

Aus der Klinik für Schweine des Klinischen Departments für Nutztiere und Bestandsbetreuung der Veterinärmedizinischen Universität Wien¹, dem Impfstoffwerk Dessau-Tornau GmbH, Rodleben² und dem Institut für Tierzucht und Genetik des Klinischen Departments für Tierzucht und Reproduktion der Veterinärmedizinischen Universität Wien³

Abklärung des Vorkommens des Schweineinfluenzavirus A-Subtyps H1N2 in österreichischen Betrieben

Ch. LANG¹, W. SIPOS¹, R. DÜRRWALD², V. HERWIG², I. SOMMERFELD-STUR³, M. SCHUH¹ und F. SCHMOLL¹

eingelangt am 5.10.2004
angenommen am 11.11.2004

Schlüsselwörter: Schweineinfluenzavirus (FLUAV/sw), H1N1, H3N2, H1N2, Hämagglutinationshemmungsreaktion, Österreich.

Zusammenfassung

967 Serumproben aus 111 schweinehaltenden Betrieben, die im Zeitraum von Jänner 2002 bis November 2003 aus den österreichischen Bundesländern Burgenland, Niederösterreich, Oberösterreich und Steiermark entnommen worden waren, wurden mittels Hämagglutinationshemmungstest auf das Vorkommen von 9 unterschiedlichen Stämmen der Schweineinfluenzavirus-Subtypen H1N1, H3N2 und H1N2 untersucht. Der erst unlängst beschriebene Subtyp H1N2 konnte erstmals in Österreich nachgewiesen werden. Die Seroprävalenzen und Seroinzidenzen der unterschiedlichen Sub- und Antigentypen in österreichischen Schweinebetrieben wurden ermittelt und mögliche Assoziationen mit klinischen Symptomen analysiert.

Keywords: swine influenza virus (FLUAV/sw), H1N1, H3N2, H1N2, hemagglutination inhibition, Austria.

Investigation on the occurrence of the porcine influenza virus A-subtype H1N2 in Austria

Introduction

For 85 years swine influenza has represented a huge health problem in swine production. The basic elements for the evolution of influenza viruses are antigenic drift and antigenic shift, but of these two the more important factor is antigenic shift, which occurs because of interspecies transmission in toto or through genetic reassortment. The subtypes H1N1 and H3N2 have been enzootic in European's swine producing countries for the last 20 years. In 1994 a new subtype, H1N2, was isolated in Great Britain and spread to the continent. In some European countries this new subtype has been detected during the last years and all three subtypes are circulating now concurrently. The aim of this study was the screening for the subtype H1N2 in the Austrian pig population.

Material and methods

967 serum samples of 111 farms collected from January 2002 until November 2003 in Burgenland, Lower Austria, Styria, and Upper Austria were analysed by hemagglutination inhibition test against 9 different swine influenza A virus strains of the subtypes H1N1, H3N2, and H1N2. The new subtype H1N2 was detected in Austria for the first time. H1N2 was only detected in two single animals from different farms, which reacted negative against the other two subtypes. As the other samples displaying anti-H1N2-Abs also exhibited marked reactions against the other two subtypes, these cases were considered to be false positive of H1N2 due to possible cross reaction with H1N1 and H3N2.

Results and discussion

Seroprevalences and seroincidences (seroincidences stand for shortly dated back infections whereas seroprevalences comprise all antigen contacts independent from time) of different subtypes and antigen types of influenza A viruses in Austrian swine farms were investigated and associations with disease symptoms were analysed. The results of the vaccinated and of the not vaccinated population were evaluated separately each on the basis of individual animals and on farm level. The seroprevalence for the 802 not vaccinated animals added up to 33.5 % for the subtype H1N1, 14.5 % for H3N2, and 12.8 % for H1N2; the

Abkürzungen: Abs = antibodies; AK = Antikörper; FLUAV/sw = Schweineinfluenzavirus; H = Hämagglutinin; HAE = Hämagglutinierende Einheiten; HAH = Hämagglutinationshemmtest; HI = Hämagglutinationsinhibition oder Hämagglutinationshemmungsreaktion, MDBK = Madin-Darby bovine kidney; N = Neuraminidase; PBS = Phosphate Buffered Saline; PRRSV = Porcine Respiratory and Reproductive Syndrome Virus

seroincidence was 13.2 % for H1N1, 5.6 % for H3N2, and 2.7 % for H1N2. The 110 vaccinated animals spreaded as follows: 70.0 % (H1N1), 47.7 % (H3N2), and 39.1 % (H1N2); the analysis of the incidence (incidences of vaccinated animals stand for a shortly dated back vaccination) resulted in 41.2 % for H1N1, 22.7 % for H3N2, and 7.2 % for H1N2. The seroprevalence of the 47 not vaccinated farms was 34.0 % for H1N1, 6.4 % for H3N2, and 8.5 % for H1N2; the seroincidence added up to 4.3 % for H1N1, and 2.1 % for H3N2, and 0 % for H1N2. The results of the 13 vaccinated farms showed a prevalence of 76.9 % (H1N1), 53.9 % (H3N2), and 30.8 % (H1N2); the incidences on farm level were 38.5 % for H1N1, and 15.4 % for H3N2, and 0 % for H1N2.

Based on statistical investigations the only association between results and disease symptoms was found between animals with reproduction problems and the subtype H1N1.

Einleitung

Das Influenzavirus Typ A (*Influenza A virus*, FLUAV) aus der Familie der *Orthomyxoviridae* ist sowohl beim Geflügel als auch beim Säugetier ein hoch kontagiöser Erreger respiratorischer Erkrankungen (EASTERDAY u. HINSHAW, 1992). Bei den Influenzaviren werden aufgrund ihres Genoms 3 verschiedene Typen (A, B, C) unterschieden und taxonomisch 3 verschiedenen Genera zugeordnet, wobei beim Schwein nur der Typ A klinische Bedeutung hat (REGENMORTELL et al., 2000). Influenza A Viren besitzen 8 Segmente einer einzelsträngigen RNA negativer Polarität. Aufgrund der Segmentierung ist ein Austausch einzelner RNA-Segmente bei Doppel- oder Mehrfachinfektionen einer einzelnen Zelle möglich (Shift oder Reassortment), der in kürzester Zeit zu neuen Genomkonfigurationen und Subtypen führen kann. Dieser Prozeß spielt neben der genetischen Drift über Punktmutationen eine große Rolle in der Influenzavirusevolution. Anhand des unterschiedlichen Aufbaus der Glykoproteine Hämagglutinin (H) und Neuraminidase (N) werden 15 verschiedene Hämagglutinin- und 9 Neuraminidase-Typen des Influenzavirus Typ A unterschieden, die als Basis für die Subtypisierung der Influenza A Viren dienen. Beim Schwein haben sich 3 Subtypen des Influenza A Virus (FLUAV/sw) in der Population etabliert. Die Subtypen H1N1 und H3N2 sind seit Ende der 1970er Jahre als Erreger respiratorischer Erkrankungen in Europa prävalent. Der Subtyp H1N2 hat sich Anfang der 1990er Jahre über Reassortments in Westeuropa entwickelt (OLSEN, 2002; REETH, van, 2001).

Das klinische Erscheinungsbild der Schweineinfluenza äußert sich in Form einer akuten Bronchopneumonie. Kardinalsymptome sind frequente Atmung, hohes Fieber und Abgeschlagenheit. Respiratorische Symptome wie Tachypnoe, Dyspnoe, Husten und Nasenausfluß sowie eine stark erhöhte innere Körpertemperatur assoziiert mit Apathie und Inappetenz dominieren das Krankheitsbild; auch Kreislaufstörungen können auftreten (OLSEN, 2002). Die Inkubationszeit beträgt 1 bis 5 Tage. Der Krankheitsverlauf ist relativ heftig und kurz. Nach 3 bis 5 Tagen erholen sich die Tiere wieder. Während die Morbiditätsrate beinahe 100 % beträgt, liegt die Mortalitätsrate unter 1 %

(EASTERDAY u. HINSHAW, 1992). Neben dem typischen akuten Verlauf kennt man eine chronische Verlaufsform, die sich als Abortusgeschehen in der zweiten Hälfte der Trächtigkeit manifestiert (LABURN et al., 2003; WALLACE u. ELM, 1979) oder zur Geburt lebensschwacher Ferkel führt, die auf Grund einer mangelnden oder fehlenden Kolostrum- beziehungsweise Milchaufnahme zum Kümmern neigen (CHOI et al., 2004; DEE, 1995).

Das Schweineinfluenzavirus kann eine zentrale Rolle bei der Entstehung von neuen humanen Influenzavirus-Subtypen spielen, weil das Schwein sowohl für andere Säugetier-Subtypen als auch für Geflügel-Subtypen empfänglich ist. Das Trachealepithel der Schweine verfügt neben 2,3-N-Acetyl-Neuraminsäure-Galactose-Rezeptoren, die passend für Geflügelinfluenzavirus sind, auch über 2,6-N-Acetyl-Neuraminsäure-Galactose-Rezeptoren, an denen Säugetier-Subtypen binden können. Aus diesem Grund ist das Schwein für Infektionen mit Stämmen unterschiedlicher Spezies prädestiniert, wodurch es zum Reassortment von Geflügel-, Schweine- und humanen Subtypen kommen kann. Das Schwein wird deshalb als sogenanntes „mixing vessel“ bezeichnet. Eine Direktübertragung von Schweineinfluenzaviren auf den Menschen ist möglich (CHOI et al., 2002).

Die Schweineinfluenzavirus-Subtypen H1N1 und H3N2 sind seit den 1980er Jahren in den schweineproduzierenden Ländern Europas enzootisch. Der Subtyp H1N2 konnte erstmals 1994 in Großbritannien isoliert werden (BROWN et al., 1995) und verbreitete sich von dort aus in das kontinentale Europa, wo er zuerst in Frankreich, Italien, Belgien und Deutschland nachgewiesen wurde (GOURREAU et al., 1994; REETH et al., 2000; SCHRADER u. SÜSS, 2002). Mittlerweile zirkulieren alle 3 Subtypen in Europa. Obwohl das durch die 3 Subtypen verursachte Krankheitsbild identisch ist, gibt es große genetische und antigenetische Unterschiede. Während das Hämagglutinin des H1N2-Subtyps aus humanen H1N1-Stämmen hervorgeht, wurde die Neuraminidase von einem porcinen H3N2-Stamm übernommen. Außerdem zeigen die internen viralen Gene aller 3 Subtypen genetische Ähnlichkeit mit aviären Influenzavirusstämmen (LABARQUE et al., 2004a; REETH et al., 2002, 2003a, 2003b, 2004).

Ziel dieser Arbeit war es, zu untersuchen, ob der Sub-

Tab. 1: Übersicht über in der Hämagglutinationshemmungsreaktion eingesetzte Influenzavirusstämme

Influenzavirusstamm A/swine/...	Herkunft	Charakteristik	H-Antigentyp ¹
H1N1			
Bakum/3543/98	Deutschland	Feldisolat	H1 I
Potsdam/ 1/81	Deutschland	Feldisolat	H1 I
IDT/Re 230	Impfstoffwerk Dessau-Tornau GmbH	Impfstamm	H1 I
Bakum/ 5/95	Deutschland	Feldisolat	H1 II
H1N2			
Scotland/410440/94	Großbritannien	Feldisolat	H1 III
England/17394/96	Großbritannien	Feldisolat	H1 III
Bakum/1832/00	Deutschland	Feldisolat	H1 III
H3N2			
Bakum/ 909/93	Deutschland	Feldisolat	H3
IDT/Re 220	Impfstoffwerk Dessau-Tornau GmbH	Impfstamm	H3

¹ Eine Einteilung in Antigentypen ist gegenwärtig noch nicht üblich, wird aber in der Zukunft erforderlich sein, da die Antigentypisierung auch für den Impfschutz Bedeutung hat; die Antigentypisierung wurde zum besseren Verständnis der Gesamtheit der Antigenemathematik entworfen und aufgestellt.

typ H1N2 auch in österreichischen Schweinebetrieben vorkommt, und zusätzlich epidemiologische Daten zur Prävalenz der anderen beiden Subtypen (H1N1 und H3N2) zu erfassen. Aufgrund der benachbarten Lage Österreichs zu Deutschland wurden überwiegend aktuelle Schweineinfluenzavirusisolate aus Deutschland in die Untersuchungen mittels HI-Test einbezogen. Wegen des auf den Subtyp H1N2 ausgerichteten Schwerpunktes der Fragestellung wurden Prototypen des H1N2-Subtyps aus Großbritannien zusätzlich involviert. Weiterhin wurden 2 Impfstämme eines im Jahr 2003 neu in Deutschland zugelassenen Influenzaimpfstoffes für Schweine in das Untersuchungsprogramm integriert.

Material und Methode

Herkunft des Probenmaterials

Es wurden 967 Serumproben untersucht, welche im Zeitraum von Jänner 2002 bis November 2003 in 111 Betrieben (1 - 39 Proben je Betrieb, durchschnittlich 8,7 pro Betrieb) in den österreichischen Bundesländern Burgenland, Niederösterreich, Oberösterreich und Steiermark im Zuge eines allgemeinen Screening-Programmes entnommen worden waren. Die Seren wurden bis zur weiteren Untersuchung bei -80 °C tiefgefroren. Die Proben stammten von Tieren unterschiedlicher Altersgruppen mit folgender Verteilung: 35,7 % Läufer, 25,9 % Jungsauen, 15,2 % Eber, 12,3 % trächtige Sauen und 10,9 % Ferkel. 82,9 % der Tiere waren nicht geimpft, 11,5 % mit den handelsüblichen Impfstoffen Gripovac® (Merial, Hallbergmoos, Deutschland) und Viraflu® (Merial, Alzulassung desselben Produkts) geimpft; bei 5,6 % war der Impfstatus unbekannt. Auch die klinische Symptomatik wurde erhoben (68,0 % ohne klinische Symptome, 32,0 % Kümmern bei Ferkeln und Zuchtläufern, 19,4 % Reproduktionsstörungen bei

Jungsauen und trächtigen Sauen, 4,3 % länger zurückliegende respiratorische Erkrankungen und 4,1 % aktuelle respiratorische Erkrankungen, sowie 3,7 % sowohl respiratorische Erkrankungen als auch Reproduktionsstörungen ebenfalls auf Jungsauen und trächtige Sauen bezogen). Geimpfte Tiere wurden separat bewertet und nicht in die Erhebungen zur epidemiologischen Situation einbezogen.

Hämagglutinationshemmungsreaktion

Die serologischen Untersuchungen erfolgten mittels Hämagglutinationshemmungsreaktion. Die Blutproben wurden zentrifugiert und die Seren abgenommen. Es erfolgte eine Vorbehandlung der Seren mit Neuraminidase (DADE BEHRING, ORKDO 05, Fa. Dade Behring, Schwalbach, Deutschland) 14 - 18 h bei 37 °C. Anschließend wurden die Proben mit Natriumcitrat (1,5 %ig) versetzt und 30 min bei 56 °C inaktiviert. Dann wurden die Seren 1 h lang bei 4 - 8 °C an Hühnererythrozyten adsorbiert.

Insgesamt wurden insgesamt 9 Influenzavirusstämme in die Untersuchungen einbezogen (siehe Tab. 1). Die Influenzavirusstämme wurden auf Zellkulturen (MDBK) vermehrt, nach der Ernte separat gepoolt, bei 4 - 8 °C gelagert und entsprechend dem Bedarf als Antigen suspension verwendet. Die Antigen suspensionen wurden jeweils auf 8 hämagglutinierende Einheiten (HAE) eingestellt. Die eingestellten Antigen suspensionen wurden in einer Rücktitration der im Test verwendeten Antigen suspension nochmals überprüft.

Zur Testdurchführung wurden die durch die Vorbehandlung bereits 1:10 vorverdünnten Seren auf Mikrotiterplatten logarithmisch zur Basis 2 titriert. Anschließend wurde das gleiche Volumen (25 µl) der auf 8 HAE eingestellten Antigen suspension in alle Kavitäten der Mikrotiterplatte pipettiert und das Antigen-Antikörper-Gemisch 30 min bei 20 - 25 °C inkubiert. Für eine Erythrozytenkontrolle wurden in mehrere Kavitäten einer Mikrotiterplatte 50 µl Phosphate

Buffered Saline (PBS) pipettiert. Anschließend wurden zu allen Mikrotiterplatten 50 µl einer auf 0,5 % eingestellten Hühnererythrozytensuspension gegeben. Die Reaktionen wurden dann bei 20 - 25 °C 30 min inkubiert.

Bei jedem Testansatz wurden seronegative Seren als Negativkontrollen und seropositive Seren als Positivkontrollen eingesetzt. Weiterhin wurde für jedes Serum eine Serumkontrolle (keine Antigenzugabe) mitgeführt, um unspezifische Hämagglutinationshemmungen ausschließen zu können.

Der Test war auswertbar, wenn in der Antigenrücktitration bis zur Verdünnungsstufe 1:8 eine Haemagglutination ablesbar war, in allen Kavitäten der Erythrozytenkontrolle eine vollständige Sedimentation der Erythrozyten als Knopfbildung erkennbar war, der ermittelte HI-Antikörpertiter der positiven Kontrollseren dem bekannten Wert entsprach und das negative Kontrollserum keinen Antikörpertiter erkennen ließ.

Das Ergebnis der Untersuchung wurde als Titer der hämagglutinationshemmenden Antikörper der jeweils untersuchten Serumprobe ausgedrückt und entsprach der höchsten Verdünnungsstufe der Serumprobe, in der eine vollständige Hemmung der Hämagglutination auftrat.

Einstufung der Hämagglutinationshemmungstiter

In umfassenden Untersuchungen zur Antikörperkinetik bei experimentell infizierten Schweinen, geimpften Schweinen und natürlich infizierten Schweinen im Impfstoffwerk Dessau-Tornau konnte nachgewiesen werden, daß die hämagglutinationshemmenden Antikörper einer Dynamik unterliegen, die Aussagen zur Aktualität der Infektionen auf Bestandsebene ermöglichen (DÜRRWALD u. SELBITZ, 2002; DÜRRWALD et al., 2004a). Eine Woche nach einer Influenzavirusinfektion treten spezifische Antikörper auf, die maximal eine Woche auf diesem Niveau bestehen bleiben, um dann regelmäßig eine Titerstufe pro Woche abzufallen und sich 6 bis 8 Wochen nach der Infektion auf ein stabileres Niveau einzustellen, daß dann nur langsam abflacht. Diese Dynamik wurde genutzt, um die ermittelten Antikörpertiter hinsichtlich Seroprävalenz und Seroinzidenz einordnen zu können. Als Seroprävalenz wird der Anteil untersuchter Individuen oder Bestände definiert, der zum Zeitpunkt der Probenentnahme insgesamt seropositiv war. Als Seroinzidenz wird der Anteil der Individuen oder Bestände definiert, die aufgrund der Antikörperhöhe auf einen aktuellen Infektionsschub schlussfolgern lassen. Wenn auf Bestandsebene bei mehr als 50 % der untersuchten Schweineseren Titer höher als 1:160 nachzuweisen waren, wurden die Infektionen als aktuelle Infektionen eingestuft. Die Einstufung als aktuell ist relativ und deutet an, daß die Infektionen nicht länger als 4 bis 6 Wochen zurückliegen (Seroinzidenz). Waren die Titer niedriger, wurden die Infektionen als länger zurückliegende Infektionen eingestuft. Aktuelle und zurückliegende Infektionen zusammen definieren die Seroprävalenz.

Die Blutproben wurden nach folgenden Titerhöhen bewertet:

Titer < 1:20 negativ,

Titer < 1:160 als länger zurückliegende Infektionen,

Titer \geq 1:160 als relativ aktuelle Infektionen.

Probleme bei dieser Einstufung treten bei Tieren mit mehrfachen Antigenkontakten auf. Dies betrifft vor allem

ältere Sauen, die entweder mehrfach geimpft wurden oder mehrere Infektionsschübe durchlaufen haben, deshalb höhere Basistiter aufweisen und somit aktuelle Infektionen vortäuschen können. Diese Fehlermöglichkeit wird dadurch kompensiert, daß Schweine eine hohe Durchsatzrate haben und somit durchschnittlich kein hohes Lebensalter erreichen. Weiterhin wird dieser Fehler durch die Bewertung auf Bestandsebene ausgeglichen, indem hier nur eine positive Bewertung erfolgt, wenn mehr als 50 % der Tiere reagieren; dadurch bleiben die wenigen, älteren Einzeltiere mit hohen Titern unberücksichtigt. Auf Ebene der einzelnen Individuen gleicht sich der Fehler über die hohe Gesamtzahl der Individuen aus. Bei der Testvalidierung zeigte sich, daß mehrheitlich bereits Antikörpertiter ab 1:20 positiv bewertet werden können. Der Terminus „länger zurückliegende Infektionen“ besagt, daß die Tiere Antigenkontakte hatten, die länger als 4 bis 6 Wochen zurückliegen. Verlaufsuntersuchungen nach experimentellen Infektionen mit Feldstämmen zeigten, daß diese Antigenkontakte länger als ein Jahr zurückliegen können (DÜRRWALD et al., 2004a); somit können die Seroprävalenzen nur einen Überblick über die Antigenkontakte geben, diese jedoch nicht auf einen Zeitraum einschränken.

Die Seroprävalenzen (Titer \geq 1:20) und Seroinzidenzen (Titer \geq 1:160) wurden auf Individualebene (Basis Einzelserum, Individualprävalenz, Individualinzidenz) und auf Bestandsebene (Basis Betrieb, Herden- oder Bestandsprävalenz, Herden- oder Bestandsinzidenz) erstellt.

Statistische Methoden

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programmpaket SPSS für Windows, Version 9.0.1. Tiere mit einem Titer von \geq 1:20 wurden als positiv für die Prävalenzschätzung, solche mit einem Titer von \geq 1:160 als positiv für die Inzidenzschätzung definiert. Für die Untersuchung von Assoziationen zwischen klinischen Symptomen und Titerstatus wurden die definierten klinischen Symptome als binomiale Dummyvariablen definiert. Die Auswertung erfolgte dann mit dem Fisher-Yates-Test (BORTZ u. LIENERT, 1998). Der Prävalenz- und Inzidenzvergleich zwischen geimpften und ungeimpften Tieren wurde ebenfalls mittels Fisher-Yates-Test durchgeführt mit einer statistischen Signifikanz < 0,01 beziehungsweise < 0,05 (Tab. 2), der Prävalenz- und Inzidenzvergleich zwischen den Bundesländern erfolgte mittels Chi²-Test mit einer statistischen Signifikanz < 0,01 (Tab. 3 u. 4), wobei signifikante Abweichungen einzelner Bundesländer durch standardisierte Residuen ermittelt wurden (BROSIUS u. BROSIUS, 1995).

Ergebnisse

Im Verlauf dieser Studie konnte der Schweineinfluenzavirus A-Subtyp H1N2 in Österreich serologisch nachgewiesen werden. Für diesen Stamm liegen 2 gesicherte positive Untersuchungsergebnisse aus 2 verschiedenen Betrieben in der Steiermark vor. In beiden Fällen war jeweils nur ein Tier betroffen, welches negativ gegenüber den Subtypen H1N1 und H3N2 reagierte. Bei beiden Betrieben handelte es sich um kombinierte Betriebe mit 50 Zuchtsauen und 100 Mastplätzen beziehungsweise 100 Zuchtsauen und 270 Mastplätzen. Die Tiere beider Betriebe waren gegen *Erysipelothrix rhusiopathiae*, Myko-

plasmen und Porcines Parvovirus vakziniert, ein Betrieb impfte die Zuchtsauen zusätzlich mittels eines inaktivierten Impfstoffes gegen PRRSV, der zweite vakzinierte gegen *E. coli* und Rhinitis atrophicans. Die positiven Reagenten waren in beiden Betrieben Ferkel, die kümmerten. Bei den weiteren H1N2-seropositiven Proben aus anderen Betrieben konnte ein falsch-positives Ergebnis auf Grund einer Kreuzreaktion mit den anderen beiden Subtypen im HI-Test nicht sicher ausgeschlossen werden, da die Tiere zugleich auch Antikörpertiter gegen H1N1 und/oder H3N2 aufwiesen. Zusätzlich zum erstmaligen serologischen Nachweis des Subtyps H1N2 wurden die Seroprävalenz und Seroinzidenz der anderen beiden Subtypen berechnet und mögliche Assoziationen mit klinischen Symptomenkomplexen analysiert.

Insgesamt konnten 43,7 % der Serumproben als Influenza-positiv bewertet werden. Hiervon wiesen 23,6 % Antikörper gegen nur einen Subtyp, 10,5 % gegen 2 Subtypen und 9,7 % Antikörper gegen alle 3 Subtypen auf. In Folge wurden alle Ergebnisse getrennt nach geimpfter und nicht geimpfter Population ausgewertet. Die Unterscheidung zwischen einem geimpften und einem nicht geimpften Tier wurde wie folgt definiert: Da 6 bis 8 Monate nach der Vakzinierung noch Wechselwirkungen zwischen den Impfantikörpern und Antigenen, die auf Grund einer Infektion mit dem Feldvirus entstehen, auftreten, die einem Booster-Effekt entsprechen, wurde der Differenzierungszeitraum noch um einige Monate verlängert. Alle Tiere, die innerhalb von 12 Monaten vor der Gewinnung der Blutprobe vakziniert worden waren, galten als geimpft. Auf Betriebsebene wurde derselbe Zeitraum gewählt und die Definition „geimpfter Betrieb“ galt auch für Bestände, in denen nur ein Teil der Tiere vakziniert worden war. Die Seroprävalenz der 802 ungeimpften Tiere betrug für den Subtyp H1N1 33,5 %, für H3N2 14,5 % und für H1N2 12,8 %. Die Seroinzidenz der ungeimpften Population verhielt sich wie folgt: H1N1: 13,2 %, H3N2: 5,6 % und H1N2: 2,7 %. Unter den 110 vakzinierten Tieren waren 70 % H1N1-positiv, 47,7 % der Tiere hatten Antikörper gegen H3N2 und 39,1 % reagierten positiv gegenüber H1N2-Stämmen. Die Auswertung der Inzidenzen (Inzidenzen sprechen im Falle geimpfter Tiere für nicht lange zurückliegende Impfungen) der geimpften Population ergab folgende Werte: 41,2 % für H1N1, 22,7 % für H3N2 und 7,2 % für H1N2.

Die Seroprävalenz für die 47 ungeimpften Betriebe für den Subtyp H1N1 betrug 34,0 %, für H3N2 6,4 % und für H1N2 8,5 %. Die Seroinzidenz der ungeimpften Betriebe verhielt sich wie folgt: H1N1: 4,3 % und H3N2: 2,1 %. Für die 13 vakzinierten Betriebe ergaben sich eine Seroprävalenz von 76,9 % (H1N1), 53,9 % (H3N2) und 30,8 % (H1N2). Die Inzidenzen der geimpften Betriebe betragen für H1N1 38,5 % und für H3N2 15,4 %. Weder die vakzinierten noch die nicht vakzinierten Betriebe wiesen eine aktuelle H1N2-Infektion auf. 31,5 % der seropositiven Betriebe hatten Antikörper gegen alle 3 Subtypen, während nur 14,4 % Antikörper gegen 2 verschiedene Subtypen und 21,6 % Antikörper gegen einen Subtypen aufwiesen.

Tab. 2 zeigt die Prävalenzen und Inzidenzen der einzelnen Subtypen auf Individual- und Bestandesebene jeweils getrennt nach geimpften und nicht geimpften Tieren. Von der Auswertung ausgeschlossen wurden Seren aus Betrieben mit unbekanntem Impfstatus sowie alle Proben,

bei denen keine Serumkontrolle durchgeführt wurde oder kein eindeutiges Ergebnis erzielt werden konnte. Es zeigte sich, daß mit Ausnahme des Stammes Bakum/5/95 die geimpften Tiere höhere Individualprävalenzen und mit Ausnahme der Stämme Bakum/5/95 und England/17394/96 die geimpften Tiere auch höhere Individualinzidenzen aufwiesen. Auf Betriebsebene waren diese Unterschiede nur bei einem Teil der Stämme ebenfalls nachweisbar.

Tab. 3 und 4 enthalten eine regionale Aufschlüsselung des untersuchten Probenmaterials der nicht geimpften Population, wobei die Seren aus dem Burgenland auf Grund der zu geringen und deshalb nicht repräsentativen Probenanzahl statistisch nicht ausgewertet wurden. Bei den geimpften Tieren, die nicht tabellarisch aufgearbeitet wurden, ließen sich weder auf Einzeltierebene noch auf Betriebsebene Unterschiede in den Prävalenzen und Inzidenzen zwischen den Bundesländern nachweisen. Bei den ungeimpften Tieren hingegen zeigten sich bei einzelnen Stämmen signifikante Unterschiede in der Individualprävalenz und -inzidenz.

Tab. 4 enthält Angaben über Bundesländergröße, Einzeltier- und Herdenzahl. In Tab. 5 wurde der Zusammenhang zwischen klinischer Symptomatik und den einzelnen Schweineinfluenza-Subtypen auf Betriebsebene dargestellt, wobei nur im Falle des Symptomenkomplexes Reproduktionsstörungen bei den nicht geimpften Betrieben eine Assoziation mit 2 Virusstämmen des Subtyps H1N1 (IDT/Re 230 und Bakum 3543/98 als Repräsentanten des häufigsten Antigentyps H1 I) erkennbar war. In beiden Fällen war unter den positiven Betrieben ein höherer Anteil an Betrieben mit Reproduktionsstörungen als unter den negativen Betrieben.

Diskussion

Die vorliegende Studie basiert hauptsächlich auf Untersuchungen in den österreichischen Bundesländern Oberösterreich, Niederösterreich und Steiermark. Diese Länder haben den größten Anteil an der Gesamtschweinepopulation Österreichs (siehe Tab. 4). Somit ist diese Studie repräsentativ für Österreich. Die Schweinedichte schwankt in diesen Bundesländern zwischen 52 und 96 Schweinen/km². Die Herdendichte beträgt hier ca. 1 Betrieb/km². Die Dichte der Schweinepopulation spielt für die Influenzaepidemiologie eine große Rolle, da sie für die Aufrechterhaltung von kontinuierlichen Infektionsketten entscheidend ist. Die in die Studie einbezogenen Bundesländer Österreichs haben somit eine Schweinepopulation mittlerer Größe im Vergleich zu den Regionen mit hoher Schweinedichte in Europa, wie z.B. Flandern in Belgien, Dänemark, und Weser-Ems-Region in Deutschland, wo regional 300 bis 1.300 Schweine/km² bei Betriebsdichten von 0,64 bis 2/km² konzentriert sind. Im Vergleich zu diesen Regionen verfügen die 3 Bundesländer Österreichs über eine mittlere Betriebsdichte, was auf geringe Tierbestände in den Einzelbetrieben schließen läßt.

Als Grundlage für die Untersuchungen wurde der Hämagglutinationshemmungstest gewählt. Dieser Test ermöglicht die Differenzierung der unterschiedlichen Subtypen des Schweineinfluenzavirus. Die gegenwärtig kommerziell erhältlichen ELISA-Testkits erlauben entweder nur den Nachweis des Subtyps H1N1 (IDEXX® Herdcheck SIV,

Tab. 2: Übersicht der Seroprävalenzen und Seroinzidenzen

Parameter	Anzahl untersuchter Seren oder Betriebe	Influenza A virus/swine/...																	
		H1N1					H3N2					H1N2							
		IDT/ Re 230	Bakum/ 3543/98	Potsdam/ 1/91	Bakum/ 5/95	IDT/ Re 220	Bakum/ 909/93	Scotland/ 410440/94	England/ 17394/96	Bakum/ 1832/00	IDT/ Re 230	Bakum/ 3543/98	Potsdam/ 1/91	Bakum/ 5/95	IDT/ Re 220	Bakum/ 909/93	Scotland/ 410440/94	England/ 17394/96	Bakum/ 1832/00
ungeimpfte Population																			
Individual- prävalenz	793	29,8 % ^a (235/790)	27,9 % ^a (220/789)	14,7 % ^a (116/789)	0,0 % (0/790)	9,3 % ^a (73/789)	14,0 % ^a (111/791)	9,4 % ^a (74/785)	5,9 % (47/793)	7,5 % ^a (59/791)	29,8 % ^c (14/47)	29,8 % (14/47)	10,6 % ^c (5/47)	0,0 % (0/47)	4,3 % ^a (2/47)	6,4 % ^a (3/47)	4,3 % (2/47)	2,1 % (1/47)	6,4 % (3/47)
Herden- prävalenz	47	12,8 % ^a (101/790)	12,8 % ^a (101/789)	4,6 % ^a (36/789)	0,0 % (0/790)	5,1 % ^a (40/789)	8,7 % ^a (69/791)	4,2 % ^c (33/785)	2,4 % (19/793)	2,9 % ^a (23/791)	12,8 % ^c (14/47)	12,8 % (14/47)	4,6 % ^a (36/789)	0,0 % (0/790)	5,1 % ^a (40/789)	8,7 % ^a (69/791)	4,2 % ^c (33/785)	2,4 % (19/793)	2,9 % ^a (23/791)
Individual- inzidenz	793	6,4 % ^a (3/47)	6,4 % (3/47)	2,1 % (1/47)	0,0 % (0/47)	2,1 % (1/47)	4,3 % (2/47)	0,0 % (0/47)	0,0 % (0/47)	0,0 % (0/47)	6,4 % ^a (3/47)	6,4 % (3/47)	2,1 % (1/47)	0,0 % (0/47)	2,1 % (1/47)	4,3 % (2/47)	0,0 % (0/47)	0,0 % (0/47)	0,0 % (0/47)
Herden- inzidenz	47	66,4 % ^b (71/107)	49,1 % ^b (52/106)	49,5 % ^b (53/107)	0,9 % (1/107)	44,4 % ^b (48/108)	48,6 % ^b (52/107)	33,6 % ^b (36/107)	19,0 % ^b (20/105)	31,1 % ^b (33/106)	66,4 % ^b (71/107)	49,1 % ^b (52/106)	49,5 % ^b (53/107)	0,9 % (1/107)	44,4 % ^b (48/108)	48,6 % ^b (52/107)	33,6 % ^b (36/107)	19,0 % ^b (20/105)	31,1 % ^b (33/106)
Individual- prävalenz	108	61,5 % ^d (8/13)	46,2 % ^b (6/13)	38,5 % (5/13)	0,0 % (0/13)	38,5 % ^b (5/13)	53,9 % ^b (7/13)	23,1 % (3/13)	7,7 % (1/13)	23,1 % (3/13)	61,5 % ^d (8/13)	46,2 % ^b (6/13)	38,5 % (5/13)	0,0 % (0/13)	38,5 % ^b (5/13)	53,9 % ^b (7/13)	23,1 % (3/13)	7,7 % (1/13)	23,1 % (3/13)
Herden- prävalenz	13	50,5 % ^b (54/107)	29,2 % ^b (31/106)	33,6 % ^b (36/107)	0,9 % (1/107)	29,6 % ^b (32/108)	31,8 % ^b (34/107)	9,3 % ^d (10/107)	2,9 % (3/105)	9,4 % ^b (10/106)	50,5 % ^b (54/107)	29,2 % ^b (31/106)	33,6 % ^b (36/107)	0,9 % (1/107)	29,6 % ^b (32/108)	31,8 % ^b (34/107)	9,3 % ^d (10/107)	2,9 % (3/105)	9,4 % ^b (10/106)
Individual- inzidenz	108	38,5 % ^b (5/13)	7,7 % (1/13)	15,4 % (2/13)	0,0 % (0/13)	15,4 % (2/13)	15,4 % (2/13)	0,0 % (0/13)	0,0 % (0/13)	0,0 % (0/13)	38,5 % ^b (5/13)	7,7 % (1/13)	15,4 % (2/13)	0,0 % (0/13)	15,4 % (2/13)	15,4 % (2/13)	0,0 % (0/13)	0,0 % (0/13)	0,0 % (0/13)
Herden- inzidenz	13	in Klammern Anzahl positiver / Anzahl auswertbarer Proben (Individualbasis) bzw. Bestände (Herdenbasis); ^{a, b} unterschiedlich gekennzeichnete Werte unterscheiden sich mit p < 0,01; ^{c, d} unterschiedlich gekennzeichnete Werte unterscheiden sich mit p < 0,05																	

Tab. 3: Übersicht der Seroprävalenzen und Seroinzidenzen der ungeimpften Schweinepopulationen der untersuchten Bundesländer

Parameter	Anzahl untersuchter Serien oder Betriebe	Influenza A virus/swine/...											
		H1N1					H3N2					H1N2	
		IDT/ Re 230	Bakum/ 3543/98	Potsdam/ 1/91	Bakum/ 5/95	IDT/ Re 220	Bakum/ 909/93	Scotland/ 410440/94	England/ 17394/96	Bakum/ 1832/00			
Oberösterreich													
Individual- prävalenz	188	34,6 % (64/185)	26,3 % (49/186)	24,3 % ^a (45/185)	0,0 % (0/188)	17,8 % ^a (33/185)	22,7 % ^a (42/185)	8,7 % (16/182)	7,5 % (14/187)	11,4 % (21/185)			
Herden- prävalenz	16	31,3 % (5/16)	25,0 % (4/16)	18,8 % (3/16)	0,0 % (0/16)	6,3 % (1/16)	12,5 % (2/16)	6,3 % (1/16)	6,3 % (1/16)	6,3 % (1/16)			
Individual- inzidenz	188	16,8 % ^b (31/185)	11,3 % (21/186)	8,6 % ^a (16/185)	0,0 % (0/188)	8,1 % (15/185)	13,0 % ^a (24/185)	3,8 % (7/182)	2,7 % (5/187)	2,7 % (5/185)			
Herden- inzidenz	16	12,5 % (2/16)	6,3 % (1/16)	0,0 % (0/16)	0,0 % (0/16)	0,0 % (0/16)	6,3 % (1/16)	0,0 % (0/16)	0,0 % (0/16)	0,0 % (0/16)			
Niederösterreich													
Individual- prävalenz	73	19,7 % (14/71)	22,2 % (16/72)	5,7 % ^b (4/70)	0,0 % (0/73)	5,6 % ^b (4/71)	9,7 % ^b (7/72)	5,7 % (4/70)	2,8 % (2/71)	1,4 % (1/72)			
Herden- prävalenz	7	28,6 % (2/7)	28,6 % (2/7)	14,3 % (1/7)	0,0 % (0/7)	0,0 % (0/7)	0,0 % (0/7)	0,0 % (0/7)	0,0 % (0/7)	14,3 % (1/7)			
Individual- inzidenz	73	2,8 % ^a (2/71)	11,1 % (8/72)	0,0 % ^b (0/70)	0,0 % (0/73)	1,4 % (1/71)	5,6 % ^b (4/72)	7,1 % (5/70)	1,4 % (1/71)	0,0 % (0/72)			
Herden- inzidenz	7	0,0 % (0/7)	14,3 % (1/7)	0,0 % (0/7)	0,0 % (0/7)	0,0 % (0/7)	0,0 % (0/7)	0,0 % (0/7)	0,0 % (0/7)	0,0 % (0/7)			
Steiermark													
Individual- prävalenz	532	9,8 % (157/526)	29,3 % (153/522)	12,8 % ^b (67/525)	0,0 % (0/532)	6,9 % ^b (36/524)	11,8 % ^b (62/525)	10,3 % (54/523)	5,9 % (31/526)	7,0 % (37/525)			
Herden- prävalenz	23	30,4 % (7/23)	34,8 % (8/23)	4,3 % (1/23)	0,0 % (0/23)	4,3 % (1/23)	4,3 % (1/23)	4,3 % (1/23)	0,0 % (0/23)	4,3 % (1/23)			
Individual- inzidenz	532	12,9 % ^b (68/526)	13,8 % (72/522)	3,8 % ^b (20/525)	0,0 % (0/532)	4,6 % (24/524)	7,8 % ^b (41/525)	4,0 % (21/523)	2,5 % (13/526)	3,2 % (17/525)			
Herden- inzidenz	23	4,3 % (1/23)	4,3 % (1/23)	4,3 % (1/23)	0,0 % (0/23)	4,3 % (1/23)	4,3 % (1/23)	0,0 % (0/23)	0,0 % (0/23)	0,0 % (0/23)			

^{a, b} unterschiedlich gekennzeichnete Werte unterscheiden sich mit $p < 0,01$

Tab. 4: Schweinebestände der österreichischen Bundesländer im Untersuchungszeitraum 2002/2003¹

Bundesland	Fläche (km ²)	Anzahl Schweine	Anzahl Betriebe	Schweine/km ²	Betriebe/km ²
2002 (Österreich total: 3.304.405 Schweine, 68.794 Halter von Schweinen)					
Oberösterreich	11.979	1.149.653	15.418	95,97	1,29
Niederösterreich	19.171	922.975	15.084	48,14	0,79
Steiermark	16.387	891.763	19.338	54,42	1,18
Kärnten	9.533	200.082	8.183	20,99	0,86
Burgenland	3.966	79.743	2.509	20,11	0,63
Salzburg	7.154	16.402	2.409	2,29	0,34
Tirol	12.647	30.342	4.944	2,40	0,39
Vorarlberg	2.601	13.286	896	5,11	0,34
Wien	415	404	13	0,97	0,03
2003 (Österreich total: 3.244.866 Schweine, 63.358 Halter von Schweinen)					
Oberösterreich	11.979	1.153.350	14.444	96,28	1,21
Niederösterreich	19.171	923.482	14.142	48,17	0,74
Steiermark	16.387	863.130	16.793	52,67	1,03
Kärnten	9.533	165.778	7.648	17,39	0,80
Burgenland	3.966	83.250	2.090	20,99	0,53
Salzburg	7.154	16.137	2.620	2,26	0,37
Tirol	12.647	24.509	4.715	1,94	0,37
Vorarlberg	2.601	15.029	897	5,78	0,35
Wien	415	201	9	0,48	0,02

¹Bundesanstalt Statistik Austria

Tab. 5: Beziehung zwischen klinischer Symptomatik und den einzelnen Schweineinfluenza-Subtypen

Klinische Symptomatik	Anzahl der Betriebe	Anzahl Betriebe mit akuter Infektion	Influenza A virus/swine/...										
			H1N1					H3N2					H1N2
			IDT/ Re 230	Bakum/ 354/98	Potsdam/ 1/91	Bakum/ 5/95	IDT/ Re 220	Bakum/ 909/93	Scotland/ 410440/94	England/ 17394/96	Bakum/ 1632/00		
nicht geimpfte Population													
keine klinischen Symptome	30	0	0,0 % ¹	0,0 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %
kümmern	11	1	0,042 ²	0,042	0,362	0,0 %	0,362	0,0 %	0,362	0,126	0,0 %	0,0 %	0,0 %
Reproduktionsstörungen	5	2	0,560	0,560	0,234	0,0 %	0,234	0,0 %	0,234	0,417	0,0 %	0,0 %	0,0 %
länger zurückliegende resp. Erkrankung	4	0	40,0 %	40,0 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %	20,0 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %
akute respiratorische Erkrankung	1	0	0,027	0,027	1,000	0,0 %	1,000	0,0 %	1,000	0,204	0,0 %	0,0 %	0,0 %
			0,0 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %
			1,000	1,000	1,000	0,0 %	1,000	0,0 %	1,000	1,000	0,0 %	0,0 %	0,0 %
			0,0 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %
			1,000	1,000	1,000	0,0 %	1,000	0,0 %	1,000	1,000	0,0 %	0,0 %	0,0 %
geimpfte Population													
keine klinischen Symptome	8	2	25,0 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %
kümmern	0	0	0,293	0,385	0,128	0,0 %	0,128	0,0 %	0,128	0,128	0,0 %	0,0 %	0,0 %
Reproduktionsstörungen	3	1	33,3 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %
länger zurückliegende resp. Erkrankung	1	0	1,000	1,000	1,000	0,0 %	1,000	0,0 %	1,000	1,000	0,0 %	0,0 %	0,0 %
akute resp. Erkrankung	1	1	100,0 %	100,0 %	100,0 %	0,0 %	100,0 %	0,0 %	100,0 %	100,0 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %
			0,385	0,770	0,154	0,0 %	0,154	0,0 %	0,154	0,154	0,0 %	0,0 %	0,0 %

¹ (Virusstamm-) Inzidenz unter den Betrieben mit klinischen Symptomen; ² Irrtumswahrscheinlichkeit für die Aussage, daß ein Zusammenhang zwischen klinischer Symptomatik und Antikörpertiter besteht; fehlende p-Werte ergeben sich aus fehlender Varianz in den (Inzidenz-) Titern.

Fa. IDEXX, Wörrstadt, Deutschland) oder die Bestimmung von H1N1 und H3N2 (Biovet® Swinecheck, Fa. Biovet, Quebec, Canada). Kommerzielle ELISA-Testsysteme ermöglichen jedoch noch nicht die Detektion von H1N2, was ein großes diagnostisches Problem darstellt. Die Hämagglutinationsinhibition oder Hämagglutinationshemmungsreaktion ermöglicht ein schnelles Reagieren auf evolutionäre Veränderungen, wenn neue Stämme vorliegen, da der Testvorgang unabhängig vom Stamm gleich ist. Für den Influenza-Nachweis in österreichischen Betrieben lag es daher nahe, auf die Hämagglutinationsinhibition zurückzugreifen und diese Methode bevorzugt einzusetzen. Bei der Interpretation der Ergebnisse ist allerdings eine gewisse Erfahrung nötig. Obwohl der Subtyp H1N12 auch das Hämagglutinin 1 (H1) enthält, zeigt er keine oder nur schwache Kreuzreaktivitäten mit H1N1-Stämmen. Dies ist auf die große Variabilität des Subtyps H1N1 zurückzuführen, bei dem inzwischen diverse Antigentypen unterschieden werden müssen. Der am häufigsten vorkommende Antigentyp (hier als Antigentyp H1 I bezeichnet, siehe Tab. 1) wird in den vorliegenden Untersuchungen durch die Stämme A/swine/ Bakum/3543/98, Potsdam/1/81 und IDT/Re 230 vertreten. Der Subtyp Bakum/5/95, welcher Mitte der 1990er Jahre in Nordwestdeutschland hohe Prävalenz zeigte (SCHENK, 1999), reagiert dagegen zum erstgenannten Antigentyp H1 I nicht kreuzreaktiv in der HAH und muß als eigenständiger Antigentyp (H1 II) betrachtet werden. Dieser Antigentyp spielt gegenwärtig in Deutschland keine Rolle mehr (WIECZOREK et al., 2003). Der Subtyp H1N2 nimmt insofern eine Sonderstellung ein, als er zumit den meisten H1N1-Stämmen nicht kreuzreagiert, jedoch schwach mit älteren Stämmen, insbesondere den älteren Impfstämmen kreuzreagieren kann. Auch scheinen noch ca. ein Drittel der zirkulierenden Stämme vom Antigentyp Bakum/3543/98 mit dem H1N2 schwach kreuzzureagieren (WIECZOREK et al., 2003). Auch REETH et al. (2002, 2003a, 2003b, 2004) dokumentierten schwache Kreuzreaktionen gegenüber dem Subtyp H1N2. Ungeachtet der schwachen Kreuzreaktionen mit einzelnen Stämmen anderer Subtypen muß der neue Subtyp H1N2 als eigenständiger H1 Antigentyp betrachtet werden (H1 III). Noch komplizierter wird die Bewertung durch die schwächere Replikation des Subtyps H1N2 bei Simultaninfektionen mit H3N2 und H1N1 (DÜRRWALD et al., 2004b), nach welchen die Serokonversion des Subtyps H1N2 wegen der verkürzten Replikationszeit nur schwach ist und denen von Kreuzreaktionen gleicht, obwohl sie keine ist. Auch REETH et al. (2002, 2003a, 2003b, 2004) dokumentierten schwache Kreuzreaktionen gegenüber dem Subtyp H1N2. Ungeachtet der schwachen Kreuzreaktionen mit einzelnen Stämmen anderer Subtypen muß der neue Subtyp H1N2 als eigenständiger H1 Antigentyp betrachtet werden (H1 III).

In den in Österreich zugelassenen Vakzinen sind die Subtypen H1N1 und H3N2, jedoch nicht H1N2 enthalten. Trotzdem waren 39,1 % der Tiere H1N2-positiv, hatten jedoch niedrigere Antikörpertiter als gegen die anderen beiden Subtypen. Dadurch wurde die erwähnte Kreuzreaktivität bestätigt. Studien von REETH et al. (2003b) zeigten, daß H1N1+H3N2-Vakzinen durchaus eine gewisse Kreuzimmunintät gegenüber H1N2 bewirken, welche aber keinen vollständigen immunologischen Schutz gibt. In den

durchgeführten Challenge-Versuchen wurde nachgewiesen, daß Tiere, die eine mit H1N2 supplementierte Vakzine erhielten und 3 Wochen später mit dem H1N2-Feldvirus intratracheal infiziert wurden, weder klinische Symptome aufwiesen noch eine Virusreplikation im Trachealgewebe stattfand. Im Gegensatz hierzu zeigten die mit der herkömmlichen Vakzine (H1N1+H3N2) vakzinieren Schweine, nachdem sie dem H1N2-Feldvirus ausgesetzt waren, klinische Symptome und eine, wenn auch geringere, Virusreplikation im Zielgewebe.

Der tatsächlich entstandene Antikörperspiegel, der durch die applizierten Vakzinen induziert wurde, ist am Vergleich der Prävalenzen und Inzidenzen der ungeimpften mit der geimpften Population abzuschätzen. Bei der Analyse der Antikörpertiter in der vorliegenden Studie hatten die geimpften Tiere Titer gegenüber den H1N1- (außer Bakum/5/95) und H3N2-Stämmen, worin sich der relativ gute Impfschutz widerspiegelt, den die kommerziell erhältlichen Vakzinen gegen diese beiden Subtypen noch bieten. Da aber in Zukunft durchaus mit einem vermehrten Auftreten des neuen Subtyps H1N2 zu rechnen ist, wird es erforderlich sein, zukünftige Impfstoffe gegen Influenza für Schweine mit diesem Subtypen zu supplementieren.

Die in der Studie eingesetzten Vakzinestämme IDT/Re 220 (H3N2) und IDT/Re 230 (H1N1) aus Deutschland erfaßten die prävalenten Influenzavirusinfektionen der korrespondierenden Antigentypen sehr gut, woraus geschlossen werden kann, daß die Stämme auch für den Einsatz in Österreich geeignet sind.

Die Untersuchungsergebnisse demonstrieren, daß der Subtyp H1N1 in Österreich von weitaus größerer Bedeutung ist als der Subtyp H3N2. In einigen anderen europäischen Ländern wie Belgien, Frankreich, Italien, Deutschland und Großbritannien zirkulieren alle 3 Subtypen gleichzeitig. Seroprävalenzstudien von LABARQUE et al. (2004b) zeigten in Belgien eine sehr hohe Durchseuchungsrate sowie eine verhältnismäßig ausgewogene Verteilung von H1N1 (89,3 %), H3N2 (65,3 %) und H1N2 (52,7 %). Der Subtyp H1N1 überwiegt in Deutschland in Gebieten mit geringerer bis mittlerer Schweinedichte (WIECZOREK et al., 2003). In Gebieten mit hoher Schweinedichte wechseln sich Infektionszüge mit dem Subtyp H3N2 und dem Subtyp H1N1 etwa halbjährlich ab, wobei der neue Subtyp H1N2 zunehmend in diese Zyklen integriert wird und häufiger im H1N1-Zyklus nachzuweisen ist (DÜRRWALD et al., 2004c). Die Situation in Österreich entspricht somit der in den Regionen geringer und mittlerer Schweinedichte Deutschlands mit einer Dominanz des Subtyps H1N1 und gelegentlichen Infektionen mit dem Subtyp H3N2 bei bisher nur sporadischem Auftreten des neuen Subtyps H1N2.

Betrachtet man die regionale Verteilung der Individualprävalenz und -inzidenz der ungeimpften Tiere, zeigten sich bei einzelnen Stämmen signifikante Unterschiede. Oberösterreich wies im Vergleich mit Niederösterreich und der Steiermark signifikant höhere Prävalenzen der Stämme Potsdam/1/91, IDT/Re 220 und Bakum/909/93 sowie höhere Inzidenzen der Stämme IDT/Re 230, Potsdam/1/91 und Bakum/909/93 auf. Bei Betrachtung auf Betriebsebene beziehungsweise bei der Analyse der geimpften Population ergaben sich keine Unterschiede.

In Österreich konnte im Zuge dieser Arbeit erstmals der

neue FLUAV/sw-Subtyp H1N2 nachgewiesen werden. Allerdings handelt es sich bei den beiden sicheren Nachweisen nur um Einzeltierbefunde, die vermutlich darauf zurückzuführen sind, daß maternale Antikörper von den Muttersauen an die Ferkel weitergegeben wurden. Da in beiden Fällen keine Antikörper gegen die anderen beiden Subtypen vorlagen, ist dieser Nachweis sicher und nicht auf Kreuzreaktivitäten zurückzuführen. Es handelte sich jedoch in beiden Betrieben nicht um aktuelle Infektionsschübe. Entweder hatten die Muttersauen eine zurückliegende Infektion mit dem Subtyp H1N2 in Österreich oder sie wurden importiert. Der Subtyp H1N2 hat sich somit in Österreich noch nicht stabilisiert, jedoch ist mit seinem Import und gelegentlichem Auftreten zu rechnen.

Die Prototypen der H1N2-Stämme, wie zum Beispiel der Stamm A/sw/Scotland/410440/94 wurden von MAROZIN et al. (2002) als evolutionäre Zwischenstufe in der Evolution früherer, in der humanen Population zirkulierender H1-Gene zu den jetzt in den Schweinepopulation zirkulierenden interpretiert, wobei die evolutionäre Entwicklung des neuen Subtyps H1N2 in Kontinentaleuropa noch weiterer Untersuchungen bedarf. MAROZIN et al. (2002) konnten nachweisen, daß die für N2 kodierenden Gene der H1N2-Stämme mit denen britischer H3N2-Stämme verwandt sind und unterschiedlich zu denen kontinentaler H3N2-Stämme, wohingegen bei den H1-Genen inzwischen ein Reassortment mit in Frankreich zirkulierenden H1N1-Stämmen nach mehrfachem Eintrag der britischen H1N2-Stämme in Frankreich stattgefunden hat, woraus eine größere Heterogenität bei den H1N2-Stämmen resultiert. In den Vereinigten Staaten von Amerika vollzog sich während des letzten Jahrzehnts ein Wechsel von einer stabilen H1N1-Endemie zu einer genetischen und antigenetischen heterogenen Koexistenz aller 3 Subtypen mit einer sehr großen Variabilität von Stämmen (WEBBY et al., 2004). Teilweise konnten sehr auffällige Variationen des Reassortments zwischen porcinen und aviären Subtypen festgestellt werden, was die genetische und antigenetische Bandbreite der Influenzaviren eminent vergrößern könnte (OLSEN et al., 2003). Die Problematik des Reassortments zwischen porcinen und aviären Subtypen belastete während der letzten Jahre hauptsächlich den asiatischen Raum. Im Zuge einer großräumigen Seroprävalenzstudie in China wurde in den Schweinebeständen eine hohe Durchseuchungsrate mit H1- und H3-, aber auch mit anderen Subtypen festgestellt (LI et al., 2003). Gerade während des letzten Jahres gaben Berichte über ein Überspringen von aviären Stämmen auf Schweine Anlaß zur Sorge, die jedoch dementiert wurden. Die Gefahr, die in epidemiologischer Hinsicht von der Vogelgrippe für die Spezies Schwein und damit auch für den Menschen ausgeht, sollte jedoch nicht unterschätzt werden.

Interessant sind die Ergebnisse der Analyse der klinischen Parameter, bei der sich nur signifikante Beziehungen zwischen Reproduktionsstörungen und aktuellen Infektionen des am häufigsten in Österreich vorkommenden Subtyps H1N1 sichern ließen, dagegen keine Assoziationen mit respiratorischen Erscheinungen. Dies könnte dafür sprechen, daß die in der Literatur beschriebene chronische Verlaufsform gegenwärtig in Österreich von größerer Bedeutung ist. Entweder wurden die initialen respiratorischen Symptome der Infektion in den

Betrieben nicht bemerkt oder die Infektionen verliefen in Bezug auf respiratorische Symptome inapparent. Dagegen ließen sich bei geimpften Tieren keinerlei Beziehungen zwischen klinischen Symptomen und Antikörpertitern gegen Influenzaviren sichern, ein Zeichen dafür, daß der Impfschutz mit den eingesetzten Vakzinen gegeben ist und daß die dabei ermittelten H1N2-Antikörpertiter tatsächlich kreuzreaktiver Natur sind.

Eine genaue Beobachtung der evolutionären Entwicklung der Schweineinfluenzaviren wird nicht nur für die Schweinepopulation selbst, sondern wegen des zoonotischen Potentials auch für die Gesundheitssicherung der menschlichen Bevölkerung weiterhin von Bedeutung sein. Dabei wird das Auftreten des neuen, antigenetisch von den bisher zirkulierenden porcinen H1N1-Stämmen abweichenden Subtyps H1N2 für die Influenza-Diagnostik und -Prophylaxe zukünftig auch in Österreich eine wichtige Rolle spielen.

Danksagung

Die Autoren danken Herrn PD Dr. Süss, Friedrich-Loeffler-Institut Insel Riems, Standort Jena, Frau Dr. Schrader, Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin, und Frau Prof. Dr. Kristien van Reeth, Universität Gent für die Bereitstellung von Influenzavirusfeldstämmen und Frau Kerstin Wiczorek, Frau Roswitha Ulrich, Frau Dorit Appl und Frau Katrin Schulz, Forschungslabor Virologie, Bereich Forschung und Entwicklung, Impfstoffwerk Dessau-Tornau GmbH für hervorragende labortechnische Assistenz.

Christiane Lang bedankt sich beim Büro des Studiendekans der Veterinärmedizinischen Universität Wien für die Gewährung eines Leistungsstipendiums zur Durchführung ihrer Dissertation.

Literatur

- BORTZ, J., LIENERT, G.A. (1998): Kurzgefaßte Statistik für die klinische Forschung. Ein praktischer Leitfaden für die Analyse kleiner Stichproben. Springer, Berlin, p. 72-75.
- BROSIUS, G., BROSIUS, F. (1995): SPSS base system and professional statistics. Thomson Publishing, Bonn, p. 372.
- BROWN, I.H., CHAKRAVERTY, P., HARRIS, P.A., ALEXANDER, D.J. (1995): Disease outbreaks in pigs in Great Britain due to an influenza A virus of H1N2 subtype. *Vet. Rec.* **136**, 328-329.
- BUNDESANSTALT STATISTIK AUSTRIA: Viehbestand am 1. 12. 2002, statistische Nachrichten 5/2003, S. 381; Viehbestand am 1. 12. 2003, Statistische Nachrichten 7/2004, S. 631.
- CHOI, Y.K., GOYAL, S.M., JOO, H.S. (2002): Prevalence of swine influenza virus subtypes on swine farms in the United States. *Arch. Virol.* **147**, 1209-1220.
- CHOI, Y.K., GOYAL, S.M., JOO, H.S. (2004): Evaluation of transmission of swine influenza type A subtype H1N2 virus in seropositive pigs. *Am. J. Vet. Res.* **65**, 303-306.
- DEE, S.A. (1995): Viral causes of porcine reproductive failure - part I. *Comp. Cont. Education Pract. Vet.* **17**, 962-972.
- DÜRRWALD, R., SELBITZ, H.-J. (2002): Swine influenza control by vaccination. *Pig Progress Respiratory Diseases* **VI**, 11-14.
- DÜRRWALD, R., HERWIG, V., WIECZOREK K., ULRICH, R., APPL, D., SCHULZ, K. (2004a): Diagnosis of swine influenza. (persönl. Mitteilung)
- DÜRRWALD, R., HERWIG, V., WIECZOREK K., ULRICH, R., APPL, D., SCHULZ, K. (2004b): Simultaneous experimental challenge with three subtypes of swine influenza A virus. (persönl. Mitteilung)
- DÜRRWALD, R., HERWIG, V., WIECZOREK K., ULRICH, R., APPL, D., SCHULZ, K. (2004c): Initiation of a surveillance programme for swine influenza in Germany. (persönl. Mitteilung)

- EASTERDAY, B.C., HINSHAW, V.S. (1992): Swine influenza. In: LEMAN A.D., STRAW, B.E., MENGELING, W.L., D'ALLAIRE, S.D., TAYLOR, D.J.Jr. (eds.): Diseases of swine. Iowa State Press, p. 349-357.
- GOURREAU, J.M., KAISER, C., VALETTE, M., DOUGLAS, A.R., LABIE, J., AYMARD, M. (1994): Isolation of two H1N2 influenza viruses from swine in France. *Arch. Virol.* **135**, 365-382.
- LABARQUE, G., BARBÉ, F., PENSAERT, M., REETH, K. van (2004a): Maternal immunity to H1N1 and H3N2 swine influenza viruses fails to protect against the novel H1N2 subtype. Proc. 18th IPVS Congress, Hamburg, p. 83.
- LABARQUE, G., VYT, P., REETH, K. van, PENSAERT, M. (2004b): Seroprevalence of different swine influenza virus subtypes in swine in Belgium in 2001 – 2003. Proc. 18th IPVS Congress, Hamburg, p. 84.
- LABURN, H.P., FAURIE, A., MITCHELL, D. (2003): The fetus and fever. *J. Therm. Biol.* **28**, 107-116.
- LI, H., XIN, X., YANG, H., LI, Y., QIN, Y., XUEHUI, C., CHEN, H., YU, K., BI, Y., TONG, G. (2003): Serological and virological surveillance for swine influenza virus infections among pigs over large areas in China in 1998 - 2002. Proc. 4th International Symposium of Emerging and Re-emerging Pig Diseases, Rome, p. 259-260.
- MAROZIN, S., GREGORY, V., CAMERON, K., BENNETT, M., VALETTE, M., AYMARD, M., FONI, E., BARIGAZZI, G., LINY., HAY, A. (2002): Antigenic and genetic diversity among swine influenza A H1N1 and H1N2 viruses in Europe. *J. Gen. Virol.* **83**, 735-745.
- OLSEN, C.W. (2002): The emergence of novel swine influenza viruses in North America. *Vir. Res.* **85**, 199-210.
- OLSEN, C.W., KARASIN, A., ERICKSON, G. (2003): Characterization of a swine-like reassortant H1N2 influenza virus isolated from a wild duck in the United States. *Vir. Res.* **93**, 115-121.
- REETH, K. van (2001): A new look at swine influenza in Europe. Proc. 2001 A. D. Leman Swine Conference, Minneapolis, USA Sept. 2001, p. 32-40.
- REETH, K. van, BROWN, I.H., PENSAERT, M. (2000): Isolations of H1N2 influenza A virus from pigs in Belgium. *Vet. Rec.* **146**, 588-589.
- REETH, K. van, BROWN, I., ESSEN, S., PENSAERT, M. (2004): Genetic relationships, serological cross-reaction and cross-protection between H1N2 and other influenza A virus subtypes endemic in European pigs. *Vir. Res.* **103**, 115-124.
- REETH, K. van, GREGORY, V., HAY, A., PENSAERT, M. (2002): Protection against a European H1N2 swine influenza virus in pigs previously infected with H1N1 and/or H3N2 subtypes. *Vaccine* **21**, 1375-1381.
- REETH, K. van, GUCHT, S. van, PENSAERT, M. (2003a): Investigations of the efficacy of European H1N1- and H3N2-based swine influenza vaccines against the novel H1N2 subtype. *Vet. Rec.* **153**, 9-13.
- REETH, K. van, LABARQUE, G., PENSAERT, M. (2003b): The establishment of an H1N2 influenza virus in the European swine population and its impact on prevention and control. Proc. 4th International Symposium of Emerging and Re-emerging Pig Diseases, Rome, p. 250-253.
- REGENMORTEL, M.H.V. van, FAUQUET, C.M., BISHOP, D.H.L., CARSTENS, E.B., ESTES, M.K., LEMON, S.M., MANILOFF, J., MAYO, M.A., MCGEOCH, D.J., PRINGLE, C.R., WICKNER, R.B. (2000): Virus taxonomy. Classification and nomenclature of viruses. 7th Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Academic Press, San Diego.
- SCHENK, L.-P. (1999): Seroepidemiologische Untersuchungen zu Influenzavirusinfektionen in den Schweinebeständen Deutschlands am Beispiel Niedersachsens. *Vet.-med. Diss.*, FU Berlin.
- SCHRADER, C., SÜSS, J. (2002): Genetic characterization of a porcine H1N2 influenza virus strain isolated in Germany. *Inter-virology* **46**, 66-70.
- WALLACE, G.D., ELM, J.L. (1979): Transplacental transmission and neonatal infection with swine influenza virus (Hsw1N1) in swine. *Am. J. Vet. Res.* **40**, 1169-1172.
- WEBBY, R.J., ROSSOW, K., ERICKSON, G., SIMS, Y., WEBSTER, R. (2004): Multiple lineages of antigenically and genetically diverse influenza A virus co-circulate in the United States swine population. *Vir. Res.* **103**, 67-73.
- WIECZOREK, K., ULRICH, R., WENNING, D., HERWIG, V., DÜRRWALD, R. (2003): Zwischenauswertung des IDT-Diagnostikprogrammes zur Überwachung der Schweineinfluenza in Deutschland. (persönl. Mitteilung)

Anschrift der Verfasser:

Dipl. Tzt. Christiane Lang, Dr. Wolfgang Sipos, Univ. Prof. Dr. Maximilian Schuh, Dr. Friedrich Schmoll, Univ. Prof. Dr. Irene Sommerfeld-Stur, Veterinärplatz 1, A-1210 Wien. Dr. Ralf Dürrwald, Dr. Volker Herwig, Streetzer Weg 15a, D-06862 Rodleben, Deutschland.

e-mail: ralf.duerrwald@idt-direct.de

e-mail: Friedrich.Schmoll@vu-wien.ac.at