

UMWELT UND GESUNDHEIT

03/2024

Abschlussbericht

# Entwicklung eines Nachweisverfahrens für (Vogel) Grippeviren in der Umwelt

von:

Ann Kathrin Ahrens, Prof. Dr. Timm C. Harder, PhD  
Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit, Greifswald – Insel Riems

Herausgeber:

Umweltbundesamt



UMWELT UND GESUNDHEIT 03/2024

Ressortforschungsplan des Bundesministeriums für  
Umwelt, Naturschutz, nukleare Sicherheit und  
Verbraucherschutz

Forschungskennzahl 3718 62 236 0  
FB001496

Abschlussbericht

## **Entwicklung eines Nachweisverfahrens für (Vogel) Grippeviren in der Umwelt**

von

Ann Kathrin Ahrens, Prof. Dr. Timm C. Harder, PhD  
Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für  
Tiergesundheit, Greifswald – Insel Riems

Im Auftrag des Umweltbundesamtes

## **Impressum**

### **Herausgeber**

Umweltbundesamt  
Wörlitzer Platz 1  
06844 Dessau-Roßlau  
Tel: +49 340-2103-0  
Fax: +49 340-2103-2285  
[buergerservice@uba.de](mailto:buergerservice@uba.de)  
Internet: [www.umweltbundesamt.de](http://www.umweltbundesamt.de)

### **Durchführung der Studie:**

Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit  
Südufer 10  
17493 Greifswald – Insel Riems

### **Abschlussdatum:**

September 2022

### **Redaktion:**

Fachgebiet II 1.4 Mikrobiologische Risiken  
PD Dr. Hans-Christoph Selinka

Publikationen als pdf:

<http://www.umweltbundesamt.de/publikationen>

ISSN 1868-4340

Dessau-Roßlau, Oktober 2024

Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt bei den Autorinnen und Autoren.

### **Kurzbeschreibung: Entwicklung eines Nachweisverfahrens für (Vogel) Grippeviren in der Umwelt**

Das aviäre Influenzavirus (AIV), dessen natürliches Reservoir wildlebende aquatische Vögel darstellen, stellt insbesondere für die kommerzielle Geflügelhaltung ein Risiko dar, gefährdet aber in seiner hochpathogenen Form auch Populationen geschützter Wildvogelarten und birgt ein zoonotisches Potential für den Menschen.

Im Rahmen des vorliegenden Projektes, sollte eine Methodik etabliert und hinsichtlich des Potentials zur Anreicherung von AIV aus Oberflächenwasser validiert werden. Darüber hinaus sollte der Einfluss der unterschiedlichen abiotischen Effekte (Wassertemperatur und Wasserqualität) sowie der Zeit auf unterschiedliche AIV-Isolate untersucht werden, um die Virustenazität unterschiedlicher Isolate in dieser Matrix zu untersuchen. Des Weiteren sollte der Effekt von Wasser als Transmissionsmedium innerhalb einer Tierpopulation experimentell untersucht werden und die minimale Infektionsdosis pro Liter ermittelt werden.

Virusanreicherungen wurden mit einem hier optimierten Ultrafiltrationsverfahren (Rexeed™-25-A) durchgeführt. Die Entwicklung eines Referenzstandards für die Detektion behüllter RNA Viren in Wasserproben basierend auf dem Bacteriophagen  $\phi 6$  erleichterte Validierungsuntersuchungen erheblich. Der AIV-Nachweis wurde mittels RT-PCR in Echtzeit und durch Virusisolierung versucht. Während die Validierungsläufe eine durchschnittliche Anreicherung um das 60-fache ergaben, wurden bei Feldwasserproben niedrigere Werte (10-15fach) beobachtet. Insgesamt wurden 25/36 (61 %) der Wasserproben und 18/36 (50 %) der korrespondierenden Gewässersedimentproben, die während einer HPAIV-Epidemie aus flachen Gewässern in avifaunistisch reichen Wasservogelhabitaten entnommen wurden, AIV-positiv getestet. Die in diesen Proben gefundenen AIV-Viruslasten waren jedoch im Allgemeinen zu gering für eine Virusisolierung oder eine weitere Sub- und Pathotypisierung, wie dies auch bei anderen Umweltproben, z. B. abgelagerter Vogelkot, der Fall war. Darüber hinaus spiegelte das durch diese aktiven Überwachungsmethoden nachgewiesene Virusspektrum nicht vollständig eine laufende HPAIV-Epidemie unter anseriformen Wildvögeln wider, wie sie durch die parallellaufende passive Überwachung mit einer Untersuchung von Vogelkadavern festgestellt wurde. Das passive Monitoring bleibt somit im Vergleich zur Untersuchung von Umweltproben in der Sensitivität und Spezifität unübertroffen.

Weiterhin wurde die Bedeutung kleiner flacher Gewässer als Übertragungsmedium von AIV unter Stockenten untersucht. In Gruppen mit Zugang zu einem 100-Liter-Wasserbecken wurde ein verzögerter Beginn, aber rascher Verlauf einer experimentell induzierten AIV Infektion beobachtet, die von zwei mit LP- oder HP-AIV inokulierten Stockenten auf jeweils acht Sentinelstockenten übertragen wurde. Im Gegensatz dazu zeigten Gruppen mit einer Nippränke, wie sie in kommerziellen Entenhaltungen anzutreffen ist, einen schnellen Beginn, aber längeren Verlauf der Infektion. Hochpathogene AIV-Infektionen konnten auch durch im Wasser resuspendiertes Virus ausgelöst werden, wobei geringste Titer von nur  $10^2$  infektiösen Einheiten je Liter Wasser sich als ausreichend erwiesen.

Insgesamt machten die Untersuchungen die hohe Bedeutung von Wasser als Transmissionsmedium aviärer Influenzainfektionen bei Vögeln deutlich. Kleinste Mengen viraler Infektiosität in Wasser können Ketten produktiver Infektionen von Wasservögeln begründen. Risiken für zoonotische AIV Infektionen des Menschen durch Kontakt mit solchen Wasserproben sind bei den hier nachgewiesenen geringen Viruslasten vermutlich vernachlässigbar. Die speziesübergreifende Übertragung von AIV von Vögeln auf den Menschen erforderte (bislang) sehr hohe Viruslasten, die in den untersuchten Feldproben nicht erreicht wurden.

**Abstract: Development of a detection method for (avian) influenza viruses in the environment**

The avian influenza virus (AIV), whose natural reservoir resides in populations of wild aquatic birds, poses a risk especially for commercial poultry farming, but in its highly pathogenic form (HPAIV) also endangers populations of protected wild bird species and bears zoonotic propensity.

Within the framework of the present project, a methodology was established and validated for its potential to enrich AIV from surface water. Furthermore, the influence of different abiotic effects (water temperature and water quality) and time on different AIV isolates should be investigated in this matrix. Furthermore, the effect of water as a transmission medium within an animal population was to be investigated experimentally, and the minimum infective dose of virus per liter was to be determined.

Virus enrichments were performed using an optimized ultrafiltration method (Rexeed™-25-A). The development of a reference standard for the detection of enveloped RNA viruses in water samples, based on the bacteriophage Phi6, greatly facilitated validation studies. AIV detection was attempted by RT-PCR in real time and by virus isolation. While the validation runs showed an average enrichment of 60-fold, lower values of 10-15-fold were observed in field water samples. Overall, 25/36 (61%) of water samples and 18/36 (50%) of corresponding sediment samples collected from shallow waters in avifaunistically rich water bird habitats during an AIV epidemic tested positive for AIV-specific RNA. However, the AIV viral loads found in these samples were generally too low for virus isolation or further sub- and pathotyping, as was the case with other environmental samples such as deposited bird droppings. Furthermore, the virus spectrum detected by these active surveillance methods did not fully reflect an ongoing HPAIV epidemic among anseriform wild birds as detected by parallel ongoing passive surveillance of bird carcasses. Passive monitoring based on samples from diseased and dead birds thus remains unsurpassed in sensitivity and specificity compared to environmental sampling.

Furthermore, the importance of small shallow water bodies as a transmission medium of AIV among mallards was investigated. In duck groups with access to a small 100-litre water basin, a delayed onset but rapid progression of experimentally induced AIV infection was observed, transmitted from two mallards inoculated with AIV to eight sentinel mallards each. In contrast, groups with a nipple drinker, as found in commercial duck farms, showed a rapid onset but prolonged course of infection. HPAIV infections could also be triggered by virus resuspended in basin water, with lowest titers of only  $10^2$  infectious units per liter of water proving sufficient.

All in all, the investigations made clear the high importance of water as a transmission medium of avian influenza infections in birds. Smallest amounts of viral infectivity in water can establish chains of productive infections of waterfowl. Risks for zoonotic AIV infections of humans through contact with such water samples are probably negligible at the low viral loads detected here. Cross-species transmission of AIV from birds to humans required (so far) very high viral loads, which were not reached in any of the field samples studied.

## Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	9
Abkürzungsverzeichnis .....	10
1 Zusammenfassung.....	11
1.1 Einleitung .....	11
1.1.1 Notwendigkeit.....	12
1.1.2 Forschungsziel.....	12
1.1.3 Forschungsvorhaben.....	12
1.1.4 Kenntnisstand .....	12
1.2 Praktische Tätigkeiten.....	14
1.2.1 Nachweisverfahren aviärer Influenzaviren.....	14
1.2.2 Etablierung und Validierung eines Aufreinigungs- und anreicherungsverfahrens für aviäre Influenzaviren aus Oberflächenwasser .....	14
1.2.3 Aufkonzentrierung des Rexeed™-25-A-Eluats durch nachfolgende Filtration mittels Polypropylen-Filter .....	15
1.2.4 Ultrazentrifugation .....	16
1.2.5 Ultrazentrifugation Anwendung validierter Anreicherungs- und Nachweisverfahren für aviäre Influenzaviren aus Oberflächenwasser .....	16
1.2.6 AIV Detektion im Sediment.....	17
1.2.7 Untersuchungen zur Tenazität aviärer Influenzaviren in Oberflächenwasser .....	18
1.2.8 Untersuchungen zur Bedeutung von Oberflächenwasser als Übertragungsmedium aviärer Influenzaviren .....	18
2 Zielerreichung des Forschungsvorhabens.....	21
3 Summary .....	22
3.1 Introduction .....	22
3.1.1 Necessity.....	23
3.1.2 Research objective.....	23
3.1.3 Research project .....	23
3.1.4 State of knowledge .....	23
3.2 Practical activities .....	25
3.2.1 Detection of avian influenza viruses.....	25
3.2.2 Establishment and validation of a purification and enrichment method for avian influenza viruses from surface water .....	25
3.2.3 Concentration of the Rexeed™-25-A eluate by subsequent filtration using polypropylene filters.....	26



3.2.4	Ultracentrifugation .....	27
3.2.5	Use of validated enrichment and detection methods for avian influenza viruses from surface water .....	27
3.2.6	AIV detection in sediment .....	28
3.2.7	Examination of the tenacity of avian influenza viruses in water .....	28
3.2.8	Investigations on the importance of surface water as a transmission medium of avian influenza viruses .....	29
4	Achievement of objectives of the research project .....	31
5	Ergebnisse .....	32
5.1	Diagnostik.....	32
5.2	Etablierung und Validierung eines Ultrafiltrationsverfahrens zur Anreicherung aviärer Influenzaviren aus Oberflächenwasser .....	34
5.3	Ergebnisse zur Bedeutung von Oberflächen- und Tränkewasser für die Übertragung aviärer Influenzaviren .....	37
5.4	Schlussfolgerungen und Ausblick.....	39
6	Quellenverzeichnis .....	41



## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Schematischer AIV-Transmissionszyklus im offenen Gewässer	11
Abbildung 2:	Etablierung eines geeigneten Aufreinigungs- und Anreicherungsverfahrens für AIV aus Wasserproben	15
Abbildung 3:	Validierung von Post- Rexeed™-25-A Anreicherungsverfahren	16
Abbildung 4:	Verlauf der Viruslast einer LPAIV-Infektion bei Stockenten in Abhängigkeit von der Tränkequelle (Pool versus Nipptränke)	19
Abbildung 6:	Infektionsverlauf einer HPAIV-Infektion bei Stockenten in Abhängigkeit von der initialen HPAIV Infektionsdosis in Oberflächenwasser ( $10^2$ , $10^3$ oder $10^4$ TCID <sub>50</sub> /L Wasser)	19
Figure 7:	Schematic AIV transmission cycles in open water	22
Figure 8:	Establishment of a suitable purification and enrichment process for AIV from water samples	26
Figure 9:	Validation of Post- Rexeed™-25-A Enrichment Methods	27
Figure 10:	Course of the viral load of an LPAIV infection in mallards depending on the drinking source (pool versus nipple drinker)	29
Figure 11:	Course of HPAIV infection in mallard ducks as a function of the initial HPAIV infective dose in surface water ( $10^2$ , $10^3$ or $10^4$ TCID <sub>50</sub> /L water)	30
Abbildung 12:	Vergleich verschiedener Plattenbelegungsformate zur Sub- und Pathotypisierung aviärer Influenzaviren mittels RT-qPCR	33
Abbildung 13:	Beispiele der Subtypdifferenzierung (H2 und H7) in Abhängigkeit verschiedener RT-qPCR Versionen	33
Abbildung 14:	Geografische Lokalisation der Probenentnahmen	36
Abbildung 15:	Leistungscharakteristika der etablierten Phi6-Diagnostik	37
Abbildung 16:	Dynamik einer Infektion mit niedrig (H4N6) oder hoch pathogenem (H5N8) aviären Influenzaviren bei Stockenten in Abhängigkeit von der Verfügbarkeit verschiedener Tränkewasserquellen	38

## Abkürzungsverzeichnis

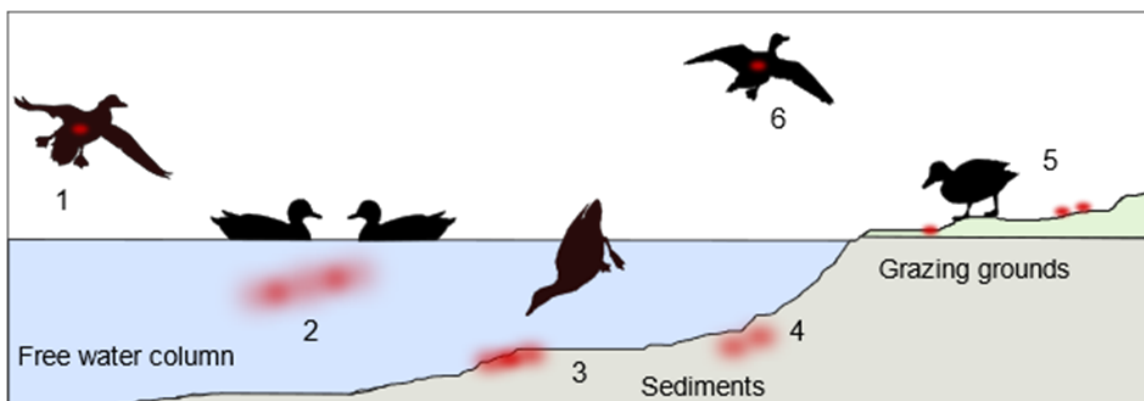
<b>AIV</b>	Aviäres Influenza Virus
<b>IAV</b>	Influenza A Virus
<b>HA oder H</b>	Hämagglutinin
<b>NA oder N</b>	Neuraminidase
<b>Rita</b>	<i>Riems Influenza A Typing Array</i>
<b>PCR</b>	<i>Polymerase-Chain-reaction</i> ; Polymerase-Kettenreaktion
<b>RNA</b>	<i>Ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
<b>Pfu</b>	<i>Plaque forming units</i> ; Plaque-bildende Einheiten
<b>Cq</b>	<i>Quantification cycle</i>
<b>RT-qPCR</b>	semiquantitative PCR mit reverser Transkription
<b>TCID<sub>50</sub></b>	<i>Tissue Culture Infectious Dose 50%</i> , Gewebe-infektiöse Dosis 50%
<b>L</b>	Liter
<b>mL</b>	Milliliter

# 1 Zusammenfassung

## 1.1 Einleitung

Die aviären Influenzaviren (AIV) gehören zu den Influenza A Viren (IAV) und somit zur Virusfamilie der *Orthomyxoviridae* (Mohammed et al. 2009). Bei den Influenza A Viren handelt es sich um behüllte Viren mit einem okto-segmentierten RNA-Genom in negativer Orientierung (Krammer et al. 2018). Durch das segmentierte Genom sind Influenzaviren in der Lage durch Genom-Reassortierung RNA-Segmente mit anderen Influenzaviren auszutauschen (Krammer et al. 2018). Durch diesen Vorgang entstehen neue Influenzavirusvarianten mit potentiell veränderten Eigenschaften hinsichtlich z.B. Wirtsspektrum und Virulenz (McLean und Graham 2022). Basierend auf den beiden Oberflächen-Glykoproteinspezies, dem Hämagglutinin (HA) und der Neuraminidase (NA), können AIVs in 16 HA und 9 NA Subtypen unterteilt (subtypisiert) werden (Hill et al. 2022; Cimini und Schwemmle 2021). Anhand ihrer Pathogenität in Hühnern können AIV der Subtypen H5 und H7 noch weiter differenziert werden (Sun et al. 2010; Schrauwen et al. 2011). Niedrig (*low* – LP, monobasisches endoproteolytisches Motiv im HA Protein) und hoch (*high* – HP, multibasisches Motiv) pathogene AIVs führen im Geflügel zu stark unterschiedlicher Morbidität und Mortalität (Alqazlan et al. 2022). HPAIV führt vor allem bei hühnerartigem Geflügel zu einer akut verlaufenden, systemischen Infektion, die sich rasch in einem betroffenen Bestand ausbreitet und in aller Regel tödlich verläuft. Das natürliche Reservoir aller LPAIVs stellen Wasservögel dar, welche in der Regel asymptomatische Infektionen durchlaufen (Hill et al. 2022; Krammer et al. 2018). HP Varianten wurden bislang nur für die Subtypen H5 und H7 beschrieben; hier besteht eine tierseuchenrechtlich geregelte Anzeigepflicht bei Infektionen in Wildvögeln und Geflügel (Verhagen et al. 2017; Dietze et al. 2018). Die Infektionsgefahr mit AIV für den Menschen ist generell gering, da erhebliche Adaptationen der Viren zur Anpassung an die neue Wirtsspezies Mensch nötig sind. Dennoch kommen menschliche Infektionen sporadisch vor (Graaf und Fouchier 2014; Li et al. 2022; McLean und Graham 2022; Jiang et al. 2022). Aufgrund von Reassortierungen zwischen humanen und aviären IAV, z.B. in Wirtsspezies wie dem Schwein, können neue Varianten entstehen, deren zoonotisches und pandemisches Potential schwer einschätzbar ist (Nandi und Allen 2021; Cimini und Schwemmle 2021; Graaf und Fouchier 2014).

**Abbildung 1: Schematischer AIV-Transmissionszyklus im offenen Gewässer**



(1) Ein AIV positives Tier trägt das Virus in das Gewässer ein. (2) Mit dem Ausscheiden von AIV durch infizierte Vögel verteilen sich die Viren im Wasser und können auch sedimentieren. Hierbei bestehen neue Kontaktmöglichkeiten mit empfänglichen Vögeln. AIV kann dabei ins oberflächliche Sediment (3) oder in tieferliegenden Sedimentschichten (4) abgelagert werden. Virusausscheidungen und -kontakte sind gleichermaßen im Uferbereich möglich (5). Mit neuerlich infizierten Wasservögeln (6) kann das Virus dann weiterverbreitet werden.

Quelle: Ahrens AK, Selinka HC, Mettenleiter TC, Beer M, Harder TC. Exploring surface water as a transmission medium of

avian influenza viruses - systematic infection studies in mallards. Emerg Microbes Infect. 2022 Dec;11(1):1250-1261. doi: 10.1080/22221751.2022.2065937.

### 1.1.1 Notwendigkeit

In den vergangenen Jahren hat die Anzahl und Intensität von potentiell zoonotischen HPAI-Ausbrüchen bei Wildvögeln und Geflügel in Deutschland massiv zugenommen. HPAI Viren werden zunehmend auch in den Sommermonaten nachgewiesen. Insofern ist das Risiko einer Exposition des Menschen gegenüber in die Umwelt ausgeschiedenen AI Viren im natürlichen Habitat ihrer Reservoirwirte (z.B. Badeseen und angegliederte Wiesenbereiche) neu zu bewerten. Hierzu sind Daten zum Vorkommen von AIV in Oberflächengewässern unabdingbar. Deren Erarbeitung wiederum erfordert sensitive Nachweissysteme, deren Entwicklung u.a. Gegenstand dieser Studie ist.

### 1.1.2 Forschungsziel

Im Zuge des Forschungsprojektes, sollte die Rolle des Wassers als Transmissionsmedium für aviär assoziierte Influenzaausbrüche untersucht werden. Dazu wurde das Projekt in Teilprojekte untergliedert, die jeweils einen spezifischen Aspekt untersuchten.

#### Forschungsziele

- ▶ Entwicklung eines mehrstufigen Nachweisverfahrens für (aviäre) Influenzaviren in Wasserproben bestehend aus Virusanreicherung aus der Wasserprobe, molekularbiologischem Nachweis und Charakterisierung der vorhandenen Influenzaviren sowie Vitalitätstests zur Einschätzung des infektiösen Potentials.
- ▶ Abschätzung der Wahrscheinlichkeit einer Übertragung von (aviären) Influenzaviren über das Wasser unter Berücksichtigung von Umweltfaktoren.

### 1.1.3 Forschungsvorhaben

Zur Bearbeitung und Klärung der oben genannten Forschungsfragen im Kontext der Risikoeinschätzung von aviären Influenzaviren im Wasser für den Menschen, wurden die zwei Hauptfragestellungen in Teilfragestellungen bearbeitet.

#### Forschungsvorhaben

- ▶ Entwicklung sensitiver Nachweissysteme von AIV RNA mittels real time RT-PCR (RT-qPCR)
- ▶ Etablierung und Validierung eines Verfahrens zur Virusanreicherung aus Wasserproben
- ▶ Anwendung des validierten Anreicherungssystems im Rahmen eines *Surveillance*-Feldversuches
- ▶ Untersuchung des Trägermediums Wasser für die AIV-Transmission (Tierversuch)
- ▶ Bestimmung der minimalen Virusdosis in Wasser für eine AIV-Infektion im Tier (Tierversuch)

### 1.1.4 Kenntnisstand

Studien, die sich allgemein mit der Anreicherung viraler Partikel aus dem Wasser zu diagnostischen Zwecken beschäftigten, haben zumeist auf humane Darm-assoziierte Viren, wie

Noroviren, Enteroviren und Hepatitis A Viren fokussiert. Das Methodenspektrum zum Anreichern dieser unbehüllten und daher mechanisch strapazierfähigen Viren ist breit aufgestellt und umfasst, z.T. in einer stufenförmigen Verschachtelung mehrerer Techniken, Membranfiltration, bindungsspezifische Anreicherung, Ausfällung etc. (Borgmästars et al. 2017). Vergleichsweise wenige Anreicherungsverfahren haben u.a. auch Influenzaviren in ihrem Repertoire (Rönnqvist et al. 2012; Lickfett et al. 2018; Zhang et al. 2014; Deboosere et al. 2011).

Die verfügbaren Daten zeigten, dass besonders negativ geladene Membranfilter für die Influenzavirusanreicherung aus dem Wasser geeignet zu sein scheinen. In Abhängigkeit von der Wasserqualität lag die Viruswiederfindungsrate bei Experimenten mit dotierten Wasserproben zwischen 0,3 und 6,4% für Trinkwasser und zwischen 0,01 und 13,8% für Regenwasser (Rönnqvist et al. 2012). Daneben zeigten Studien, die mit Wasserproben aus dem Feld durchgeführt wurden sind, dass eine AI Virusanreicherung mittels elektrostatisch geladener Filter möglich war; der Virusnachweis erfolgte dann molekular-virologisch aus dem Filter-material. In dieser Weise wurden mehr als 200 Wasserproben untersucht, von denen 4,8 % positiv auf AIV getestet wurden (Lickfett et al. 2018).

Die Heterogenität der wenigen spezifischen Studien aufgrund unterschiedlicher Filter, Elutionspuffer, Wasserqualitäten, Virussubtypen und vor- bzw. nachgelagerten Anreicherungsschritten verhinderte deren Vergleichbarkeit, zumal nur wenige Daten tatsächlich aus Felduntersuchungen stammten. Nicht jedes Verfahren erschien uneingeschränkt geeignet für umfassende Feldanalysen, z.B. aufgrund zu großer Probenvolumina (> 100L). Unter Berücksichtigung dieser Prämissen sollte ein technisch wenig komplexes Filtrationsverfahren etabliert werden, das mit hochsensitiven molekular-virologischen Diagnosesystemen verknüpft werden sollte. Hierzu erfolgte eine

- ▶ Prüfung unterschiedlicher Aufreinigungssysteme hinsichtlich ihrer
  - Aufreinigungsleistung (Effizienz)
  - Anwendungstauglichkeit für einen systematischen Einsatz (technischer Aufwand)
  - Verwendbarkeit im Rahmen eines *Surveillance*-Systems für AIV (Feldtauglichkeit)

Zum zweiten Forschungsziel, der „Abschätzung der Wahrscheinlichkeit einer Übertragung von (aviären) Influenzaviren über das Wasser unter Berücksichtigung von Umweltfaktoren“ ergaben initiale Suchen in Literaturdatenbanken ebenfalls kein Ergebnis, das dosisabhängige Beziehungen zwischen viruskontaminiertem Wasser und Infektionen bei Wasservögeln bzw. dem Menschen oder anderen Säugetieren darstellte. Aufgrund dessen wurde eine tierexperimentelle Herangehensweise gewählt, mit der folgende spezifische Fragestellungen bearbeitet werden sollten:

- ▶ Übertragungseffizienz von AIV bei Wasservögeln in Abhängigkeit der Wasserquelle
  - Existieren sub- und pathotyp-spezifische Unterschiede?
- ▶ Näherungsweise Bestimmung der minimal notwendigen AI-Dosis in einer Wasserquelle zur Induktion einer Infektion im Tier

Insgesamt war aus den kombinierten Daten der Surveillancestudie und den Ergebnissen der Tierexperimente auf das Risiko rückzuschließen, dass Menschen durch Kontakt mit kontaminiertem Oberflächenwasser, z.B. in Badeseen, AIV Infektionen akquirieren können.

## 1.2 Praktische Tätigkeiten

### 1.2.1 Nachweisverfahren aviärer Influenzaviren

Die Diagnostik von AIV ist aufgrund der 16 unterschiedlichen HA und 9 NA Subtypen sowie der Pathotypvarianten LP und HP komplex. Für stark untergliederte Subtypen wie H5 wird eine weitere Differenzierung in verschiedene Linien (Kladen) erforderlich. Zum selben Zeitpunkt können unterschiedliche Sub- aber auch Pathotypen in einer Population bzw. in einer Region, ja sogar in einzelnen Vogelindividuen, zirkulieren. Tierseuchenrechtlich verantwortliches Handeln baut auf einer verlässlichen und umfassenden Diagnostik auf. Um diesen Maßgaben gerecht zu werden, wurde eine Vielzahl diagnostischer Verfahren entwickelt und publiziert. Real time RT-PCRs (RT-qPCRs) haben in den letzten Jahren den Status von Routineuntersuchungen erreicht und gelten mittlerweile auch gegenüber klassischen Virusisolierungen als Goldstandards. Im aktuellen Projekt wurde ein Arrayverfahren von RT-qPCRs, der sogenannte Riems Influenza A Typing Assay (RITA) weiterentwickelt. Das erstmals 2016 publizierte Rita-Verfahren (Hoffmann et al. 2016) stellt eine schnelle und umfassende Methode zum Genomnachweis verschiedener AIV Subtypen dar.

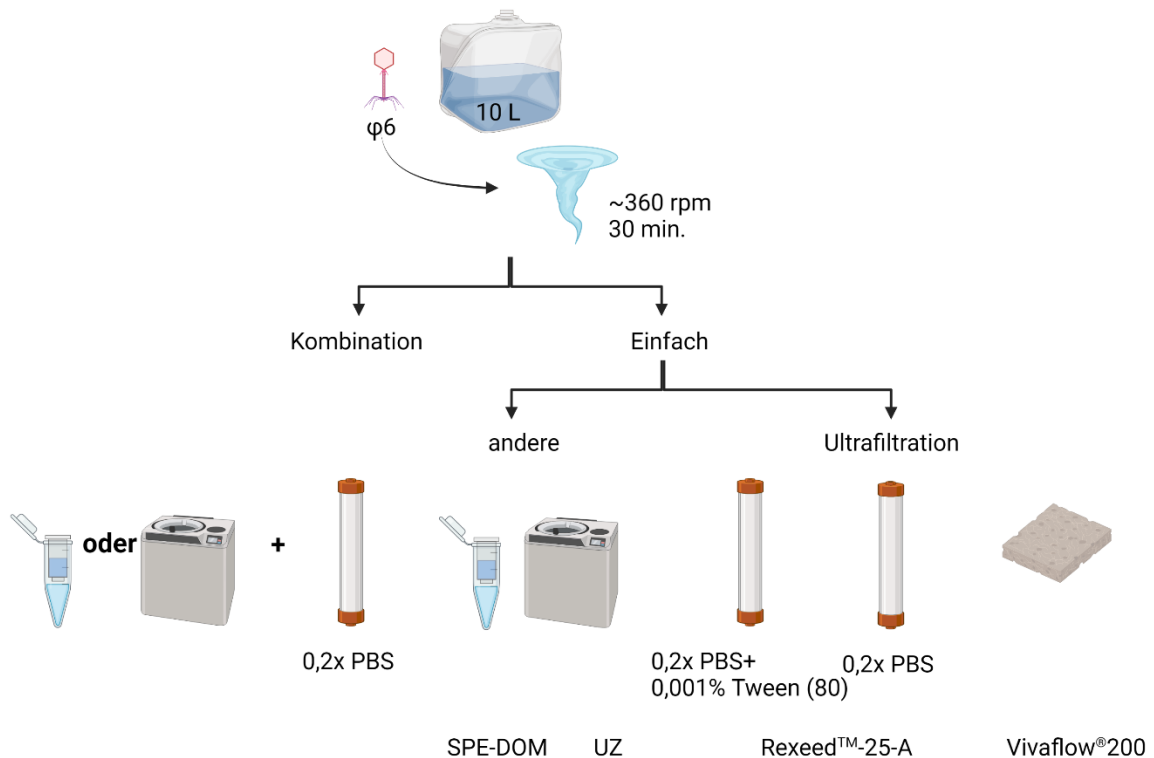
Auf Grund hoher Fehlerraten bei der Influenza A Virusgenomreplikation (bis zu einer Mutation pro Genom und Replikationszyklus), sowie der Reassortierung von AIVs, wurde das ursprüngliche RITA-Verfahren der Situation aktuell zirkulierender AI Viren angepasst, um eine hohe Spezifität und Sensitivität auch weiterhin zu gewährleisten. Darüber hinaus, wurde der Test durch Kombinationen verschiedener RT-qPCRs in Duplexverfahren mit unterschiedlichen Sondenmarkierungen ökonomisiert. Weiterhin wurde das Sub- und Pathotypspektrum erweitert sowie Tests für differentialdiagnostisch zu beachtenden Virusinfektionen wie dem Newcastle Disease Virus und dem Virus der aviären infektiösen Bronchitis hinzugefügt. Auskopplungen aus dem gesamten Set von RT-qPCRs für spezielle Anwendungen (z.B. im Rahmen umrissener AIV Ausbrüche mit einem spezifischen Stamm des HPAIV) dienen einer weiteren Ökonomisierung.

Die hier weiter entwickelten Verfahren wurden Anfang 2022 in der Fachzeitschrift „Viruses“ veröffentlicht (vgl. Abschnitt 3.1: Hassan et al. 2022).

### 1.2.2 Etablierung und Validierung eines Aufreinigungs- und anreicherungsverfahrens für aviäre Influenzaviren aus Oberflächenwasser

Verschiedene Verfahren wurden bereits hinsichtlich ihrer (begrenzten) Eignung für Influenzaviren in anderen Studien geprüft (s. 1.5). In dieser Studie wurden Ultrafiltrationsverfahren untersucht. Hierbei kamen die Systeme VivaFlow200 und Rexeed™-25-A (**Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**) zur Anwendung. Das Rexeed™-25-A-Verfahren war bereits zuvor am UBA mit gutem Erfolg für den Virennachweis aus Abwässern geprüft worden (Hans-Christoph Selinka). Zur Validierung wurde ein Standard-Erreger, der Bakteriophage Phi6 (BSL-1), als Surrogat eines behüllten RNA Virus höherer Sicherheitsstufen eingesetzt. Methodische Entwicklungen zum Nachweis der Phi6 Infektiosität sowie der viralen RNA mittels RT-qPCR wurden hier entwickelt. Ausgangspunkt der Untersuchungen waren jeweils Wasserproben von 10L, die in den Validierungsläufen mit definierten Mengen Phi6 bzw. LPAIV versetzt wurden.

**Abbildung 2: Etablierung eines geeigneten Aufreinigungs- und Anreicherungsverfahrens für AIV aus Wasserproben**



Das Schema gibt einen Überblick über die verschiedenen geprüften Aufreinigungsverfahren im Einzel-, sowie im Kombinationsansatz. Stellvertretend für die verschiedenen Rexeed™-25-A Aufreinigungsverfahren steht die Säule in der Abbildung, wohingegen die eckige Membran für das VivaFlow-System steht. Das Reaktionsgefäß mit dem Filter steht für die SPE-DOM-Aufreinigung, die Ultrazentrifuge für die Virusanreicherung durch Ultrazentrifugation.

*Quelle:* Investigating environmental matrices for use in avian influenza virus surveillance – surface water, sediments and avian fecal samples; Ann Kathrin Ahrens, Hans-Christoph Selinka, Claudia Wylezich, Hubert Wonnemann, Ole Sindt, Hartmut H. Hellmer, Florian Pfaff, Dirk Höper, Thomas C. Mettenleiter, Martin Beer and Timm C. Harder, under revision in Microbiology Spectrum, generiert mit BioRender.com

Aufgrund der Aufreinigungskapazität, der technischen Einfachheit und der Uniformität der Aufreinigungsleistungen setzte sich die Rexeed™-25-A-Methode gegen VivaFlow200 durch. Der Einsatz von Rexeed-Elutionspuffer ohne Zugabe von Tween führte zu den besten Ergebnissen, die eine im Durchschnitt ca. 60-fache Anreicherung der hinzugefügten Phi6 bzw. AIV Erreger in den Validierungsläufen gewährleistete.

Zur weiteren Optimierung der Anreicherung wurden Verfahren geprüft, die sich an die Rexeed™-25-A -Behandlung anschlossen (Abb. 3).

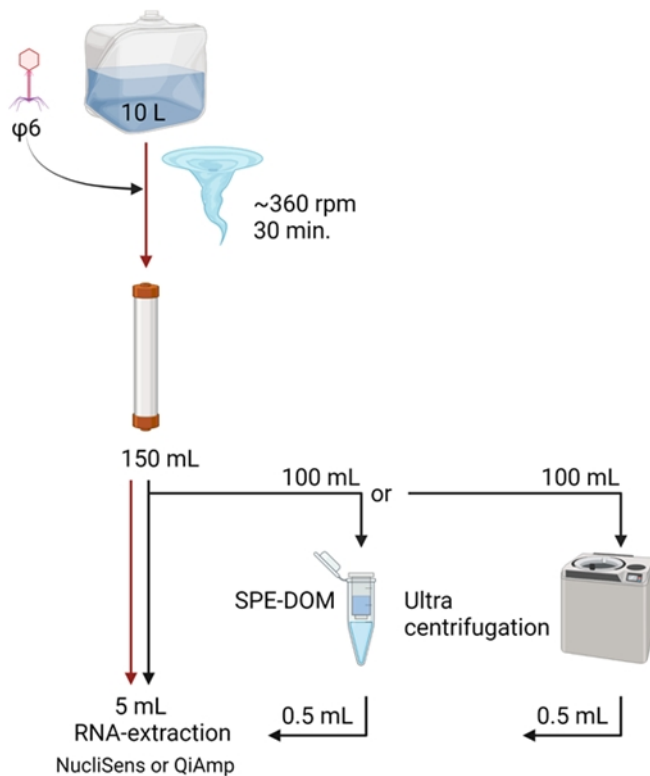
### 1.2.3 Aufkonzentrierung des Rexeed™-25-A-Eluats durch nachfolgende Filtration mittels Polypropylen-Filter

Das Verfahren folgte im Wesentlichen den Vorschriften aus (Dittmar et al. 2008). Der Polypropylene-Filter wurde im Alleineinsatz sowie in Kombination mit einer vorherigen Rexeed™-25-A-Filtration verglichen (Abb. 3). Triplikat-Untersuchungen zeigten, dass der höchste



Aufreinigungsfaktor durch den alleinigen Einsatz der Rexeed™-25-A-Säule zu verzeichnen war. Es konnte gezeigt werden, dass größere Mengen erregerspezifischer RNA im Polypropylenfilter verblieben und nicht regeneriert werden konnten.

**Abbildung 3: Validierung von Post- Rexeed™-25-A Anreicherungsmethoden**



Die Säule repräsentiert in dieser Abbildung die Rexeed-25-A Aufreinigung.

*Quelle:* Investigating environmental matrices for use in avian influenza virus surveillance – surface water, sediments and avian fecal samples; Ann Kathrin Ahrens, Hans-Christoph Selinka, Claudia Wylezich, Hubert Wonnemann, Ole Sindt, Hartmut H. Hellmer, Florian Pfaff, Dirk Höper, Thomas C. Mettenleiter, Martin Beer and Timm C. Harder, under revision in Microbiology Spectrum, generiert mit BioRender.com

#### 1.2.4 Ultrazentrifugation

Elate der Rexeed™-25-A-Aufreinigung wurden hierbei einer 3-stündigen Ultrazentrifugation unterzogen (SW-32-Ti Beckman Rotor, 4°C, bei 175 000xg), um partikuläre Elemente in der Größe von Inflenzaviren sedimentieren zu können. Dies führte allerdings zu keiner weiteren Erhöhung der Viruslasten (vgl. Abb. 3).

Aufgrund der Ergebnisse wurden die beschriebenen Post-Rexeed™-25-A-Anreicherungs-methoden nicht in den nachfolgend geschilderten Felduntersuchungen eingesetzt.

#### 1.2.5 Ultrazentrifugation Anwendung validierter Anreicherungs- und Nachweisverfahren für aviäre Inflenzaviren aus Oberflächenwasser

Regelmäßige Wasserproben wurden an fünf Standorten in Deutschland von vier nationalen Partnern (Succowstiftung Greifswald, Nationalparkamt Wattenmeer Schleswig-Holstein, Dr. F.

Woog am Max-Ethyl-See in Stuttgart, Dr. Kruckenberg am Dümmersee) und einem internationalen Partner (Prof. J. Waldenström, Univ. Kalmar, Schweden) durchgeführt. Diese Proben wurden in Flachwasserbereichen von Seen oder der Ostsee entnommen, die als häufig aufgesuchte Lebensräume von wandernden Wasservogelarten ausgewiesen wurden. Darüber hinaus wurden einzelne Proben aus Gewässern im Zusammenhang mit meldepflichtigen HPAI-Ausbrüchen in Geflügelbetrieben entnommen; diese wurden ad hoc von Mitarbeitern des Instituts für Epidemiologie des Friedrich-Loeffler-Instituts durchgeführt. Zusätzliche Probenahmen aus Tiefseegebieten des Antarktischen Ozeans konnten durch Mitarbeiter (Dr. Hartmut H. Hellmer) einer Antarktis-Expedition des Alfred-Wegener-Instituts, Bremerhaven (Expedition PS 124: 15.01.2021 bis 30.03.2021) durchgeführt werden; die Genehmigung zur Probenahme und Untersuchung am Friedrich-Loeffler-Institut wurde zuvor vom Umweltbundesamt als Teilantrag der Alfred-Wegener-Expedition PS 124 (Aktenzeichen 94033-176) eingeholt. Eine weitere Probe stammt aus dem Tier-HPAI-Teilversuch im Rahmen dieser Studie (vgl. 1.6.4).

Die Proben wurden unter festgelegten Bedingungen mit Rexeed™ 25-A Säulen filtriert. Das Eluat wurde dann in einem mehrstufigen Verfahren getestet. Zunächst wurde die Probe sowohl infektiologisch (Plaque-Assay) als auch molekularbiologisch (RT-qPCR) auf den internen Marker, den Bakteriophagen Phi6, untersucht. Dies diente der Normalisierung der Anreicherungseffizienz im Vergleich zu den Validierungstests. Anschließend wurde die Probe mittels generischer RT-qPCR auf das Vorhandensein von Influenza-A-Virus-RNA untersucht. Je nach der Viruslast in der Probe wurden positive Proben mit der RITA-Methode (Hassan et al. 2022) weiter subtypisiert (höhere Viruslasten, < Cq 34) oder zunächst nur auf die beiden meldepflichtigen Subtypen (H5 und H7; niedrigere Viruslasten) getestet. Wurden H5 oder H7 nachgewiesen, wurde der Pathotyp auch in Abhängigkeit von der HA-Spaltstellensequenz untersucht.

In 27 der 44 (61 %) Feldproben aus Wildvogellebensräumen wurden Fragmente des RNA-Genoms von Influenza-A-Viren durch generische RT-qPCR nachgewiesen. Insgesamt neun Proben mussten nach einem Verdünnungsschritt aufgrund hoher Konzentrationen von PCR-Inhibitoren in der Probe erneut getestet werden. Die ermittelten Cq-Werte lagen zwischen Cq=33,7 und Cq=39,7 und repräsentieren niedrige Viruslasten. In einer Probe wurde der Subtyp H6N2 nachgewiesen, in drei weiteren Proben der Subtyp H5. Proben aus HPAIV-Ausbruchsbeständen wurden alle positiv auf AIV getestet, aber nur zwei positiv auf H5, während Proben von kranken Vögeln aus diesen Beständen alle hochpositiv auf HPAIV H5N1 getestet wurden. In den fünf Wasserproben aus dem antarktischen Weddellmeer wurde kein genomisches AIV-Material nachgewiesen. Keine der routinemäßig gesammelten positiven Proben wies bei der Kultivierung auf MDCK-II-Zellen infektiöse Viren auf.

### **1.2.6 AIV Detektion im Sediment**

Neben den Wasserproben wurde auch RNA aus 36 Sedimenten extrahiert, die bei der Wasserprobennahme aus demselben Beprobungsbereich parallel entnommen wurden. Die erhaltenen Ct-Werte lagen zwischen 32,1 und 38,0. In 18 der 36 (50%) Sedimentproben konnte AIV nachgewiesen werden. Insgesamt konnten sechs verschiedene (2, 4, 5, 6, 7 und 9) HA und drei (3, 6 und 9) NA Subtypen identifiziert werden. Lediglich eine Probe wurde erfolgreich pathotypisiert. Sie war sowohl positiv für H5-LP, als auch für H5-Klade 2.3.4.4b und somit für HP.

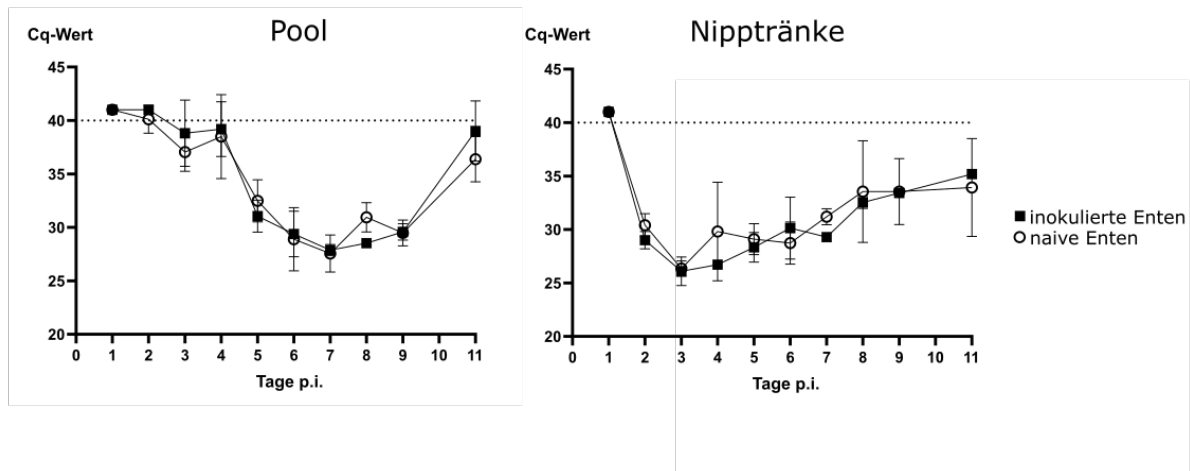
### **1.2.7 Untersuchungen zur Tenazität aviärer Influenzaviren in Oberflächenwasser**

Die Übertragbarkeit von AIV hängt von deren Infektiosität ab. Das Vermögen von Viren auch außerhalb von Wirtsorganismen über einen gewissen Zeitraum infektiös zu bleiben, wird als Tenazität bezeichnet. Viren mit einer Lipidumhüllung, wie Influenza A Viren, gelten als weniger tenazid als unbehüllte Viren (z.B. Enteroviren). Die wissenschaftliche Literatur verweist jedoch auf eine überdurchschnittlich hohe Tenazität aviärer Influenza A Viren, die, in Abhängigkeit von der Wassertemperatur, pH und der Salinität, über Tage bis Monate hinweg infektiös bleiben können (Brown et al. 2009; Poulson et al. 2016 ). Dies könnte ein Selektionskriterium sein, das den Viren eine verbesserte Transmissibilität verleiht. In der aktuellen Studie wurde versucht, Wasserbedingungen im Labor zu simulieren wie sie über das Jahr verteilt im Greifswalder Bodden (Region mit hoher Dichte von AIV-positiven Wasservogelpopulationen) vorherrschen. Salinität und pH wurden entsprechend justiert und monatlich wurden die in diesem Wasser resuspendierten Testviren dem annualen Temperaturwechsel des Greifswalder Boddens (zwischen +3 und +20°C) ausgesetzt. Es war geplant, Aliquots der Testviren in 14-tägigen Abständen zu entnehmen und in Titrationsversuchen in Zell- bzw. Eikulturen auf deren Infektiosität zu prüfen. Aufgrund eines technischen Versagens eines Gerätes im Versuchsaufbau, wurde jedoch die gesamte Infektiosität inaktiviert, was erst zu einem Zeitpunkt bemerkt wurde, als eine Versuchswiederholung aufgrund des nahenden Projektendes nicht mehr durchführbar war.

### **1.2.8 Untersuchungen zur Bedeutung von Oberflächenwasser als Übertragungsmedium aviärer Influenzaviren**

In einem genehmigten Tierversuch mit handaufgezogenen, kommerziellen Stockenten wurde in verschiedenen Konstellationen der Einfluss von Oberflächenwasser auf die Übertragbarkeit von AIV Infektionen in diesen Reservoirwirten untersucht. Im ersten Versuchsteil wurden den Tiergruppen entweder ein Pool mit 100 L Tränke- und Badewasser (simuliert flache Wasserkörper im Habitat) oder eine Nipptränke (simuliert eine kommerzielle Entenmasthaltung) angeboten. Je zwei Enten wurden oro-okulonasal mit LPAIV (H4N6) bzw. HPAIV (H5N8) infiziert und am Folgetag mit jeweils einer Entengruppe von 8 Tieren assoziiert. Die Virusübertragung zwischen den inkokulierten und den hinzugesetzten Tieren erfolgte in jeder der Gruppen. Allerdings unterschied sich der Infektionsverlauf (Abb. 4). In den Nipptränkegruppen verlief die Infektion gedehnt, d.h. es wurden sehr schnell Tiere positiv, und die gesamte Gruppe zeigte über nahezu zehn Tage hinweg Virusausscheidung. Die Poolgruppen dagegen wiesen eine komprimierte Infektion auf und waren nur für wenige Tage als Virusausscheider aktiv. Ein kleineres Wasservolumen (Nipptränke, so wie in Tierhalterungen) scheint eine schnellere Virusverbreitung zu unterstützen.

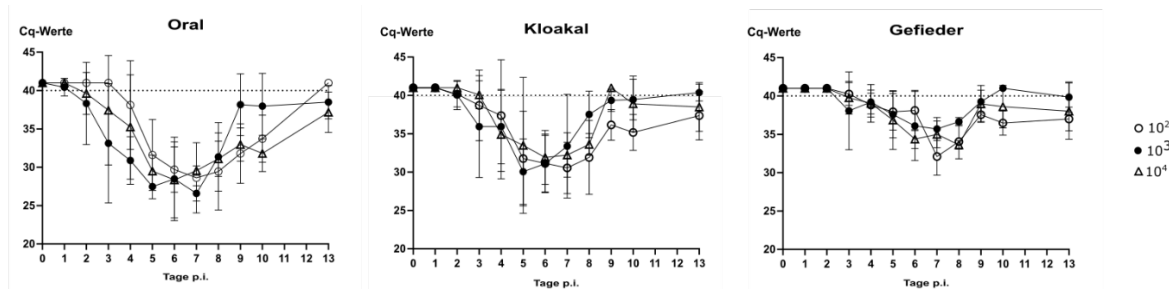
**Abbildung 4: Verlauf der Viruslast einer LPAIV-Infektion bei Stockenten in Abhängigkeit von der Tränkequelle (Pool versus Nipptränke)**



Quelle: Ahrens AK, Selinka HC, Mettenleiter TC, Beer M, Harder TC. Exploring surface water as a transmission medium of avian influenza viruses - systematic infection studies in mallards. Emerg Microbes Infect. 2022 Dec;11(1):1250-1261. doi: 10.1080/22221751.2022.2065937.

Im zweiten Teil des Versuchs wurde die minimale HPAIV-Infektionsdosis ( $10^2$ ,  $10^3$  oder  $10^4$  TCID<sub>50</sub>/L Wasser) näherungsweise bestimmt, die erforderlich war, um bei vier Stockenten pro Gruppe eine produktive Infektion auszulösen, wenn sie in einem 100-Liter-Pool mit Wasser zum Trinken oder Schwimmen exponiert wurden. Unabhängig von der anfänglichen HPAI-Virusdosis, die zu Beginn des Versuchs einmalig in das Becken gegeben wurde, zeigten alle Versuchsgruppen einen produktiven, ähnlichen Infektionsverlauf (Abb. 5). In der Gruppe mit der niedrigsten Virusdosis begann die Virusinfektion etwas verzögert (Stunden bis wenige Tage).

**Abbildung 5: Infektionsverlauf einer HPAIV-Infektion bei Stockenten in Abhängigkeit von der initialen HPAIV Infektionsdosis in Oberflächenwasser ( $10^2$ ,  $10^3$  oder  $10^4$  TCID<sub>50</sub>/L Wasser)**



Oral – Infektionslast gemessen mittels RT-qPCR in oropharyngealen Tupfern; Kloakal – kloakal entnommene Tupfer; Gefieder – Tupferprobe gewonnen durch Reiben eines Tupfers am Brustgefieder. Quelle: Ahrens AK, Selinka HC, Mettenleiter TC, Beer M, Harder TC. Exploring surface water as a transmission medium of avian influenza viruses - systematic infection studies in mallards. Emerg Microbes Infect. 2022 Dec;11(1):1250-1261. doi: 10.1080/22221751.2022.2065937.

Die maximal erreichten Viruslasten zeigten vergleichbare Werte, so dass geschlossen werden kann, dass eine geringere initiale Infektionsdosis nicht zwangsläufig zu einer geringeren Virus-

last im Versuchsverlauf führt. Entscheidend bleibt, dass zumindest eine der vier Probanden-Enten die Infektion aus dem Wasser aufnimmt, das Virus repliziert und so weitere Kontakttiere im Pool infiziert werden.

Es wurde vermutet, dass sogar elektrostatisch am Gefieder von nicht-infizierten Enten anhaftende AIV ausreichen, um eine Infektion zwischen verschiedenen Wasserkörpern zu transmittieren. Obwohl im Versuch erhebliche Viruslasten am Gefieder gemessen wurden (Abb. 5), schlug ein Übertragungsversuch mit Viren-behafteten Gefieder einer nicht infizierten Stockente fehl.

Die Ergebnisse dieses Studienteil wurden im Mai 2022 zusammen mit den Projektpartnern in der Fachzeitschrift „Emerging Microbes & Infections“ publiziert (Ahrens et al. 2022a).

## 2 Zielerreichung des Forschungsvorhabens

### Zusammenfassung der Zielerreichung des Forschungsvorhabens

Im Rahmen des Forschungsvorhabens konnte gezeigt werden:

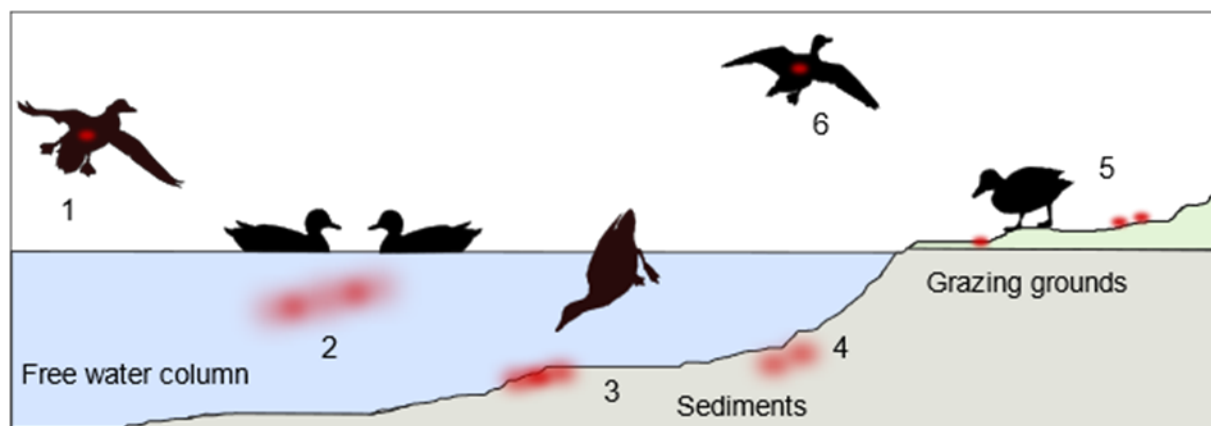
- ▶ Ultrafiltrationsverfahren, wie die hier etablierte Methode unter Verwendung von Rexeed™-25-A Säulen, können aviäre Influenzaviren (AIV) aus Oberflächenwasser anreichern.
- ▶ Die AIV-Inzidenz von Oberflächenwasserproben aus avifaunistisch reichen Flachwassergebieten ist hoch (61% positive Proben).
- ▶ Die Viruslasten solcher Proben sind jedoch gering, so dass eine vollständige molekular-virologische Sub- und Pathotypisierung, und auch eine klassische Virusisolierung wenig erfolgversprechend bleiben.
- ▶ Auch in parallel entnommenen Sedimenten können AIV detektiert werden, jedoch mit den gleichen Nachteilen der geringen Viruslasten wie bei den Wasserproben.
- ▶ Verschiedene AIV-Subtypen wurden im Wasser bzw. dem dazugehörigen Sediment detektiert, so dass die verschiedenen Matrices u.U. auch verschiedene Viruspopulationen repräsentieren.
- ▶ Auch sehr geringe Virusdosen, die in Wasser resuspendiert sind, können produktive Infektionen bei Stockenten auslösen.
- ▶ Geringe Mengen von viruskontaminiertem Tränkwasser beschleunigen den Beginn und dilatieren den Verlauf einer AIV Infektion bei Stockenten.
- ▶ Oberflächenwasser hat eine erhebliche Bedeutung in der Epidemiologie der AIV Infektion bei Reservoirwirten wie den Stockenten. Ein Risiko der zoonotischen Übertragung solcher in Wasser resuspendierten AIV auf den Menschen, z.B. an Badeseen, kann nicht ausgeschlossen werden, wird aber im Hinblick auf die geringen Viruslasten solcher Wasserproben, die hier gemessen wurden, als vernachlässigbar eingestuft.

## 3 Summary

### 3.1 Introduction

The avian influenza viruses (AIV) belong to the influenza A viruses (IAV) and thus to the virus family Orthomyxoviridae (Mohammed et al. 2009). Influenza A viruses are enveloped viruses with an octo-segmented RNA genome in negative orientation (Krammer et al. 2018). Due to the segmented genome, influenza viruses are able to exchange RNA segments with other influenza viruses through genome reassortment (Krammer et al. 2018). This process gives rise to new influenza virus variants with potentially altered properties in terms of e.g. host range and virulence (McLean and Graham 2022). Based on the two surface glycoproteins, haemagglutinin (HA) and neuraminidase (NA), AIVs can be divided (subtyped) into 16 HA and 9 NA subtypes (Hill et al. 2022; Cimini and Schwemmler 2021). Based on their pathogenicity in chickens, AIVs of subtypes H5 and H7 can be further differentiated (Sun et al. 2010; Schrauwen et al. 2011). Low (low - LP, monobasic endoproteolytic motif in HA protein) and highly (high - HP, multibasic motif) pathogenic AIVs lead to greatly different morbidity and mortality in poultry (Alqazlan et al. 2022). HPAIVs cause acute systemic infection, especially in chicken-like poultry, which spreads rapidly in an affected flock and is usually fatal. The natural reservoir of all LPAIVs is waterfowl, which usually undergo asymptomatic infections (Hill et al. 2022; Krammer et al. 2018). HP variants have so far only been described for subtypes H5 and H7; here, there is an obligation to report infections in wild birds and poultry under animal health legislation (Verhagen et al. 2017; Dietze et al. 2018). The risk of infection with AIV for humans is generally low, as considerable adaptations of the viruses are necessary to adapt to the new host species humans. Nevertheless, human infections occur sporadically (Graaf and Fouchier 2014; Li et al. 2022; McLean and Graham 2022; Jiang et al. 2022). Due to reassortments between human and avian IAV, e.g. in host species such as pigs, new variants may emerge whose zoonotic and pandemic potential is difficult to assess (Nandi and Allen 2021; Cimini and Schwemmler 2021; Graaf and Fouchier 2014).

**Figure 6: Schematic AIV transmission cycles in open water**



1 — An AIV positive animal carries the virus into the water body. 2 — With the excretion of AIV by infected birds, the viruses spread in the water and can also sediment. In this process, new opportunities for contact with susceptible birds exist. AIV can be deposited into the superficial sediment (3) or into deeper sediment layers (4). Virus shedding and contact are equally possible in the riparian zone (5). The virus can then be further spread with newly infected waterfowl (6).

Source: Ahrens AK, Selinka HC, Mettenleiter TC, Beer M, Harder TC. Exploring surface water as a transmission medium of avian influenza viruses - systematic infection studies in mallards. *Emerg Microbes Infect.* 2022 Dec;11(1):1250-1261. doi: 10.1080/22221751.2022.2065937.



### 3.1.1 Necessity

In recent years, the number and intensity of potentially zoonotic HPAI outbreaks in wild birds and poultry in Germany has increased massively. HPAI viruses are also increasingly detected in the summer months. In this respect, the risk of human exposure to AI viruses shed into the environment in the natural habitat of their reservoir hosts (e.g. bathing lakes and associated meadow areas) must be reassessed. For this purpose, data on the occurrence of AIV in surface waters are indispensable. This in turn requires sensitive detection systems, the development of which is one of the subjects of this study.

### 3.1.2 Research objective

In the course of the research project, the role of water as a transmission medium for avian-associated influenza outbreaks was to be investigated. For this purpose, the project was divided into sub-projects, each of which investigated a specific aspect.

#### Research objective

- ▶ Development of a multi-stage detection method for (avian) influenza viruses in water samples consisting of virus enrichment from the water sample, molecular biological detection and characterisation of the influenza viruses present as well as vitality tests to assess the infectious potential.
- ▶ Estimation of the probability of transmission of (avian) influenza viruses via water, taking into account environmental factors.

### 3.1.3 Research project

To address and clarify the above research questions in the context of risk assessment of avian influenza viruses in water for humans, the two main questions were addressed in sub-questions.

#### Research project

- ▶ Development of sensitive detection systems of AIV RNA using real time RT-PCR (RT-qPCR).
- ▶ Establishment and validation of a suitable ultrafiltration method for virus enrichment.
- ▶ Application of the validated enrichment system in a surveillance field trial.
- ▶ Investigation of water as a carrier medium for AIV transmission (animal experiment).
- ▶ Determination of the minimum viral dose in water for AIV infection in an animal (animal experiment).

### 3.1.4 State of knowledge

Studies that have generally dealt with the enrichment of viral particles from water for diagnostic purposes have mostly focused on human intestine-associated viruses, such as noroviruses, enteroviruses and hepatitis A viruses. The range of methods for enrichment of these non-enveloped and therefore mechanically hard-wearing viruses is broad and includes, sometimes in a stepwise nesting of several techniques, membrane filtration, binding-specific enrichment, precipitation, etc. (Borgmästars et al. 2017). Comparatively few enrichment techniques have

influenza viruses, among others, in their repertoire (Rönnqvist et al. 2012; Lickfett et al. 2018; Zhang et al. 2014; Deboosere et al. 2011).

The available data showed that negatively charged membrane filters seem to be particularly suitable for influenza virus enrichment from water. Depending on the water quality, virus recovery rates in experiments with spiked water samples ranged from 0.3 to 6.4% for drinking water and from 0.01 to 13.8% for rainwater (Rönnqvist et al. 2012). In addition, studies conducted with water samples from the field showed that AI virus enrichment was possible using electrostatically charged filters; virus detection was then carried out molecularly virologically from the filter material. More than 200 water samples were analysed in this way, of which 4.8% tested positive for AIV (Lickfett et al. 2018).

The heterogeneity of the few specific studies due to different filters, elution buffers, water qualities, virus subtypes and upstream or downstream enrichment steps prevented their comparability, especially since only few data actually came from field investigations. Not every method appeared to be fully suitable for more comprehensive field analyses, e.g. due to too large sample volumes (> 100L). Taking these premises into account, a technically less complex filtration procedure was to be established, which was to be linked to highly sensitive molecular virological diagnostic systems. For this purpose, a

- ▶ Testing of different purification systems was carried out with regard to their purification performance (efficiency)
  - Suitability for systematic use (technical effort)
  - Usability within the framework of a surveillance system for AIV (field suitability).

With regard to the second research objective, "Estimation of the probability of transmission of (avian) influenza viruses via water, taking environmental factors into account", initial searches in literature databases also failed to produce any results showing dose-dependent relationships between virus-contaminated water and infections in waterfowl or humans or other mammals. Because of this, an animal experimental approach was chosen to address the following specific questions:

- ▶ Transmission efficiency of AIV in water birds depending on the water source.
  - Are there sub- and pathotype-specific differences?
- ▶ Approximate determination of the minimum AI dose required in a water source to induce infection in the animal.

Overall, from the combined data of the surveillance study and the results of the animal experiments, it was possible to infer the risk of humans acquiring AIV infections through contact with contaminated surface water, e.g. in bathing lakes.

## **3.2 Practical activities**

### **3.2.1 Detection of avian influenza viruses**

The diagnosis of AIV is complex due to the 16 different HA and 9 NA subtypes as well as the pathotype variants LP and HP. For highly subdivided subtypes such as H5, further differentiation into different lineages (clades) is required. At the same time, different subtypes but also pathotypes can circulate in a population or in a region, even in individual bird individuals. Responsible action under animal disease law is based on reliable and comprehensive diagnostics. To meet these requirements, a variety of diagnostic methods have been developed and published. Real-time RT-PCRs (RT-qPCRs) have achieved the status of routine examinations in recent years and are now also considered gold standards compared to classical virus isolations. In the current project, an array method of RT-qPCRs, the so-called Riems Influenza A Typing Assay (RITA), was further developed. The Rita method (Hoffmann et al. 2016), first published in 2016, is a rapid and comprehensive method for genome detection of different AIV subtypes.

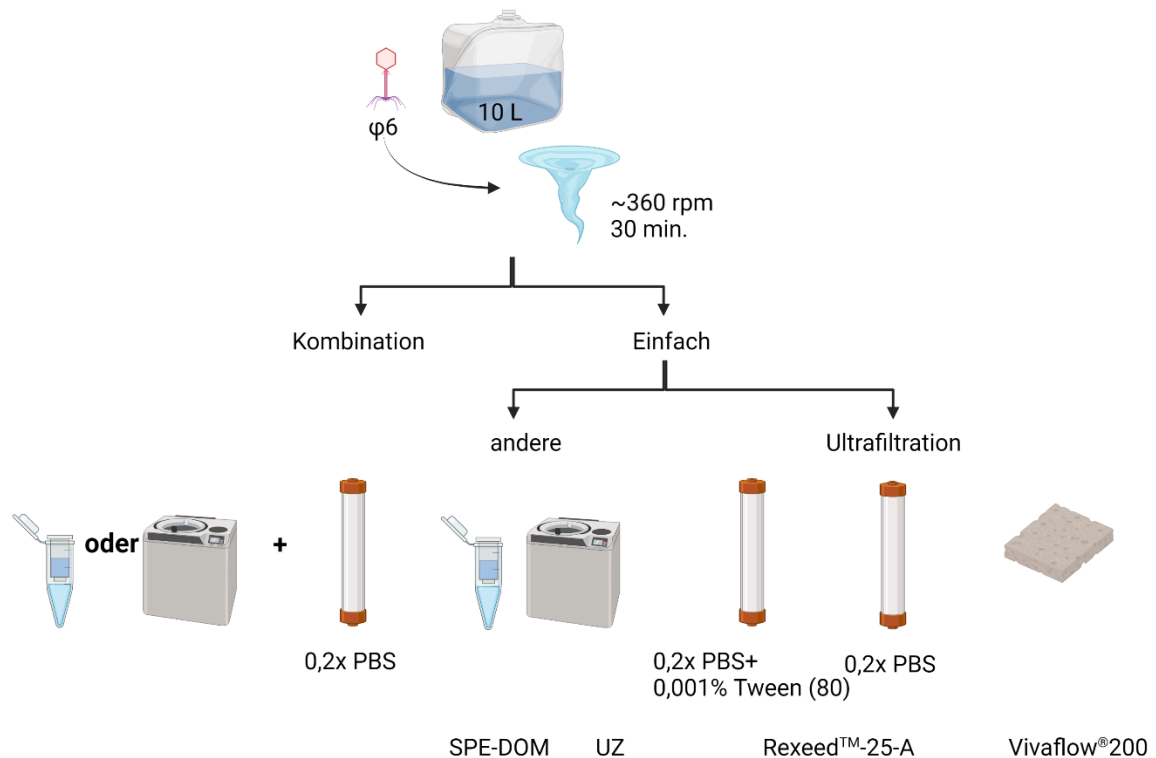
Due to high error rates in influenza A virus genome replication (up to one mutation per genome and replication cycle), as well as the reassortment of AIVs, the original RITA method was adapted to the situation of currently circulating AI viruses to ensure high specificity and sensitivity. In addition, the test was economized by combining different RT-qPCRs in duplex procedures with different probe labels. Furthermore, the sub- and pathotype spectrum was extended and tests for viral infections requiring differential diagnosis, such as Newcastle disease virus and avian infectious bronchitis virus, were added. Extractions from the entire set of RT-qPCRs for specific applications (e.g. in the context of outlined AIV outbreaks with a specific strain of HPAIV) served to further economize.

The methods further developed here were published in the journal "Viruses" at the beginning of 2022 (Hassan et al. 2022).

### **3.2.2 Establishment and validation of a purification and enrichment method for avian influenza viruses from surface water**

Various methods have already been tested with regard to their (limited) suitability for influenza viruses in other studies (see 1.5). In this study, ultrafiltration methods were investigated. The VivaFlow200 and Rexeed™-25-A systems (Figure 2) were used. The Rexeed™-25-A method had previously been tested at UBA with good success for the detection of viruses from wastewater (Hans-Christoph Selinka). For validation, a standard infectious agent, the bacteriophage Phi6 (BSL-1), was used as a surrogate of an enveloped RNA virus of higher safety levels. Methodological developments for the detection of Phi6 infectivity and viral RNA by RT-qPCR were developed here. Starting point of the investigations were water samples of 10L, which were mixed with defined amounts of Phi6 or LPAIV in the validation runs.

**Figure 7: Establishment of a suitable purification and enrichment process for AIV from water samples**



The diagram gives an overview of the different purification methods tested in the single and combined approach. The column represents the different Rexeed™-25-A purification methods, whereas the angular membrane represents the VivaFlow system. The reaction tube with the attached filter depicts SPE-DOM purification, the ultracentrifuge represents virus enrichment by ultracentrifugation.

**Source:** Investigating environmental matrices for use in avian influenza virus surveillance – surface water, sediments and avian fecal samples; Ann Kathrin Ahrens, Hans-Christoph Selinka, Claudia Wylezich, Hubert Wonnemann, Ole Sindt, Hartmut H. Hellmer, Florian Pfaff, Dirk Höper, Thomas C. Mettenleiter, Martin Beer and Timm C. Harder, under revision in Microbiology Spectrum, generated with BioRender.com.

Due to the purification capacity, technical simplicity and uniformity of purification performance, the Rexeed™-25-A method prevailed over VivaFlow200. The use of Rexeed™-25-A elution buffer without the addition of Tween gave the best results, ensuring an average of approximately 60-fold enrichment of the added Phi6 or AIV pathogens.

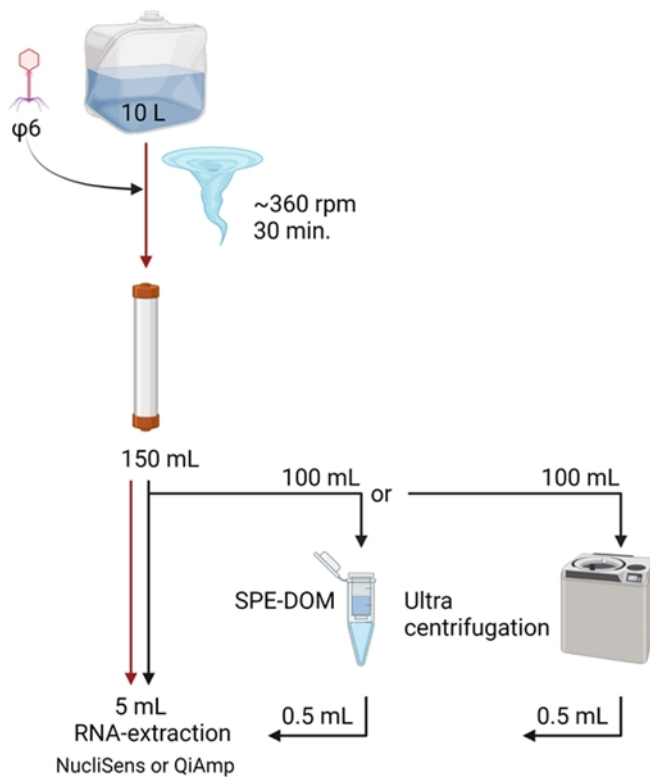
To further optimize enrichment, procedures were tested that followed the Rexeed™-25-A treatment (Fig. 8).

### 3.2.3 Concentration of the Rexeed™-25-A eluate by subsequent filtration using polypropylene filters

The procedure essentially followed the instructions from (Dittmar et al. 2008). The polypropylene filter was compared when used alone and in combination with a previous Rexeed™-25-A filtration (Fig. 8). Triplicate studies showed that the highest purification factor was recorded by

using the Rexeed™-25-A column alone. It was shown that larger amounts of pathogen-specific RNA remained in the polypropylene filter and could not be regenerated.

**Figure 8: Validation of Post- Rexeed™-25-A Enrichment Methods**



The diagram illustrates the procedure for testing the Post Rexeed™-25-A methods. The column represents the Rexeed™-25-A purification.

*Source:* Investigating environmental matrices for use in avian influenza virus surveillance – surface water, sediments and avian fecal samples; Ann Kathrin Ahrens, Hans-Christoph Selinka, Claudia Wylezich, Hubert Wonnemann, Ole Sindt, Hartmut H. Hellmer, Florian Pfaff, Dirk Höper, Thomas C. Mettenleiter, Martin Beer and Timm C. Harder, under revision in Microbiology Spectrum, Created with BioRender.com

### 3.2.4 Ultracentrifugation

Eluates of the Rexeed™-25-A purification were subjected to 3 h ultracentrifugation (SW-32-Ti Beckman rotor, 4°C, at 175 000xg) to sediment particulate elements the size of influenza viruses. However, this did not lead to any further increase in viral loads (cf. Fig. 8).

In this respect, post- Rexeed™-25-A enrichment methods were not used in the field investigations described below.

### 3.2.5 Use of validated enrichment and detection methods for avian influenza viruses from surface water

Regular water sampling was carried out at five sites in Germany by four national partners (Succowstiftung Greifswald, Nationalparkamt Wattenmeer Schleswig-Holstein, Dr. F. Woog at Max-Ethyl-See in Stuttgart, Dr. Kruckenberg at Dümmersee) and one international partner (Prof.

J. Waldenström, Univ. Kalmar, Sweden). These samples were taken in shallow water areas of lakes or the Baltic Sea, which were designated as frequently visited habitats of migratory water bird species. Furthermore, individual samples were taken from water bodies in the context of notifiable HPAI outbreaks in poultry farms; these were carried out ad hoc by staff of the Institute of Epidemiology of the Friedrich-Loeffler-Institute. Additional sampling from deep water areas of the Antarctic Ocean could be carried out by staff (Dr Hartmut H. Hellmer) of an Antarctic expedition of the Alfred Wegener Institute, Bremerhaven (Expedition PS 124: 15.01.2021 to 30.03.2021); permission for sampling and examination at the Friedrich Loeffler Institute was obtained beforehand from the Federal Environment Agency as a sub-application of the Alfred Wegener Expedition PS 124 (file number 94033-176). Another sample originates from the animal HPAI sub-trial within the framework of this study (cf. 1.6.4).

Samples were filtered under established conditions using Rexeed™ 25-A columns. The eluate was then tested in a multi-step procedure. First, the sample was tested infectiologically (plaque assay) as well as molecularly (RT-qPCR) for the internal marker, bacteriophage Phi6. This served to normalize the enrichment efficiency in comparison to the validation tests. Subsequently, the sample was tested for the presence of influenza A virus RNA using generic RT-qPCR. Depending on the viral load in the sample, positive samples were further subtyped using the RITA method (Hassan et al. 2022) (higher viral loads, < Cq 34) or initially tested only for the two notifiable subtypes (H5 and H7; lower viral loads). If H5 or H7 were detected, the pathotype was also examined depending on the HA cleavage site sequence.

In 27 of the 44 (61%) field samples collected from wild bird habitats, fragments of the RNA genome of influenza A viruses were detected by generic RT-qPCR. A total of nine samples had to be retested after a dilution step due to high concentrations of PCR inhibitors in the sample. The Cq values determined were between Cq=33.7 and Cq=39.7 and represent low viral loads. In one sample the H6N2 subtype was detected, in three other samples the H5 subtype was detected. Samples taken from HPAIV outbreak flocks all tested positive for AIV, but only two tested positive for H5, whereas samples taken from sick birds in these flocks all tested highly positive for HPAIV H5N1. No AIV genomic material was detected in the five water samples collected from the Antarctic Weddell Sea. None of the routinely collected positive samples showed infectious virus by culturing on MDCK II cells.

### **3.2.6 AIV detection in sediment**

In addition to the water samples, RNA was also extracted from 36 sediments taken in parallel with the water sampling from the same sampling area. The Ct values obtained ranged from 32.1 to 38.0. AIV could be detected in 18 of the 36 (50%) sediment samples. In total, six different (2, 4, 5, 6, 7 and 9) HA and three (3, 6 and 9) NA subtypes could be identified. Only one sample was successfully pathotyped.

### **3.2.7 Examination of the tenacity of avian influenza viruses in water**

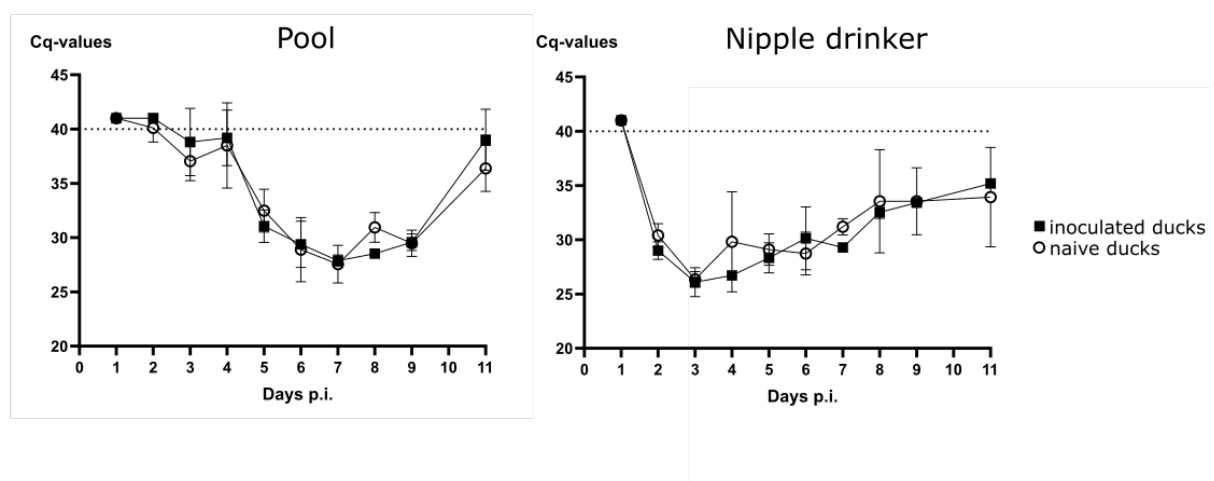
The transmissibility of AIV depends on their infectivity. The ability of viruses to remain infectious outside of host organisms for a certain period of time is referred to as tenacity. Viruses with a lipid envelope, such as influenza A viruses, are considered less tenacious than non-enveloped viruses (e.g. enteroviruses). However, the scientific literature points to an above-average tenacity of avian influenza A viruses, which can remain infectious for days to months depending on water temperature, pH and salinity (Brown et al. 2009; Poulson et al. 2016 ). This

could be a selection criterion that confers enhanced transmissibility to viruses. In the current study, an attempt was made to simulate water conditions in the laboratory as they prevail throughout the year in the Greifswalder Bodden (region with a high density of AIV-positive water bird populations). Salinity and pH were adjusted accordingly and test viruses resuspended in this water were exposed to the annual temperature change of the Greifswald Bodden (between +3 and +20°C) on a monthly basis. It was planned to take aliquots of the test viruses at 14-day intervals and to test their infectivity in cell and egg cultures in titration experiments. However, due to a technical failure of a device in the experimental set-up, the entire infectivity was inactivated, which was only noticed at a time when a repetition of the experiment was no longer feasible due to the approaching end of the project.

### 3.2.8 Investigations on the importance of surface water as a transmission medium of avian influenza viruses

In an approved animal experiment with hand-reared commercial mallard ducks, the influence of surface water on the transmissibility of AIV infections in these reservoir hosts was investigated in different constellations. In the first part of the experiment, the groups of animals were offered either a pool with 100 L of drinking and bathing water (simulating shallow water bodies in the habitat) or a nipple drinker (simulating a commercial duck fattening facility). Two ducks were oro-oculonasally infected with LPAIV (H4N6) and HPAIV (H5N8), respectively, and associated each with a group of 8 ducks the following day. Virus transmission between the inoculated and the added animals occurred in each of the groups. However, the course of infection differed (Fig. 4). In the nipple drinker groups, infection was prolonged, i.e. animals became positive very quickly, and the entire group showed virus excretion for almost ten days. The pool groups, on the other hand, showed a compressed infection and were only active as virus excretors for a few days. A smaller water volume (nipple drinker, as in livestock farms) seems to support a faster virus spread.

**Figure 9: Course of the viral load of an LPAIV infection in mallards depending on the drinking source (pool versus nipple drinker)**

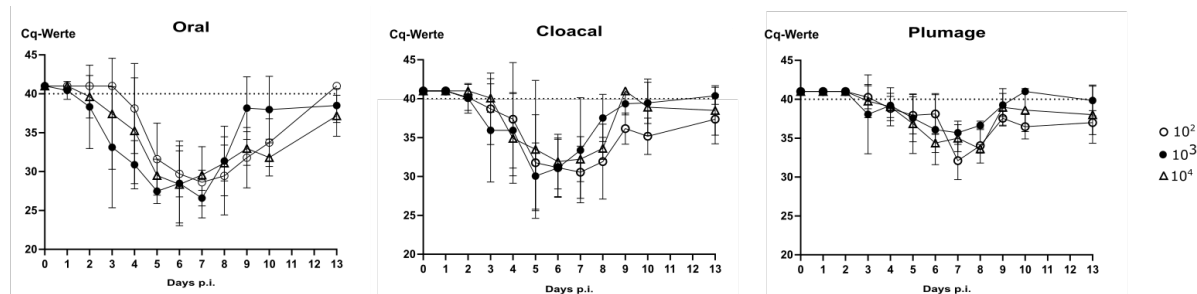


The figure shows the AI viral loads (LPAI, feather swabs) determined by RT-qPCR as a function of the drinking water source. Source: Ahrens AK, Selinka HC, Mettenleiter TC, Beer M, Harder TC. Exploring surface water as a transmission medium of avian influenza viruses - systematic infection studies in mallards. *Emerg Microbes Infect.* 2022 Dec;11(1):1250-1261. doi: 10.1080/22221751.2022.2065937.



In the second part of the experiment, the minimum required HPAIV infective dose ( $10^2$ ,  $10^3$ , or  $10^4$  TCID<sub>50</sub>/L) needed to trigger successful infection should be determined. In addition, previously published results indicating that electrostatic virus attachment to plumage is sufficient for virus dissemination should be investigated. Regardless of the initial HPAIV virus concentration exposed to the pool once at the start of the trial, all swab samples from animals in all concentration groups showed a similar course of infection; an increase in viral load up to day five to seven post-infection, followed by a decrease in viral load until the end of the trial (cf. Fig. 10).

**Figure 10: Course of HPAIV infection in mallard ducks as a function of the initial HPAIV infective dose in surface water ( $10^2$ ,  $10^3$  or  $10^4$  TCID<sub>50</sub>/L water)**



Oral - infection load measured by RT-qPCR in oropharyngeal swabs; Cloacal - swabs taken cloacally; Plumage - swab sample obtained by rubbing a swab on the breast plumage.

Source: Ahrens AK, Selinka HC, Mettenleiter TC, Beer M, Harder TC. Exploring surface water as a transmission medium of avian influenza viruses - systematic infection studies in mallards. *Emerg Microbes Infect.* 2022 Dec;11(1):1250-1261. doi: 10.1080/22221751.2022.2065937.

The maximum virus loads achieved showed comparable values, so that it can be concluded that a lower initial infection dose does not necessarily lead to a lower virus load in the course of the experiment. It remains crucial that at least one of the four test ducks picks up the infection from the water, replicates the virus and thus infects further contact animals in the pool.

It was suspected that even AIV electrostatically adhering to the plumage of uninfected ducks was sufficient to transmit infection between different bodies of water. Although considerable viral loads were measured on the plumage in the experiment (Fig. 5), a transmission attempt with virus-loaded plumage from an uninfected mallard duck failed.

The results were published in May 2022 together with the project partner in the journal "Emerging Microbes & Infections", cf. (Ahrens et al. 2022).

## 4 Achievement of objectives of the research project

### Summary of the achievement of objectives of the research project

Within the framework of the research project, it was possible to demonstrate:

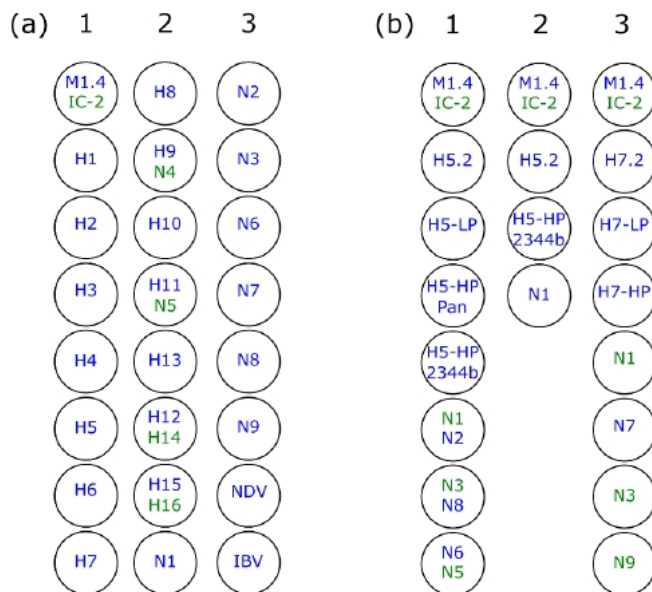
- ▶ Ultrafiltration procedures, such as the method established here using Rexeed™-25-A columns, can enrich avian influenza viruses (AIV) from surface water.
- ▶ The AIV incidence of surface water samples from avifaunistically rich shallow water areas is high (61% positive samples).
- ▶ However, the viral loads of such samples are low, so that complete molecular virological sub- and pathotyping, as well as classical virus isolation, remain unpromising.
- ▶ AIVs can also be detected in sediments taken in parallel, but with the same disadvantages of low viral loads as in water samples.
- ▶ Different AIV subtypes were detected in the water or the associated sediment, so that the different matrices may also represent different virus populations. Even very small doses of virus resuspended in water can cause productive infections in mallards.
- ▶ Small amounts of virus-contaminated drinking water accelerate the onset and dilate the course of AIV infection in mallards.
- ▶ Surface water is of considerable importance in the epidemiology of AIV infection in reservoir hosts such as mallards. A risk of zoonotic transmission of such AIV resuspended in water to humans, e.g. at bathing lakes, cannot be excluded, but is considered negligible in view of the low viral loads of such water samples measured here.

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Diagnostik

Verschiedene Sub- und Pathotypen aviärer Influenzaviren (AIV) kommen gemeinsam in gleichen Regionen, Habitaten, ja sogar einzelnen Vogelindividuen vor. Dies kompliziert eine erregerspezifische Diagnose erheblich. Eine verlässliche und rasche Diagnose, die bis zur Sub- und Pathotypebene reicht, ist jedoch die Grundlage für die Bekämpfung anzeigepflichtiger AIV-Infektionen bei Wildvögeln und Geflügel. Die Echtzeit-RT-PCR (RT-qPCR) hat sich in den letzten Jahren zu einem Standard-Diagnoseinstrument entwickelt und wird hier in einem Array mit insgesamt 24 RT-qPCR Reaktionen zur vollständigen Subtypisierung von 16 Hämagglutinin- und neun Neuraminidase-Subtypen von AIV eingesetzt. Dieser Array, der als Riems Influenza A Typing Array, Version 2 (RITA-2), bezeichnet wird, stellt eine aktualisierte und ökonomisierte Version des RITA-1-Arrays dar, der zuvor von Hoffmann et al. 2016 veröffentlicht wurde. RITA-2 bietet eine verbesserte Integration der Einzeltests (24 statt 32 parallele Reaktionen) und ein reduziertes Testvolumen (12,5 statt 25 µL). Außerdem werden RT-qPCRs zum Nachweis von Newcastle Disease (NDV) und Infektiösen Bronchitis-Viren (IBV) hinzugefügt, die wichtigen Differentialdiagnosen der AIV Infektion darstellen. Darüber hinaus maximiert RITA-2 die Inklusivität aller Sequenzen innerhalb eines Subtyps und deren Exklusivität in der Detektion, d.h. die Vermeidung von intersubtypischen Kreuzreaktionen. Das offene Format von RITA-2 ist besonders geeignet für die Anpassung des Arrays an verschiedenen epidemiologische Situationen: Es ist möglich, ausgewählte RT-qPCRs zu entkoppeln und neu anzuordnen, um spezifische AIV-Varianten nachzuweisen, die epizootische Ausbrüche mit zeitlicher und/oder geografischer Begrenzung verursachen. Der RITA-2 Assay und seine Erweiterungen wurden im Rahmen dieser Studie entwickelt und liefern das zentrale Werkzeug für den hochsensitiven und spezifischen Nachweis von AIV auch in Wasserproben. Die Publikation Hassan KE, Ahrens AK, Ali A, El-Kady MF, Hafez HM, Mettenleiter TC, Beer M, Harder T. Improved Subtyping of Avian Influenza Viruses Using an RT-qPCR-Based Low Density Array: 'Riems Influenza a Typing Array', Version 2 (RITA-2). *Viruses*. 2022 Feb 17;14(2):415. doi: 10.3390/v14020415 stellt die Details der Entwicklung, Validierung und Anwendung im Felde vor.

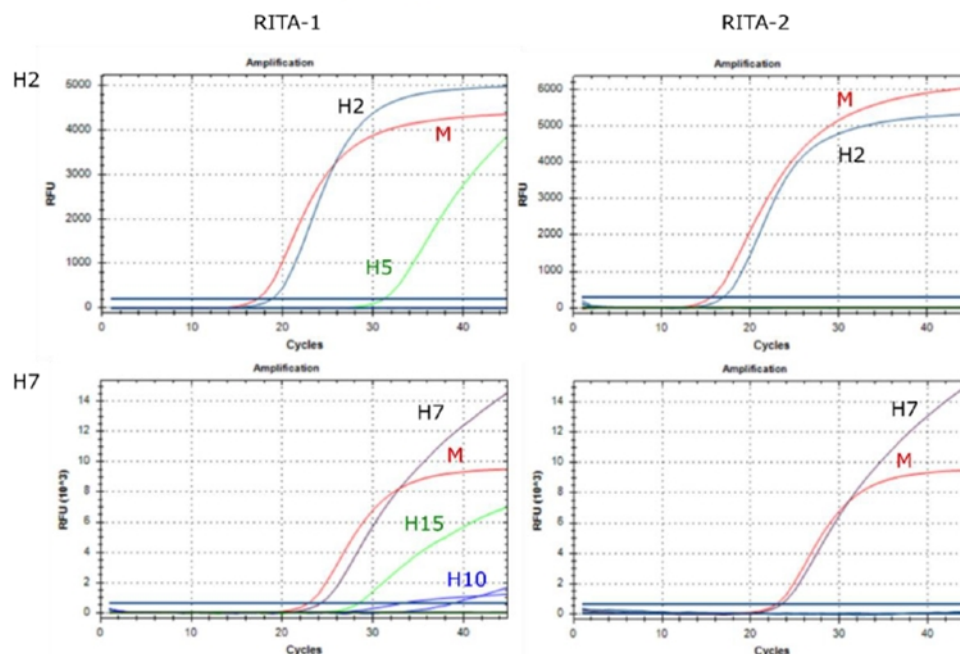
**Abbildung 11: Vergleich verschiedener Plattenbelegungsformate zur Sub- und Pathotypisierung aviärer Influenzaviren mittels RT-qPCR**



Die Abbildung (entnommen aus Hassan et al., 2022) zeigt im schematischen Vergleich die Plattenbelegung für das RITA2-System (links) als auch für diverse weitere Zusammenstellungen von real time RT-PCRs. Blau kennzeichnet Signaldetektion mittels Fluoreszenz Messung im FAM-Kanal, wohingegen die grün gekennzeichneten Parameter im HEX-Kanal gemessen werden.

Quelle: Hassan KE, Ahrens AK, Ali A, El-Kady MF, Hafez HM, Mettenleiter TC, Beer M, Harder T. Improved Subtyping of Avian Influenza Viruses Using an RT-qPCR-Based Low Density Array: 'Riems Influenza a Typing Array', Version 2 (RITA-2). Viruses. 2022 Feb 17;14(2):415. doi: 10.3390/v14020415.

**Abbildung 12: Beispiele der Subtypdifferenzierung (H2 und H7) in Abhängigkeit verschiedener RT-qPCR Versionen**



Die dargestellten Amplifikationsplots zeigen die Messunterschiede einer Probe (H2 bzw. H7) in Abhängigkeit der benutzten RITA-Version (Version 1 oder 2). Die Proben im RITA-2-System werden mit höherer Sensitivität und Spezifität detektiert,

wohingegen in einer älteren RITA Version bei dem Subtyp H2 falsch positiv H5 und bei dem Subtyp H7 falsch positiv H10 und H15 mit detektiert wurden. Quelle: Hassan KE, Ahrens AK, Ali A, El-Kady MF, Hafez HM, Mettenleiter TC, Beer M, Harder T. Improved Subtyping of Avian Influenza Viruses Using an RT-qPCR-Based Low Density Array: 'Riems Influenza a Typing Array', Version 2 (RITA-2). *Viruses*. 2022 Feb 17;14(2):415. doi: 10.3390/v14020415.

Um die AIV-Diagnostik zu verbessern wurden die verwendeten Primer-Oligos an die aktuell zirkulierenden AIV-Sequenzen angepasst. Darüber hinaus, wurde durch Doppel Belegungen der Platten eine umfassendere Diagnostik erreicht. Zusätzlich verringert sich durch die Doppelbelegung die Anzahl an PCR-Vertiefungen. Sodass, nun anstatt drei Proben vier Proben parallel und umfassender getestet werden können (RITA-2). Desweiteren, wurde aus den aus dem System die relevanten Primer-Sonden-Mixe für die beiden Anzeigepflichtigen Subtypen H5 und H7 zusammen mit den Sequenzen für die spezifische Pathotypisierung sowie die aktuell relevanten NA-Subtypen so aufgetragen, dass eine vor befundete Probe innerhalb von Acht-Vertiefungen hinsichtlich des Anzeigepflichtigen Subtypes, der Pathogenität und seines NA-Subtypes diagnostiziert werden kann (Riemser-Achter).

Die vollständige Publikation kann unter Hassan, K.E.; Ahrens, A.K.; Ali, A.; El-Kady, M.F.; Hafez, H.M.; Mettenleiter, T.C.; Beer, M.; Harder, T. Improved Subtyping of Avian Influenza Viruses Using an RT-qPCR-Based Low Density Array: 'Riems Influenza a Typing Array', Version 2 (RITA-2). *Viruses* 2022, 14, 415. <https://doi.org/10.3390/v14020415> gefunden werden.

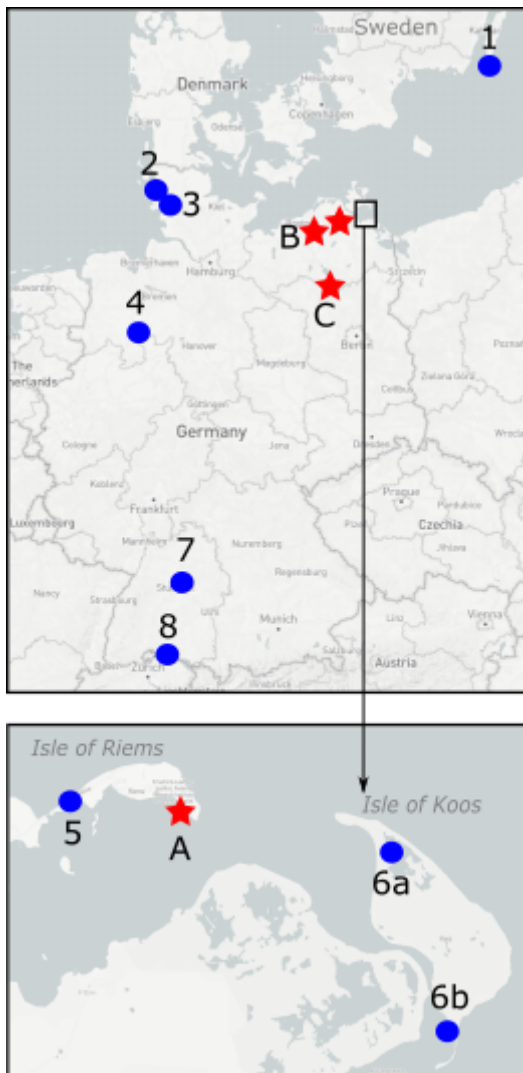
## **5.2 Etablierung und Validierung eines Ultrafiltrationsverfahrens zur Anreicherung aviärer Influenzaviren aus Oberflächenwasser**

Das Monitoring von Wildvogelpopulationen auf aviäre Influenzaviren liefert wichtige Basisdaten zur Epidemiologie der AIV. Es dient auch der Frühwarnung vor hochpathogenen AIV, die, aus Wildvogelpopulationen auf Geflügel übertragen, zu schweren, verlustreichen Infektionen im Geflügel führen und massive ökonomische Schäden begründen. Die Beprobung einzelner Wasservögel ist schwierig und vielfach eingeschränkt (z.B. aufgrund des Arten- und Habitatschutzes). Umweltproben aus den Habitaten der Vögel, wie Oberflächenwasser, Sedimente und in der Umwelt abgelagerten frischen Vogelkot als Matrices für den AIV-Nachweis könnten hier Erleichterungen in der Beprobung ermöglichen. Die in der Umwelt nachzuweisenden Viren stammen aus den im Habitat infizierten Vögeln, insofern ist mit einem gegenüber Direktproben aus den Vögeln erheblichen Verdünnungseffekt, vor allem in Oberflächenwasser zu rechnen. Daher ist eine Anreicherung der Viruspartikel aus diesen Matrices vor ihrem molekular-virologischen Nachweis unabdingbar. Hier wurde ein Ultrafiltrationsverfahren mit 10L Oberflächenwasserproben unter Verwendung von Rexeed™-25-A Systemen weiterentwickelt und validiert. Hierzu wurde ein internes Kontroll- und Normierungswerkzeug mit dem Bakteriophagen  $\phi 6$  etabliert, und mit dem AIV-Nachweis mittels RT-qPCR kombiniert. Während die Validierungsläufe eine durchschnittliche Anreicherung um das 60-fache ergaben, wurden bei Feldwasserproben niedrigere Werte von 10-15-fach gemessen. Insgesamt wurden 25/36 (61%) der Wasserproben und 18/36 (50 %) der entsprechenden Sedimentproben, die während einer HPAIV-Epidemie aus flachen Gewässern in avifaunistisch reichen Wasservogelhabitaten entnommen wurden, AIV-positiv getestet. Die in diesen Proben gefundenen AIV-Viruslasten waren jedoch im Allgemeinen zu niedrig für eine Virusisolierung oder eine weitere Sub- und Pathotypisierung, wie dies bei anderen Proben, z. B. in der Umwelt abgelagertem Vogelkot, der Fall war. Darüber hinaus spiegelte das durch diese aktiven Überwachungsmethoden nach-

gewiesene Virusspektrum nicht vollständig eine laufende HPAIV-Epidemie unter anseriformen Wildvögeln wider, wie sie durch die passive Überwachung festgestellt wurde, die in Bezug auf die Empfindlichkeit nach wie vor unübertroffen ist.

Im Rahmen des Projektes wurde ein Verfahren zur Virusaufreinigung aus Wasserproben weiterentwickelt. Darüber hinaus, wurden zwei weitere Methoden zu erweiterter Anreicherung ausprobiert, sowie eines Bakteriophagen gestützte interne Kontrolle für das Versuchsvorhaben erprobt. Das etablierte System wurde dann auf verschiedene Oberflächenwasserproben angewandt. Die Probenentnahme variierte von Probenort zu Probenort. Darüber hinaus wurden Wasserproben untersucht aus der unmittelbaren Nähe eines bereits gesicherten HPAIV Ausbruches. Diese und weitere umfassende Ergebnisse dieses Teilprojektes können der Publikation Investigating environmental matrices for use in avian influenza virus surveillance – surface water, sediments and avian fecal samples; Ann Kathrin Ahrens, Hans-Christoph Selinka, Claudia Wylezich, Hubert Wonnemann, Ole Sindt, Hartmut H. Hellmer, Florian Pfaff, Dirk Höper, Thomas C. Mettenleiter, Martin Beer and Timm C. Harder, under revision in Microbiology Spectrum entnommen werden.

Abbildung 13 Geografische Lokalisation der Probenentnahmen

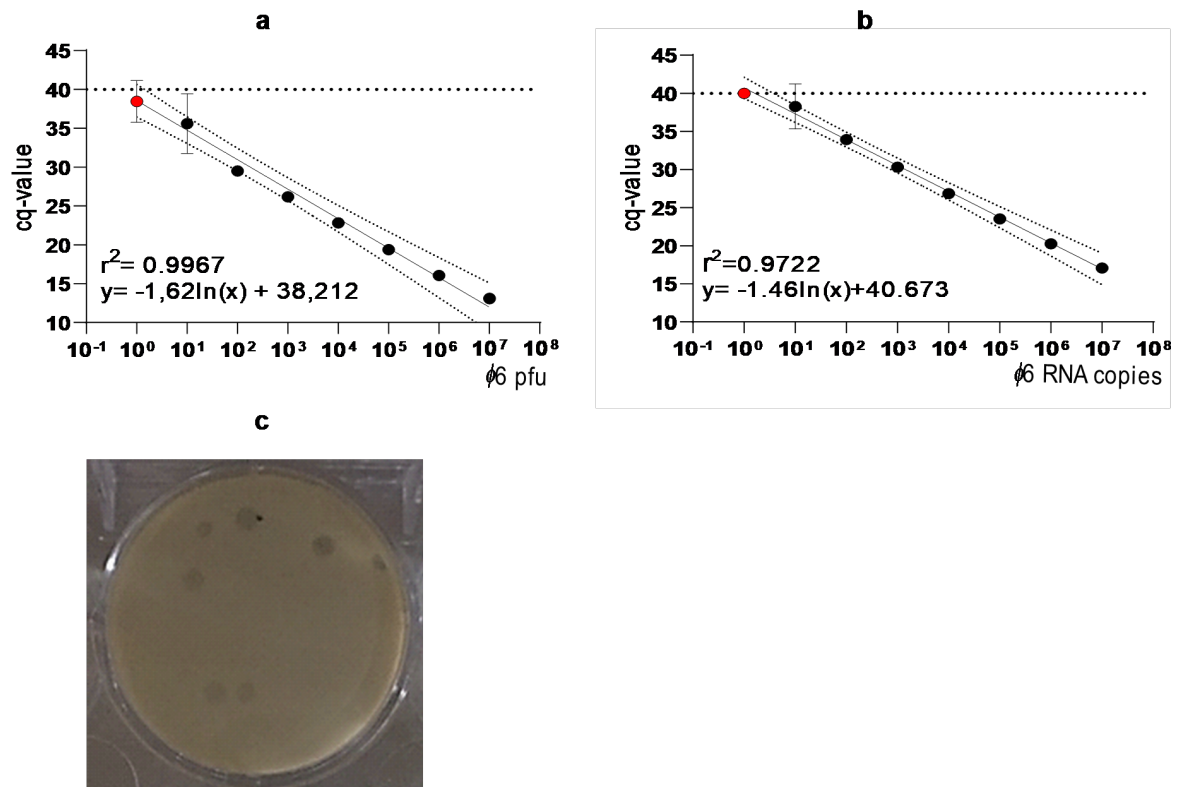


Die Abbildung zeigt die geographische Lokalisation der entnommenen Routine (blau) und Ausbruchspuren (rot). Die Proben wurden dann wie in **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.** beschrieben weiterbehandelt. Die daraus extrahierte RNA wurde im Anschluss auf AIV getestet. Hierfür, wurden Primer-Sonden-Mixe aus dem in 5.1 beschriebenen Verfahren genutzt. Um die einzelnen Läufe miteinander vergleichen zu können, wurde vor der eigentlichen Aufreinigung eine definierte Menge des Bakteriophagen Phi6 hinzugegeben. Die Validierungsdaten dazu sind in der nachfolgenden Abbildung dargestellt.

*Quelle:* Investigating environmental matrices for use in avian influenza virus surveillance – surface water, sediments and avian fecal samples; Ann Kathrin Ahrens, Hans-Christoph Selinka, Claudia Wylezich, Hubert Wonnemann, Ole Sindt, Hartmut H. Hellmer, Florian Pfaff, Dirk Höper, Thomas C. Mettenleiter, Martin Beer and Timm C. Harder, under revision in Microbiology Spectrum.



**Abbildung 14 Leistungscharakteristika der etablierten Phi6-Diagnostik**



Die kombinierte Abbildung zeigt in „a“ den Vergleich der mittels RT-qPCR gemessenen Cq-Werte als semiquantitatives Maß der spezifischen RNA Konzentration gegen die Infektiositätstiter gemessen im Phi6-Plaquetest. Es ergibt sich eine exzellente Korrelation, so dass Cq-Werte in Relation zur Infektiosität gesetzt werden können. In Teilabbildung „b“ wurden die RT-qPCR Cq-Werte gegen eine Verdünnungsreihe von Phi6-RNA-Kopien aufgetragen. Auch hier ergibt sich eine sehr gute Korrelation. Die Teilabbildung „c“ zeigt Phi6-Typsiche Plaques in einer Mehrwellplatte.

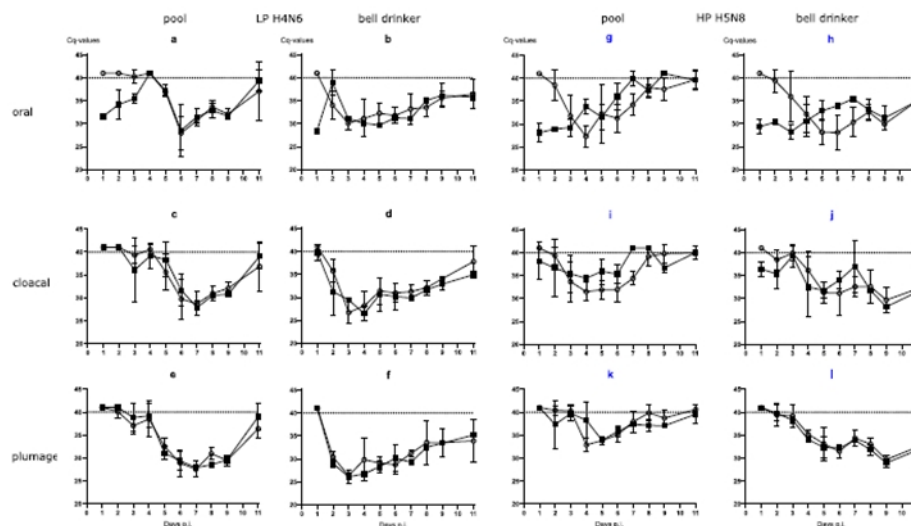
*Quelle:* Investigating environmental matrices for use in avian influenza virus surveillance – surface water, sediments and avian fecal samples; Ann Kathrin Ahrens, Hans-Christoph Selinka, Claudia Wylezich, Hubert Wonnemann, Ole Sindt, Hartmut H. Hellmer, Florian Pfaff, Dirk Höper, Thomas C. Mettenleiter, Martin Beer and Timm C. Harder, under revision in Microbiology Spectrum.

### 5.3 Ergebnisse zur Bedeutung von Oberflächen- und Tränkewasser für die Übertragung aviärer Inflenzaviren

Es sollten Kenntnisse über die HP- bzw. LPAIV-Virusübertragungsdynamik in Abhängigkeit von Wasser- bzw. Tränkequellen (Pool und Stülptränke) gewonnen werden. Hierzu wurde ein tierexperimenteller Ansatz gewählt. Entengruppen, die in Ställen mit Stülptränken gehalten wurden, stellen hierbei eine Trockenstallhaltung nach, wie sie in kommerziellen Entenmastbetrieben vorzufinden ist. Die Gruppenhaltung mit einem Pool (100L) simuliert offene Gewässer in Feuchtgebieten. Desweiteren sollte die Virusdosis bestimmt werden, welche mindestens benötigt wird, um eine AIV-Infektion erfolgreich, allein über das Wasser als Übertragungsmedium, zu induzieren. Modi der Virusübertragung innerhalb der Versuchsgruppen wurden durch tägliche Tupferprobennahmen aus dem Oropharynx und der Kloake sowie durch Abstrichtupfer des Brustgefieders untersucht. Es konnten neue Erkenntnisse über die unter-

schiedlichen Infektionsverläufe, in Abhängigkeit von der Verfügbarkeit verschiedener Wasser- und Tränkequellen gewonnen werden. So zeigte sich eine wesentlich raschere Virusausbreitung in Gruppen mit Stülptränkenhaltung, die auch über einen längeren Zeitraum Virus-positiv blieben. In Versuchsgruppen mit Pool lief dagegen die Infektion mit erheblicher Verzögerung an, kulminierte aber rascher, und das Virus wurde schneller eliminiert. Im zweiten Versuchsteil konnte die minimale Virusdosis für eine Infektion via Poolwasser als ausschließliche Infektionsquelle bestimmt werden. Hierfür waren erstaunlich geringe Virustiter erforderlich. Sobald das erste Tier sich infiziert hatte, breitete sich die Infektion schnell in der Gruppe aus. Hierzu trug die massive Virusausscheidung infizierter Tiere bei, und auch das Poolwasser, das die Enten zum Schwimmen und als einzig verfügbare Tränke nutzten, wies nach kurzer Zeit sehr hohe Virustiter auf. Oberflächenwasser spielt daher eine wichtige Rolle als Infektionsmedium für Wasservögel.

**Abbildung 15. Dynamik einer Infektion mit niedrig (H4N6) oder hoch pathogenen (H5N8) aviären Inflenzaviren bei Stockenten in Abhängigkeit von der Verfügbarkeit verschiedener Tränkewasserquellen.**



Die Ausscheidung viraler RNA gemessen mittels RT-qPCR über einen zehntägigen Versuchsverlauf ist dargestellt. Verglichen werden dabei die Tupferentnahmeorte (Oral, Kloakal und Gefieder), die unterschiedliche Wasserquelle (Nippeltränke und Pool), das Infektionsvirus (LP-H4N6 und HP-H5N8) sowie ob es sich um direkte oder indirekt infizierte Tiere handelt. Die Ergebnisse zeigen, dass ungeachtet des AIV-Subtyps und des Beprobungsmodus AIV-Ausscheidung früher bei den Tieren detektiert werden kann, welche die Nippeltränke als Wasserquelle hatten. Die Infektion der Pool-Tiere setzt um einige Tage verzögert ein. Jedoch, durchlaufen die Pool-Tiere die Infektion deutlich schneller als die Nippeltränkentiere.

Quelle: Ahrens AK, Selinka HC, Mettenleiter TC, Beer M, Harder TC. Exploring surface water as a transmission medium of avian influenza viruses - systematic infection studies in mallards. *Emerg Microbes Infect.* 2022 Dec;11(1):1250-1261. doi: 10.1080/22221751.2022.2065937

Dieser tierexperimentelle Versuch zeigte, dass bereits die Darreichungsform des Tränkewaser, das hier auch als Virusträgermedium fungiert, einen Einfluss auf die Infektionsdynamik hat. So zeigten die beiden Tiergruppen mit der Nippeltränke, dass dort eine Infektion deutlich früher und insgesamt über einen längeren Zeitraum verläuft als bei den Pool-Gruppen. Vollständige Ergebnisse und weiterführende Diskussionen können der Publikation Ahrens AK, Selinka HC, Mettenleiter TC, Beer M, Harder TC. Exploring surface water as a transmission medium of avian influenza viruses - systematic infection studies in mallards. *Emerg Microbes Infect.* 2022 Dec;11(1):1250-1261. doi: 10.1080/22221751.2022.2065937 entnommen werden.

## 5.4 Schlussfolgerungen und Ausblick

Das Forschungsprojekt zielte auf den vertieften Erkenntnisgewinn des Zusammenspiels von AIV und Wasser als Übertragungsmedium ab. Hierzu wurden zwei Hauptzielstellungen seitens des UBAs formuliert, welche durch die Teilprojekte bearbeitet wurden. Die Ergebnisse der Teilvorhaben sind im Folgenden stichpunktartig zusammengefasst.

- ▶ Entwicklung eines mehrstufigen Nachweisverfahrens für (aviäre) Influenzaviren in Wasserproben bestehend aus Virusanreicherung aus der Wasserprobe, molekularbiologischem Nachweis und Charakterisierung der vorhandenen Influenzaviren sowie Vitalitätstests zur Einschätzung des infektiösen Potentials.
  - Durch Filtrationsverfahren, insbesondere durch die Ultrafiltration mit Rexeed™-25-A ist es möglich, AI-Viren aus dem Wasser anzureichern. Andere parallel getestete Filtrationsverfahren sowie Ultrazentrifugation führten nicht zu verbesserten Anreicherungsresultaten.
  - In vielen Wasserproben, die aus Oberflächenwasser flacher Wasserkörper in avifaunistisch reichen Gebieten gewonnen wurden, konnten AIV nachgewiesen werden. Hierbei erwiesen sich vor allem aus Proben aus kleineren, geschlossenen und flachen Gewässern mit hohem Wasservogelbesatz als eher geeignet für den Nachweis.
  - Die Viruslasten in den Proben erwiesen sich als sehr gering; Infektiosität konnte nicht detektiert werden. Dies kann jedoch eine Folge der geringen Viruslasten in den Ausgangsproben sein. Allerdings müssen auch weitere biotische und abiotische Einflussfaktoren aus den Oberflächenwasser und Sedimentproben berücksichtigt werden, denn mit artifiziell virusdotierten Leitungswasserproben war eine deutlich effizientere Virusanreicherung zu konstatieren.
  - Verschiedene AIV-Subtypen wurden parallel in den Wasserproben detektiert. Dies deutet darauf hin, dass tatsächlich AIV verschiedener artspezifischer und individueller Herkünfte in diesen Proben angesetzt wurden. Im Umkehrschluss kann vermutet werden, dass der Kontakt empfänglicher Wirtsvögel mit solchen Matrices zu simultanen Doppel- und Mehrfachinfektionen führen kann, die als Voraussetzung für Reassortierungsvorgänge die Vielfalt influenzaviraler Genome beflügelt.
  - Korrespondierende Sedimentproben wiesen nicht selten ein von der Wasserprobe abweichendes Muster detektierbarer AIV-Subtypen auf. Es wird vermutet, dass in den Sedimenten eine Speicherfunktion der zuvor in der Wassersäule dispergierten AIV zum Tragen kommt und damit ältere, vor einigen Tagen bis Wochen abgesetzte AIV repräsentiert.
- ▶ Abschätzung der Wahrscheinlichkeit einer Übertragung von (aviären) Influenzaviren über das Wasser unter Berücksichtigung von Umweltfaktoren.
  - In den hier durchgeführten Infektionsexperimenten mit authentischen, hochempfindlichen AIV-Wirtsspezies (Stockenten) konnte gezeigt werden, dass auch sehr geringe Infektionsdosen von 100 gewebe-infektiösen Dosen 50% in einem Liter Wasser ausreichen, um eine produktive AIV Infektion auszulösen.
  - In den hier untersuchten Feldproben (Oberflächenwasser und Sedimente) sind auch nach Anreicherung nur sehr geringe Viruslasten detektiert worden.

- Menschliche Infektionen mit AIV waren bislang nahezu ausschließlich auf intensiven Kontakt mit infiziertem Geflügel zurückgeführt worden; es bedarf einer Exposition gegenüber einer hohen Virusdosis, um Menschen zu infizieren. Dies ist begründet in der Tatsache, dass empfängliche Wirtszellen im Respirationstrakt des Menschen nur in den tiefen, alveolären Strukturen zu finden sind, nicht jedoch in oberen Atemwegsgeweben. Das Risiko einer menschlichen Infektion kann also als Wahrscheinlichkeit definiert werden, dass Virus von außen diese Zellen erreicht.
- Das Risiko einer menschlichen Infektion mit AIV durch Kontakt mit Wasser (z.B. in Badeseen) wird als vernachlässigbar eingeschätzt, wenn die hier gemessenen sehr geringen Viruslasten zugrunde gelegt werden.
- Höhere Virusdosen können dagegen in abgesetztem Kot infizierter Vögel erwartet werden. Intensive Kontakte von Menschen mit dieser Matrix ließe eine höhere Wahrscheinlichkeit der Infektion erwarten. In diesem Zusammenhang sind Liegewiesen an Badeseen zu nennen, die von Familien mit Kleinkindern besucht werden und gleichzeitig Wasservögel wie Graugänse als Weidebereich nutzen.
- Als weitere potentielle menschliche Infektionsquelle sind virushaltige Aerosole und Stäube zu nennen, die insbesondere bei der Räumung massiv infizierter Geflügelhaltungen entstehen können. Hier ist präventiv auf eine professionelle persönliche Schutzausrüstung der Mitarbeitenden zu achten.

Abschließend soll darauf verwiesen werden, dass aktuell hochpathogene aviäre Influenzaviren mit offenbar geringem zoonotischen Potential weiträumig und ganzjährig in Wildvögeln in Deutschland zirkulieren. Dabei kommt es gelegentlich zu Übertragungen auf Geflügelhaltungen, und auch Übertragungen zwischen Geflügelhaltungen spielen eine Rolle für die Virusverbreitung. Parallel zur Verbreitung in Vogelspezies wurden auch sporadische Infektionen fleischfressender Land- und Meeressäuger (Füchse, Otter, Seehunde) nachgewiesen, die das generelle Potential der Viren für einen Wirtswechsel unterstreichen. Bislang waren diese Fälle ausschließlich auf (alimentäre) Infektionen durch Aufnahme infizierter Vogelkadaver zurückzuführen. Übertragungen zwischen Säugetieren wurden bislang nicht beschrieben. Jede Anwesenheit dieser Viren in Säugetieren erhöht jedoch das Risiko der Adaptation dieser Viren an Säugerwirte und den Menschen. Eine engmaschige Surveillance verbunden mit einer konsequenten Prävention und Bekämpfung von Infektionen des Geflügels bleibt daher von hoher Bedeutung für die Vermeidung menschlicher Infektionen.

## 6 Quellenverzeichnis

- Adlhoch, Cornelia; Fusaro, Alice; Gonzales, José L.; Kuiken, Thijs; Marangon, Stefano; Niqueux, Éric et al. (2022): Avian influenza overview May - September 2021. In: *EFSA journal. European Food Safety Authority* 20 (1), e07122. DOI: 10.2903/j.efsa.2022.7122.
- Ahrens, Ann Kathrin; Selinka, Hans-Christoph; Mettenleiter, Thomas C.; Beer, Martin; Harder, Timm C. (2022a): Exploring surface water as a transmission medium of avian influenza viruses - systematic infection studies in mallards. In: *Emerging microbes & infections* 11 (1), S. 1250–1261. DOI: 10.1080/22221751.2022.2065937.
- Ahrens, Ann Kathrin; Selinka, Hans-Christoph; Mettenleiter, Thomas C.; Beer, Martin; Harder, Timm C. (2022b): Exploring surface water as a transmission medium of avian influenza viruses – systematic infection studies in mallards. In: *Emerging microbes & infections*, S. 1–30. DOI: 10.1080/22221751.2022.2065937.
- Alexander, Dennis J. (2007): An overview of the epidemiology of avian influenza. In: *Vaccine* 25 (30), S. 5637–5644. DOI: 10.1016/j.vaccine.2006.10.051.
- Alqazlan, Nadiyah; Astill, Jake; Raj, Sugandha; Sharif, Shayan (2022): Strategies for enhancing immunity against avian influenza virus in chickens: a review. In: *Avian pathology : journal of the W.V.P.A* 51 (3), S. 211–235. DOI: 10.1080/03079457.2022.2054309.
- Aquino de Carvalho, Nathalia; Stachler, Elyse N.; Cimabue, Nicole; Bibby, Kyle (2017): Evaluation of Phi6 Persistence and Suitability as an Enveloped Virus Surrogate. In: *Environmental science & technology* 51 (15), S. 8692–8700. DOI: 10.1021/acs.est.7b01296.
- Bárbara, Andreia; Torrontegi, Olalla; Camacho, Maria-Cruz; Barral, Marta; Hernández, Jose-Manuel; Höfle, Ursula (2017): Avian Influenza Virus Surveillance in South-Central Spain Using Fecal Samples of Aquatic Birds Foraging at Landfills. In: *Front. Vet. Sci.* 4, S. 178. DOI: 10.3389/fvets.2017.00178.
- Borgmästars, Emmy; Jazi, Mehrdad Mousavi; Persson, Sofia; Jansson, Linda; Rådström, Peter; Simonsson, Magnus et al. (2017): Improved Detection of Norovirus and Hepatitis A Virus in Surface Water by Applying Pre-PCR Processing. In: *Food and environmental virology* 9 (4), S. 395–405. DOI: 10.1007/s12560-017-9295-3.
- Brown, Justin D.; Goekjian, Ginger; Poulson, Rebecca; Valeika, Steve; Stallknecht, David E. (2009): Avian influenza virus in water: infectivity is dependent on pH, salinity and temperature. In: *Veterinary microbiology* 136 (1-2), S. 20–26. DOI: 10.1016/j.vetmic.2008.10.027.
- Chaparro, Jacqueline; Vivanco, Jorge (2013): Isolating RNA from the Soil. In: *BIO-PROTOCOL* 3 (18). DOI: 10.21769/BioProtoc.903.
- Chatziprodromidou, Ioanna P.; Arvanitidou, Malamatenia; Guitian, Javier; Apostolou, Thomas; Vantarakis, George; Vantarakis, Apostolos (2018): Global avian influenza outbreaks 2010-2016: a systematic review of their distribution, avian species and virus subtype. In: *Systematic reviews* 7 (1), S. 17. DOI: 10.1186/s13643-018-0691-z.
- Ciminski, Kevin; Schwemmle, Martin (2021): Bat-Borne Influenza A Viruses: An Awakening. In: *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 11 (2). DOI: 10.1101/cshperspect.a038612.
- Coombe, Michelle; Iwasawa, Stefan; Byers, Kaylee A.; Prystajecky, Natalie; Hsiao, William; Patrick, David M.; Himsworth, Chelsea G. (2021): A SYSTEMATIC REVIEW AND NARRATIVE SYNTHESIS OF THE USE OF ENVIRONMENTAL SAMPLES FOR THE SURVEILLANCE OF AVIAN

INFLUENZA VIRUSES IN WILD WATERBIRDS. In: *Journal of wildlife diseases* 57 (1), S. 1–18. DOI: 10.7589/JWD-D-20-00082.

Deboosere, Nathalie; Horm, Srey Viseth; Pinon, Anthony; Gachet, Jessica; Coldefy, Chloé; Buchy, Philippe; Vialette, Michèle (2011): Development and validation of a concentration method for the detection of influenza A viruses from large volumes of surface water. In: *Applied and environmental microbiology* 77 (11), S. 3802–3808. DOI: 10.1128/AEM.02484-10.

Dietze, Klaas; Graaf, Annika; Homeier-Bachmann, Timo; Grund, Christian; Forth, Leonie; Pohlmann, Anne et al. (2018): From low to high pathogenicity-Characterization of H7N7 avian influenza viruses in two epidemiologically linked outbreaks. In: *Transboundary and emerging diseases* 65 (6), S. 1576–1587. DOI: 10.1111/tbed.12906.

Dittmar, Thorsten; Koch, Boris; Hertkorn, Norbert; Kattner, Gerhard (2008): A simple and efficient method for the solid-phase extraction of dissolved organic matter (SPE-DOM) from seawater. In: *Limnol. Oceanogr. Methods* 6 (6), S. 230–235. DOI: 10.4319/lom.2008.6.230.

Elnagar, Ahmed; Harder, Timm C.; Blome, Sandra; Beer, Martin; Hoffmann, Bernd (2021): Optimizing Release of Nucleic Acids of African Swine Fever Virus and Influenza A Virus from FTA Cards (International Journal of Molecular Sciences, 22).

ENDMEMO (Hg.): DNA/RNA Copy Number Calculator. Online verfügbar unter [http://endmemo.com/bio/dnacopynum.php#:~:text=1%20\\*%2010%2D9%20\\*%206.02,each%20base%20was%20325%20dalton](http://endmemo.com/bio/dnacopynum.php#:~:text=1%20*%2010%2D9%20*%206.02,each%20base%20was%20325%20dalton).

Feare, Chris J. (2010): Role of wild birds in the spread of highly pathogenic avian influenza virus H5N1 and implications for global surveillance. In: *Avian diseases* 54 (1 Suppl), S. 201–212. DOI: 10.1637/8766-033109-ResNote.1.

Germeraad, Evelien A.; Elbers, Armin R. W.; Bruijn, Naomi D. de; Heutink, Rene; van Voorst, Wendy; Hakze-van der Honing, Renate et al. (2020): Detection of Low Pathogenic Avian Influenza Virus Subtype H10N7 in Poultry and Environmental Water Samples During a Clinical Outbreak in Commercial Free-Range Layers, Netherlands 2017. In: *Front. Vet. Sci.* 7, S. 237. DOI: 10.3389/fvets.2020.00237.

Gobbo, Federica; Fornasiero, Diletta; Marco, Maria Alessandra de; Zecchin, Bianca; Mulatti, Paolo; Delogu, Mauro; Terregino, Calogero (2021): Active Surveillance for Highly Pathogenic Avian Influenza Viruses in Wintering Waterbirds in Northeast Italy, 2020–2021. In: *Microorganisms* 9 (11). DOI: 10.3390/microorganisms9112188.

Graaf, Annika; Beer, Martin; Harder, Timm (2017): Real-time reverse transcription PCR-based sequencing-independent pathotyping of Eurasian avian influenza A viruses of subtype H7. In: *Virology journal* 14 (1), S. 137. DOI: 10.1186/s12985-017-0808-3.

Graaf, Miranda de; Fouchier, Ron A. M. (2014): Role of receptor binding specificity in influenza A virus transmission and pathogenesis. In: *The EMBO journal* 33 (8), S. 823–841. DOI: 10.1002/embj.201387442.

Hans-Christoph Selinka an Ann Kathrin Ahrens Timm C. Harder.

Hartmann, Nils Marten; Dartscht, Melanie; Szewzyk, Regine; Selinka, Hans-Christoph (2013): Monitoring of adenovirus serotypes in environmental samples by combined PCR and melting point analyses. In: *Virology journal* 10, S. 190. DOI: 10.1186/1743-422X-10-190.

Hassan, Kareem E.; Ahrens, Ann Kathrin; Ali, Ahmed; El-Kady, Magdy F.; Hafez, Hafez M.; Mettenleiter, Thomas C. et al. (2022): Improved Subtyping of Avian Influenza Viruses Using an



RT-qPCR-Based Low Density Array: 'Riems Influenza a Typing Array', Version 2 (RITA-2). In: *Viruses* 14 (2). DOI: 10.3390/v14020415.

Hill, Nichola J.; Bishop, Mary Anne; Trovão, Nídia S.; Ineson, Katherine M.; Schaefer, Anne L.; Puryear, Wendy B. et al. (2022): Ecological divergence of wild birds drives avian influenza spillover and global spread. In: *PLoS pathogens* 18 (5), e1010062. DOI: 10.1371/journal.ppat.1010062.

Hoffmann, B.; Depner, K.; Schirrmeier, H.; Beer, M. (2006): A universal heterologous internal control system for duplex real-time RT-PCR assays used in a detection system for pestiviruses. In: *Journal of Virological Methods* 136 (1-2), S. 200–209. DOI: 10.1016/j.jviromet.2006.05.020.

Hoffmann, Bernd; Harder, Timm; Lange, Elke; Kalthoff, Donata; Reimann, Ilona; Grund, Christian et al. (2010): New real-time reverse transcriptase polymerase chain reactions facilitate detection and differentiation of novel A/H1N1 influenza virus in porcine and human samples. In: *Berliner und Münchener tierärztliche Wochenschrift* 123 (7-8), S. 286–292. DOI: 10.2376/0005-9366-123-286.

Hoffmann, Bernd; Hoffmann, Donata; Henritzi, Dinah; Beer, Martin; Harder, Timm C. (2016): Riems influenza a typing array (RITA): An RT-qPCR-based low density array for subtyping avian and mammalian influenza a viruses. In: *Scientific reports* 6, S. 27211. DOI: 10.1038/srep27211.

Hoye, Bethany J.; Munster, Vincent J.; Nishiura, Hiroshi; Klaassen, Marcel; Fouchier, Ron A. M. (2010): Surveillance of wild birds for avian influenza virus. In: *Emerging infectious diseases* 16 (12), S. 1827–1834. DOI: 10.3201/eid1612.100589.

Javier, Ronald T.; Butel, Janet S. (2008): The history of tumor virology. In: *Cancer research* 68 (19), S. 7693–7706. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-08-3301.

Jiang, Wenming; Dong, Chunxia; Liu, Shuo; Peng, Cheng; Yin, Xin; Liang, Shaobo et al. (2022): Emerging Novel Reassortant Influenza A(H5N6) Viruses in Poultry and Humans, China, 2021. In: *Emerging infectious diseases* 28 (5), S. 1064–1066. DOI: 10.3201/eid2805.212163.

Kärber, G. (1931): Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche. In: *Archiv f. experiment. Pathol. u. Pharmacol* 162 (4), S. 480–483. DOI: 10.1007/BF01863914.

Keeler, Shamus P.; Dalton, Melinda S.; Cressler, Alan M.; Berghaus, Roy D.; Stallknecht, David E. (2014): Abiotic factors affecting the persistence of avian influenza virus in surface waters of waterfowl habitats. In: *Applied and environmental microbiology* 80 (9), S. 2910–2917. DOI: 10.1128/AEM.03790-13.

Killingley, Ben; Nguyen-Van-Tam, Jonathan (2013): Routes of influenza transmission. In: *Influenza and other respiratory viruses* 7 Suppl 2, S. 42–51. DOI: 10.1111/irv.12080.

King, Jacqueline; Harder, Timm; Conraths, Franz J.; Beer, Martin; Pohlmann, Anne (2021): The genetics of highly pathogenic avian influenza viruses of subtype H5 in Germany, 2006-2020. In: *Transboundary and emerging diseases* 68 (3), S. 1136–1150. DOI: 10.1111/tbed.13843.

Kramberger, Petra; Urbas, Lidija; Štrancar, Aleš (2015): Downstream processing and chromatography based analytical methods for production of vaccines, gene therapy vectors, and bacteriophages. In: *Human vaccines & immunotherapeutics* 11 (4), S. 1010–1021. DOI: 10.1080/21645515.2015.1009817.

Krammer, Florian; Smith, Gavin J. D.; Fouchier, Ron A. M.; Peiris, Malik; Kedzierska, Katherine; Doherty, Peter C. et al. (2018): Influenza. In: *Nature reviews. Disease primers* 4 (1), S. 3. DOI: 10.1038/s41572-018-0002-y.



Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Hg.) (2008): Supply, Storage and Propagation of Supply, Storage and Propagation of Phages. Special Instructions. Online verfügbar unter <https://www.dsmz.de/fileadmin/Bereiche/Microbiology/Dateien/Kultivierungshinweise/Phages-neu.pdf>.

Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Hg.) (2011): 545. TRYPTONE SOYA BROTH (TSB). Online verfügbar unter [https://www.dsmz.de/microorganisms/medium/pdf/DSMZ\\_Medium545.pdf](https://www.dsmz.de/microorganisms/medium/pdf/DSMZ_Medium545.pdf).

Leung, Y. H. Connie; Zhang, Li-Juan; Chow, Chun-Kin; Tsang, Chun-Lok; Ng, Chi-Fung; Wong, Chun-Kuen et al. (2007): Poultry drinking water used for avian influenza surveillance. In: *Emerging infectious diseases* 13 (9), S. 1380–1382. DOI: 10.3201/eid1309.070517.

Li, Jun; Fang, Yezhen; Qiu, Xiaofeng; Yu, Xinfen; Cheng, Shi; Li, Na et al. (2022): Human infection with avian-origin H5N6 influenza A virus after exposure to slaughtered poultry. In: *Emerging microbes & infections* 11 (1), S. 807–810. DOI: 10.1080/22221751.2022.2048971.

Li, Yao-Tsun; Linster, Martin; Mendenhall, Ian H.; Su, Yvonne C. F.; Smith, Gavin J. D. (2019): Avian influenza viruses in humans: lessons from past outbreaks. In: *British medical bulletin* 132 (1), S. 81–95. DOI: 10.1093/bmb/ldz036.

Lickfett, Todd M.; Clark, Erica; Gehring, Thomas M.; Alm, Elizabeth W. (2018): Detection of Influenza A viruses at migratory bird stopover sites in Michigan, USA. In: *Infection ecology & epidemiology* 8 (1), S. 1474709. DOI: 10.1080/20008686.2018.1474709.

McLean, Rebecca K.; Graham, Simon P. (2022): The pig as an amplifying host for new and emerging zoonotic viruses. In: *One health (Amsterdam, Netherlands)* 14, S. 100384. DOI: 10.1016/j.onehlt.2022.100384.

Mehle, Nataša; Gutiérrez-Aguirre, Ion; Kutnjak, Denis; Ravnikar, Maja (2018): Water-Mediated Transmission of Plant, Animal, and Human Viruses. In: *Advances in virus research* 101, S. 85–128. DOI: 10.1016/bs.aivir.2018.02.004.

Minh, Aline Do; Kamen, Amine A. (2021): Critical Assessment of Purification and Analytical Technologies for Enveloped Viral Vector and Vaccine Processing and Their Current Limitations in Resolving Co-Expressed Extracellular Vesicles. In: *Vaccines* 9 (8). DOI: 10.3390/vaccines9080823.

Mohammed, Sule L.; Lehmann, Harold P.; Kim, George R. (2009): A proposed taxonomy for characterization and assessment of avian influenza outbreaks. In: *International journal of medical informatics* 78 (3), S. 182–192. DOI: 10.1016/j.ijmedinf.2008.06.015.

Mulholland, Catherine; McMenamy, Michael J.; Hoffmann, Bernd; Earley, Bernadette; Markey, Bryan; Cassidy, Joseph et al. (2017): The development of a real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (rRT-PCR) assay using TaqMan technology for the pan detection of bluetongue virus (BTV). In: *Journal of Virological Methods* 245, S. 35–39. DOI: 10.1016/j.jviromet.2017.03.009.

Naguib, Mahmoud M.; Graaf, Annika; Fortin, Andrea; Luttermann, Christine; Wernery, Ulrich; Amarín, Nadim et al. (2017): Novel real-time PCR-based patho- and phylotyping of potentially zoonotic avian influenza A subtype H5 viruses at risk of incursion into Europe in 2017. In: *Euro surveillance : bulletin Européen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin* 22 (1). DOI: 10.2807/1560-7917.ES.2017.22.1.30435.

- Nandi, Aadrita; Allen, Linda J. S. (2021): Probability of a zoonotic spillover with seasonal variation. In: *Infectious Disease Modelling* 6, S. 514–531. DOI: 10.1016/j.idm.2021.01.013.
- Nazir, Jawad; Haumacher, Renate; Ike, Anthony; Stumpf, Petra; Böhm, Reinhard; Marschang, Rachel E. (2010): Long-term study on tenacity of avian influenza viruses in water (distilled water, normal saline, and surface water) at different temperatures. In: *Avian diseases* 54 (1 Suppl), S. 720–724. DOI: 10.1637/8754-033109-ResNote.1.
- Nazir, Jawad; Haumacher, Renate; Ike, Anthony C.; Marschang, Rachel E. (2011): Persistence of avian influenza viruses in lake sediment, duck feces, and duck meat. In: *Applied and environmental microbiology* 77 (14), S. 4981–4985. DOI: 10.1128/AEM.00415-11.
- Nuñez, Ivette A.; Ross, Ted M. (2019): A review of H5Nx avian influenza viruses. In: *Therapeutic advances in vaccines and immunotherapy* 7, 2515135518821625. DOI: 10.1177/2515135518821625.
- Pannwitz, G.; Wolf, C.; Harder, T. (2009): Active Surveillance for Avian Influenza Virus Infection in Wild Birds by Analysis of Avian Fecal Samples from the Environment. In: *Journal of wildlife diseases* 45 (2), S. 512–518. DOI: 10.7589/0090-3558-45.2.512.
- Pawar, Shailesh D.; Keng, Sachin S.; Tare, Deeksha S.; Thormothe, Anil L.; Sapkal, Gajanan N.; Anukumar, B. et al. (2019): A virus precipitation method for concentration & detection of avian influenza viruses from environmental water resources & its possible application in outbreak investigations. In: *The Indian journal of medical research* 150 (6), S. 612–619. DOI: 10.4103/ijmr.IJMR\_1697\_18.
- Polson, A. (1993): Purification and aggregation of influenza virus by precipitation with polyethylene glycol. 1974. In: *Preparative biochemistry* 23 (1-2), S. 207–225. DOI: 10.1080/10826069308544551.
- Poulson, R. L.; Tompkins, S. M.; Berghaus, R. D.; Brown, J. D.; Stallknecht, D. E. (2016): Environmental Stability of Swine and Human Pandemic Influenza Viruses in Water under Variable Conditions of Temperature, Salinity, and pH. In: *Applied and environmental microbiology* 82 (13), S. 3721–3726. DOI: 10.1128/AEM.00133-16.
- Rönnqvist, Maria; Ziegler, Thedi; Bonsdorff, Carl-Henrik von; Maunula, Leena (2012): Detection method for avian influenza viruses in water. In: *Food and environmental virology* 4 (1), S. 26–33. DOI: 10.1007/s12560-011-9075-4.
- Sartorius Lab Instruments (2016): Vivaflow 50|50R|200 (SLU6097-e160609). Online verfügbar unter <https://www.sartorius.hr/media/elma0gg4/usermanual-en-manual-vivaflow50-200-slu6097-e.pdf>.
- Scheuch, Matthias; Höper, Dirk; Beer, Martin (2015): RIEMS: a software pipeline for sensitive and comprehensive taxonomic classification of reads from metagenomics datasets. In: *BMC Bioinformatics* 16 (1), S. 69. DOI: 10.1186/s12859-015-0503-6.
- Schrauwen, Eefje J. A.; Bestebroer, Theo M.; Munster, Vincent J.; Wit, Emmie de; Herfst, Sander; Rimmelzwaan, Guus F. et al. (2011): Insertion of a multibasic cleavage site in the haemagglutinin of human influenza H3N2 virus does not increase pathogenicity in ferrets. In: *The Journal of general virology* 92 (Pt 6), S. 1410–1415. DOI: 10.1099/vir.0.030379-0.
- Smith Carmela M.; Hill Vincent R. (2009): Dead-End Hollow-Fiber Ultrafiltration for Recovery of Diverse Microbes from Water. In: *Applied and environmental microbiology* 75 (16), S. 5284–5289. DOI: 10.1128/AEM.00456-09.

- Stallknecht, D. E.; Brown, J. D. (2009): Tenacity of avian influenza viruses. In: *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)* 28 (1), S. 59–67. DOI: 10.20506/rst.28.1.1880.
- Stumpf, Petra; Failing, Klaus; Papp, Tibor; Nazir, Jawad; Böhm, Reinhard; Marschang, Rachel E. (2010): Accumulation of a low pathogenic avian influenza virus in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*). In: *Avian diseases* 54 (4), S. 1183–1190. DOI: 10.1637/9162-111709-Reg.1.
- Sun, Xiangjie; Tse, Longping V.; Ferguson, A. Damon; Whittaker, Gary R. (2010): Modifications to the hemagglutinin cleavage site control the virulence of a neurotropic H1N1 influenza virus. In: *Journal of virology* 84 (17), S. 8683–8690. DOI: 10.1128/JVI.00797-10.
- Swayne, D. E.; Suarez, D. L. (2000): Highly pathogenic avian influenza. In: *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)* 19 (2), S. 463–482. DOI: 10.20506/rst.19.2.1230.
- Tindale, Lauren C.; Baticados, Waren; Duan, Jun; Coombe, Michelle; Jassem, Agatha; Tang, Patrick et al. (2020): Extraction and Detection of Avian Influenza Virus From Wetland Sediment Using Enrichment-Based Targeted Resequencing. In: *Front. Vet. Sci.* 7, Artikel 301. DOI: 10.3389/fvets.2020.00301.
- Verhagen, Josanne H.; Fouchier, Ron A. M.; Lewis, Nicola (2021): Highly Pathogenic Avian Influenza Viruses at the Wild-Domestic Bird Interface in Europe: Future Directions for Research and Surveillance. In: *Viruses* 13 (2). DOI: 10.3390/v13020212.
- Verhagen, Josanne H.; Lexmond, Pascal; Vuong, Oanh; Schutten, Martin; Guldemeester, Judith; Osterhaus, Albert D M E et al. (2017): Discordant detection of avian influenza virus subtypes in time and space between poultry and wild birds; Towards improvement of surveillance programs. In: *PloS one* 12 (3), e0173470. DOI: 10.1371/journal.pone.0173470.
- Webster, Robert G.; Guan, Yi; Peiris, Malik; Walker, David; Krauss, Scott; Zhou, Nan Nan et al. (2002): Characterization of H5N1 influenza viruses that continue to circulate in geese in southeastern China. In: *J Virol* 76 (1), S. 118–126. DOI: 10.1128/jvi.76.1.118-126.2002.
- WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH (Hg.) (2009): CHAPTER 2.3.4. AVIAN INFLUENZA. OIE Terrestrial Manual 2009. Online verfügbar unter [https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Animal\\_Health\\_in\\_the\\_World/docs/pdf/2.03.04\\_AI.pdf](https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Animal_Health_in_the_World/docs/pdf/2.03.04_AI.pdf).
- Wylezich, Claudia; Calvelage, Sten; Schlottau, Kore; Ziegler, Ute; Pohlmann, Anne; Höper, Dirk; Beer, Martin (2021): Next-generation diagnostics: virus capture facilitates a sensitive viral diagnosis for epizootic and zoonotic pathogens including SARS-CoV-2. In: *Microbiome* 9 (1), S. 51. DOI: 10.1186/s40168-020-00973-z.
- Wylezich, Claudia; Papa, Anna; Beer, Martin; Höper, Dirk (2018): A Versatile Sample Processing Workflow for Metagenomic Pathogen Detection. In: *Scientific reports* 8 (1), S. 13108. DOI: 10.1038/s41598-018-31496-1.
- Zhang, Hongbo; Chen, Qianjiao; Chen, Ze (2014): A simple and efficient method for detecting avian influenza virus in water samples. In: *Journal of Virological Methods* 199, S. 124–128. DOI: 10.1016/j.jviromet.2014.01.013.