

Aus der ¹IDT Biologika GmbH, Dessau-Roßlau und der ²Tierpathologie Dr. Vissiennon, Leipzig

Untersuchungen zur Wirksamkeit von Oseltamivir gegen H1N2 Influenzaviren bei Schweinen

von Ralf Dürrwald¹, **Théophile Vissiennon²**, Hans-Joachim Selbitz¹ und Michael Schlegel¹

(8 Abbildungen, 1 Tabelle, 22 Literaturangaben)

Kurztitel: Wirksamkeit von Oseltamivir gegen porcine Influenza

Stichworte: Antivirale Therapie – Oseltamivir – Influenza – H1N2 – Schwein

Zusammenfassung

Die Wirksamkeit von Oseltamivir (Tamiflu®) gegen H1N2 Influenzaviren wurde an Schweinen nach experimenteller simultaner Aerosolinfection mit den Influenzavirusstämmen A/sw/Cloppenburg/IDT4777/2005 (H1N2) und A/sw/Dötlingen/IDT4735/2005 (H1N2) geprüft und mit der Wirkung eines Inaktivimpfstoffs verglichen. Die experimentelle Infektion induzierte bei Schweinen der nicht geimpften und nicht behandelten Kontrollgruppe Dyspnoe, Fieber und Abgeschlagenheit. Die Virusausscheidung erfolgte über

5 Tage. Die Lungen hatten einen hohen Virusgehalt und eine ausgeprägte interstitielle Pneumonie. Mit Tamiflu® behandelte Schweine zeigten signifikant geringere Symptome und hatten eine signifikant verminderte Virusausscheidung in Nasentupfern im Vergleich zur Kontrollgruppe. Der Virusgehalt und die histopathologischen Veränderungen in den Lungen unterschieden sich nicht von der Kontrollgruppe. Geimpfte Tiere hatten signifikant niedrigere Symptome, Virusausscheidung, Viruslast in der Lunge und signifikant weniger histopathologische Lungenveränderungen.

et al., 2010; Welsh et al., 2010). Es hat sich inzwischen zu einem neuen Virus reassortiert, welches aus sieben Segmenten des Pandemie (H1N1) 2009 Virus und dem für die Neuraminidase kodierenden Gen der H3N2 Viren besteht (Moreno et al., 2011; Starick et al., 2012).

Die Vielfalt bei den Influenzaviren des Schweins nimmt zu (Zell et al., 2013). Prophylaxe- und Bekämpfungsstrategien müssen komplexer werden. Die Impfung mit Inaktivimpfstoffen ist eine sehr effektive Maßnahme zur Prophylaxe der Influenzavirusinfektionen (Dürrwald et al., 2009). Die Anforderungen an Impfstoffzulassungen sind hoch (European Directorate for the Quality of Medicines, 2005). Deshalb kann auf Neuentwicklungen in der Epidemiologie der Schweineinfluenza nur langsam reagiert werden.

In der Humanmedizin gibt es als zusätzliche Stütze die antivirale Therapie. Ionenkanalblocker wie Amantadin und Polymerasehemmer wie Ribavirin sowie Neuraminidaseinhibitoren wie Oseltamivir und Zanamivir stehen zur Verfügung (Hsu et al., 2012). Hier ist das Problem die Resistenzbildung (Hsu et al., 2012). Schweineinfluenzaviren sind seit Ende der 1980er Jahre resistent gegen Amantadin (Krumbholz et al., 2009). Die Ursache dieser Resistenz ist nicht geklärt (Krumbholz et al., 2009). Zur Anwendung von Neuraminidasehemmern wie Oseltamivir und Zanamivir bei Tieren gibt es nur wenige Untersuchungen. Ziel dieser Studie war es daher, die Anwendung von Neuraminidaseinhibitoren am Beispiel von Oseltamivir (Tamiflu®) bei

Abstract

Study on the protective effect of Oseltamivir (Tamiflu®) treatment against H1N2 virus in pigs

Key words: antiviral therapy – Oseltamivir – influenza – H1N2 – pig

The protective effect of Oseltamivir (Tamiflu®) treatment was investigated in pigs. 16-week-old pigs were infected simultaneously by aerosol infection with high doses of influenza viruses A/sw/Cloppenburg/IDT4777/2005 (H1N2) and A/sw/Dötlingen/IDT4735/2005 (H1N2). 15 pigs received 150 mg/day Tamiflu® for 4 days starting 20 hours before infection. 15 pigs were vaccinated with the trivalent vaccine RESPIPORC FLU3 (28 and 7 days before infection). 15 pigs were neither treated nor vaccinated. The reassortant H1N2 strains caused fever, dyspnoea, and pneumonia in the not treated and not vaccinated group. Tamiflu®-

treatment and vaccination prevented clinical signs and reduced significantly virus shedding. Vaccination prevented virus replication and inflammation in the lungs whereas Tamiflu®-treatment did not.

1 Einleitung

Influenzavirusinfektionen sind bei Schweinen weit verbreitet und haben in Interaktion mit anderen Erregern einen großen Einfluss auf die Leistung in den Schweinebeständen (Bachmann, 1989; Van Reeth et al., 2008; Kuntz-Simon und Madec, 2009). In Europa kommen die Subtypen H1N1, H3N2 und H1N2 bei Schweinen vor (Pensaert et al., 1981; Zell et al., 2013). Das Pandemie (H1N1) 2009 Virus ist leicht auf Schweine übertragbar (Lange et al., 2009; Moreno et al., 2010; Song et al., 2010; Weingartl

Schweinen zu prüfen und mit der durch die prophylaktische Anwendung von Impfstoffen erzielbaren Schutzwirkung zu vergleichen.

2 Material und Methoden

2.1 Tiere

Es wurden 45 Schweine der Rasse Pietrain x Large White aus dem Bestand der IDT Biologika GmbH, Dessau-Roßlau verwendet. Die Schweine waren 117 Tage alt zum Zeitpunkt der experimentellen Belastungsinfektion mit H1N2 Influenzaviren. Sie hatten keine Antikörper gegen porcine Influenzaviren vor Versuchsbeginn.

2.2 Immunisierung und Medikation

Die Schweine wurden randomisiert und drei Gruppen zugeordnet. Eine Gruppe erhielt die Medikation mit Tamiflu®, eine weitere Gruppe wurde geimpft und die dritte Gruppe verblieb ungeimpft und unbehandelt. Die Impfung der Schweine erfolgte zweimal mit je 2,0 ml RESPIPORC FLU3 (IDT Biologika GmbH, Dessau-Roßlau, Charge LM FLV 29 10 05) intramuskulär 28 (89. Lebenstag) und 7 Tage (110. Lebenstag) vor der experimentellen Belastungsinfektion. Tamiflu® (Hoffmann-La Roche AG, Basel, Charge B113313, 75 mg Osetamivir je Hartkapsel) wurde am Abend vor der Infektion und bis zum Tag 3 nach der Infektion verabreicht. Die Initialdosis betrug zwei Hartkapseln am Abend vor der Infektion. In den folgenden Tagen wurden jeweils eine Kapsel am Morgen und eine am Abend gegeben. Dazu wurden die Schweine mit Schlingen fixiert, der Kopf hochgehalten und die Kapsel mit einer langen Pinzette auf dem Zungengrund positioniert. Das Schlucken der Kapsel wurde kontrolliert. Die Tiere wurden bis 5 Minuten nach der Applikation beobachtet, um sicherzustellen, dass die Kapseln nicht ausgespuckt wurden.

2.3 Experimentelle Infektion

Die Schweine aller Gruppen wurden in einer BSL-2 Infektionseinheit eingestallt und zeitgleich per Aerosol infiziert. Die Influenza A Virus-Stämme sw/Cloppenburg/IDT4777/2005 (H1N2) und A/sw/Dötlingen/IDT4735/2005 (H1N2) wurden simultan mit Aerosolgeneratoren SAG-1 vernebelt. Die eingesetzten Infektionsdosen betragen $10^{6,61}$ TCID₅₀/m³ (Tissue Culture Infectious Dose 50, Stamm 4777) und $10^{6,86}$ TCID₅₀/m³ (Stamm 4735). Das Aerosol stand 2 Stunden in der Infektionseinheit. Bei beiden Infektionsstämmen handelt es sich um H1N2-Feldisolate aus dem IDT-Diagnostikprogramm Schweineinfluenza vom Dezember 2005 (Zell et al., 2008). Entsprechend der European Pharmacopoeia (EP) Monographie 0963 zur Prüfung von Influenzavirusimpfstoffen bei Schweinen (European Directorate for the Quality of Medicines, 2005) wurden jeweils 5 Schweine am Tag 1 und Tag 3 nach der Infektion mit Elektrozangen betäubt und ausgeblutet. Lungengewebsproben zur Bestimmung des Virustiters im Lungengewebe und Proben für die Histologie wurden aus jedem Lungenlappen entnommen. In den ersten beiden

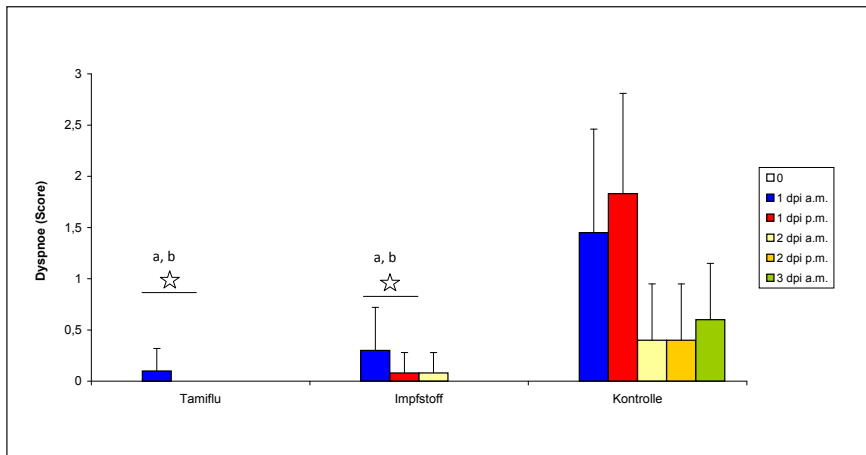


Abb. 1: Dyspnoe (Score) nach experimenteller Infektion mit H1N2 Influenzaviren bei mit Tamiflu® behandelten (Tamiflu), geimpften (Impfstoff) und nicht behandelten, nicht geimpften Schweinen (Kontrolle); signifikante Unterschiede sind durch Sternchen gekennzeichnet ($p < 0,05$, a Vergleich Tamiflu mit Kontrolle, b Vergleich Impfstoff mit Kontrolle, c Vergleich Tamiflu mit Impfstoff), dpi = Tage nach Infektion, a.m. = Vormittag, p.m. = Nachmittag.

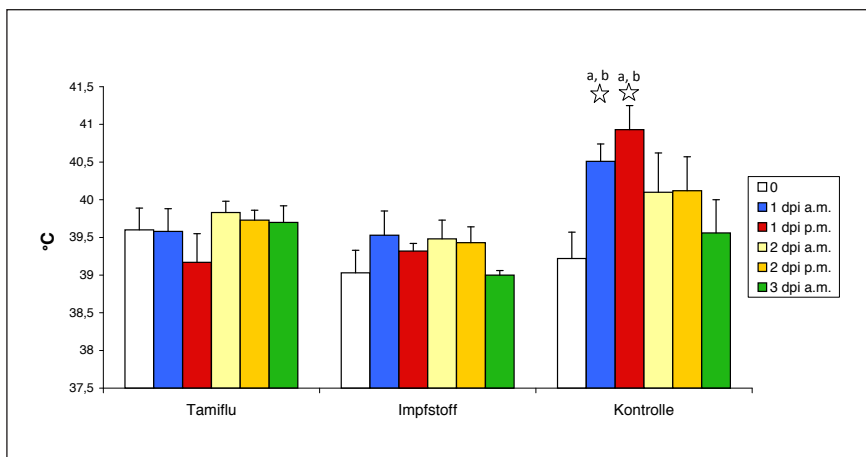


Abb. 2: Rektale Körpertemperaturen (°C) nach experimenteller Infektion mit H1N2 Influenzaviren bei mit Tamiflu® behandelten (Tamiflu), geimpften (Impfstoff) und nicht behandelten, nicht geimpften Schweinen (Kontrolle); signifikante Unterschiede sind durch Sternchen gekennzeichnet ($p < 0,05$, a Vergleich Tamiflu mit Kontrolle, b Vergleich Impfstoff mit Kontrolle, c Vergleich Tamiflu mit Impfstoff), dpi = Tage nach Infektion, a.m. = Vormittag, p.m. = Nachmittag.

Tagen nach der Infektion wurden zweimal täglich (morgens und abends) die rektalen Körpertemperaturen mittels Digitalthermometern gemessen und die klinischen Symptome erfasst. Am Tag drei erfolgte dies am Morgen. Die klinischen Symptome wurden anhand eines Scores (Bereich 0 – 4) ermittelt: 0 gesund ohne Beeinträchtigung der Atmung, 1 erhöhte Atemfrequenz und moderate Flankenbewegungen, 2 erschwerte Atmung und starke Flankenbewegungen, 3 angestrenzte Atmung, die den gesamt-

ten Körper erfasst mit ruckartigen Flankenbewegungen, 4 extreme Atmungsprobleme mit schnappartiger Atmung und/oder hundesitziger Stellung. Dies erfolgte durch zwei Tierärzte bei ruhenden Schweinen. Die erfassten Werte wurden gemittelt. Fünf weitere Schweine blieben zur Überwachung der Serokonversion bis zum Tag 10 nach der Infektion im Versuch. Blutprobenentnahmen erfolgten 28 und 7 Tage sowie direkt vor der Infektion und nach der Infektion im Abstand von 2 Tagen. Zusätzlich wurden täglich

Nasentupferproben zur Bestimmung der Virausscheidung genommen.

2.4 Viruskultivierung

Die Viruskultivierung zur Herstellung der zur Infektion der Schweine eingesetzten Viren erfolgte in MDBK-Zellen (Friedrich-Loeffler-Institut, Insel Riems) unter Einsatz von Trypsin (SIGMA, 4 BAEE units/ml). Die Zellen wurden in Rollerflaschen eingesät (ca. 1×10^7 Zellen je Rollerflasche), inkubiert (37°C) und mit den Viren beimpft (m.o.i. (multiplicity of infection) 10^{-5}) nachdem sich ein konfluenter Zellrasen gebildet hatte. Nach Auftreten des cytopathischen Effekts wurde die Virussuspension geerntet und der Gehalt an Infektiosität über Virustitration in Zellkulturen bestimmt (Dürwald et al., 2009).

2.5 Virustitration

Lungengewebsstücke der einzelnen Lungenlappen wurden gepoolt (ca. 1 g), in sterile Mörser gegeben und nach Zugabe von sterilem Seesand mit Pistillen zerrieben. Anschließend wurde Verdünnungsmedium (1 ml Amphotericin B, 0,1 ml Gentamycin ad 100 ml PBS) hinzugegeben (1:10), das Homogenat zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Die aus jedem der beiden Nasenlöcher der Schweine entnommenen Nasentupferproben wurden direkt nach der Entnahme in je 2 ml Stabilisierungsmedium (60 ml DSG 72, 0,2 ml Gentamycin, 2 ml Amphotericin B ad 200 ml Zellkulturmedium) gegeben. Verdünnungsreihen (\log_{10}) von Lungen- und Nasentupferproben wurden angelegt.

0,1 ml der zu untersuchenden Proben wurden am 11. Tag nach Bebrütungsbeginn in die Allantoishöhle embryonierter Hühnereier injiziert (5 Eier je Verdünnungsstufe) und die Perforationsstelle verschlossen (Pattex hot-Sticks). Die Eier wurden danach 4 Tage im Inkubator bei 37°C bebrütet und täglich mittels Schierlampe auf Vitalität geprüft. 4 Tage nach der Beimpfung wurden die Eier geöffnet, die Allantoisflüssigkeit entnommen und im Haemagglutinationstest geprüft (Durchführung wie Haemagglutinationstest ohne Serumzugabe zum Antigen). Anhand der positiven

Reaktionen (Haemagglutination) wurde die EID_{50} (Ei-infektiöse Dosis 50) nach der Methode von Spearman und Kaerber (Spearman, 1908; Kaerber, 1931) berechnet.

2.6 Lungenpathologie und Histologie

Nach der Entnahme wurden die Lungen makroskopisch beurteilt und fotografiert. Die Ergebnisse der Beurteilung wurden in ein Lungendiagramm eingetragen. Der Prozentsatz der veränderten Lungenoberfläche wurde prozentual bestimmt. Formalinfixierte Lungenproben wurden in Paraffin eingebettet. 5 μ m dicke Schnitte wurden mit Haematoxylin und Eosin gefärbt und lichtmikroskopisch beurteilt. Der Grad der Veränderungen wurde anhand eines semiquantitativen Scores (Skalierung von 0 – 4) beurteilt: 0 keine Veränderungen, 1 vereinzelte interstitielle Alveolarmakrophagen, 2 leichte interstitielle Hyperplasie des bronchus-assoziierten lymphatischen Gewebes, 3 ausgeprägte Alveolarmakrophagen, 4 massive interstitielle Alveolarmakrophagen, deutliche parenchymatöse neutrophile Granulozyten.

Zur spezifischen Färbung der Virusantigene wurde die StreptAvidin-Biotin Peroxidase Complex (SABC)-Methode im Dako Autostainer Plus (Dako GmbH, Hamburg) angewandt. Die Proben wurden mit Xylol und Äthanol in abnehmender Konzentration entparaffiniert und auf 37 °C erhitzt. Endogene Peroxidasen wurden 5 min mit Flex Peroxidase-Blocking Reagent inaktiviert. Die Probe wurde auf einen pH-Wert von 6 eingestellt. Anschließend wurde ein polyklonales monospezifisches anti-H1N2 Immunsereum vom Kaninchen (IDT Biologika GmbH, Dessau-Roßlau) unmittelbar vor Gebrauch im Verhältnis 1:100 verdünnt und als Primärantikörper eingesetzt. Die Proben wurden dann 30 min bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss wurde Flex/HRP (HRP, Dako GmbH, Hamburg) für 30 min dem Substrat zugesetzt. Danach erfolgte die Substrat-Chromogen-Reaktion zweimal für je 5 min. Die Präparate wurden anschließend mit Flex Substrate Buffer bearbeitet. Zur Sichtbarmachung der Zellkerne wurden die Präparate mit Haematoxylin gefärbt.

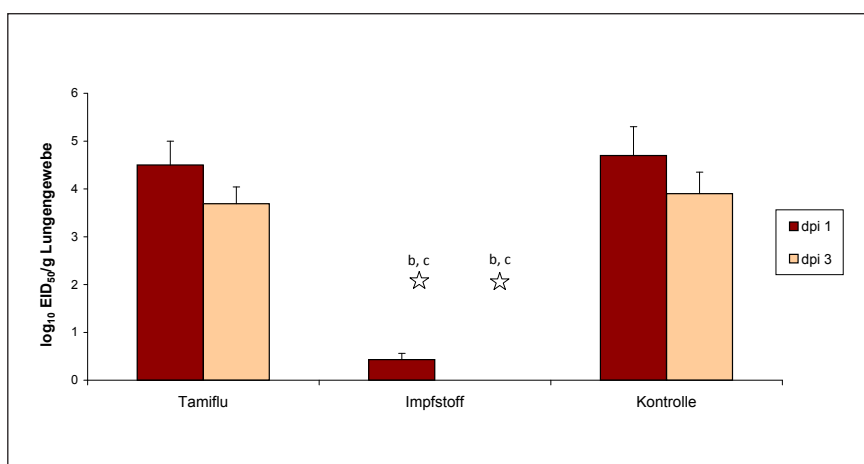


Abb. 3: Virusgehalt der Lunge ($\log_{10} EID_{50}/g$ Lungengewebe) nach experimenteller Infektion mit H1N2 Influenzaviren bei mit Tamiflu® behandelten (Tamiflu), geimpften (Impfstoff) und nicht behandelten, nicht geimpften Schweinen (Kontrolle); signifikante Unterschiede sind durch Sternchen gekennzeichnet ($p < 0,05$, a Vergleich Tamiflu mit Kontrolle, b Vergleich Impfstoff mit Kontrolle, c Vergleich Tamiflu mit Impfstoff), dpi = Tage nach Infektion.

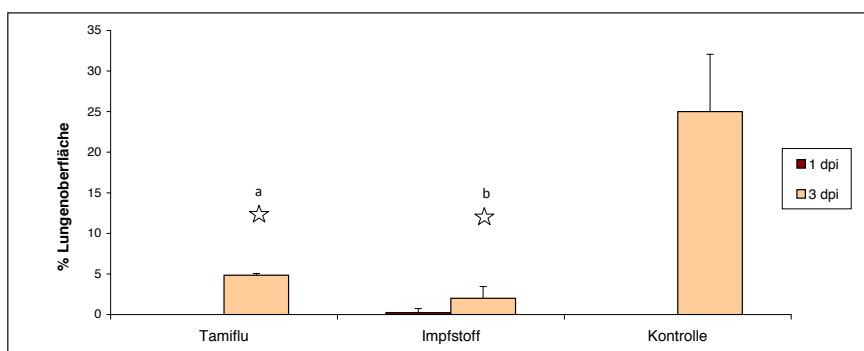


Abb. 4: Makroskopische Lungenveränderungen (%) nach experimenteller Infektion mit H1N2 Influenzaviren bei mit Tamiflu® behandelten (Tamiflu), geimpften (Impfstoff) und nicht behandelten, nicht geimpften Schweinen (Kontrolle); signifikante Unterschiede sind durch Sternchen gekennzeichnet ($p < 0,05$, a Vergleich Tamiflu mit Kontrolle, b Vergleich Impfstoff mit Kontrolle, c Vergleich Tamiflu mit Impfstoff), dpi = Tage nach Infektion.

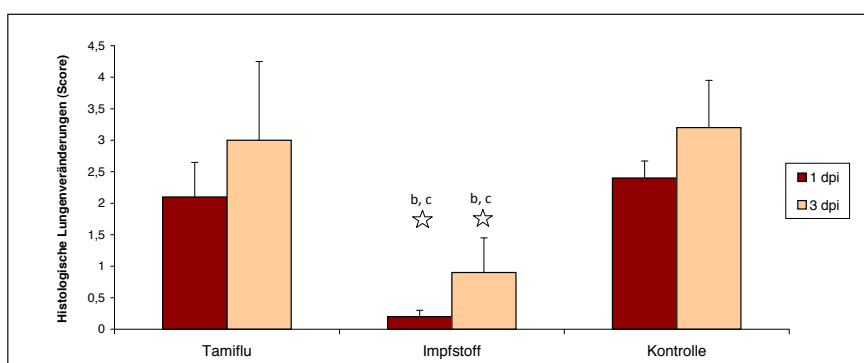


Abb. 5: Histologische Lungenveränderungen (Score) nach experimenteller Infektion mit H1N2 Influenzaviren bei mit Tamiflu® behandelten (Tamiflu), geimpften (Impfstoff) und nicht behandelten, nicht geimpften Schweinen (Kontrolle); signifikante Unterschiede sind durch Sternchen gekennzeichnet ($p < 0,05$, a Vergleich Tamiflu mit Kontrolle, b Vergleich Impfstoff mit Kontrolle, c Vergleich Tamiflu mit Impfstoff), dpi = Tage nach Infektion.

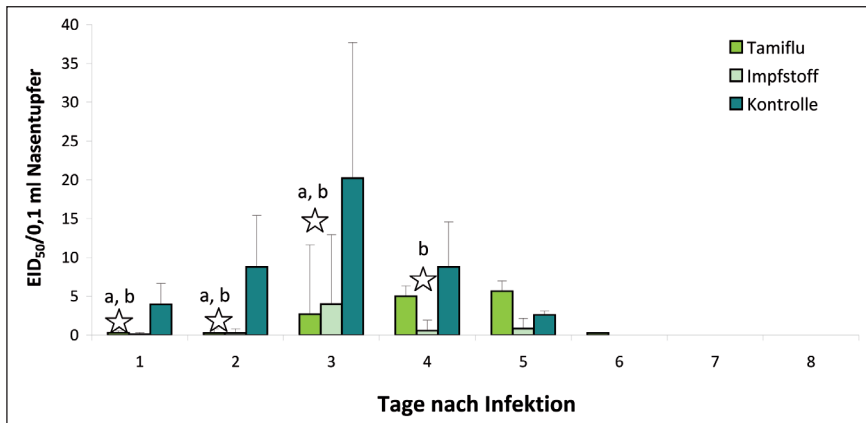


Abb. 6: Kinetik der Virusausscheidung ($EID_{50}/0,1$ ml Nasentupferlösung) nach experimenteller Infektion mit H1N2 Influenzaviren bei mit Tamiflu® behandelten (Tamiflu), geimpften (Impfstoff) und nicht behandelten, nicht geimpften Schweinen (Kontrolle); signifikante Unterschiede sind durch Sternchen gekennzeichnet ($p < 0,05$, a Vergleich Tamiflu mit Kontrolle, b Vergleich Impfstoff mit Kontrolle, c Vergleich Tamiflu mit Impfstoff).

2.7 Antikörperbestimmung mittels Haemagglutinationshemmtest

Die Blutproben wurden bei 1.000 g zentrifugiert, das Serum wurde abpipettiert und bis zur weiteren Untersuchung bei -20 °C tiefgefroren. Es erfolgte eine Vorbehandlung der Seren mit Neuraminidase (ORKD 005, Fa. Dade Behring, Schwalbach) 14 – 18 h bei 37 °C. Anschließend wurden die Proben mit Natriumcitrat (1,5%ig) versetzt und 30 min bei 56 °C inaktiviert. Dann wurden die Seren 1 h bei 4 – 8 °C an Hühnererythrozyten adsorbiert.

Der Influenzavirusstamm A/sw/Bakum/1832/00 (H1N2) wurde als Antigen verwendet und auf 8 haemagglutinierende Einheiten (HAE) eingestellt. Zur Testdurchführung wurden die durch die Vorbehandlung bereits 1:10 vorverdünnten Seren auf Mikrotiterplatten logarithmisch zur Basis zwei titriert. Anschließend

wurde das gleiche Volumen (25 μ l) der auf 8 HAE eingestellten Antigensuspension in alle Kavitäten der Mikrotiterplatte pipettiert und das Antigen-Antikörpergemisch 30 min bei 20 – 25 °C inkubiert. Für eine Erythrozytenkontrolle wurde in mehrere Kavitäten einer Mikrotiterplatte 50 μ l Phosphate Buffered Saline (PBS) pipettiert. Anschließend wurden zu allen Mikrotiterplatten 50 μ l einer auf 0,5 % eingestellten Hühnererythrozytensuspension gegeben. Die Reaktionen wurden dann bei 20 – 25 °C 30 min inkubiert.

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

2.8 Statistik

Für die statistischen Untersuchungen wurde der Mann-Whitney-U-Test verwendet. Die Berechnungen wurden mit dem Programm SPSS 15.0 durchgeführt.

3 Ergebnisse

Die experimentelle Infektion induzierte typische Symptome der Influenza bei den nicht geimpften und nicht behandelten Kontrolltieren. Am Tag nach der Infektion zeigten die Schweine eine deutliche Dyspnoe (Abb. 1) mit heftigen Bewegungen der Rüsselscheibe und ausgeprägten abdominalen Flankenbewegungen. Es kam zur Induktion von Fieber (Abb. 2). Die Schweine lagen viel. In den folgenden Tagen gingen die Symptome schnell wieder zurück (Abb. 1, 2). Der Virusgehalt der Lunge war sehr hoch (Abb. 3). Das Virus war gleichmäßig über die gesamte Lunge verteilt. Makroskopisch waren Veränderungen an den apikalen Bereichen des mittleren Lungenlappens und des Spitzenlappens erkennbar. Der Grad der Veränderungen war gering (Abb. 4). Histologisch zeigte sich eine Hyperplasie des bronchus-assoziierten lymphatischen Gewebes (Abb. 5, 7 und 8). Virus wurde über 5 Tage ausgeschieden (Abb. 6). Die mit Tamiflu® behandelten Schweine zeigten kaum Symptome (Abb. 1) und hatten kein Fieber (Abb. 2). Makroskopisch waren keine Lungenveränderungen erkennbar (Abb. 4). Der Virusgehalt der Lungen und die histopathologischen Veränderungen unterschieden sich bei den mit Tamiflu® behandelten Schweinen nicht von denen der Kontrollgruppe (Abb. 3 und 5, 7 und 8). Die Virusaus-

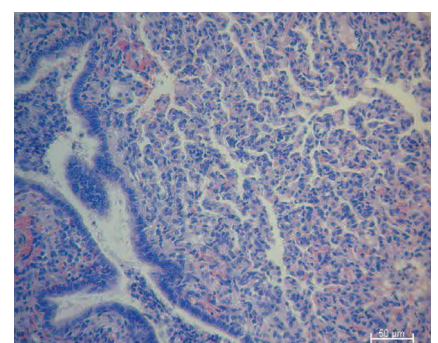
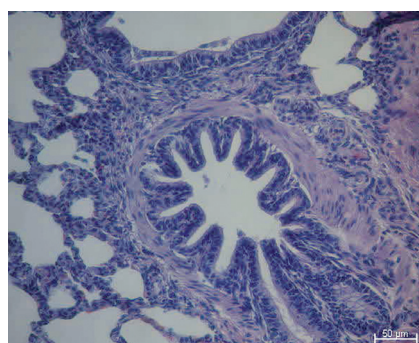
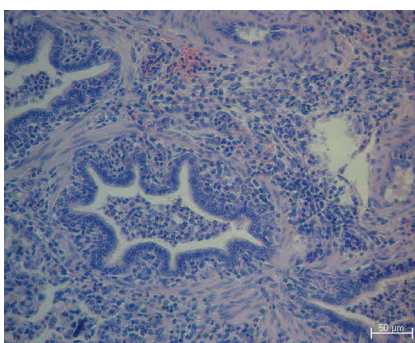


Abb. 7: Histologische Veränderungen in den Lungen nach Infektion mit H1N2 Influenzaviren am Tag 1 nach Infektion bei mit Tamiflu® behandelten Schweinen (links), geimpften Schweinen (Mitte) und nicht behandelten, nicht geimpften Kontrolltieren (rechts) (Haematoxylin-Färbung).

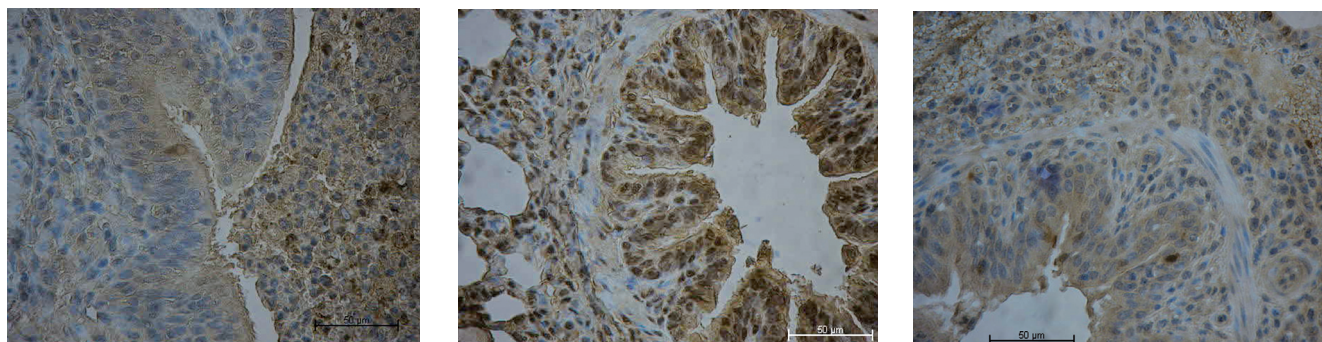


Abb. 8: Immunhistochemische (anti-H1N2 Serum) Darstellung der Virusantigene in Lungen nach Infektion mit H1N2 Influenzaviren am Tag 1 nach Infektion bei mit Tamiflu® behandelten Schweinen (links), geimpften Schweinen (Mitte) und nicht behandelten, nicht geimpften Kontrolltieren (rechts) (SABC-Methode).

scheidung war signifikant geringer als bei den Kontrolltieren (Abb. 6).

Geimpfte Schweine hatten signifikant geringere klinische Symptome (Abb. 1 und 2), signifikant geringere Viruslast in der Lunge (Abb. 3), signifikant geringere makroskopische und histopathologische Veränderungen des Lungengewebes (Abb. 4 und 5) und schieden signifikant weniger Virus aus als die Kontrolltiere (Abb. 6). Die geimpften Schweine reagierten mit einer sehr schwachen Serokonversion auf die einmalige Impfung (Tab. 1). Nach der zweiten Impfung hatten alle Schweine hohe Titer an haemagglutinationshemmenden Antikörpern (Tab. 1). Diese Antikörper blieben über den gesamten Versuchszeitraum auf hohem Niveau (Tab. 1).

Tamiflu®-behandelte und nicht geimpfte, nicht behandelte Kontrollschweine reagierten auf die Infektion mit der Bildung von haemagglutinationshemmenden Antikörpern (Tab. 1). Am Tag 8 nach der Infektion hatten alle Individuen Antikörper gegen H1N2 Influenzavirus (Tab. 1).

4 Diskussion

Oseltamivir wird nach mehrstufiger Synthese aus Shikiminsäure hergestellt, welche aus gentechnologisch modifizierten *Escherichia coli* oder echtem Sternanis gewonnen werden kann (Hoffmann-LaRoche, 2006). Der Wirkstoff hemmt die Neuraminidase von Influenzaviren und somit die zur Freisetzung von neu gebildeten Influenzaviren erforderliche enzymatische Aktivität zur Spaltung von Sialinsäure (Hoffmann-LaRoche, 2006). Die Ergebnisse der Untersuchungen re-

flektieren, dass Neuraminidaseinhibitoren wie Tamiflu® bei Schweinen eine signifikante Reduktion von klinischen Symptomen und Virusausscheidung bewirken und somit zur Bekämpfung der Schweineinfluenza einsetzbar wären.

Dieser Einsatz ist wenig praktikabel, weil i) die verfügbaren Darreichungsformen nur an einzelnen Individuen und hier nur mit großem Aufwand appliziert werden können, ii) die Anwendung nicht ökonomisch wäre und iii) eine Massenanwendung die Gefahr einer Resistenzbildung unterstützen würde.

Dennoch sind die Untersuchungen von

Interesse. Sie bestätigen, dass Neuraminidasehemmer an einem späten Zeitpunkt des Infektionszyklus der Influenzaviren in der Zelle ansetzen und die Ausschleusung von Viren reduzieren. Sie verhindern nicht den Eintritt des Virus in die Zelle. Deshalb können bei Infektion mit hohen Dosen an Influenzaviren wie beim Aerosolchallenge keine Unterschiede in der Virusbelastung der Lunge detektiert werden.

Tamiflu® war im hier dargestellten Versuchsansatz bereits einen Tag vor der Infektion eingesetzt worden, um die Wirksamkeit besser herausarbeiten zu können.

Tabelle 1: Antikörperkinetik nach Infektion mit H1N2 Influenzaviren bei mit Tamiflu®-behandelten, geimpften und nicht geimpften, nicht behandelten Schweinen

28 dai*	7 dai	Infektion	2 dpi**	4 dpi	6 dpi	8 dpi	10 dpi
Tamiflu							
<20	<20	<20	<20	<20	<20	80	320
<20	<20	<20	<20	<20	<20	40	80
<20	<20	<20	<20	<20	<20	80	160
<20	<20	<20	<20	<20	<20	160	640
<20	<20	<20	<20	<20	<20	40	40
Impfstoff							
<20	20	640	640	80	80	160	320
<20	20	320	160	80	80	40	320
<20	<20	80	160	80	80	80	320
<20	20	160	320	160	160	160	320
<20	<20	160	80	640	640	320	320
Kontrolle							
<20	<20	<20	<20	<20	20	80	160
<20	<20	<20	<20	<20	20	80	160
<20	<20	<20	<20	<20	20	40	80
<20	<20	<20	<20	<20	40	320	160
<20	<20	<20	<20	<20	<20	80	80

* days ante infectionem (Tage vor Infektion), ** days post infectionem (Tage nach Infektion)

Die Symptome sind nach der Infektion mit Influenzaviren kurz. Die Fieberzacke tritt häufig nur am Tag 1 nach der Infektion auf, manchmal auch zusätzlich noch am Tag 3 nach der Infektion. Bei späterem Einsatz von Tamiflu® zum Zeitpunkt deutlicher Symptome am Tag 1 nach Infektion wäre aufgrund der schnellen Rekonvaleszenz in diesem Tiermodell nicht zu unterscheiden gewesen, ob die Effekte durch die Medikation oder durch natürliche Prozesse hervorgerufen worden wären.

Assoziiert mit dem hohen Virusgehalt in der Lunge bei mit Tamiflu® behandelten Schweinen waren ausgeprägte histopathologische Veränderungen, die sich nicht von denen der Kontrollgruppe unterscheiden. Geimpfte Schweine hatten dagegen sowohl signifikant niedrigere Virustiter in der Lunge als auch signifikant geringgradigere histopathologische Veränderungen im Lungengewebe. Dies ist auf die Wirkung haemagglutinationshemmender Antikörper zurückzuführen, die neutralisierende Eigenschaften haben und somit den Viruseintritt in die Zelle blockieren. Die bei allen geimpften Schweinen über den gesamten Untersuchungszeitraum hohen Antikörpertiter haben eine effektive Virusreplikation im Lungengewebe unterdrückt.

Bezüglich des Versuchsablaufes wurde sich an der EP Monographie 0963 orientiert, welche die Kriterien für die Prüfung von Impfstoffen festlegt. Der Virusgehalt muss entsprechend dieser Monographie bei geimpften Schweinen am Tag 1 und 3 nach der Infektion signifikant geringer sein als bei nicht geimpften. Der Impfstoff hat nach dieser Monographie bestanden, der Wirkstoff Tamiflu® dagegen nicht. Dennoch hat die Behandlung der Schweine mit Tamiflu® die klinischen Symptome und die Virusausscheidung im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant reduziert. Daher bleibt zu bedenken, ob die Festlegungen der EP Monographie 0963 nicht zu einseitig auf die Schutzwirkung des Haemagglutinins fokussieren. Impfstoffe, insbesondere inaktivierte Ganzvirusimpfstoffe, wie das eingesetzte RESPIPORC FLU3, enthalten alle Antigene der Influenzaviren und somit mehr antigene Bestandteile als nur

das Haemagglutinin. Neuraminidasehemmende Antikörper könnten ähnliche Effekte bewirken wie Neuraminidaseinhibitoren. Solche Effekte können mit den durch die EP Monographie 0963 vorgeschriebenen Prüfungen nicht gemessen werden.

Wichtig für solche Prüfungen sind effiziente Infektionsmodelle wie die in dieser Studie angewandte Aerosolinfektion. Die anhand von Nasentupferproben bestimmten Kinetiken zur Virusausscheidung zeigen, dass der Infektionsverlauf bei Influenza kurz ist. Bereits 8 Tage nach Infektion sind schützende Antikörper vorhanden und eliminieren das Virus. Die Anwendung von Tamiflu® reduzierte die Virusausscheidung. Jedoch gingen die in den Nasentupfern ermittelten Virustiter nach dem Absetzen der Tamiflu®-Behandlung wieder in die Höhe. Dies zeigt, dass eine viertägige Behandlung nicht ausreichend ist. Auch unter Tamiflu®-Behandlung bilden sich haemagglutinationshemmende Antikörper in Folge einer Infektion. Diese sind am Tag 8 nach Infektion bei allen Individuen vorhanden. Bei nicht immunsupprimierten Infizierten braucht daher Tamiflu® nicht länger als 8 Tage eingesetzt zu werden.

Bei den beiden simultan im Infektionsversuch eingesetzten Influenzavirusstämmen handelt es sich um H1N2 Stämme, welche sich neu reassortiert und die Neuraminidase der porzinen H3N2 Influenzaviren übernommen haben (Zell et al., 2008). Mit dem hier vorgestellten Versuch wurde erstmals demonstriert, dass diese Stämme im Tierexperiment am Wirt virulent sind. Die hier beschriebene Wirksamkeit von Oseltamivir lässt sich aufgrund der identischen Neuraminidase auch auf die porzinen H3N2 Influenzaviren übertragen. In Folgeuntersuchungen wurde diese Wirkung auch gegenüber den nicht reassortierten porzinen H1N2 und H1N1 Influenzaviren bewiesen (Dürrwald et al., 2013). Die Resultate legen nahe, dass es bei porzinen Influenzaviren noch keine Resistenzen gegen Oseltamivir gibt. Somit bestätigen diese *in vivo*-Untersuchungen die Ergebnisse von *in vitro*-Prüfungen von Schweineinfluenzaviren (Bauer et al., 2011).

5 Fazit

Oseltamivir ist bei Schweinen wirksam gegen H1N2 Influenzaviren. Es reduziert die Symptome (Dyspnoe, Fieber) und senkt die Virusausscheidung. Die Anwendung von Neuraminidasehemmern erzielt nicht die gleichen Effekte wie die Impfung, die zudem noch die Viruslast in der Lunge und die histologischen Veränderungen vermindert.

Danksagung

Die Autoren danken Frau Kerstin Wiczorek, Frau Roswitha Ulrich, Frau Dorrit Appl, Frau Katrin Schulz, und Frau Simone Köppen, IDT Biologika GmbH, Dessau-Roßlau, für hervorragende labor-technische Assistenz und Herrn Dr. Guntram Hagemann für die Bereitstellung der Schweine sowie Herrn René Rau und DVM Olaf Lüder für die Unterstützung bei den Tierversuchen.

Literatur

- Bachmann, P. A. (1989): Swine Influenza Virus. In: Virus Infections of Vertebrates (C. Horzinek, Hrsg.) Band 2, Virus Infections of Porcines (M. B. Pensaert, Hrsg.), Elsevier, Amsterdam, 193-207.
- Bauer, K., R. Dürrwald, M. Schlegel, K. Pfarr, N. Wiesener, D. Topf, H. M. Dahse, P. Wutzler, M. Schmidtke (2011): Neuraminidase inhibitor susceptibility of swine influenza A viruses isolated in Germany between 1981 and 2008. *Med. Microbiol. Immunol.* 201, 61-72.
- Dürrwald, R., V. Herwig, H.-J. Selbitz (2009): Prüfung der Schutzwirkung eines trivalenten Influenzavirus-Inaktivatimpfstoffs für Schweine in Infektionsversuchen mit aktuellen Feldstämmen der Subtypen H1N1, H3N2 und H1N2. *Tierärztl. Praxis* 37(G), 103-112.
- Dürrwald, R., M. Schlegel, K. Bauer, T. Vissinon, P. Wutzler, M. Schmidtke (2013): Efficacy of influenza vaccination and Tamiflu® treatment – Comparative studies with Eurasian swine influenza viruses in pigs. *PLoS ONE* 8(4), e61597. Doi:10.1371/journal.pone.0061597.
- European Directorate for the Quality of Medicines (2005): Porcine influenza vaccine (inactivated). In: European Pharmacopoeia. European Directorate for the Quality of Medicines 01/2005: 0963.
- Hoffmann-LaRoche (2006): Factsheet Tamiflu (PDF, 336 kB). Stand 17. November 2006.
- Hsu, J., N. Santesso, R. Mustafa, J. Brozek, Y. L. Chen, J. P. Hopkins, A. Cheung, G. Hovhannisyan, L. Ivanova, S. A. Flottorp, I. Sæterdal, A. D. Wong, J. Tian, T. M. Uyeki, E. A. Aki, P. Alonso-Coello, F. Smaill, H. J. Schünemann (2012): Antivirals for treatment of influenza: A systematic review and meta-analysis of observational studies. *Ann. Intern. Med.* 156, 512-524.

8. Kärber, G. (1931): Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche [A contribution to the collective treatment of a pharmacological experiment series]. *Archiv für experimentelle Pathologie und Pharmakologie* 162, 480-483.
9. Kuntz-Simon, G., F. Madec (2009): Genetic and antigenic evolution of swine influenza viruses in Europe and evaluation of their zoonotic potential. *Zoonoses Public Health* 56, 310-325.
10. Krumbholz, A., M. Schmidtke, S. Bergmann, S. Motzke, K. Bauer, J. Stech, R. Dürrwald, P. Wutzler, R. Zell (2009): High prevalence of amantadine resistance among circulating European porcine influenza A viruses. *J. Gen. Virol.* 90, 900-908.
11. Lange, E., D. Kalthoff, U. Blohm, J. P. Teifke, A. Breithaupt, C. Maresch, E. Starick, S. Fereidouni, B. Hoffmann, T. C. Mettenleiter, M. Beer, T. W. Vahlenkamp (2009): Pathogenesis and transmission of the novel swine-origin influenza virus A/H1N1 after experimental infection of pigs. *J. Gen. Virol.* 90, 2119-2123.
12. Moreno, A., L. Di Trani, L. Alborali, G. Vaccari, I. Barbieri, E. Falcone, E. Sozzi, S. Puzelli, G. Ferri, P. Cordioli (2010): First pandemic H1N1 outbreak from a pig farm in Italy. *Open Virol. J.* 4, 52-56.
13. Moreno, A., L. Di Trani, S. Faccini, G. Vaccari, D. Nigrelli, M. B. Boniotti, E. Falcone, A. Boni, C. Chiapponi, E. Sozzi, P. Cordioli (2011): Novel H1N2 swine influenza reassortant strain in pigs derived from the pandemic H1N1/2009 virus. *Vet. Microbiol.* 149, 472-477.
14. Pensaert, M., K. Ottis, J. Vandeputte, M. M. Kaplan, P. A. Bachmann (1981): Evidence for the natural transmission of influenza A virus from wild ducks to swine and its potential importance for man. *Bull. World Health Organ* 59, 75-78.
15. Song, M. S., J. H. Lee, P. N. Pascua, Y. H. Baek, H. I. Kwon, K. J. Park, H. W. Choi, Y. K. Shin, J. Y. Song, C. J. Kim, Y. K. Choi (2010): Evidence of human-to-swine transmission of the pandemic (H1N1) 2009 influenza virus in South Korea. *J. Clin. Microbiol.* 48, 3204-3211.
16. Spearman, C. (1908): The method of the "right and wrong" cases ("constant stimuli") without Gauss's formulae. *British Journal Psychology* 2, 227-242.
17. Starick, E., E. Lange, C. Grund, E. grosse Beilage, S. Döhring, A. Maas, T. Noé, M. Beer, T. C. Harder (2012) Reassortants of pandemic influenza A virus H1N1/2009 and endemic porcine HxN2 viruses emerge in swine population in Germany. *J. Gen. Virol.* 93, 1658-1663.
18. Van Reeth, K., I. H. Brown, R. Dürrwald, E. Foni, G. Labarque, P. Lenihan, J. Maldonado, I. Markowska-Daniel, M. Pensaert, Z. Pospisil, G. Koch (2008): Seroprevalence of H1N1, H3N2 and H1N2 influenza viruses in pigs in seven European countries in 2002-2003. *Influenza and Other Respiratory Viruses* 2, 99-105.
19. Weingartl, H. M., Y. Berhane, T. Hisanage, J. Neufeld, H. Kehler, C. Emburay-Hyatt, K. Hooper-McGreevy, S. Kasloff, B. Dalman, J. Bystrom, S. Alexandersen, Y. Li, J. Pasick (2010): Genetic and pathobiologic characterization of pandemic H1N1 2009 influenza viruses from a naturally infected swine herd. *J. Virol.* 84, 2245-2256.
20. Welsh, M. D., P. M. Baird, M. P. Guelbenzu-Gonzalo, A. Hanna, S. M. Reid, S. Essen, C. Russell, S. Thomas, L. Barrass, F. McNeilly, J. McKillen, D. Todd, V. Harkin, S. McDowell, B. Choudhury, R. M. Irvine, J. Borobia, J. Grant, I. H. Brown (2010): Initial incursion of pandemic (H1N1) 2009 influenza A virus into European pigs. *Vet. Rec.* 166, 642-645.
- 21: Zell, R., S. Motzke, A. Krumbholz, P. Wutzler, V. Herwig, R. Dürrwald (2008): Novel reassortant of swine influenza H1N2 virus in Germany. *J. Gen. Virol.* 89, 271-276.
22. Zell, R., C. Scholtissek, S. Ludwig (2013): Genetics, evolution, and the zoonotic capacity of European swine influenza viruses. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 370, 29-55.

Korrespondenzadresse:

Dr. Ralf Dürrwald
 IDT Biologika GmbH
 Am Pharmapark
 06861 Dessau-Roßlau
 ralf.duerrwald@idt-biologika.de