, Bøtner A, Heegaard PM, et al. Genetic and biological characterisation of an avian-like H1N2 swine influenza virus generated by reassortment of circulating avian-like H1N1 and H3N2 subtypes in Denmark. *Virol J.* 2013;10:290.
39. Rose N, Hervé S, Eveno E, Barbier N, Eono F, Dorenlor V, et al. Dynamics of influenza A virus infections in permanently infected pig farms: evidence of recurrent infections, circulation of several swine influenza viruses and reassortment events. *Vet Res.* 2013;44(1):72.
40. Sosa Portugal S, Cortey M, Tello M, Casanovas C, Mesonero-Escuredo S, Barrabés S, et al. Diversity of influenza A viruses retrieved from respiratory disease outbreaks and subclinically infected herds in Spain (2017-2019). *Transbound Emerg Dis.* 2021;68(2):519-30.
41. Beato MS, Tassoni L, Milani A, Salviato A, Di Martino G, Mion M, et al. Circulation of multiple genotypes of H1N2 viruses in a swine farm in Italy over a two-month period. *Vet Microbiol.* 2016;195:25-9.
42. Henao-Diaz A, Giménez-Lirola L, Baum DH, Zimmerman J. Guidelines for oral fluid-based surveillance of viral pathogens in swine. *Porcine Health Manag.* 2020;6:28.
43. J.R. Prickett SC, J.M. Kinyon. Stability of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and antibody in swine oral fluid. *Journal of Swine Health and Production.* 2010;18:187-95.

44. Weiser AC, Poonsuk K, Bade SA, Gauger PC, Rotolo M, Harmon K, et al. Effects of sample handling on the detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in oral fluids by reverse-transcription real-time PCR. *J Vet Diagn Invest.* 2018;30(6):807-12.
45. Decorte I, Van der Stede Y, Nauwynck H, De Regge N, Cay AB. Effect of saliva stabilisers on detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in oral fluid by quantitative reverse transcriptase real-time PCR. *Vet J.* 2013;197(2):224-8.
46. Welch SR, Davies KA, Buczkowski H, Hettiarachchi N, Green N, Arnold U, et al. Analysis of Inactivation of SARS-CoV-2 by Specimen Transport Media, Nucleic Acid Extraction Reagents, Detergents, and Fixatives. *J Clin Microbiol.* 2020;58(11).
47. Rudsdale A, Shedden D (2009). Investigation of the Suitability of the Virocult® Swab Transport Device for Influenza A Specimens Which Are to be Analyzed by Cell Culture or Molecular Techniques. *Clinical Virology Symposium, Daytona Beach, Poster M42.*

IV. ERWEITERTE DISKUSSION

Die Überwachung von IAV bei Schweinen spielt eine wichtige Rolle für die frühzeitige Erkennung neuer Reassortanten, und kann möglicherweise dazu beitragen das Risiko der Entstehung neuer Pandemien zu reduzieren (Harder et al., 2013; Henritzi et al., 2016; Henritzi et al., 2020).

Im Hinblick auf die Überwachung der IAV mittels direktem Erregernachweis weist der für die Diagnostik als Goldstandard erachtete NT einige Schwachstellen auf. Dies ist zum einen der kurze Zeitraum (< 7 Tage), in dem der direkte Erregernachweis mittels PCR aus Nasentupfern möglich ist (Brookes et al., 2010; Deblanc et al., 2018). Zum anderen sind Entnahmetechniken von Einzeltieren mit höheren Kosten verbunden (Swenson et al., 2001). Darüber hinaus muss beachtet werden, dass in Betrieben mit niedrigen Intraherdprävalenzen die Anzahl der zu untersuchenden Tiere erhöht werden muss, welches letztlich den Kosten- und Zeitaufwand weiter steigert (Lillie-Jaschniski et al., 2022; Stadler et al., 2024). Als Beispiel für Einzeltierdiagnostik mit reduzierter Invasivität und reduziertem personellen Aufwand ist die Entnahme von Nasenwischproben (NWP) einzustufen (Edwards et al., 2014). Bei dieser tierschonenden Alternative können durch Abwischen der Rüsselscheibe Sekrete aus den Nasenlöchern aufgefangen werden (Edwards et al., 2014; Nolting et al., 2015). Dennoch muss auch bei dieser Methodik beachtet werden, dass es sich um Einzeltierproben handelt, und diese als kosten- und zeitintensiv eingestuft werden. Als Gruppenuntersuchungsmaterialien eignen sich neben den beschriebenen OFs auch GWP und Staubproben (SP). Bei GWP wird das Gesäuge einer laktierenden Sau mit einem Gazetupfer abgewischt und stellt somit ein probates Mittel dar um den IAV-Status der säugenden Ferkel zu determinieren (Garrido-Mantilla et al., 2019). In den USA werden GWP als geeignetes Material für die IAV-Detektion angesehen (Garrido-Mantilla et al., 2019). Bei SP werden entweder die direkte Umgebung der Schweine, oder Bereiche, zu welchen diese nicht unmittelbar Kontakt haben (Futterrohre, Buchtenabtrennungen) beprobt. Mittels dieser

Materialien werden sowohl für Influenza als auch für weitere Krankheitserreger bereits Ergebnisse erzielt, welche als vergleichbar mit anderen Materialien anzusehen sind (Garrido-Mantilla et al., 2019). Neben diesen werden auch weitere Probenmaterialien wie beispielsweise Umgebungsproben und GWP als Verfahren zur schnellen Beprobung einer großen Anzahl an Tieren diskutiert (Nolting et al., 2015; Neira et al., 2016; Garrido-Mantilla et al., 2019). Da sich weder GWP noch SP als geeignete Materialien für eine Laborstudie eignen, wurden die zuerst genannten Kaustricke in der vorliegenden Studie verwendet.

OFs stellen als Gruppenuntersuchungsmethodik ein Verfahren dar, welches kostengünstig und einfach, auch von Personen ohne Erfahrung durchgeführt werden kann (Detmer et al., 2011). Daneben sind Kaustricke auch aus Sicht des Tierschutzes als nicht invasiv und als tierfreundlich einzustufen (Detmer et al., 2011; Lillie-Jaschniski et al., 2022). Da sich die Beprobung von Saugferkeln mittels OFs schwierig gestaltet, ist eine Spezifizierung dieser als Family Oral Fluids (FOF) etabliert. Hierfür wird der Strick in der Abferkelbucht so positioniert, dass sowohl die Sau als auch die Ferkel Zugang zu dem Kaustrick haben. Studien zeigen, dass Ferkel so das Verhalten der Sau nachahmen und die Akzeptanz und Aussagekraft dieser Probe vergleichbar zu OFs aus anderen Altersgruppen ist (Almeida et al., 2020). Auch zeigen neben Garrido-Mantilla et al. (2019) diverse Studien die Limitation der OFs hinsichtlich der Charakterisierung und VI von IAV. Zu Einschränkungen in der Diagnostik werden neben möglichen Antikörpern auch die Rolle der Prävalenz von IAV innerhalb einer Herde diskutiert (Romagosa et al., 2012; Goodell et al., 2016; Panyasing et al., 2016).

Ein weiterer Aspekt weswegen die Charakterisierung von IAV mittels VI oder RT-qPCR aus Speichelflüssigkeiten nur eingeschränkt funktioniert, könnte auf die im Speichel enthaltenen möglichen Inhibitoren zurückzuführen sein (Ochert et al., 1994; Detmer et al., 2011). Hierunter werden unter anderem im Speichel enthaltene Enzyme (Ochert et al., 1994) wie das Glycoprotein-340 und MUC5B (Detmer et al., 2011), aber auch Bakterien diskutiert (Nolting et al., 2015; Hood et al., 2020; Azeem et al., 2021). Das Wissen über die in einer Herde zirkulierenden IAV-

Stämme stellt gerade im Hinblick auf weitere prophylaktische Maßnahmen, wie die Verwendung des passenden Impfstoffes eine bedeutende Rolle dar, da derzeit verfügbare Impfstoffe über eine reduzierte Kreuzprotektivität verfügen (Tamura et al., 2005; Rahn et al., 2015; Sandbulte et al., 2015; Everett et al., 2019; Deblanc et al., 2020). Die Charakterisierung der einzelnen IAV-Stämme findet derzeit vor allem mittels PCR statt, da eine VI zeit- und auch kostenintensiv ist (Christopher-Hennings et al., 2019).

Ziel dieser Studie war es daher zu evaluieren, ob sich durch Zusatz von Stabilisierungsmedien die Subtypisierungsrate von IAV mittels RT-qPCR in gespickten OFs verbessern lässt.

Für das Spiken der OFs wurden zwei verschiedene Subtypen, ein aviärer (H1N2 clade 1C) und ein pandemischer (H1N2, clade 1A) Stamm verwendet. Der pandemische Stamm wurde vor allem wegen der zunehmenden Nachweishäufigkeit in Europa ausgewählt (Starick et al., 2012; Harder et al., 2013; Henritzi et al., 2020; Chepkwony et al., 2021). Dieser weist in der jeweiligen Region genotypische Unterschiede auf, die durch Reassortierung mit regionalen, endemisch vorkommenden IAV-Subtypen entstanden sind (Watson et al., 2015; Henritzi et al., 2020). In einer von 2015 – 2018 durchgeführten Studie, wird von Henritzi et al. (2020) ein Überblick über die in den verschiedenen europäischen Ländern zirkulierenden Subtypen inklusive einer phylogenetischen Ausarbeitung gegeben. Hieraus wird deutlich, dass im Vergleich zu dem im Zeitraum von 2010 – 2013 durchgeführten ESNIP (Simon et al., 2014) ein enormer Zuwachs der pandemischen integralen Genomsegmenten von < 1% auf über 20% zu erkennen ist (Henritzi et al., 2020). In einer weiteren Studie, welche von 2009 bis 2013 in 14 europäischen Ländern durchgeführt wurde, zeigt, dass der pandemische Subtyp ein Drittel der detektierten IAV-Subtypen darstellt (Watson et al., 2015). Hierbei werden jedoch geographische Unterschiede hinsichtlich des Vorkommens der Subtypen deutlich (Watson et al., 2015). Der zweite im Rahmen der eigenen Untersuchungen verwendete Stamm, H1avN2, ist erstmals in Dänemark im Jahr 2003 detektiert worden und ist heute der dort am häufigsten nachgewiesene Subtyp (Trebbien et al., 2013; Simon et al.,

2014). Auch in Frankreich (Rose et al., 2013), Schweden, Deutschland (Harder et al., 2013), Spanien (Sosa Portugal et al., 2021), Italien (Beato et al., 2016) Belgien und den Niederlanden (Chepkwony et al., 2021) kann dieser Subtyp nachgewiesen werden.

In der vorliegenden Studie sind bei den beiden verwendeten Subtypen signifikante Unterschiede in der Menge der detektierbaren IAV-RNA (Anstieg der Ct-Werte) während des Probenlagerungszeitraums von 14 Tagen festgestellt worden ($p < 0,001$). Beim pandemischen Stamm ist über den Beobachtungszeitraum von zwei Wochen im Vergleich zu dem aviären Stamm eine signifikant niedrigere Menge an IAV-RNA feststellbar ($p < 0,001$). Insbesondere bei Vorliegen der pandemischen Stämme kann daher ein ungeplant verlängerter Probenversand zum Auftreten von falsch negativen Ergebnissen führen. Daher liegt die Vermutung nahe, dass die Dunkelziffer der zirkulierenden pandemischen Stämme höher ist als die diagnostizierte Anzahl.

Da in Schweinebeständen zunehmend endemische Verlaufsformen (Simon-Grifé et al., 2012) der IAV-Infektion, mit mitunter niedrigen Erregermengen, auftreten wurde in der vorliegenden Studie neben einer hohen Viruslast (VL) auch eine niedrige VL verwendet. Hierbei wird bei Verwendung der niedrigeren VL eine signifikant geringere Nachweisrate von IAV im Vergleich zur höheren VL festgestellt ($p < 0,001$). Folglich könnten bei IAV-Infektionen in Betrieben mit niedriger VL diese fälschlicherweise als negativ eingestuft werden. Eine Erhöhung des Probenumfangs ist daher in diesen Betrieben in Erwägung zu ziehen. Hinsichtlich der Subtypisierungsrate wird kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden verwendeten Viruslasten festgestellt, wobei die Anzahl der subtypisierbaren Ergebnisse in den mit hoher Viruslast gespikten Proben numerisch höher ist.

Eine Lagerung der Proben über 14 Tage reduziert signifikant die Chance IAV-RNA zu detektieren. Es kann zwar kein statistisch signifikanter Einfluss der Lagerungsdauer auf die Menge der nachweisbaren IAV-RNA festgestellt werden, jedoch fällt bei einer rein deskriptiven Betrachtung der Ergebnisse die reduzierte Subtypisierbarkeit der Proben zu den späteren Messzeitpunkten auf. Darüber hinaus zeigen die Ergebnisse

unserer Studie deutlich, dass die Bedingungen der Probenlagerung einen entscheidenden Einfluss auf den Nachweis von IAV-RNA haben. In der vorliegenden Untersuchung hat die Lagerungstemperatur einen signifikanten Einfluss auf die Menge an detektierbarer IAV-RNA ($p < 0,001$). Hierbei erzielt die gekühlte Lagerung (4 °C) eine signifikant geringere Abnahme der IAV-RNA Menge im Vergleich zu den bei Raumtemperatur gelagerten Proben. Auch in anderen Publikationen wird gezeigt, dass die detektierbare Menge IAV-RNA im gefrorenen Zustand (-20 °C) für 120 Tage unverändert bleibt, wohingegen bei einer Lagerung bei 4 °C oder bei 22 °C die Menge der messbaren RNA stetig abnimmt (Ryba et al., 2012). Bei Betrachtung der Ergebnisse der vorliegenden Studie wird darüber hinaus deutlich, dass eine Kühlung der Proben (bei hoher VL) den Nachweis von IAV-RNA bis zum Zeitpunkt der letzten Messung (Tag 14) ermöglicht. Dies stimmt mit publizierten Empfehlungen bezüglich des Umgangs mit OFs überein. Henao-Diaz et al. (2020) beschreiben u.a. die Notwendigkeit des gekühlten Transportes von OFs. Prickett et al. (2010) betonen ebenfalls die Notwendigkeit des Einfrierens bzw. die der Kühlung der Proben auf 4 °C, um möglichst geringe RNA-Verluste in OFs zu verzeichnen. Zu beachten ist jedoch, dass in Proben mit niedriger VL, trotz Kühlung bereits zum Zeitpunkt der zweiten Messung negative Ergebnisse vorlagen. Im Gegensatz dazu können durch Zugabe eines Stabilisierungsmediums positive Ergebnisse bis zum 14. Tag erreicht werden. Dies verdeutlicht, dass in Betrieben mit niedriger Viruslast, wie dies in endemisch infizierten Herden häufiger der Fall ist, für eine möglichst sichere IAV-Diagnostik der alleinige gekühlte Versand als unzureichend darstellt. Daher werden in der vorliegenden Studie drei verschiedene Stabilisatormedien verwendet, und diese miteinander verglichen.

Bei zwei der verwendeten Medien handelt es sich um molekulare Transportmedien, wohingegen V ein Virustransportmedium darstellt. Molekulare Medien führen zu einer Inaktivierung des in der Probe enthaltenen Virus, wodurch diese nicht für weitere diagnostische Zwecke wie beispielsweise die VI aufbereitet werden können. Diese Medien sind entsprechend für hoch infektiöse Viren wie beispielsweise SARS-CoV-2

(Welch et al., 2020) von Bedeutung, da durch die Zugabe des Stabilisators die Verarbeitung im Labor unter niedrigeren Sicherheitsstufen erfolgen kann. In unserer Studie werden P und N als Vertreter für diese Medien verwendet. Ersteres enthält Guanidinthiocyanat, welches zu einer Keim Inaktivierung führt, aber dennoch durch firmeninterne Reagenzien die in der Probe enthaltene RNA stabilisiert und damit den Nachweis der Nukleinsäure ermöglicht. Daum et al. (2011) demonstrieren die Eignung dieses Mediums für die Detektion des hochpathogenen aviären Influenza Virus H5 und den Transport der Proben bei Raumtemperatur. Schlaudecker et al. (2014) erarbeiten in diesem Zusammenhang die Bedeutung eines solchen Mediums für den Versand von Proben aus entlegeneren Orten, oder Ländern mit geringeren technischen Standards und vergleichen in diesem Kontext P mit einem herkömmlichen universellen Transportmedium. Hierbei zeigt sich P als adäquates Medium, um Proben unter geringerem Sicherheitsaufwand zu versenden und zu untersuchen und ermöglicht zudem eine zuverlässige Detektion von Erregern (Schlaudecker et al., 2014). Laut Herstellerangaben ermöglicht der Zusatz von N den Nachweis von viraler RNA für eine Woche bei RT und bis zu einem Monat bei 4 °C. In der vorliegenden Studie liegen bei den mit N versetzten OFs jedoch bereits sieben Tage nach dem Spiken mit dem Subtyp H1avN2 (Ct-32) negative PCR-Ergebnisse vor. V ist ein Virustransportmedium, welches Viren nicht inaktiviert und die Probe daher für weitere diagnostische Maßnahmen, wie die VI in Zellkulturen verwendet werden kann (Welch et al., 2024). Nach Rudsdale und Sheddon (2009) ist der Nachweis von IAV in mit V suspendierten Proben sowohl bei Raumtemperatur als auch unter gekühlten Bedingungen bis zu acht Tagen möglich. In der vorliegenden Studie kann IAV-RNA in gespikten und mit V gelagerten Proben nach 14 Tagen (RT) unabhängig vom Subtyp nachgewiesen werden. Die Verwendung eines Mediums erhöht in der vorliegenden Studie die Chance der Detektion von IAV-RNA signifikant. Die Verwendung eines Stabilisators ergibt zudem einen signifikanten Einfluss auf die Menge der nachweisbaren IAV-RNA ($p < 0,001$). Hierbei kann für Proben, welche mit P, N, oder V versetzt werden eine signifikant geringere Abnahme der IAV-RNA Menge beobachtet

werden. Vor allem in Proben die anfänglich eine hohe VL aufweisen, kann durch das Hinzufügen der Medien der zeitliche Rahmen der Subtypisierbarkeit einer Probe deutlich verlängert werden. Unter den Bedingungen der vorliegenden Studie kann kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den drei untersuchten Stabilisierungsmedien hinsichtlich der Detektion von IAV-RNA sowie der Menge der nachweisbaren IAV-RNA über den Lagerungszeitraum von 14 Tagen festgestellt werden. Jedoch zeigt V numerisch den höchsten Prozentsatz positiver und subtypisierbarer Proben. Für PRRSV beschreiben Decorte et al. (2013) einen ähnlichen Zusammenhang. Hier kann lediglich durch die Zugabe des Oragene RNA Stabilisators ein positiver Einfluss auf die Detektion von PRRSV in OFs bewiesen werden, wohingegen die anderen beiden Medien (Aware Messenger, Saliva Gene Collection Module) keinen Einfluss auf die Nachweisrate von PRRSV haben (Decorte et al., 2013). Auch der von Weiser et al. (2018) verwendete Guanosintriphosphat Stabilisator zeigt keinen Einfluss auf die Nachweisrate von PRRSV, für dieses Virus kann auch kein positiver Effekt durch die Zugabe eines Antibiotikums erzielt werden (Prickett et al., 2010).

Da es sich bei der vorliegenden Studie um eine explorative Untersuchung unter Laborbedingungen handelt, wäre für die Übertragbarkeit auf Feldbedingungen eine weiterführende Untersuchung wünschenswert. Dennoch wird praktizierenden TierärztInnen aufgrund der oben beschriebenen Ergebnisse der gekühlte Versand und die Zugabe eines Transportmediums dringend empfohlen. Bei der Wahl des geeigneten Transportmediums ist es von entscheidender Bedeutung vor Versand zu wissen, welche Weiterverarbeitung mit diesen Proben durchgeführt werden soll. Im Falle einer potenziellen Virusanzucht muss ein Virustransportmedium ausgewählt werden, da hier die Viren nur stabilisiert und nicht inaktiviert werden. Wenn die Proben nur zum Nachweis von RNA an das Labor geschickt werden sollen, kann auch ein molekulares Transportmedium verwendet werden.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Influenza A Viren stehen durch deren zoonotisches Potenzial zunehmend im öffentlichen Interesse. Gerade aus diesem Aspekt sollte die flächendeckende Überwachung in Form eines aktiven Monitorings von Schweinebeständen ein anzustrebendes Ziel sein. Hierfür bedarf es diagnostische Verfahren, mithilfe derer einfach, schnell, kosteneffizient und minimalinvasiv eine große Anzahl von Tieren untersucht werden kann. Diese Aspekte erfüllen, wie in diversen Publikationen beschrieben, OFs. Im Hinblick auf die weiterführende Charakterisierung der IAV-Stämme im Sinne einer Virusisolation oder Subtypisierungs-PCR zeigt dieses Untersuchungsmaterial jedoch gewisse Einschränkungen. Die Bestimmung der im Bestand zirkulierenden Subtypen ist für den Einsatz von prophylaktischen Maßnahmen von großer Bedeutung. Ziel dieser Studie war es daher zu evaluieren, ob die Zugabe von Stabilisatormedien eine Verbesserung der Detektionsrate und der Subtypisierung von IAV beim Schwein ermöglicht. In der vorliegenden Arbeit konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Detektion von IAV-RNA und der Zugabe von Medien dargestellt werden. Darüber hinaus wurde durch die Zugabe von Stabilisierungsmedien sowie durch gekühlte Lagerung der Proben die Zunahme der Ct-Werte und damit die Abnahme der IAV-RNA Menge während des Lagerungszeitraums von 14 Tagen signifikant verringert. Zwischen den jeweiligen Stabilisierungsmedien konnte kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Detektionsrate sowie der Subtypisierungsrate von IAV festgestellt werden.

Für die Diagnostik von IAV aus OFs empfiehlt sich zusammenfassend die Speichelflüssigkeit der Kaustricke direkt nach der Probenentnahme mit einem Stabilisierungsmedium zu versetzen und unter gekühlten Bedingungen zu verschicken.

VI. SUMMARY

Influenza A viruses are of increasing in the centre of public concern due to their zoonotic potential. Particular for this aspect, the nationwide surveillance in form of active monitoring of pig herds should be the goal. This requires diagnostic methods that can be used to examine a large number of animals quickly, easily, cost-effectively and minimal invasive. These aspects are fulfilled, as described in various publications, by OFs. However, this test material has limitations with regard to the further characterization of the IAV strains in the sense of virus isolation or subtyping PCR. Determining the subtypes circulating in the herd is, however, of great importance for the use of prophylactic measures. The aim of this study was therefore to evaluate whether the addition of stabilizer media enables an improvement in the detection and subtyping rate of IAV. In the present study, a significant correlation between the detection of IAV RNA and the addition of media was demonstrated. In addition, the addition of stabilizing media and refrigerated storage of the samples significantly reduced the increase in Ct values and thus the degradation of IAV RNA during the storage period of 14 days. No significant difference was found between the respective stabilizing media with regard to the detection rate and the subtyping rate of IAV.

In summary, for the diagnosis of IAV from OFs, it is recommended to add stabilizing media to OFs immediately after sampling and to send it under refrigerated conditions.

VII. TABELLENVERZEICHNIS

Tabellen aus dem Kapitel III

<i>table 1 Number (n) and percentage (%) of swlAV positive (Ct < 40) samples and samples with Ct-values (Ct ≤ 33) by influential factors viral load, swlAV subtype, stabilizer type, time after spiking and temperature.</i>	28
<i>table 2 Overview of swlAV detection by RT-qPCR in oral fluids spiked with high or low viral loads (H1avN2 or H1pdmN2) and suspended in three different stabilizer media or without stabilizer media at different storage conditions, detected Ct-values ≥ 40 were evaluated as negative (neg.), Ct-values > 33 were not subtyped. Ct-values ≤ 33 were considered as subtypeable. TP = time after spiking, C = control, V = Sigma-Virocult®, P = Primestore®, N= NucleoProtect VET Reagent®; neg. = negative. ...</i>	30
<i>table 3 Odds Ratio (OR) with 95 % Confidence Interval (CI) and p-value for the detection of swlAV RNA (dependent variable) in spiked OFs in dependency of the independent variables stabilizer, time, and viral load estimated by the multivariable logistic regression.</i>	31
<i>table 4 Slopes (Beta), Confidence Intervals (CIs) and p-value of the factors (swlAV subtype, stabilizers, time after spiking, and temperature) influencing Ct-values using a multivariable linear analysis (N = NucleoProtect VET Reagent®, C = Control, P = Primestore®, V = Sigma-Virocult®).</i>	34

VIII. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildungen aus dem Kapitel III

figure 1 Overview of the study design. This graph shows an overall of 128 individual experiments. Oral fluids from swIAV negative pigs were spiked with H1avN2 or H1pdmN2 with either high (Ct-25) or low (Ct-32) viral loads of swIAV and suspended with stabilizing media: Virocult® (V), represented by a triangle, Primestore® (P) by a circle and NucleoProtect VET Reagent® (N) by a rectangle. The untreated control group is represented by a trapezoid. The differentiation between darker and lighter colored shapes is intended to represent the respective storage condition (4 °C / 22 °C).26

figure 2 Stability of swIAV RNA in spiked oral fluids. Oral fluids from swIAV negative pigs were spiked with H1avN2 or H1pdmN2 with either high (H; Ct-25) or low (L; Ct-32) viral loads of swIAV and stored at different temperatures (room temperature, (22 °C,) or refrigerated (4 °C), with the addition of stabilizers (V = Sigma-Virocult®, P = Primestore®, N = NucleoProtect VET Reagent®) or without (C = Control). Samples were collected at predetermined intervals (start (0), 72 h, 168 h (7 d), and 336 h (14 d) after spiking) and analyzed for swIAV by RT-qPCR. The red line indicates the limit for positive samples (CT < 40) and the green line for subtypeable samples.32

figure 3 The results of the final multivariable linear regression after backwards variable selection showing the degradation of swIAV RNA, depicted as Ct- value Increase by qRT-PCR in spiked oral fluids with the addition of the different stabilizer media or without (A), with either H1avN2 or H1pdmN2 (B), collected at different time points (start (0), 72 h, 168 h (7 d), and 336 h (14 d) after spiking) (C) and stored at either room temperature, (22 °C,) or refrigerated (4 °C) (D).....33

IX. LITERATURVERZEICHNIS

Akarsu H, Burmeister WP, Petosa C, Petit I, Müller CW, Ruigrok RW, Baudin F (2003). Crystal structure of the M1 protein-binding domain of the influenza A virus nuclear export protein (NEP/NS2). *EMBO J*, 22 (18): 4646-4655.

Allerson MW, Davies PR, Gramer MR, Torremorell M (2014). Infection dynamics of pandemic 2009 H1N1 influenza virus in a two-site swine herd. *Transbound Emerg Dis*, 61 (6): 490-499.

Almeida MN, Zimmerman JJ, Wang C, Linhares DCL (2018). Assessment of abattoir based monitoring of PRRSV using oral fluids. *Prev Vet Med*, 158: 137-145.

Almeida MN, Rotto H, Schneider P, Robb C, Zimmerman JJ, Holtkamp DJ, Rademacher CJ, Linhares DCL (2020). Collecting oral fluid samples from due-to-wean litters. *Prev Vet Med*, 174: 104810.

Alvarez J, Sarradell J, Kerkaert B, Bandyopadhyay D, Torremorell M, Morrison R, Perez A (2015a). Association of the presence of influenza A virus and porcine reproductive and respiratory syndrome virus in sow farms with post-weaning mortality. *Prev Vet Med*, 121 (3-4): 240-245.

Alvarez J, Sarradell J, Kerkaert B, Bandyopadhyay D, Torremorell M, Morrison R, Perez A (2015b). Association of the presence of influenza A virus and porcine reproductive and respiratory syndrome virus in sow farms with post-weaning mortality. *Prev Vet Med*, 121 (3-4): 240-245.

Anderson TK, Macken CA, Lewis NS, Scheuermann RH, Van Reeth K, Brown IH, Swenson SL, Simon G, Saito T, Berhane Y, Ciacci-Zanella J, Pereda A, Davis CT, Donis RO, Webby RJ, Vincent AL (2016). A Phylogeny-Based Global Nomenclature System and Automated Annotation Tool for H1 Hemagglutinin Genes from Swine Influenza A Viruses. *mSphere*, 1 (6): e00275-00316.

Archetti IL, Amadori M, Donn A, Salt J, Lodetti E (1995). Detection of foot-and-mouth disease virus-infected cattle by assessment of antibody response in oropharyngeal fluids. *J Clin Microbiol*, 33 (1): 79-84.

Archibald DW, Zon L, Groopman JE, McLane MF, Essex M (1986). Antibodies to human T-lymphotropic virus type III (HTLV-III) in saliva of acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) patients and in persons at risk for AIDS. *Blood*, 67 (3): 831-834.

Atkinson JC (1993). The role of salivary measurements in the diagnosis of salivary autoimmune diseases. *Ann N Y Acad Sci*, 694: 238-251.

Azeem S, Gauger P, Sato Y, Baoqing G, Wolc A, Carlson J, Harmon K, Zhang J, Hoang H, Yuan J, Bhandari M, Kim H, Gibson K, Matias-Ferreyra F, Yoon KJ (2021). Environmental Sampling for Avian Influenza Virus Detection in Commercial Layer Facilities. *Avian Dis*, 65 (3): 391-400.

Baltimore D (1971). Expression of animal virus genomes. *Bacteriol Rev*, 35 (3): 235-241.

Beato MS, Tassoni L, Milani A, Salviato A, Di Martino G, Mion M, Bonfanti L, Monne I, Watson SJ, Fusaro A (2016). Circulation of multiple genotypes of H1N2 viruses in a swine farm in Italy over a two-month period. *Vet Microbiol*, 195: 25-29.

Beer M (2023). Familie Orthomyxoviridae. In: Tiermedizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre. 11. Auflage; Selbitz HJ, Truyen U, Valentin-Weigand P (Hrsg.); Stuttgart, Georg Thieme Verlag: 600-610.

Beer M, König M, Haas L (2023). Labordiagnostik von Virusinfektionen. In: Tiermedizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre. 11. Auflage; Selbitz HJ, Truyen U, Valentin-Weigand P (Hrsg.); Stuttgart, Georg Thieme Verlag: 80-99.

Bennett R, Ijpelaar J (2005). Updated Estimates of the Costs Associated with Thirty Four Endemic Livestock Diseases in Great Britain: A Note. *Journal of Agricultural Economics*, 56 (1): 135-144.

Biswas SK, Boutz PL, Nayak DP (1998). Influenza virus nucleoprotein interacts with influenza virus polymerase proteins. *J Virol*, 72 (7): 5493-5501.

Both GW, Sleight MJ, Cox NJ, Kendal AP (1983). Antigenic drift in influenza virus H3 hemagglutinin from 1968 to 1980: multiple evolutionary pathways and sequential amino acid changes at key antigenic sites. *J Virol*, 48 (1): 52-60.

Boulbria G, Normand V, Leblanc-Maridor M, Belloc C, Berton P, Bouchet F, Lebret A (2020). Feasibility of pooled oral fluid collection from pre-weaning piglets using cotton ropes. *Vet Anim Sci*, 9: 100099.

Brookes SM, Núñez A, Choudhury B, Matrosovich M, Essen SC, Clifford D, Slomka MJ, Kuntz-Simon G, Garcon F, Nash B, Hanna A, Heegaard PM, Quéguiner S, Chiapponi C, Bublot M, Garcia JM, Gardner R, Foni E, Loeffen W, Larsen L, Van Reeth K, Banks J, Irvine RM, Brown IH (2010). Replication, pathogenesis and transmission of pandemic (H1N1) 2009 virus in non-immune pigs. *PLoS One*, 5 (2): e9068.

Brown IH, Done SH, Spencer YI, Cooley WA, Harris PA, Alexander DJ (1993). Pathogenicity of a swine influenza H1N1 virus antigenically distinguishable from classical and European strains. *Vet Rec*, 132 (24): 598-602.

Brown IH, Harris PA, McCauley JW, Alexander DJ (1998). Multiple genetic reassortment of avian and human influenza A viruses in European pigs, resulting in the emergence of an H1N2 virus of novel genotype. *The Journal of general virology*, 79 2947-2955.

Brown IH (2000). The epidemiology and evolution of influenza viruses in pigs. *Vet Microbiol*, 74 (1-2): 29-46.

Castrucci MR, Donatelli I, Sidoli L, Barigazzi G, Kawaoka Y, Webster RG (1993). Genetic reassortment between avian and human influenza A viruses in Italian pigs. *Virology*, 193 (1): 503-506.

Chang WK (1969). National influenza experience in Hong Kong, 1968. *Bull World Health Organ*, 41 (3): 349-351.

Chepkwony S, Parys A, Vandoorn E, Stadejek W, Xie J, King J, Graaf A, Pohlmann A, Beer M, Harder T, Van Reeth K (2021). Genetic and antigenic evolution of H1 swine influenza A viruses isolated in Belgium and the Netherlands from 2014 through 2019. *Sci Rep*, 11 (1): 11276.

Chlanda P, Schraidt O, Kummer S, Riches J, Oberwinkler H, Prinz S, Kräusslich HG, Briggs JA (2015). Structural Analysis of the Roles of Influenza A Virus Membrane-Associated Proteins in Assembly and Morphology. *J Virol*, 89 (17): 8957-8966.

Choi YK, Goyal SM, Kang SW, Farnham MW, Joo HS (2002). Detection and subtyping of swine influenza H1N1, H1N2 and H3N2 viruses in clinical samples using two multiplex RT-PCR assays. *J Virol Methods*, 102 (1-2): 53-59.

Christopher-Hennings J, Erickson GA, Hesse RA, Nelson EA, Rossow S, Scaria J, Slavic D (2019). Diagnostic Tests, Test Performance, and Considerations for Interpretation. In: Diseases of Swine. 11. Auflage; Zimmerman J, Karriker LA, Ramirez A, Schwartz KJ, Stevenson GW, Zhang J (Hrsg.); Hoboken, Wiley-Blackwell: 75-97.

Ciacchi-Zanella JR, Vincent AL, Prickett JR, Zimmerman SM, Zimmerman JJ (2010). Detection of anti-influenza A nucleoprotein antibodies in pigs using a commercial influenza epitope-blocking enzyme-linked immunosorbent assay developed for avian species. J Vet Diagn Invest, 22 (1): 3-9.

Corthier G, Aynaud JM (1977). Comparison of the immune response in serum and bucco-pharyngeal secretions following immunization by different routes with a live hog cholera virus vaccine (Thiverval strain). Ann Rech Vet, 8 (2): 159-165.

Corzo CA, Culhane M, Juleen K, Stigger-Rosser E, Ducatez MF, Webby RJ, Lowe JF (2013). Active surveillance for influenza A virus among swine, midwestern United States, 2009-2011. Emerg Infect Dis, 19 (6): 954-960.

Cox NJ, Subbarao K (2000). Global epidemiology of influenza: past and present. Annu Rev Med, 51: 407-421.

Daum LT, Worthy SA, Yim KC, Nogueras M, Schuman RF, Choi YW, Fischer GW (2011). A clinical specimen collection and transport medium for molecular diagnostic and genomic applications. Epidemiol Infect, 139 (11): 1764-1773.

de Boer GF, Back W, Osterhaus AD (1990). An ELISA for detection of antibodies against influenza A nucleoprotein in humans and various animal species. Arch Virol, 115 (1-2): 47-61.

De Vleeschauwer A, Atanasova K, Van Borm S, van den Berg T, Rasmussen TB, Uttenthal A, Van Reeth K (2009). Comparative pathogenesis of an avian H5N2 and a swine H1N1 influenza virus in pigs. *PLoS One*, 4 (8): e6662.

Deblanc C, Hervé S, Gorin S, Cador C, Andraud M, Quéguiner S, Barbier N, Paboeuf F, Rose N, Simon G (2018). 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*, 216: 142-152.

Deblanc C, Quéguiner S, Gorin S, Chastagner A, Hervé S, Paboeuf F, Simon G (2020). Evaluation of the Pathogenicity and the Escape from Vaccine Protection of a New Antigenic Variant Derived from the European Human-Like Reassortant Swine H1N2 Influenza Virus. *Viruses*, 12 (10).

Decorte I, Van der Stede Y, Nauwynck H, De Regge N, Cay AB (2013). Effect of saliva stabilisers on detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in oral fluid by quantitative reverse transcriptase real-time PCR. *Vet J*, 197 (2): 224-228.

Decorte I, Steensels M, Lambrecht B, Cay AB, De Regge N (2015). Detection and Isolation of Swine Influenza A Virus in Spiked Oral Fluid and Samples from Individually Housed, Experimentally Infected Pigs: Potential Role of Porcine Oral Fluid in Active Influenza A Virus Surveillance in Swine. *PLoS One*, 10 (10): e0139586.

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

Detmer SE, Patnayak DP, Jiang Y, Gramer MR, Goyal SM (2011). Detection of Influenza A virus in porcine oral fluid samples. *J Vet Diagn Invest*, 23 (2): 241-247.

Dewar R, Baunoch D, Wojno K, Parkash V, Khosravi-Far R (2020). Viral transportation in covid-19 pandemic: inactivated virus transportation should be implemented for safe transportation and handling at diagnostics laboratories. *Arch Pathol Lab Med*.

Dong M, Fisher C, Añez G, Rios M, Nakhasi HL, Hobson JP, Beanan M, Hockman D, Grigorenko E, Duncan R (2016). Standardized methods to generate mock (spiked) clinical specimens by spiking blood or plasma with cultured pathogens. *J Appl Microbiol*, 120 (4): 1119-1129.

Dorjee S, Revie CW, Poljak Z, McNab WB, Sanchez J (2016). One-Health Simulation Modelling: A Case Study of Influenza Spread between Human and Swine Populations using NAADSM. *Transbound Emerg Dis*, 63 (1): 36-55.

Dsa OC, Kadni TS, N S (2023). From cold chain to ambient temperature: transport of viral specimens- a review. *Ann Med*, 55 (2): 2257711.

Duerrwald R, Schlegel M, Bauer K, Vissiennon T, Wutzler P, Schmidtke M (2013). Efficacy of influenza vaccination and tamiflu® treatment-comparative studies with Eurasian Swine influenza viruses in pigs. *PLoS One*, 8 (4): e61597.

Duesberg PH (1968). The RNA of influenza virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 59 (3): 930-937.

Edwards JL, Nelson SW, Workman JD, Slemons RD, Szablewski CM, Nolting JM, Bowman AS (2014). Utility of snout wipe samples for influenza A virus surveillance in exhibition swine populations. *Influenza Other Respir Viruses*, 8 (5): 574-579.

EKF Diagnostics (2024). Primestore® MTM - Ein neues Virustransportmedium für Infektionskrankheiten. <https://www.ekfdiagnostics.de/produkt/primestore-mtm-molekulare-transportmedien/>. accessed: 30.09.2024.

ElHefnawi M, Alaidi O, Mohamed N, Kamar M, El-Azab I, Zada S, Siam R (2011). Identification of novel conserved functional motifs across most Influenza A viral strains. *Virol J*, 8: 44.

Er C, Skjerve E, Brun E, Hofmo PO, Framstad T, Lium B (2016). Production impact of influenza A(H1N1)pdm09 virus infection on fattening pigs in Norway. *J Anim Sci*, 94 (2): 751-759.

Everett HE, Aramouni M, Coward V, Ramsay A, Kelly M, Morgan S, Tchilian E, Canini L, Woolhouse MEJ, Gilbert S, Charleston B, Brown IH, Brookes SM (2019). Vaccine-mediated protection of pigs against infection with pandemic H1N1 2009 swine influenza A virus requires a close antigenic match between the vaccine antigen and challenge virus. *Vaccine*, 37 (17): 2288-2293.

Fouchier RA, Osterhaus AD, Brown IH (2003). Animal influenza virus surveillance. *Vaccine*, 21 (16): 1754-1757.

Fukumi H (1959). Summary report on the Asian influenza epidemic in Japan, 1957. *Bull World Health Organ*, 20 (2-3): 187-198.

Gamblin SJ, Skehel JJ (2010). Influenza hemagglutinin and neuraminidase membrane glycoproteins. *J Biol Chem*, 285 (37): 28403-28409.

Garrido-Mantilla J, Alvarez J, Culhane M, Nirmala J, Cano JP, Torremorell M (2019). Comparison of individual, group and environmental sampling strategies to conduct influenza surveillance in pigs. *BMC Vet Res*, 15 (1): 61.

Giurgea LT, Morens DM, Taubenberger JK, Memoli MJ (2020). Influenza Neuraminidase: A Neglected Protein and Its Potential for a Better Influenza Vaccine. *Vaccines* (Basel), 8 (3).

Goodell CK, Prickett J, Kittawornrat A, Johnson J, Zhang J, Wang C, Zimmerman JJ (2016). Evaluation of Screening Assays for the Detection of Influenza A Virus Serum Antibodies in Swine. *Transbound Emerg Dis*, 63 (1): 24-35.

Graaf-Rau A, Hennig C, Lillie-Jaschniski K, Koechling M, Stadler J, Boehmer J, Ripp U, Pohlmann A, Schwarz BA, Beer M, Harder T (2023). Emergence of swine influenza A virus, porcine respirovirus 1 and swine orthopneumovirus in porcine respiratory disease in Germany. *Emerg Microbes Infect*, 12 (2): 2239938.

Greenspan D, Palese P, Krystal M (1988). Two nuclear location signals in the influenza virus NS1 nonstructural protein. *J Virol*, 62 (8): 3020-3026.

Gregg MB, Hinman AR, Craven RB (1978). The Russian flu. Its history and implications for this year's influenza season. *Jama*, 240 (21): 2260-2263.

Grøntvedt CA, Er C, Gjerset B, Germundsson A, Framstad T, Brun E, Jørgensen A, Lium B (2011a). Clinical Impact of Infection with Pandemic Influenza (H1N1) 2009 Virus in Naïve Nucleus and Multiplier Pig Herds in Norway. *Influenza Res Treat*, 2011: 163745.

Grøntvedt CA, Er C, Gjerset B, Germundsson A, Framstad T, Brun E, Jørgensen A, Lium B (2011b). Clinical impact of infection with pandemic influenza (H1N1) 2009 virus in naïve nucleus and multiplier pig herds in Norway. *Influenza Research and Treatment*, 2011 (1): 163745.

Gumbert S, Froehlich S, Rieger A, Stadler J, Ritzmann M, Zoels S (2020). Reproductive performance of pandemic influenza A virus infected sow herds before and after implementation of a vaccine against the influenza A (H1N1)pdm09 virus. *Porcine Health Manag*, 6 (1): 4.

Haesebrouck F, Biront P, Pensaert MB, Leunen J (1985). Epizootics of respiratory tract disease in swine in Belgium due to H3N2 influenza virus and experimental reproduction of disease. *Am J Vet Res*, 46 (9): 1926-1928.

Harder TC, Grosse Beilage E, Lange E, Meiners C, Döhring S, Pesch S, Noé T, Grund C, Beer M, Starick E (2013). Expanded cocirculation of stable subtypes, emerging lineages, and new sporadic reassortants of porcine influenza viruses in swine populations in Northwest Germany. *J Virol*, 87 (19): 10460-10476.

Hartshorn KL, White MR, Mogues T, Ligtenberg T, Crouch E, Holmskov U (2003). Lung and salivary scavenger receptor glycoprotein-340 contribute to the host defense against influenza A viruses. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 285 (5): L1066-1076.

Hemmink JD, Morgan SB, Aramouni M, Everett H, Salguero FJ, Canini L, Porter E, Chase-Topping M, Beck K, Loughlin RM, Carr BV, Brown IH, Bailey M, Woolhouse M, Brookes SM, Charleston B, Tchilian E (2016). Distinct immune responses and virus shedding in pigs following aerosol, intra-nasal and contact infection with pandemic swine influenza A virus, A(H1N1)09. *BMC Vet Res*, 47 (1): 103.

Henao-Diaz A, Giménez-Lirola L, Baum DH, Zimmerman J (2020). Guidelines for oral fluid-based surveillance of viral pathogens in swine. *Porcine Health Manag*, 6: 28.

Hennig C, Graaf A, Petric PP, Graf L, Schwemmle M, Beer M, Harder T (2022). Are pigs overestimated as a source of zoonotic influenza viruses? *Porcine Health Manag*, 8 (1): 30.

Henritzi D, Zhao N, Starick E, Simon G, Krog JS, Larsen LE, Reid SM, Brown IH, Chiapponi C, Foni E, Wacheck S, Schmid P, Beer M, Hoffmann B, Harder TC (2016). Rapid detection and subtyping of European swine influenza viruses in porcine clinical samples by haemagglutinin- and neuraminidase-specific tetra- and triplex real-time RT-PCRs. *Influenza Other Respir Viruses*, 10 (6): 504-517.

Henritzi D, Petric PP, Lewis NS, Graaf A, Pessia A, Starick E, Breithaupt A, Strebelow G, Luttermann C, Parker LMK, Schröder C, Hammerschmidt B, Herrler G, Beilage EG, Stadlbauer D, Simon V, Krammer F, Wacheck S, Pesch S, Schwemmle M, Beer M, Harder TC (2020). Surveillance of European Domestic Pig Populations Identifies an Emerging Reservoir of Potentially Zoonotic Swine Influenza A Viruses. *Cell Host Microbe*, 28 (4): 614-627.e616.

Hood G, Roche X, Brioudes A, von Dobschuetz S, Fasina FO, Kalpravidh W, Makonnen J, Lubroth J, Sims L (2020). A literature review of the use of environmental sampling in the surveillance of avian influenza viruses. *Transboundary and Emerg Dis*, 68 (1): 110-126.

International Committee on Taxonomy of Viruses (2021). https://ictv.global/taxonomy/taxondetails?taxnode_id=202303955&taxon_name=Alphainfluenzavirus. accessed: 25.09.2024.

Ito T, Kawaoka Y, Vines A, Ishikawa H, Asai T, Kida H (1998). Continued circulation of reassortant H1N2 influenza viruses in pigs in Japan. *Arch Virol*, 143 (9): 1773-1782.

Jalily PH, Duncan MC, Fedida D, Wang J, Tietjen I (2020). Put a cork in it: Plugging the M2 viral ion channel to sink influenza. *Antiviral Res*, 178: 104780.

Janke BH (2013). Clinicopathological features of Swine influenza. *Curr Top Microbiol Immunol*, 370: 69-83.

Jensen C, Johnson FB (1994). Comparison of various transport media for viability maintenance of herpes simplex virus, respiratory syncytial virus, and adenovirus. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 19 (3): 137-142.

Kittawornrat A, Prickett J, Chittick W, Wang C, Engle M, Johnson J, Patnayak D, Schwartz T, Whitney D, Olsen C, Schwartz K, Zimmerman J (2010). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in serum and oral fluid samples from individual boars: will oral fluid replace serum for PRRSV surveillance? *Virus Res*, 154 (1-2): 170-176.

Krug R, Fodor E (2013). Textbook of influenza. Webster, R: 57-66.

Krug RM (2015). Functions of the influenza A virus NS1 protein in antiviral defense. *Curr Opin Virol*, 12: 1-6.

Kwit K, Pomorska-Mól M, Markowska-Daniel I (2013). Course of pregnancy in gilts after intranasal infection with the H1N2 subtype of swine influenza virus during the first month of pregnancy. *Medycyna Weterynaryjna*, 69: 687-691.

Kwit K, Pomorska-Mól M, Markowska-Daniel I (2014). The influence of experimental infection of gilts with swine H1N2 influenza A virus during the second month of gestation on the course of pregnancy, reproduction parameters and clinical status. *BMC Vet Res*, 10: 123.

Kwit K, Pomorska-Mól M, Markowska-Daniel I (2015). Pregnancy outcome and clinical status of gilts following experimental infection by H1N2, H3N2 and H1N1pdm09 influenza A viruses during the last month of gestation. *Archives of Virology*, 160 (10): 2415-2425.

Kyriakis CS, Olsen CW, Carman S, Brown IH, Brookes SM, Doorselaere JV, Reeth KV (2010). Serologic cross-reactivity with pandemic (H1N1) 2009 virus in pigs, Europe. *Emerg Infect Dis*, 16 (1): 96-99.

Kyriakis CS, Brown IH, Foni E, Kuntz-Simon G, Maldonado J, Madec F, Essen SC, Chiapponi C, Van Reeth K (2011). Virological surveillance and preliminary antigenic characterization of influenza viruses in pigs in five European countries from 2006 to 2008. *Zoonoses Public Health*, 58 (2): 93-101.

Kyriakis CS, Rose N, Foni E, Maldonado J, Loeffen WLA, Madec F, Simon G, Van Reeth K (2013). Influenza A virus infection dynamics in swine farms in Belgium, France, Italy and Spain, 2006-2008. *Vet Microbiol*, 162 (2-4): 543-550.

Kyriakis CS, Papatsiros VG, Athanasiou LV, Valiakos G, Brown IH, Simon G, Van Reeth K, Tsiodras S, Spyrou V, Billinis C (2016). Serological Evidence of Pandemic H1N1 Influenza Virus Infections in Greek Swine. *Zoonoses Public Health*, 63 (5): 370-300.

Lagan P, Hamil M, Cull S, Hanrahan A, Wregor RM, Lemon K (2024). Swine influenza A virus infection dynamics and evolution in intensive pig production systems. *Virus Evol*, 10 (1): veae017.

Lamb RA, Choppin PW (1983). The gene structure and replication of influenza virus. *Annu Rev Biochem*, 52: 467-506.

Landolt GA, Karasin AI, Schutten MM, Olsen CW (2006). Restricted infectivity of a human-Lineage H3N2 influenza A virus in pigs is hemagglutinin and neuraminidase gene dependent. *J Clin Microbiol*, 44 (2): 297-301.

Leuwerke B, Kitikoon P, Evans R, Thacker E (2008). Comparison of three serological assays to determine the cross-reactivity of antibodies from eight genetically diverse U.S. swine influenza viruses. *J Vet Diagn Invest*, 20 (4): 426-432.

Lillie-Jaschniski K, Lisgara M, Pileri E, Jardin A, Velazquez E, Köchling M, Albin M, Casanovas C, Skampardonis V, Stadler J (2022). A New Sampling Approach for the Detection of Swine Influenza a Virus on European Sow Farms. *Vet Sci*, 9 (7): 338.

Loeffen WL, Kamp EM, Stockhofe-Zurwieden N, van Nieuwstadt AP, Bongers JH, Hunneman WA, Elbers AR, Baars J, Nell T, van Zijderveld FG (1999). Survey of infectious agents involved in acute respiratory disease in finishing pigs. *Vet Rec*, 145 (5): 123-129.

Loeffen WLA, Heinen PP, Bianchi ATJ, Hunneman WA, Verheijden JHM (2003). 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*, 92: 23-35.

Loftager MK, Eriksen L, Nielsen R (1993). Antibodies against *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 2 in mucosal secretions and sera of infected pigs as demonstrated by an enzyme-linked immunosorbent assay. *Res Vet Sci*, 54 (1): 57-62.

Lorusso A, Calistri P, Mercante MT, Monaco F, Portanti O, Marcacci M, Cammà C, Rinaldi A, Mangone I, Di Pasquale A, Iommarini M, Mattucci M, Fazii P, Tarquini P, Mariani R, Grimaldi A, Morelli D, Migliorati G, Savini G, Borrello S, D'Alterio N (2020). A "One-Health" approach for diagnosis and molecular characterization of SARS-CoV-2 in Italy. *One Health*, 10: 100135.

Lowen AC (2017). Constraints, Drivers, and Implications of Influenza A Virus Reassortment. *Annu Rev Virol*, 4 (1): 105-121.

MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG (2024). NucleoProtect VET Reagent, Stabilisierungs- und Inaktivierungsreagenz. <https://www.mn-net.com/de/detail/index/sArticle/5502>. accessed: 30.09.2024.

Maldonado J, Van Reeth K, Riera P, Sitjà M, Saubi N, Espuña E, Artigas C (2006). Evidence of the concurrent circulation of H1N2, H1N1 and H3N2 influenza A viruses in densely populated pig areas in Spain. *Vet J*, 172 (2): 377-381.

Martin K, Helenius A (1991). Nuclear transport of influenza virus ribonucleoproteins: the viral matrix protein (M1) promotes export and inhibits import. *Cell*, 67 (1): 117-130.

McKimm-Breschkin JL (2013). Influenza neuraminidase inhibitors: antiviral action and mechanisms of resistance. *Influenza Other Respir Viruses*, 7 Suppl 1 (Suppl 1): 25-36.

Medical Wire & Equipment (2024). Σ -Virocult®. <https://www.mwe.co.uk/product/sigma-virocult-virus-transport-media/#:~:text=SIGMA%20VIROCULT%C2%AE%20is%20used%20for%20optimum%20recovery%20and> accessed: 30.09.2024.

Meguro H, Bryant JD, Torrence AE, Wright PF (1979). Canine kidney cell line for isolation of respiratory viruses. *J Clin Microbiol*, 9 (2): 175-179.

Mena I, Nelson MI, Quezada-Monroy F, Dutta J, Cortes-Fernández R, Lara-Puente JH, Castro-Peralta F, Cunha LF, Trovão NS, Lozano-Dubernard B, Rambaut A, van Bakel H, García-Sastre A (2016). Origins of the 2009 H1N1 influenza pandemic in swine in Mexico. *Elife*, 5: e16777.

Menšík J, Černý L, Zeman J (1957). Intrauterine transmission of swine influenza. *Vet Čas*, 6: 455-465.

Montoya M, Foni E, Solórzano A, Razzuoli E, Baratelli M, Bilato D, Córdoba L, Del Burgo MAM, Martinez J, Martinez-Orellana P, Chiapponi C, Perlin DS, Del Real G, Amadori M (2017). Expression Dynamics of Innate Immunity in Influenza Virus-Infected Swine. *Front Vet Sci*, 4: 48.

Nathues H, Grummer B, Rohde J, große Beilage E (2013). Labordiagnostik an Probenmaterial aus Schweinebeständen. In: Diagnostik und Gesundheitsmanagement im Schweinebestand; große Beilage E, Wendt M (Hrsg.); Stuttgart, Verlag Eugen Ulmer Stuttgart: 132-150.

Neira V, Rabinowitz P, Rendahl A, Paccha B, Gibbs SG, Torremorell M (2016). Characterization of Viral Load, Viability and Persistence of Influenza A Virus in Air and on Surfaces of Swine Production Facilities. *PLoS One*, 11 (1): e0146616.

Nolting JM, Szablewski CM, Edwards JL, Nelson SW, Bowman AS (2015). Nasal Wipes for Influenza A Virus Detection and Isolation from Swine. *J Vis Exp* (106): e53313.

Nsubuga P, White ME, Thacker SB, Anderson MA, Blount SB, Broome CV, Chiller TM, Espitia V, Imtiaz R, Sosin D, Stroup DF, Tauxe RV, Vijayaraghavan M, Trostle M (2006). Public Health Surveillance: A Tool for Targeting and Monitoring Interventions. In: Disease Control Priorities in Developing Countries; Jamison DT, Breman JG, Measham AR, Alleyne G, Claeson M, Evans DB, Jha P, Mills A, Musgrove P (Hrsg.); Washington (DC) New York, Oxford University Press.

O'Neill RE, Talon J, Palese P (1998). The influenza virus NEP (NS2 protein) mediates the nuclear export of viral ribonucleoproteins. *EMBO J*, 17 (1): 288-296.

Ochert AS, Boulter AW, Birnbaum W, Johnson NW, Teo CG (1994). Inhibitory effect of salivary fluids on PCR: potency and removal. *PCR Methods Appl*, 3 (6): 365-368.

Olsen B, Munster VJ, Wallensten A, Waldenström J, Osterhaus AD, Fouchier RA (2006). Global patterns of influenza A virus in wild birds. *Science*, 312 (5772): 384-388.

Omar SV, Peters RP, Ismail NA, Dreyer AW, Said HM, Gwala T, Ismail N, Fourie PB (2015). Laboratory evaluation of a specimen transport medium for downstream molecular processing of sputum samples to detect *Mycobacterium tuberculosis*. *J Microbiol Methods*, 117: 57-63.

Pacheco JM, Butler JE, Jew J, Ferman GS, Zhu J, Golde WT (2010). IgA antibody response of swine to foot-and-mouth disease virus infection and vaccination. *Clin Vaccine Immunol*, 17 (4): 550-558.

Panyasing Y, Goodell CK, Giménez-Lirola L, Kittawornrat A, Wang C, Schwartz KJ, Zimmerman JJ (2013). Kinetics of influenza A virus nucleoprotein antibody (IgM, IgA, and IgG) in serum and oral fluid specimens from pigs infected under experimental conditions. *Vaccine*, 31 (52): 6210-6215.

Panyasing Y, Goodell CK, Wang C, Kittawornrat A, Prickett JR, Schwartz KJ, Ballagi A, Lizano S, Zimmerman JJ (2014). Detection of influenza A virus nucleoprotein antibodies in oral fluid specimens from pigs infected under experimental conditions using a blocking ELISA. *Transbound Emerg Dis*, 61 (2): 177-184.

Panyasing Y, Goodell C, Kittawornrat A, Wang C, Levis I, Desfresne L, Rauh R, Gauger PC, Zhang J, Lin X, Azeem S, Ghorbani-Nezami S, Yoon KJ, Zimmerman J (2016). Influenza A Virus Surveillance Based on Pre-Weaning Piglet Oral Fluid Samples. *Transbound Emerg Dis*, 63 (5): e328-338.

Patterson AR, Cooper VL, Yoon KJ, Janke BH, Gauger PC (2009). Naturally occurring influenza infection in a ferret (*Mustela putorius furo*) colony. *J Vet Diagn Invest*, 21 (4): 527-530.

Pedersen JC (2014). Hemagglutination-inhibition assay for influenza virus subtype identification and the detection and quantitation of serum antibodies to influenza virus. *Methods Mol Biol*, 1161: 11-25.

Pejsak Z, Markowska-Daniel I, Kowalczyk A, Jabłoński A, Kozaczyński W, Loda M (2005). Reproduction disorders connected with swine influenza outbreak in a large farm. *Medycyna Weterynaryjna*, 61: 1154-1159.

Pillai SP, Pantin-Jackwood M, Yassine HM, Saif YM, Lee CW (2010). The high susceptibility of turkeys to influenza viruses of different origins implies their importance as potential intermediate hosts. *Avian Dis*, 54 (1 Suppl): 522-526.

Pinto LH, Lamb RA (2006). The M2 proton channels of influenza A and B viruses. *J Biol Chem*, 281 (14): 8997-9000.

Pomorska-Mól M, Dors A, Kwit K, Kowalczyk A, Stasiak E, Pejsak Z (2017). Kinetics of single and dual infection of pigs with swine influenza virus and *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Vet Microbiol*, 201: 113-120.

Portela A, Digard P (2002). The influenza virus nucleoprotein: a multifunctional RNA-binding protein pivotal to virus replication. *J Gen Virol*, 83 (Pt 4): 723-734.

Prickett JR, Simer R, Christopher-Hennings J, Yoon KJ, Evans RB, Zimmerman JJ (2008a). Detection of Porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in porcine oral fluid samples: a longitudinal study under experimental conditions. *J Vet Diagn Invest*, 20 (2): 156-163.

Prickett JR, Kim W, Simer R, Yoon KJ, Zimmerman J (2008b). Oral-fluid samples for surveillance of commercial growing pigs for porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus type 2 infections. *Journal of Swine Health and Production*, 16: 86-91.

Prickett JR, Cutler S, Kinyon JM (2010). Stability of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and antibody in swine oral fluid. *Journal of Swine Health and Production*, 18: 187-195.

Prickett JR, Johnson J, Murtaugh MP, Puvanendiran S, Wang C, Zimmerman JJ, Opriessnig T (2011). Prolonged detection of PCV2 and anti-PCV2 antibody in oral fluids following experimental inoculation. *Transbound Emerg Dis*, 58 (2): 121-127.

Rahn J, Hoffmann D, Harder TC, Beer M (2015). Vaccines against influenza A viruses in poultry and swine: Status and future developments. *Vaccine*, 33 (21): 2414-2424.

Ramirez A, Wang C, Prickett JR, Pogranichniy R, Yoon KJ, Main R, Johnson JK, Rademacher C, Hoogland M, Hoffmann P, Kurtz A, Kurtz E, Zimmerman J (2012). Efficient surveillance of pig populations using oral fluids. *Prev Vet Med*, 104 (3-4): 292-300.

Reiner G (2015). Influenza A. In: *Krankes Schwein - kranker Bestand*; Reiner G (Hrsg.); Stuttgart, Eugen Ulmer KG: 117-119.

Reuther P, Giese S, Götz V, Kilb N, Mänz B, Brunotte L, Schwemmle M (2014). Adaptive mutations in the nuclear export protein of human-derived H5N1 strains facilitate a polymerase activity-enhancing conformation. *J Virol*, 88 (1): 263-271.

Robb NC, Smith M, Vreede FT, Fodor E (2009). NS2/NEP protein regulates transcription and replication of the influenza virus RNA genome. *J Gen Virol*, 90 (Pt 6): 1398-1407.

Rogers GN, D'Souza BL (1989). Receptor binding properties of human and animal H1 influenza virus isolates. *Virology*, 173 (1): 317-322.

Romagosa A, Gramer M, Joo HS, Torremorell M (2012). Sensitivity of oral fluids for detecting influenza A virus in populations of vaccinated and non-vaccinated pigs. *Influenza Other Respir Viruses*, 6 (2): 110-118.

Rose N, Hervé S, Eveno E, Barbier N, Eono F, Dorenlor V, Andraud M, Camsusou C, Madec F, Simon G (2013). Dynamics of influenza A virus infections in permanently infected pig farms: evidence of recurrent infections, circulation of several swine influenza viruses and reassortment events. *BMC Vet Res*, 44 (1): 72.

Rudsdale A, Sheddon D (2009). Investigation of the suitability of the Virocult® swab transport Device for influenza A specimens which are to be analyzed by cell culture or molecular techniques. *Clinical Virology Symposium*, Daytona Beach USA, 28.04 - 01.05.2009, M42.

Russell RJ, Kerry PS, Stevens DJ, Steinhauer DA, Martin SR, Gamblin SJ, Skehel JJ (2008). Structure of influenza hemagglutinin in complex with an inhibitor of membrane fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105 (46): 17736-17741.

Ryba S, Tacner J, Havlickova M, Stopka P (2012). Stability of influenza virus as evaluated by integrity of its RNA. *Acta Virol*, 56 (2): 125-128.

Ryt-Hansen P, Pedersen AG, Larsen I, Krog JS, Kristensen CS, Larsen LE (2019). Acute Influenza A virus outbreak in an enzootic infected sow herd: Impact on viral dynamics, genetic and antigenic variability and effect of maternally derived antibodies and vaccination. *PLoS One*, 14 (11): e0224854.

Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 230 (4732): 1350-1354.

Sandbulte MR, Spickler AR, Zaabel PK, Roth JA (2015). Optimal Use of Vaccines for Control of Influenza A Virus in Swine. *Vaccines (Basel)*, 3 (1): 22-73.

Schlaudecker EP, Heck JP, MacIntyre ET, Martinez R, Dodd CN, McNeal MM, Staat MA, Heck JE, Steinhoff MC (2014). Comparison of a new transport medium with universal transport medium at a tropical field site. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 80 (2): 107-110.

Scholtissek C (1994). Source for influenza pandemics. *Eur J Epidemiol*, 10 (4): 455-458.

Schwaiger T, Sehl J, Karte C, Schäfer A, Hühr J, Mettenleiter TC, Schröder C, Köllner B, Ulrich R, Blohm U (2019). Experimental H1N1pdm09 infection in pigs mimics human seasonal influenza infections. *PLoS One*, 14 (9): e0222943.

Shevchenko ES, Breslav NV, Lavrishcheva VV, Mukasheva EA, Siluianova É V, Oskerko TA, Kolobukhina LV, Merkulova LN, Dubovaia NV, Zaplatnikov AL, Burtseva EI (2013). Efficiency of the influenza A and B viruses isolation from nasopharyngeal swabs taken in the test tubes Sigma-Virocult (M40 Compliant, Sigma Virocult) and Virocult (M40 Compliant, Virocult) in 2010-2011 epidemic season. *Vopr Virusol*, 58 (3): 42-50.

Simon-Grifé M, Martín-Valls GE, Vilar MJ, García-Bocanegra I, Mora M, Martin M, Mateu E, Casal J (2011). Seroprevalence and risk factors of swine influenza in Spain. *Vet Microbiol*, 149: 1-2.

Simon-Grifé M, Martín-Valls GE, Vilar MJ, Busquets N, Mora-Salvatierra M, Bestebroer TM, Fouchier RA, Martín M, Mateu E, Casal J (2012). Swine influenza virus infection dynamics in two pig farms; results of a longitudinal assessment. *BMC Vet Res*, 43 (1): 24.

Simon G, Larsen LE, Dürrwald R, Foni E, Harder T, Van Reeth K, Markowska-Daniel I, Reid SM, Dan A, Maldonado J, Huovilainen A, Billinis C, Davidson I, Agüero M, Vila T, Hervé S, Breum S, Chiapponi C, Urbaniak K, Kyriakis CS, Brown IH, Loeffen W (2014). European surveillance network for influenza in pigs: surveillance programs, diagnostic tools and Swine influenza virus subtypes identified in 14 European countries from 2010 to 2013. *PLoS One*, 9 (12): e115815.

Sosa Portugal S, Cortey M, Tello M, Casanovas C, Mesonero-Escuredo S, Barrabés S, Pineda P, Wacheck S, Martín-Valls G, Mateu E (2021). Diversity of influenza A viruses retrieved from respiratory disease outbreaks and subclinically infected herds in Spain (2017-2019). *Transbound Emerg Dis*, 68 (2): 519-530.

Spackman E, Senne DA, Myers TJ, Bulaga LL, Garber LP, Perdue ML, Lohman K, Daum LT, Suarez DL (2002). Development of a real-time reverse transcriptase PCR assay for type A influenza virus and the avian H5 and H7 hemagglutinin subtypes. *J Clin Microbiol*, 40 (9): 3256-3260.

Stadler J, Zwickl S, Gumbert S, Ritzmann M, Lillie-Jaschniski K, Harder T, Graaf-Rau A, Skampardonis V, Eddicks M (2024). Influenza surveillance in pigs: balancing act between broad diagnostic coverage and specific virus characterization. *Porcine Health Manag*, 10 (1): 19.

Starick E, Fereidouni SR, Lange E, Grund C, Vahlenkamp T, Beer M, Harder TC (2011). Analysis of influenza A viruses of subtype H1 from wild birds, turkeys and pigs in Germany reveals interspecies transmission events. *Influenza Other Respir Viruses*, 5 (4): 276-284.

Starick E, Lange E, Grund C, Grosse Beilage E, Döhring S, Maas A, Noé T, Beer M, Harder TC (2012). Reassortants of pandemic influenza A virus H1N1/2009 and endemic porcine HxN2 viruses emerge in swine populations in Germany. *J Gen Virol*, 93: 1658-1663.

Steinhauer DA, Domingo E, Holland JJ (1992). Lack of evidence for proofreading mechanisms associated with an RNA virus polymerase. *Gene*, 122 (2): 281-288.

Suderman M, Moniwa M, Alkie TN, Ojkic D, Broes A, Pople N, Berhane Y (2021). Comparative Susceptibility of Madin-Darby Canine Kidney (MDCK) Derived Cell Lines for Isolation of Swine Origin Influenza A Viruses from Different Clinical Specimens. *Viruses*, 13 (12).

Swayne DE, Suarez DL, Sims LD (2020). Influenza. In: Diseases of Poultry, 210-256.

Swenson SL, Vincent LL, Lute BM, Janke BH, Lechtenberg KE, Landgraf JG, Schmitt BJ, Kinker DR, McMillen JK (2001). A comparison of diagnostic assays for the detection of type A swine influenza virus from nasal swabs and lungs. J Vet Diagn Invest, 13 (1): 36-42.

Swenson SL, Koster LG, Jenkins-Moore M, Killian ML, DeBess EE, Baker RJ, Mulrooney D, Weiss R, Galeota J, Bredthauer A (2010). Natural cases of 2009 pandemic H1N1 Influenza A virus in pet ferrets. J Vet Diagn Invest, 22 (5): 784-788.

Takemae N, Shobugawa Y, Nguyen PT, Nguyen T, Nguyen TN, To TL, Thai PD, Nguyen TD, Nguyen DT, Nguyen DK, Do HT, Le TQ, Hua PT, Van Vo H, Nguyen DT, Nguyen DH, Uchida Y, Saito R, Saito T (2016). Effect of herd size on subclinical infection of swine in Vietnam with influenza A viruses. BMC Vet Res, 12 (1): 227.

Talker SC, Stadler M, Koinig HC, Mair KH, Rodríguez-Gómez IM, Graage R, Zell R, Dürrwald R, Starick E, Harder T, Weissenböck H, Lamp B, Hammer SE, Ladinig A, Saalmüller A, Gerner W (2016). Influenza A Virus Infection in Pigs Attracts Multifunctional and Cross-Reactive T Cells to the Lung. J Virol, 90 (20): 9364-9382.

Tamura S, Tanimoto T, Kurata T (2005). Mechanisms of broad cross-protection provided by influenza virus infection and their application to vaccines. Jpn J Infect Dis, 58 (4): 195-207.

Tong S, Zhu X, Li Y, Shi M, Zhang J, Bourgeois M, Yang H, Chen X, Recuenco S, Gomez J, Chen LM, Johnson A, Tao Y, Dreyfus C, Yu W, McBride R, Carney PJ, Gilbert AT, Chang J, Guo Z, Davis CT, Paulson JC, Stevens J, Rupprecht CE, Holmes EC, Wilson IA, Donis RO (2013). New world bats harbor diverse influenza A viruses. *PLoS Pathog*, 9 (10): e1003657.

Torremorell M, Allerson M, Corzo C, Diaz A, Gramer M (2012). Transmission of influenza A virus in pigs. *Transbound Emerg Dis*, 59 Suppl 1: 68-84.

Trebbien R, Bragstad K, Larsen LE, Nielsen J, Bøtner A, Heegaard PM, Fomsgaard A, Viuff B, Hjulsager CK (2013). Genetic and biological characterisation of an avian-like H1N2 swine influenza virus generated by reassortment of circulating avian-like H1N1 and H3N2 subtypes in Denmark. *Virol J*, 10: 290.

Trilla A, Trilla G, Daer C (2008). The 1918 "Spanish flu" in Spain. *Clin Infect Dis*, 47 (5): 668-673.

Truyen U, Becher P (2023). Allgemeine Virologie. In: Tiermedizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre. 11. Auflage; Selbitz HJ, Truyen U, Valentin-Weigand P (Hrsg.); Stuttgart, Georg Thieme Verlag: 415-422.

Unterweger C, Debeerst S, Klingler E, Auer A, Redlberger-Fritz M, Stadler J, Pesch S, Lillie-Jaschniski K, Ladinig A (2021). Herausforderungen bei der Influenzadiagnostik in einem Schweinebetrieb – ein Fallbericht. *Tierärztl Prax Ausg G Grosstiere Nutztiere*, 49 (06): 425-431.

Van Reeth K (2000). Cytokines in the pathogenesis of influenza. *Vet Microbiol*, 74 (1-2): 109-116.

Van Reeth K (2007). Avian and swine influenza viruses: our current understanding of the zoonotic risk. *Vet Res*, 38 (2): 243-260.

Van Reeth K, Brown IH, Dürrwald R, Foni E, Labarque G, Lenihan P, Maldonado J, Markowska-Daniel I, Pensaert M, Pospisil Z (2008). Seroprevalence of H1N1, H3N2 and H1N2 influenza viruses in pigs in seven European countries in 2002–2003. *Influenza and other respiratory viruses*, 2 (3): 99-105.

Van Reeth K, Vincent AL (2019). Influenza Viruses. In: *Diseases of Swine*. 11. Auflage; Zimmermann JJ, Karriker LA, Ramirez A, Schwartz KJ, Stevenson GW, Zhang J (Hrsg.); Hoboken, Wiley-Blackwell: 576-598.

Vareille M, Kieninger E, Edwards MR, Regamey N (2011). The airway epithelium: soldier in the fight against respiratory viruses. *Clin Microbiol Rev*, 24 (1): 210-229.

Wang J, Moore NE, Deng YM, Eccles DA, Hall RJ (2015). MinION nanopore sequencing of an influenza genome. *Front Microbiol*, 6: 766.

Watson SJ, Langat P, Reid SM, Lam TT, Cotten M, Kelly M, Van Reeth K, Qiu Y, Simon G, Bonin E, Foni E, Chiapponi C, Larsen L, Hjulsager C, Markowska-Daniel I, Urbaniak K, Dürrwald R, Schlegel M, Huovilainen A, Davidson I, Dán Á, Loeffen W, Edwards S, Bublot M, Vila T, Maldonado J, Valls L, Brown IH, Pybus OG, Kellam P (2015). Molecular Epidemiology and Evolution of Influenza Viruses Circulating within European Swine between 2009 and 2013. *J Virol*, 89 (19): 9920-9931.

Webster RG, Laver WG, Air GM, Schild GC (1982). Molecular mechanisms of variation in influenza viruses. *Nature*, 296 (5853): 115-121.

Webster RG, Bean WJ, Gorman OT, Chambers TM, Kawaoka Y (1992). Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiol Rev*, 56 (1): 152-179.

Weiser AC, Poonsuk K, Bade SA, Gauger PC, Rotolo M, Harmon K, Gonzalez WM, Wang C, Main R, Zimmerman JJ (2018). Effects of sample handling on the detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in oral fluids by reverse-transcription real-time PCR. *J Vet Diagn Invest*, 30 (6): 807-812.

Welch JL, Shrestha R, Hutchings H, Pal N, Levings R, Robbe-Austerman S, Palinski R, Shanmuganatham KK (2024). Inactivation of highly transmissible livestock and avian viruses including influenza A and Newcastle disease virus for molecular diagnostics. *Front Vet Sci*, 11: 1304022.

Welch SR, Davies KA, Buczkowski H, Hettiarachchi N, Green N, Arnold U, Jones M, Hannah MJ, Evans R, Burton C, Burton JE, Guiver M, Cane PA, Woodford N, Bruce CB, Roberts ADG, Killip MJ (2020). Analysis of Inactivation of SARS-CoV-2 by Specimen Transport Media, Nucleic Acid Extraction Reagents, Detergents, and Fixatives. *J Clin Microbiol*, 58 (11).

Wesley RD (2004). Exposure of sero-positive gilts to swine influenza virus may cause a few stillbirths per litter. *Can J Vet Res*, 68 (3): 215-217.

WHO M (1980). Revision of the system nomenclature for influenza viruses. *Bull Wrd Hlth Org*, 58: 585-591.

Wills RW, Zimmerman JJ, Yoon KJ, Swenson SL, McGinley MJ, Hill HT, Platt KB, Christopher-Hennings J, Nelson EA (1997). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: a persistent infection. *Vet Microbiol*, 55 (1-4): 231-240.

Woźniak A, Miłek D, Matyba P, Stadejek T (2019). Real-Time PCR Detection Patterns of Porcine Circovirus Type 2 (PCV2) in Polish Farms with Different Statuses of Vaccination against PCV2. *Viruses*, 11 (12).

Wu NC, Wilson IA (2020). Influenza Hemagglutinin Structures and Antibody Recognition. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 10 (8): a038778.

Wu R, Hu S, Xiao Y, Li Z, Shi D, Bi D (2007). Development of indirect enzyme-linked immunosorbent assay with nucleoprotein as antigen for detection and quantification of antibodies against avian influenza virus. *Vet Res Commun*, 31 (5): 631-641.

Yoon KJ, Janke BH (2002). Swine Influenza: Etiology, Epidemiology, and Diagnosis. In: *Trends in Emerging Viral Infections of Swine*, 23-28.

Yoon KJ, Janke BH, Swalla RW, Erickson G (2004). Comparison of a commercial H1N1 enzyme-linked immunosorbent assay and hemagglutination inhibition test in detecting serum antibody against swine influenza viruses. *J Vet Diagn Invest*, 16 (3): 197-201.

Zambon MC (1999). Epidemiology and pathogenesis of influenza. *J Antimicrob Chemother*, 44 Suppl B: 3-9.

Zeller MA, Anderson TK, Walia RW, Vincent AL, Gauger PC (2018). ISU FLUture: a veterinary diagnostic laboratory web-based platform to monitor the temporal genetic patterns of Influenza A virus in swine. *BMC Bioinformatics*, 19 (1): 397.

Zhang J, Gauger PC (2014). Isolation of swine influenza virus in cell cultures and embryonated chicken eggs. *Methods Mol Biol*, 1161: 265-276.

Zhang J, Gauger PC (2020). Isolation of Swine Influenza A Virus in Cell Cultures and Embryonated Chicken Eggs. *Methods Mol Biol*, 2123: 281-294.

X. DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Priv.-Doz. Dr. Matthias Eddicks für die Überlassung dieses interessanten Themas sowie für die außerordentlich gute Betreuung. Auch bedanke ich mich bei Herrn Professor Dr. Mathias Ritzmann für die Chance an der Klinik für Schweine zu promovieren, mich hier fachlich weiterbilden und in einem tollen Team arbeiten zu können.

Ganz herzlich möchte ich bei meiner Betreuerin Frau Dr. Julia Stadler für die durchweg positive, motivierende Zusammenarbeit, die Hilfe bei allen fachlichen Fragen und das unermüdliche Korrekturlesen bedanken. Auch möchte ich mich bei Frau Dr. Susi Zöls, Frau Dr. Steffanie Senf, Frau Dr. Pauline Deffner und Frau Dr. Hannah Aßmann für die stetig aufbauenden Worte und das Korrekturlesen bedanken.

Bei der Firma CEVA Tiergesundheit, hier insbesondere bei Frau Dr. Kathrin Lillie-Jaschniski möchte ich mich herzlich für die Bereitstellung der finanziellen Mittel, für die tolle Zusammenarbeit und die wertvollen Anregungen bedanken.

Auch möchte ich mich ganz herzlich bei allen Mitdoktoranden für die tolle Arbeitsatmosphäre, die nötige Portion Humor und all die unvergesslichen Momente bei Ausfahrten bedanken.

Bei meinen ArbeitskollegInnen, die mich in dieser sehr intensiven Zeit mental unterstützt und durch Ihre Flexibilität mir nötige Pausen ermöglicht haben, bedanke ich mich von Herzen.

Meiner Familie danke ich von Herzen für deren bedingungsloses

Vertrauen während meines Studiums und der Promotion. Besonders danke ich meiner Schwester Celine, für ihre unermüdlich positive Art und aufbauenden Worte. Lukas, danke dass wir all die Rückschläge und Erfolge gemeinsam teilen können.