

Aus dem Institut für Virologie
der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

**Epidemiologische Charakterisierung porciner Rotaviren der Gruppe A und
Untersuchungen zur altersspezifischen Relevanz der Gruppen A und C**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doctor medicinae veterinariae (Dr. med. vet.)
durch die Veterinärmedizinische Fakultät
der Universität Leipzig

eingereicht von
Oliver Wenske
aus Berlin

Leipzig, 2019

Mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Dekan: Prof. Dr. Walter Brehm

Betreuer: Prof. Dr. Dr. Thomas Vahlenkamp

Gutachter: Prof. Dr. Dr. Thomas Vahlenkamp, Institut für Virologie,
Veterinärmedizinische Fakultät, Universität Leipzig

Prof. Dr. Mathias Ritzmann, Klinik für Schweine, Tierärztliche Fakultät,
Ludwig-Maximilians-Universität, München

Tag der Verteidigung: 17.09.2019

Diese Arbeit wurde publiziert in:

- Wenske O, Rückner A, Piehler D, Schwarz B, Vahlenkamp TW. Epidemiological analysis of porcine rotavirus A genotypes in Germany. *Vet Microbiol.* 2018;214:93–98.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Literaturübersicht	5
2.1	Rotavirus-Gruppen	5
2.2	Genetische Eigenschaften/Typisierung	5
2.3	Vakzinierung	7
3	Geleitwort zu Publikation 1	9
3.1	Publikation 1: Epidemiological analysis of porcine rotavirus A genotypes in Germany	11
4	Geleitwort zu Publikation 2 (Manuskript, unveröffentlicht)	21
4.1	Manuskript zu Publikation 2 (unveröffentlicht): Prevalence of rotavirus group A but not of group C decreases with age in fecal samples of diarrheic pigs	23
5	Diskussion	38
5.1	Genotypisierung von RVA	39
5.2	RVs als Zoonoseerreger	40
5.3	Klinische Relevanz und asymptomatische Träger.....	42
5.4	Nicht-typisierbare Rotaviren	42
5.5	RVA Nachweise	43
5.6	RVC Nachweise	44
5.7	Vakzinierung	45
6	Zusammenfassung	48
7	Summary	50
8	Literaturverzeichnis.....	52

Abkürzungsverzeichnis

cDNA – *complementary* DNA

DESTATIS – Statistisches Bundesamt

EUROSTAT – Statistisches Amt der Europäischen Union

dsRNA – Doppelstrang-Ribonucleinsäure

NSP – Nichtstrukturproteine

NSP5 – Nichtstrukturprotein 5

NSP6 – Nichtstrukturprotein 6

PCR – Polymerase Chain Reaction / Polymerase-Kettenreaktion

PEI – Paul-Ehrlich-Institut

qPCR – quantitative Polymerase Kettenreaktion

RT-qPCR – Reverse Transkription quantitative Polymerase-Kettenreaktion

RVA – Rotavirus A

RVAs – Rotaviren der Gruppe A

RVC – Rotavirus C

RVCs – Rotaviren der Gruppe C

RVs – Rotaviren

VP1 – Virusprotein 1

VP2 – Virusprotein 2

VP3 – Virusprotein 3

VP4 – Virusprotein 4

VP6 – Virusprotein 6

VP7 - Virusprotein

1 Einleitung

Einer der bedeutendsten Zweige der Tierproduktion ist die Schweinehaltung. Schweinefleisch ist ein begehrtes Konsum- und Exportprodukt. Dies untermauern auch die Statistiken der deutschen Schweinehaltung. Demnach findet sich in Deutschland mit 26,4 Millionen Schweinen der zweitgrößte Schweinebestand Europas (EUROSTAT 2019). Wer sich mit gastrointestinalen Erkrankungen infektiöser Natur beim Schwein beschäftigt, wird unweigerlich auch auf Rotaviren (RVs) stoßen. Die Schweinehaltung stellt unter dem Aspekt der Rotavirus (RV)-Erkrankungen aus zwei Gründen eine besondere Herausforderung dar. Zum einen bilden die Ferkel, welche für RVA-Infektionen die am meisten gefährdete Altersklasse sind, knapp ein Drittel (ca. 8 Millionen) des Schweinebestandes (DESTATIS 2018). Zum anderen strebt die intensive Schweineproduktion die größtmögliche Wurfgröße je Sau bei gleichzeitig geringem Raumbedarf an, sodass die räumliche Nähe der Ferkel eines Bestandes das Infektionsrisiko vergrößert. Die spätere Zusammenlegung von Ferkeln unterschiedlicher Würfe im Flatdeck stellt ein weiteres Infektionsrisiko dar. Die RV-Infektion beim Schwein wird mit einer Morbidität von 20 %, die Mortalität etwas geringer, aber immernoch mit ca. 15 % beschrieben (PAUL und STEVENSON 1992). Im Vergleich mit vielen anderen Pathogenen scheint dies gering, jedoch ist ein großer Einfluss als Kofaktor anderer Infektionen zu bedenken. Typischerweise spielen bei Koinfektionen vor allem Viren wie Astroviren, Coronaviren, Kobuviren und Bakterien wie z.B. *Escherichia coli* und Clostridien eine Rolle. (GOECKE et al. 2017; THEUNS et al. 2014; ZHOU et al. 2016) Nicht zu vernachlässigen ist auch die relativ hohe Tenazität der RVs gegenüber Desinfektionsmitteln (BEER und PFEFFER 2011), welche die Reduktion der Viruslast im Stall erschwert. Bei der Betrachtung ökonomischer Auswirkungen von RV-Infektionen beim Schwein sind eine Vielzahl primärer und sekundärer Faktoren im Zusammenhang zu nennen. Einerseits führen malabsorptive Prozesse zur bereits erwähnten Wachstumsdepression, die zu höheren Futterkosten und potenziell niedrigeren Verkaufspreisen aufgrund geringeren Körpergewichts führen. In Einzelfällen kann gar eine Störung im Betriebsablauf die Folge sein, da Umstellungen oder Verkäufe im regulären Aufzucht- und Mastablauf unter Biosicherheitsaspekten verschoben werden müssen. Des Weiteren bedeuten Durchfallerkrankungen im Abferkel- und Saugferkelbereich einen erhöhten Personal- und Arbeitsaufwand, da die Versorgung der Ferkel mit Elektrolytlösungen oder Zusatzfutter gegebenenfalls manuell durchgeführt werden muss.

In Folge der hohen Prävalenz und schwierigen Elimination aus Stallumgebungen kommt jedes Schwein und somit auch jedes Ferkel früher oder später mit RVs in Kontakt. Aufgrund der hohen Infektiosität der RVs entsteht somit schnell eine klinische Symptomatik. Dabei kann eine einmalige Infektion mit RVs gegebenenfalls nicht ausreichend zur Ausbildung einer adäquaten Immunität sein. Limitierend ist dabei die Ausprägung der antigenetischen Varianz zwischen verschiedenen RVs, die das Tier infizieren.

Die erste Beschreibung dieser liegt schon einige Zeit zurück und geht auf elektronenmikroskopische Beobachtungen von ADAMS und KRAFT (1963) in Proben von Mäusen zurück. Erst eine Dekade später wurden ähnliche Beobachtungen von BISHOP et al. (1973), ebenfalls unter Einsatz der Elektronenmikroskopie, beim Menschen gemacht. Wie eingangs erwähnt geht eine Vielzahl der Krankheitsbilder in der Veterinärmedizin mit der Erkrankung des Gastrointestinaltrakts einher. Neben alimentären und autoimmunbedingten Ursachen lassen sich häufig auch infektiöse Agentien viraler oder bakterieller Natur als Ursache ausmachen. Dabei ist das RV eine häufige Ursache von Diarrhö bei Ferkeln, juvenilen und auch adulten Schweinen. (MARTHALER et al. 2014; MIYAZAKI et al. 2013)

Ein voll infektiöses RV-Partikel weist eine dreilagige Proteinhülle auf. Die Kernhülle besteht aus 160 Molekülen des Virusproteins 2 (VP2). Sie umgibt das Genom, die RNA-abhängige RNA Polymerase, das Virusprotein 1 (VP1) und das *Capping*-Enzym Virusprotein 3 (VP3). Das Genom besteht aus 11 Segmenten doppelsträngiger Ribonukleinsäure (dsRNA). Diese Segmente kodieren für jeweils ein Protein. Das Segment 11 stellt dabei eine Ausnahme dar, da es für die beiden Nichtstrukturproteine NSP5 und NSP6 kodiert. Die Kernhülle wird umgeben von 260 Trimeren, die aus den Virusproteinen 6 (VP6) gebildet werden und somit die Mittelschicht ergeben. Diese wiederum wird umgeben von einer Schicht, die aus mehreren Molekülen des Virusproteins 7 (VP7) besteht. Diese sind angeordnet in 260 Trimeren, welche von Spitzen aus Virusprotein 4 (VP4) – Trimeren durchbrochen werden. Folglich sind die Virusproteine VP1, VP2, VP3, VP4, VP6 und VP7 strukturbildend. Darüber hinaus werden in infizierten Zellen die Nichtstrukturproteine (NSP) NSP1, NSP2, NSP3, NSP4, NSP5 und NSP6 des RV produziert. Rotaviren der Gruppe C (RVCs) besitzen kein NSP6 (DESSELBERGER 2014). Die NSP besitzen regulatorische Funktionen, NSP4 agiert zusätzlich als virales Enterotoxin. (DESSELBERGER 2014)

In der Vergangenheit erfolgte die gruppenweise Einordnung der RVs anhand ihrer antigenetischen Eigenschaften. In Zeiten der molekularbiologischen Diagnostik stützt sich die Gruppierung jedoch auf die genetischen Eigenschaften des VP6. Aufgrund seines spezieübergreifenden Vorkommens finden sich Beschreibungen von RV-Infektionen in zahlreichen Säugetieren und Vögeln (MARTELLA et al. 2010). Hierbei ist anzumerken, dass die verschiedenen Gruppen von RVs mehr oder weniger häufig bei unterschiedlichen Tierarten vorkommen. Neben dem am längsten bekannten Rotavirus A (RVA) wurde im Jahre 1980 Rotavirus C (RVC), seinerzeit als Pararotavirus bezeichnet, bei Ferkeln, später auch bei Menschen entdeckt (BOHL et al. 1982; SAIF et al. 1980). Daneben existieren acht weitere RV-Gruppen (B bis J), wovon die Gruppen A, B, C, E und H für das Schwein relevant sind (BRIDGER und BROWN 1985; BRIDGER und WOODE 1975; CHASEY et al. 1986; JANKE et al. 1990; SAIF et al. 1980; SAIF et al. 1994; SAIF und JIANG 1994; WAKUDA et al. 2011). Insbesondere der Bedeutung von RVCs wurde in der jüngeren Vergangenheit gesteigertes Forschungsinteresse zu Teil, da diese als potentiell klinisch relevante RV-Gruppe neben RVA, vor allem bei sehr jungen Ferkeln, in der Diskussion stehen (MARTHALER et al. 2014). Neben dem Gensegment 6 ist die Gruppierung der RVs maßgeblich auf die für die beiden Proteine VP4 und VP7 kodierenden Gensegmente gestützt (MAES et al. 2009). Die

Auswahl dieser zwei Proteine basiert auf ihrer maßgeblichen Beteiligung am Hervorrufen neutralisierender Antikörper. (HOSHINO und KAPIKIAN 2000) Bedingt ist dies durch die exponierte Lage von VP4 und VP7 (DESSELBERGER 2014), welche somit vergleichsweise große evolutionäre Veränderungen begünstigt. Dabei weisen VP4 und VP7 jedoch voneinander unabhängige immunogene Eigenschaften auf. (HOSHINO et al. 1988; MATSUI et al. 1989; OFFIT et al. 1986b; OFFIT et al. 1986a) Um diese stetigen Veränderungen und hohe genetische Varianz von VP4 und VP7 optimal zu erfassen, war die Entwicklung eines dualen Typisierungssystems am besten geeignet. Diese Gruppierung ist allerdings lediglich für Rotaviren der Gruppe A (RVAs) anerkannt und verfügbar. Die Genomsequenz, welche für VP4 kodiert, bestimmt dabei den P-Typ, dessen Namensgebung sich auf die Protease-Sensitivität dieses Oberflächenproteins stützt. Die Genomsequenz, welche für VP7 kodiert, bestimmt hingegen den G-Typ. Dessen Namensgebung basiert auf der Tatsache, dass VP7 ein Glykoprotein ist. Für RVA sind zum jetzigen Zeitpunkt 27 G- und 37 P-Typen bekannt (MATTHIJNSSENS et al. 2011; TROJNAR et al. 2013). Dementsprechend hoch fällt die Varianz der theoretisch möglichen Typenkombinationen aus. Zusätzlich weisen RVAs in Schweinen eine hohe genetische Variabilität auf (PARRA et al. 2008).

Das RV als Durchfallerreger führt zu klinischer Diarrhö, die unter anderem als Folge der virusmedierten Zerstörung der absorptiven Enterozyten, Herunterregulation absorptiver Enzyme und Veränderungen an *Tight Junctions* auftritt (GREENBERG und ESTES 2009). Darüber hinaus steigert das NSP4 die Sekretion von Chlorid in das Darmlumen und führt somit zur Ausbildung osmotischer Diarrhö. In Ermangelung adäquater Nährstoffabsorption führt eine RV-Infektion in vielen Fällen zu Abmagerung und Wachstumsdepression bei Schweinen. In den meisten Fällen ist die Mortalität von unkomplizierten RV-Infektionen gering. (PAUL und STEVENSON 1992) Sollte es jedoch zu komplizierten Koinfektionen kommen, muss mit massiven Krankheitsverläufen bis hin zum Tod der Ferkel in Folge des massiven Flüssigkeitsverlustes und mangelnder Nährstoffresorption gerechnet werden.

Unter Einbeziehung aller zuvor beschriebenen Fakten porzine RVs betreffend lässt sich eine sehr große Relevanz für die Tiergesundheit und auch für ökonomische Aspekte ableiten. In Folge der Globalisierung und vor allem des innereuropäischen Handels reicht es längst nicht mehr aus, porzine RVs nur auf regionaler Ebene zu betrachten. (LENTZ et al. 2016) Nicht zuletzt der zunehmende grenzübergreifende Tierhandel trägt zur Verbreitung weiterer RV-Spezies bei. Dementsprechend kommt der Beobachtung der zirkulierenden RVs in den Schweinebeständen beziehungsweise in verschiedenen Ländern eine große Bedeutung zu. Aktuell liegen aber eben diese Daten lediglich sporadisch für diverse Länder vor. Für Deutschland, trotz der großen wirtschaftlichen Bedeutung der Schweineproduktion, liegen bisher allerdings keine Daten zu zirkulierenden RV-Populationen im deutschen Schweinebestand oder gar zur Gewichtung der einzelnen RV-Typen vor. Dies gilt sowohl für die verschiedenen RVA-Typen als auch für Daten bezüglich weiterer RV-Gruppen. Im Rahmen dieser Arbeit soll die Informationslücke zirkulierender porziner RVA-Typen in Deutschland geschlossen

werden und darüber hinaus eine Analyse von RVA und RVC stattfinden. Hierbei werden Typisierungsergebnisse von RVA auch epidemiologisch ausgewertet. Daneben soll des Weiteren die Verteilung von RVA und RVC in verschiedenen Altersgruppen untersucht werden. In der Regel analysieren Studien zum RV-Infektionsstatus von Schweinen die Tiere lediglich innerhalb der ersten Lebenswochen. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen analysieren jedoch die Verteilung von RVA und RVC in Altersgruppen von Schweinen aus der kompletten Bandbreite vom Saugferkel zum adulten Tier. Im Hinblick auf RVAs und RVCs ergänzen die vorliegenden Daten und Auswertungen das Wissen über die Situation in der deutschen Schweinepopulation, zu der bisher noch keine vergleichbaren Daten dieses Probenumfangs vorlagen. Für die Altersverteilung von RVA und RVC sind bisher sogar überhaupt keine deutschen Daten verfügbar gewesen. Die so gewonnenen Daten können dann zum Vergleich mit epidemiologischen Publikationen anderer Länder genutzt werden. Darüber hinaus können die Erkenntnisse über Dominanzen und Verteilungsmuster der porzinen RVs zur Identifikation geeigneter Impfstämme genutzt werden. Bisher gibt es, trotz der hohen klinischen Relevanz, keinen zugelassenen Impfstoff gegen RVs beim Schwein. (PEI 2019b) Eine immunologische Prophylaxe ist dementsprechend nicht spezifisch möglich. In vielen Fällen werden Rinderimpfstoffe umgewidmet, jedoch ist eine Bewertung der Wirksamkeit der enthaltenen RVA-Stämme ohne Daten aus Deutschland unmöglich.

2 Literaturübersicht

2.1 Rotavirus-Gruppen

Die Einteilung der RVs in Serogruppen erfolgt anhand von VP6. Als Konsequenz aus der mangelnden Anzüchtbarkeit wurde die serologische Typisierung in vielen Fällen durch Polymerase-Kettenreaktion(PCR)-basierte Nachweise der RVs abgelöst. In den aktuell gängigen Diagnostikverfahren kommerzieller Labore wird vorwiegend auf RVAs untersucht. Diese Tatsache mag historisch bedingt sein, da RVAs aufgrund ihrer, im Vergleich zu RVs anderer Gruppen, besseren Anzüchtbarkeit in Zellkultur intensiver erforscht wurden. Des Weiteren kommen RVs der Gruppe A beim Menschen am häufigsten vor (PARASHAR et al. 1998) und erfahren folglich die größte Aufmerksamkeit. Aber auch bei Schweinen wurden RVAs bereits als eine der häufigsten Ursachen von Durchfall in Schweineherden identifiziert (ESTES und KAPIKIAN 2007; LORENZETTI et al. 2011; PARRA et al. 2008). Die RV-Infektionen treten dabei haltungsbedingt in vielen Fällen fokussiert und altersgruppenspezifisch auf (DE CÁSSIA LINARES et al. 2009; FU und HAMPSON 1987).

Mit wachsendem Diagnostikaufwand und sinkenden Kosten für molekularbiologische Verfahren rückten neben RVA auch weitere RV-Gruppen in den Fokus der Untersuchungen. In Folge dessen nahmen auch Untersuchungen RVC betreffend zu. Das wachsende Interesse an weiteren RV-Gruppen entsteht nicht zuletzt auch durch eine Häufung bzw. intensivere Erforschung von humanen RVC-Infektionen (RAHMAN et al. 2005). Neben humanen RVC-Infektionen wurde RVC auch in Schweinen, Frettchen (TORRES-MEDINA 1987), Rindern (TSUNEMITSU et al. 1991) und Hunden (OTTO et al. 1999) nachgewiesen. Im Vergleich zu RVA ist wenig bekannt über die Relevanz von RVC innerhalb verschiedener Altersgruppen von Schweinen.

2.2 Genetische Eigenschaften/Typisierung

Im Vergleich zur grundlegenden Prävalenzuntersuchung anderer RV-Gruppen ist die Erfassung und Charakterisierung von RVAs schon lange etabliert und weit verbreitet (GENTSCH et al. 1992; GOUVEA et al. 1994; ISEGAWA et al. 1993). Hierbei werden Sequenzdaten der Genomsegmente 9 und 4 (kodieren für die Oberflächenproteine VP7 und VP4) verwendet und werden zum Beispiel mit Hilfe von Datenbanken zur Definition von G- und P-Typ eingesetzt. MATTHIJNSSENS et al. (2008) entwickelten ein System zur Typisierung, welches gar die Sequenzdaten aller 11 Genomsegmente in die Typisierung einbezieht. Trotz der sehr guten Harmonisierung und Aussagekraft dieser Typisierungsmethode ist sie noch nicht in jedem Fall umsetzbar. Die Ursache dafür sind vor allem die noch relativ hohen Kosten für Vollgenomsequenzierungen. Für VP4, VP6 und VP7 liegen bereits zahlreiche Sequenzen zum Abgleich vor. Sequenzen der übrigen acht Genomsegmente stehen seit einiger Zeit nun auch vermehrt zur Verfügung. Nichtsdestotrotz können die Ergebnisse aus der dualen

Typisierung hervorragend zur Analyse epidemiologischer Muster und internationaler Zusammenhänge der in Schweinepopulationen zirkulierenden RVA-Typen herangezogen werden. Interessanterweise ist die Erweiterung der epidemiologischen Daten zu RVA-Typen bei Schweinen aus westlichen Industrienationen ausgesprochen notwendig, da für einige Länder gar keine Daten oder nur sehr spärlich Daten verfügbar sind. Dies ist auch für Deutschland der Fall. Die meisten Typisierungsdaten von Schweinen stammen aus Asien und Südamerika (ZELLER et al. 2012). In diesen Regionen finden vermehrte Mensch-Tier-Kontakte statt, da sowohl Lebensbereiche als auch die Wasserquellen keiner klaren Trennung von Mensch und Tier unterliegen. Als Konsequenz liegt ein Schwerpunkt der Forschung in diesen Regionen auf der Charakterisierung und Typisierung von RVs. In Kombination mit teils mangelhaftem Hygienestatus finden somit zahlreiche „*interspecies transmission events*“ statt (DEGIUSEPPE et al. 2013; MUKHERJEE et al. 2009; STEYER et al. 2008), welche die Varianz und das *Reassortment* der RVs beschleunigen können. Diese „*interspecies transmission events*“ ermöglichen den Austausch von Erbgut zwischen RVs, welche normalerweise unterschiedliche Spezies infizieren. Aber auch innerhalb einer Spezies kann *Reassortment* stattfinden. Dementsprechend hoch kann die Diversität der ausgetauschten Sequenzen sein. Die große genetische Diversität vorkommender RV-Typen entsteht einerseits durch Neueintrag, andererseits aber auch durch *Reassortment-Events*, welche insbesondere aufgrund des segmentierten Genoms von RVs vergleichsweise schnell passieren können (BROWNING et al. 1992; RAMIG 1997; SANTOS et al. 1999). Wie groß der Umfang dieses *Reassortments* letztendlich durchschnittlich in RV-Populationen ist, lässt sich bisher gar nicht oder nur vereinzelt darstellen. (MCDONALD et al. 2009) Ob das *Reassortment* ein „*interspecies transmission event*“ zur Folge hat oder ob der Prozess umgekehrt abläuft, ist im Einzelfall allerdings schwer zu bestimmen.

Neben der Überwachung epidemiologischer Aspekte können Typisierungsdaten von RVAs zu Erkenntnissen über die Infektiosität beitragen, indem auffallend weit verbreitete Genotypen identifiziert werden. Untersuchungen wie die von KIM et al. (2013) bilden die Grundlage für das Verständnis von Pathogenität verschiedener RV-Typen in Ferkeln. In jener Studie wurden zwei zuvor aus klinisch erkrankten Schweinen isolierte RVAs zur experimentellen Infektion naiver Tiere eingesetzt. Im Anschluss wurden klinische Folgen, pathohistologische Veränderungen und Virusverbreitung in diversen Organsystemen untersucht. Dabei fokussierten sich die Autoren auf RVAs vom G-Typ 9 und legten besonderes Augenmerk auf pathologische Veränderungen sowohl in intestinalen als auch extraintestinalen Geweben.

2.3 Vakzinierung

Wie bei allen viral bedingten Erkrankungen ist in klinischen Verläufen einer RV-Infektion therapeutisch die Minderung klinischer Symptome sowie die Stärkung des Immunsystems notwendig. Prophylaktisch bleibt neben Fütterungs- und Managementmaßnahmen ausschließlich die Vakzinierung. Dabei ist in der Schweinegesundheit zu unterscheiden zwischen Mutterschutzvakzinen und Ferkelschutzimpfungen. Insbesondere bei Viren, die Ferkel schon intrauterin oder während bzw. kurz nach dem Geburtsvorgang infizieren können, sind Mutterschutzvakzine notwendig. Nur so ist der optimale Schutz der Ferkel gegeben. Denn ubiquitäres Vorkommen der RVs und Kotkontakt während oder nach der Geburt stellen ein großes Infektionsrisiko dar, welches die Mutterschutzvakzine notwendig werden lässt. Derzeit gibt es in Deutschland allerdings keinen zugelassenen Impfstoff gegen RVs beim Schwein. Wie relevant eine RV-Impfung bei Sauen wäre, kann anhand einer Studie von MIYAZAKI et al. (2011) abgeschätzt werden. In dieser Untersuchung wurden Hinweise darauf gefunden, dass Ferkel von ungeimpften Jungsauen für RVA-Infektionen anfälliger waren als jene, die von ungeimpften Altsauen geboren wurden. MIYAZAKI et al. (2011) führen außerdem die unterschiedlichen Immunitätslevel gegen RVA von Sauen auf die hohe genetische und somit auch immunogene Diversität der RVs zurück. Es besteht der Verdacht, dass die Kolostrumqualität bei Jungsauen ohnehin von geringerer Qualität ist, zudem hatten Altsauen bereits häufiger Antigenkontakt und somit auch Immunitätsausbildung gegen RVs (SVENSMARK 1983). Svensmark stützt diese Untersuchungsergebnisse auf Infektionsraten von Ferkeln primiparer und multiparer Sauen. Schützende Immunität, die auch über IgA im Kolostrum an Ferkel weitergegeben wird (SAIF und FERNANDEZ 1996), könnte man mit einer Sauenschutzimpfung früher erzeugen, als dies unter regulärer Antigenexposition der Jungsauen mit Feldviren der Fall wäre. In Ermangelung eines zugelassenen Impfstoffs gegen RVs für Schweine wird häufig einer der erhältlichen bovinen Impfstoffe umgewidmet. Derzeit sind sieben Impfstoffe gegen RVs beim Rind verkehrsfähig (PEI 2019a). Der Einsatz dieser bovinen Vakzine beim Schwein ist jedoch nicht optimal. Einerseits gibt es keine umfassende Deklaration der Genotypen der enthaltenen RV-Stämme für alle bovinen Impfstoffe, andererseits unterscheiden sich bei Rindern verbreitete RVs bezüglich der Genotypen teils erheblich von denen bei Schweinen auftretenden (PAPP et al. 2013b).

Trotz des theoretischen Hindernisses (Rinder weisen andere relevante RV-Gruppen auf als Schweine (PAPP et al. 2013b)) setzen praktizierende Tierärzte den zugelassenen bovinen RV-Impfstoffen beim Schwein ein. Wissenschaftliche Untersuchungen oder Fallberichte zur Erfolgsquote gibt es nicht. Möglicherweise sorgt eine gegen VP6 gerichtete Immunität für Immunreaktionen; diese Relevanz von VP6 als immunogenem Protein der RVs wurde bereits beim Menschen beschrieben (AIYEGBO et al. 2013; AIYEGBO et al. 2014). Eine protektive Wirkung von VP6 Antikörpern ist jedoch nicht abschließend bewiesen. Schlussendlich gehen mit dramatischen Durchfallgeschehen und Umwidmung

eines Rinderimpfstoffes häufig auch Managementumstellungen und Hygieneverbesserungen einher. Somit kann der Anschein entstehen, dass der Einsatz des bovinen Impfstoffs erfolgreich war.

Neben dem Einsatz eines zugelassenen Impfstoffs bieten einige Firmen bestandsspezifische Impfstoffe mit inaktivierten RVs an. Diese sogenannten autogenen Impfstoffe beinhalten inaktivierte Pathogene, welche zuvor aus dem entsprechenden Stall isoliert worden sind. Unter Einsatz passender virologischer oder mikrobiologischer Anzuchtverfahren wird ein oder mehrere Erreger vermehrt und anschließend inaktiviert und mit Adjuvans versehen. Im Falle der RVAs wird das isolierte RV in Zellkultur vermehrt. Die Herstellung ist erschwert durch die teilweise sehr langsame Adaptation von RVs an die Wirtszellen in der Zellkultur. Zusammen mit der zu empfehlenden vorhergehenden Typisierungen, zahlreicher Adaptationspassagen sowie dem im Idealfall folgenden Produktionsprozess der Vakzine ergeben sich so häufig obsoletere Herstellungs-/Lieferzeiten, die hinter der Varianz der RVs und den eng getakteten Zeitplänen der modernen Schweinehaltung zurückbleiben. Insbesondere die Notwendigkeit von Blindpassagen zum Zwecke der Virusadaptation in der Zellkultur benötigt mehrere Wochen. Während dieser Zeit bleibt unklar, ob eine Virusvermehrung in der Zellkultur in der für die autogene Impfstoffproduktion erforderlichen Größenordnung erfolgreich ist. Sollte das entsprechende RV sich nicht an die Zellkultur adaptieren, zeigt sich folglich ein Scheitern erst nach vielen Wochen und macht das Verfahren somit wenig praxistauglich. Somit wäre ein zugelassener Impfstoff dringend erforderlich, wenn auch die Auswahl der enthaltenen Stämme aufgrund der hohen Diversität und Variabilität im Feld schwierig ist. Eine Kreuzreaktivität ist nur bedingt beschrieben worden (BOHL et al. 1984). Vor allem aber mindern Unterschiede der G- und P-Typen zwischen RVAs im Impfstoff und den zirkulierenden die Wirksamkeit von RVA-Vakzinen sehr. (SAIF und FERNANDEZ 1996)

3 Geleitwort zu Publikation 1

Im Rahmen der RVA Diagnostik stellt sich regelmäßig die Frage nach zirkulierenden oder gar dominierenden Genotypen. Die moderne Schweineproduktion ist epidemiologisch stark vernetzt. Dies ist ein Resultat der vorherrschenden Arbeitsteilung der verschiedenen Aufzucht- und Maststufen und des daraus resultierenden Handels lebender Tiere. Damit einher geht die ständige Gefahr von Verschleppung und Verbreitung von Krankheitserregern zwischen verschiedenen Betrieben. Dieser Umstand bedeutet eine teils regionale oder gar überregionale Zirkulation verschiedener RVAs unterschiedlicher Spezies. Durch zunehmende Internationalisierung in der Landwirtschaft besteht auch die Möglichkeit von grenzübergreifend gleichen RV-Spezies. Ziel unserer Arbeit war die Analyse und Erfassung der dominant vorkommenden G- und P-Typen der RVAs.

Ergebnisse

- 27 unterschiedliche Genotypen-Kombinationen wurden nachgewiesen
 - Davon 8 verschiedene G-Typen und 7 verschiedene P-Typen
- Häufigste G-Typen (VP7): G9 (38 %), G4 (31 %), G5 (14 %), G11 (6 %)
- Häufigste P-Typen (VP4): P[23] (37 %), P[6] (29 %), P[32] (18 %), P[13] (9 %)
- Häufigste G/P-Kombinationen: G9P[23] (23 %), G4P[6] (19 %), G9P[32] (8 %)
- Einige Genotypen-Kombinationen sind regional sehr dominant, einige weit über die Bundesrepublik verbreitet und einige sind regional dominant und ebenso in unterschiedlichen Bundesländern vorkommend
- Regionen mit großen Schweinepopulationen scheinen das Hervortreten dominanter RVA-Populationen zu begünstigen
- G- und P-Typen sind teilweise identisch mit Daten aus Deutschlands angrenzenden Staaten Belgien und Dänemark: G4, G5, G9, G11 sowie P[6] und P[23]
- Die G-Typen G4, G5 und G9 sowie die P-Typen P[6] und P[23] haben eine überregionale Bedeutung über große Entfernungen in ganz Europa
- RVA mit der Kombination G9P[32] wurde häufig in Deutschland nachgewiesen, aber sonst nirgends in Europa beschrieben

Schlussfolgerung

Im Vergleich mit anderen europäischen Ländern wie zum Beispiel Belgien, Dänemark, Slowenien, Spanien und Großbritannien konnten wir ebenfalls weit verbreitete RVA-Genotypen nachweisen. Zusätzlich erlaubten unsere ermittelten Daten den Vergleich mit Daten aus angrenzenden Nachbarländern und somit die Beschreibung einiger überregional vorkommender oder sogar dominanter Genotypen und G-P-Typ-Kombinationen. Schlussendlich konnten unsere Daten die Informationslücke

zirkulierender und dominanter RVA-Typen in Deutschland schließen und tragen zur Identifikation potenzieller Impfstoffkandidaten bei.

Arbeitsanteil des Promovenden:

- Probenauswahl und Zusammenführung der Metadaten, Etablierung der PCR-Methoden (in Absprache mit den anderen Autoren), diagnostische Durchführung und Auswertung der Ergebnisse, Interpretation der Ergebnisse (in Absprache mit den anderen Autoren), Erstellen sämtlicher Grafiken, Auswahl der Sequenzen für Dendrogrammerstellung, Auswertung und Interpretation der Dendrogramme, Verfassen des Manuskripts

3.1 Publikation 1: Epidemiological analysis of porcine rotavirus A genotypes in Germany



Contents lists available at ScienceDirect

Veterinary Microbiology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/vetmic

Epidemiological analysis of porcine rotavirus A genotypes in Germany

Oliver Wenske^{a,*}, Antje Rückner^b, Daniel Piehler^a, Bernd-Andreas Schwarz^a,
Thomas W. Vahlenkamp^b^a Vaccinova GmbH, Deutscher Platz 5e, 04103 Leipzig, Germany^b Institute of Virology, Center for Infectious Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, University of Leipzig, An den Tierkliniken 29, 04103 Leipzig, Germany

ARTICLE INFO

Keywords:

Rotavirus
Piglets
Swine
Germany
Genotype
Regionality
G-type
P-type

ABSTRACT

Group A porcine rotaviruses are a global threat to animal health in stock breeding. While certain genotypes have shown predominance in other countries, data from Europe's second largest swine population is still scarce. Therefore, porcine rotaviruses taken from different areas of Germany were genotyped to create a basis for comparison with data from neighboring countries. In addition, the potential predominance and regionality based on regions (federal states) have been investigated by examining 101 samples.

The study revealed the dominance of the VP7 genotypes G9, G4, G5 as well as VP4 genotypes P[23], P[6], P[32]. The most common genotype combinations were G9P[23], G4P[6], and G9P[32]. Analysis focusing on the regionality aspect revealed that areas with high pig populations promote the emergence of dominant genotype combinations. However, pig populations in Germany cannot be considered individually and therefore results were put into international context, taken from already published genotyping data. In consequence, our data contributes to the fundamental understanding of regional and supraregional rotavirus epidemiology. The detected genotypes provide a basis for prospective porcine rotavirus surveillance, that first of all helps to identify interspecies transmission. Furthermore it may provide supporting data for the selection of particular genotypes, suitable for the production of porcine rotavirus A vaccine candidates.

1. Introduction

Rotaviruses (RVs) can affect the health of mammalia and birds causing severe diarrhea and subsequent dehydration. RVs are responsible for globally 215.000 child deaths per year (Tate et al., 2016). Although the incidence of rotavirus (RV) infections is correlated with the gross national product, it is a global threat (Patel et al., 2013). In consequence, human RV vaccine programs have been established all over the world. In piglets, diarrhea and subsequent clinical symptoms are most frequently observed from 7 to 60 days (Zimmerman, 2012), but also younger piglets are affected. Germany has the second largest pig livestock in the European Union (Agriculture, forestry and fishery statistics op., 2016 p.103). Recent data seize 27 million pigs, including 7.9 million piglets (Federal Statistical Office 2017, p.19). RVs not only cause massive consequences for animal welfare, but also for economic efficiency with regard to routine production schedules within farms. Differences in breeding procedure, herd size, and the multifactorial character of diarrhea complicate the definition of specific economic losses caused by RV diarrhea. However, they can be substantial, taking into account an average mortality rate of 5% and 1 kg lower average weight at weaning. Even though porcine RV diarrhea is a widely spread

infectious disease no licensed vaccine for pigs is available in Europe. Hence, Germany's high swine population, situated in Central Europe, can be seen as an indicator for relevant circulating RV genotypes. RVs are classified into ten groups (A–J) which are based on the antigenic characteristics of VP6, one of the structural proteins. Group I and J can be defined preliminary (Banyai et al., 2017; Mihalov-Kovács et al., 2015). Of clinical and economical relevance for pigs are groups A, B, C, E and H, whereas diagnostic in livestock breeding mainly is focused on rotavirus A (RVA), which is considered to be the primary cause of diarrhea in pigs (Marthaler et al., 2014). RV genus belongs to the family of *Reoviridae* and is a nonenveloped virus, featuring a double-stranded and segmented RNA genome. The particles are triple-layered, in which the structural proteins VP4 and VP7 form the outer layer. Sequence analysis of the glycoprotein VP7 (G-type) and the protease sensitive protein VP4 (P-type) genes is a widely accepted method to determine RV genotypes. In 2008, the Rotavirus Classification Working Group proposed the extended full-genome sequence classification system, which is based on the sequence data of all 11 gene segments (Matthijnssens et al., 2008). Based on the dual typing system (G-/P-types) many genotype studies for porcine RVA have been published as recently reviewed by Vlasova et al. (2017) and Papp et al. (2013).

* Corresponding author.

E-mail address: oliver.wenske@web.de (O. Wenske).<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.12.014>Received 23 October 2017; Received in revised form 19 December 2017; Accepted 20 December 2017
0378-1135/© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

Nonetheless, data on present RV genotypes in pigs bred in Germany is not available and thus comparison to data taken from studies worldwide, especially to neighboring EU-countries is difficult. Since German pigs and piglets are exported alive, it is crucial to see RV epidemiology in an international context and porcine RVA genotyping data is required for comparison with international epidemiologic studies. For this reason we designed this study to evaluate whether RVA with specific genotypes in German pigs show a regional distribution and if the possible pattern fits in the European context. In addition, we investigated whether particular G- and P-genotypes and their combinations are emerging thus providing a basis for comparison with already available data from other countries.

2. Materials and methods

2.1. Origin of samples

The study was performed using 101 fecal swabs, feces, and small intestine samples that had been sent to Vaxxnova GmbH diagnostic facility between March 2016 and March 2017. The samples which were proven RVA or RVA and rotavirus C (RVC) positive were organized by the federal states and administrative districts they came from. Two different samples from every available administrative district were chosen randomly for RVA genotyping.

2.2. RNA preparation

The nucleic acid extraction was performed using Qiagen MagAttract 96 cador Pathogen Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions with 10% fecal solutions in Phosphate-Buffered Saline (PBS) respectively fecal swabs mounted in PBS. Tissue samples were pretreated with a ball mill before performing the nucleic acid extraction.

2.3. RT-qPCR assay rotavirus A, C

The samples were tested for the presence of RVA and RVC RNA using the modified method previously described by [Marthaler et al. \(2014\)](#).

2.4. One-step amplification of gene segments 4 (VP4) and 9 (VP7)

The extracted RNA was used for VP7- and VP4-gene amplification using primers previously described by [Fujii et al. \(2012\)](#), [Gentsch et al. \(1992\)](#), [Isegawa et al. \(1993\)](#), [Iturriza Gómara et al. \(2004\)](#) and [Simmonds et al. \(2008\)](#). The amplification of the gene segments was carried out in a one-step polymerase chain reaction (PCR) utilizing the qScript[®] XLT 1-Step RT-PCR Kit (Quantabio, Beverly, MA) following the manufacturer's instructions using the forward and reverse primer (10 µmol) and underwent 5 min at 95 °C followed by immediate chilling in ice cold water. Next, mastermix was added and the reaction was carried out under the following conditions: reverse transcription for 20 min at 48 °C, 3 min initial denaturation at 94 °C, 30 cycles of 15 s denaturation at 94 °C, 40 s at the primer-dependent annealing temperature described below, 50 s elongation at 68 °C, followed by a final extension for 10 min at 72 °C.

Annealing temperatures for primers were 50 °C for Bov4Com5/Bov4Com3 ([Isegawa et al., 1993](#)) and VP4F/VP4R ([Simmonds et al., 2008](#)), 55 °C for VP7F/VP7 R ([Fujii et al., 2012](#)) and VP7-F/VP7-R ([Iturriza Gómara et al., 2004](#)), and 47 °C for con 2/con 3 ([Gentsch et al., 1992](#)).

Every scheduled sample (see 2.1) underwent amplification with one primer pair for the VP7 and one for VP4 gene segment. The PCR products were analyzed on 1,5% agarose gels and visualized under UV light. If the result was negative, i.e. no amplicon was present at the expected base pair length, the amplification was repeated with the

other previously described primer pairs until the amplification was successful. In case none of the primers for VP7 or VP4 or even both lead to a band the sample was defined as nontypeable.

PCR products from positive samples were purified and sequenced at SeqLab Sequence laboratories (Göttingen, Germany) via Sanger sequencing with the same primers used for the PCR.

2.5. Sequence analysis

Sequence data was analyzed using the software Chromas (version 2.6.4; Technelysium Pty Ltd) and for the determination of genotypes the RotaC genotyping tool was applied ([Maes et al., 2009](#)). In addition, all sequences were compared with sequences available from NCBI blast genbank database ([NCBI Resource Coordinators, 2016](#)) under the default settings.

3. Results

3.1. Rotavirus genotypes in german pig population

The samples used for determining RV genotypes in the German pig population originated from ten different federal states. Overall, we found 27 different genotype combinations in the 79 typeable samples. Among these, 8 different G-types (depicted in [Fig. 1](#)) and 7 different P-types (depicted in [Fig. 2](#)) could be detected. 22 samples were untypeable. The most frequent VP7 genotypes were G9 (38%), G4 (31%), G5 (14%) and G11 (6%). Prevalent VP4 genotypes were P[23] (37%), P[6] (29%), P[32] (18%), and P[13] (9%). The outstanding dominant genotype combinations were G9P[23] (23%), G4P[6] (19%), and G9P[32] (8%). Only two samples could be defined by either G- or P-type since their sequence results laid below the cut-off value of 80% as proposed for VP4 and VP7 by [Maes et al. \(2009\)](#). Therefore, they are considered to be new genotypes (suggested GX and P[X]), which were not yet described.

3.2. Genotype prevalence in federal state-centered view

Analyzing the genotype distribution on a narrow federal state based level, we found a high occurrence of genotype G9 in specific combinations. Hereby, G9P[23] represents the most common genotype combinations in the district of Baden-Württemberg, Saxony-Anhalt as well as Thuringia and belongs to the dominant combinations in Lower Saxony, North Rhine-Westphalia, and Bavaria. The most frequent RV combination found in North Rhine-Westphalia and Lower Saxony is G4P[6]. The third noticeable genotype combination is G9P[32], one of the dominant types in Lower Saxony and North Rhine-Westphalia.

Getting focused on the absolute distribution of RV genotypes, five noticeable combinations are emerging. In addition to the regional dominance as described in the above-mentioned paragraph, G9P[23] is collaterally present in seven different federal countries. The same conclusion can be made for G4P[6] which is in fact dominant in some regions, but is additionally widely spread over five different federal countries. The third dominant genotype G9P[32], was only detected in two different federal states. In contrast to this, two genotypes (G4P[23] and G5P[23]) weren't noticeable under the aspect of dominance within single federal states, but are widely spread throughout five different federal states each. Additionally, these states are located in different directions of Germany. The occurrence of all genotype combinations found within the federal states is listed in [Table 1](#).

4. Discussion

4.1. Regional emerging genotypes and genotype combinations

The collected data shows the predominance of certain RVA genotype combinations as well as specific VP7 and VP4 genotypes. It is

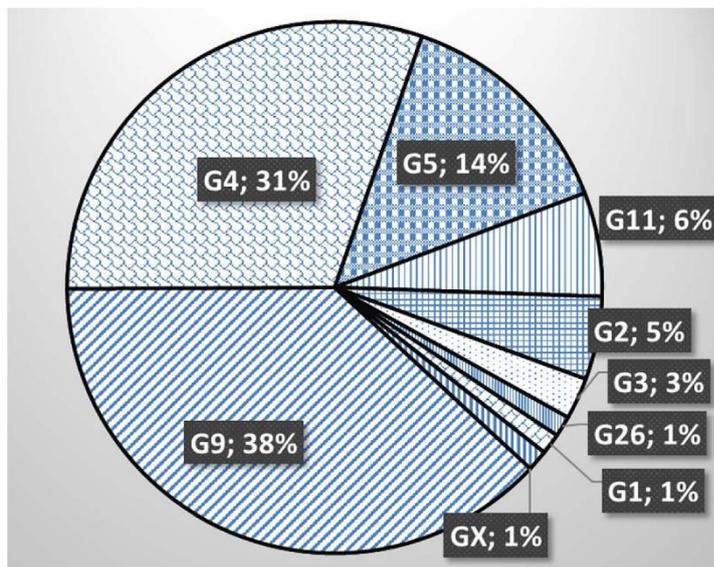


Fig. 1. Distribution of porcine group A rotavirus G-typing (VP7) genotypes from Germany (GX: suggested new genotype); n = 79.

noticeable that G- as well as P-types show clear dominance patterns on a national point of view with widely spread types all over Germany (Fig. 3). Analyzing the genotype combinations revealed that the three frequently found combinations G4P[6], G9P[32] and, to a smaller extent, G9P[23] are mainly concentrated on the regions with the highest density of pig farms. G9P[32] was only found with a high frequency in North Rhine-Westphalia and Lower Saxony (see Table 1), the two federal states with the biggest swine populations (Federal Statistical Office, 2017). The genotype combination G5P[13] was exclusively found in Lower Saxony and Thuringia. These two combinations can be seen as examples for geographic regional occurrence with high dominance. On the other hand, the genotype combination G9P[23] was detected geographically more widespread in seven of ten federal states with high frequency (Table 1). Other genotype combinations, e.g. G4P[23] and G5P[23], were detected less frequently but spread over many federal states.

Since most of the samples from this study were taken in North Rhine-Westphalia and Lower Saxony, the results can be considered representative for the German pig population. For further studies, it might be useful to gather a comparable number of samples from every federal state in relation to the livestock population. In context with the dynamic market on pigs and piglets it is clear that Germany must be seen on its whole and federal borders can only give a theoretical division (Lentz et al., 2016). As a consequence, our results must be set in the European context as depicted in Fig. 4.

4.2. Detected genotypes in the european and global comparison

Since pigs are transported and traded internationally and the RVs occur ubiquitous, it is essential to compare the described porcine RVA genotypes from our study with data as compiled recently by Vlasova et al. (2017). Especially the data gained from North Rhine-Westphalia

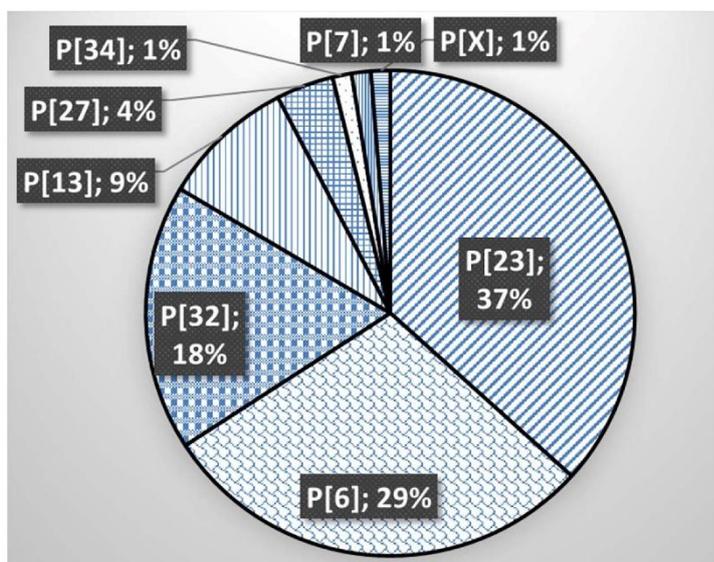


Fig. 2. Distribution of porcine group A rotavirus P-typing (VP4) genotypes from Germany (P[X]: suggested new genotype); n = 79.

Table 1
Regional distribution of genotype combinations of porcine rotavirus A arranged by sample origin.

genotype combinations	Federal states										total
	NRW	BW	BA	BB	MW	LS	SN	ST	SH	TH	
G1P[7]	1										1
G2P[23]	1										1
G2P[27]										1	1
G2P[32]					1						1
G2P[34]							1				1
G3P[6]						1					1
G3P[32]	1										1
G4P[6]	7	1				5	1	1			15
G4P[13]								1			1
G4P[23]		1			1	1		1	1		5
G4P[32]			1				1		1		3
G5P[6]								1			1
G5P[13]						1				2	3
G5P[23]	1		1	1				1		1	5
G5P[27]			1								1
G5P[32]						1					1
G9P[6]				1		2	1				4
G9P[13]	1				1						2
G9P[23]	2	4	2			3		3	1	3	18
G9P[32]	3					3					6
G11P[6]							1				1
G11P[13]					1						1
G11P[27]								1			1
G11P[32]		1				1					2
G26P[X]	1										1
GXP[6]			1								1

Abbreviations: NRW (North Rhine-Westphalia), BW (Baden-Württemberg), BA (Bavaria), BB (Brandenburg), MW (Mecklenburg-West Pomerania), LS (Lower Saxony), SN (Saxony), ST (Saxony-Anhalt), SH (Schleswig-Holstein), TH (Thuringia).

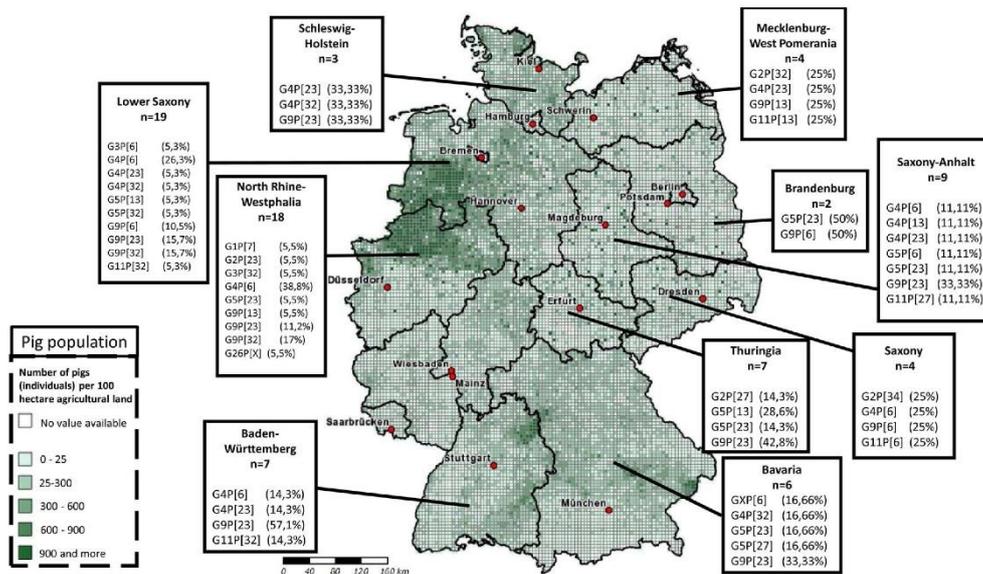


Fig. 3. Density of pig population displayed together with porcine rotavirus A genotype combinations and their prevalence and distribution in Germany. The distribution and prevalence (percent) of the detected rotavirus A genotype combinations together with the density of the German pig population is displayed. The samples were available from 10 out of 16 federal states. (map was modified with our genotyping results from www.atlas-agrarstatistik.nrw.de (2010), Federal Statistical Office (Destatis), 2017)

and Lower Saxony as the two most important centers of pig production in Germany show that the intense pig and piglet trade contributes to the emergence and distribution of porcine RVA.

Analyzing the G-/P-types separately it is noticeable that Germany shares the G-genotypes G4, G5, G9, G11 in addition to the P-genotypes P[6] and P[23] with its directly neighboring countries Belgium and Denmark. Hereby, G4 and P[6] are also dominant in Denmark and are even important in the more distanced countries Slovenia, Spain and the

United Kingdom. G5 is the third frequent G-genotype in Germany and is also dominant in the United Kingdom and Slovenia. The genotypes G9 and P[23] are most often found in Germany similar to the situation with regard to G9 in Spain (Vlasova et al., 2017). Since the Spanish pig population is even bigger than the German, the dominance of G9 in both countries underlines the possibility that the emergence of rotaviruses group A (RVAs) with this genotype might be accelerated by large swine populations. These previously described patterns lead to the

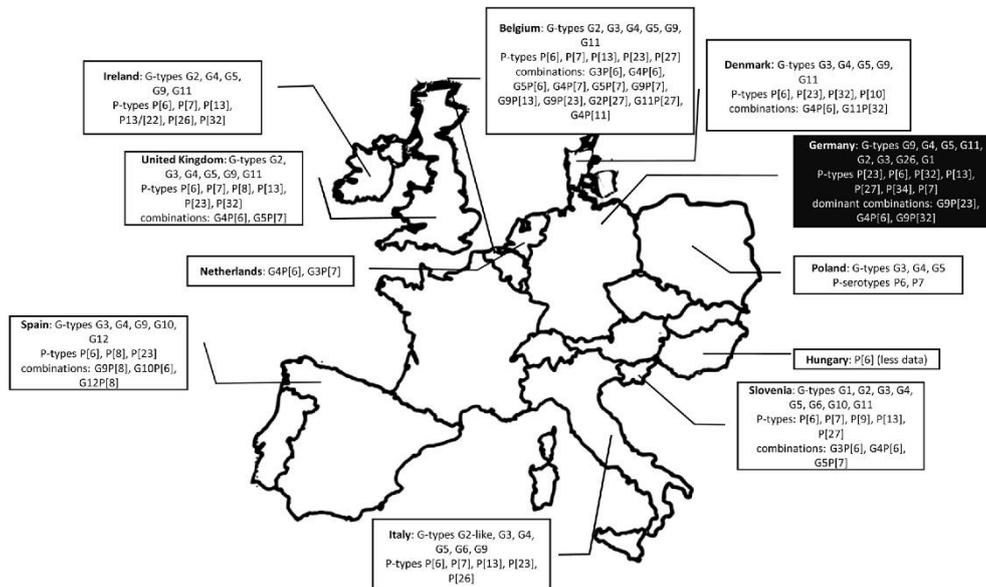


Fig. 4. German porcine rotavirus A genotypes and genotype combinations in comparison to selected data from selected countries in Europe; data other than Germany adopted (abridged) from Vlasova et al. (2017) and Midgley et al. (2012); enumeration of data from Germany in order of frequency.

conclusion that the circulating porcine RVs share specific G- respective P-genotypes within an area of adjacent countries. On the other hand, specific RVAs seem to have an extended distribution since they are also well established in more distanced European countries. Another finding is the nationally limited emergence of genotypes within big swine populations as it can be described for G2, which was in central Europe only detected in Belgium and Germany. Another case can be described for P[13] which was found to be widely spread in Germany but was, within Germany's neighboring countries, only described in Belgium. Even more striking is P[32] which was found to be the third important P-genotype in Germany but was only detected in Denmark and none of the other countries sharing a border with Germany (Vlasova et al., 2017). The fact that should be highlighted here is that Spain and Denmark are very important pig producers in Europe with high production rates.

On the other hand, G10 and G12 e.g. are two of five G-genotypes in Spain which were not found in Germany. Additionally, G3 and P[7] are extremely wide spread in Europe but were of very low prevalence in Germany. G9P[23] and G9P[32] were found relatively frequently in Germany. In Europe, G9P[23] was only found in Belgium and G9P[32] was not detected anywhere else in Europe. However, apart from the focus on the genotype combination, the G-type G9 and the P-type P[23] individually are numerous (Vlasova et al., 2017). P[32] was at least described in Denmark, Ireland and the United Kingdom. The combination G4P[6] was very often found in Germany which was also the case in the adjacent countries Denmark and the Netherlands and also in Slovenia and the United Kingdom (Vlasova et al., 2017). These observations give good indications that RVA epidemiology is, with some exceptions as in the case of G4P[6], more or less regionally or nationally restricted. Whether common patterns and dominancies in different countries are the consequence of RV spread through direct or indirect vectors or even interspecies transmission remains unclear as long as full genome sequencing or extended classification (Maes et al., 2009) is not routinely established for porcine RVs.

Having reviewed globally important porcine RVs, Papp et al. (2013) found G3, G4 G5, G9 and G11 widely spread and important for porcine RV epidemiology. These G-types were also found in our samples. Furthermore, they listed G5, G3 and G4 globally and in Europe as the most

frequent found G-types. As depicted in Fig. 1, our results differ, especially with regard to G9. For P-genotypes our results are comparable to previous published data in Europe (Papp et al., 2013). Two samples in our study showed the genotypes G26 respectively P[34] which were both only described in Vietnam (Anh et al., 2014; Vlasova et al., 2017). G26 is described in humans as the result of a presumed interspecies transmission from pigs (Agbemabiese et al., 2017; My et al., 2014). Along with the fact that some porcine-relevant RVs seem to stand out globally, the change of predominant genotypes over a period of time might also play a very important role (Papp et al., 2013), emphasizing the need for constant RV surveillance. Obviously, some RVAs with specific genotype combinations might either be very infectious and well adapted and/or very resistant due to their viral characteristics so they spread over numerous countries. On the other hand, besides the regional or supraregional dominant genotypes, we found a large number of only rarely described genotypes. Hence, less samples were available from this type of areas which can also be a reason for the lack of detected dominant porcine RVA types in some areas. Nevertheless, the transfer of RVAs of the same genotype or genotype combination is not restricted by a regional border which is not surprising since trade patterns are compromising bigger structures than a federal border. Additionally, a high density of pig populations with the corresponding intense trade efforts can be considered important for the appearance of supraregional RVAs of specific genotype combinations.

4.3. Phylogenetic dendrograms

To get a first insight on transmission and isolate relationships we built two phylogenetic dendrograms (as also performed by Amimo et al., 2013) for the suitable VP4 and VP7 sequences. Therefore we chose all suitable VP7 and VP4 sequences from the most frequent found RVA isolate types G9P[23], G4P[6] and G9P[32] and for VP4 we chose the sequences from the isolates with the G9P[23] and the G4P[6] typing results. In both cases, the best match from the NCBI database was added to the tree, many isolates had identical matches. Both phylogenetic dendrograms can be found as supplement 1 and 2. The dendrogram for VP4 revealed that the sequence 146860 was identical with 179743. Interestingly, both samples stem from the same federal state.

The G-type of these two samples, however, differs. Moreover, some sequences matched best to human RVAs but neither identity in the BLAST nor the dendrogram could underline direct correlations between the two species human and pig. Finally, some RVA sequences, as well for VP7 as for VP4, clustered as regionally closely isolated samples together. However, in other cases regionally distant isolates also clustered together.

5. Conclusion

The above conducted comparison of our results with results found in other European countries (Papp et al., 2013; Vlasova et al., 2017), revealed numerous VP7 and VP4 genotypes in Germany, which were also found in other countries. Collateral to globally important genotypes, we found porcine RVA genotypes in Germany with a suprarregional epidemiology within neighboring countries. Evaluating the data on a regional focused view reveals that dense pig populations seem to accelerate the promotion of country-specific genotypes and genotype combinations. Facing growing globalization with consequences also for animal and meat trade, epidemiologic data should be kept updated and compared regularly (Lentz et al., 2016). Our study offers data that can be used for epidemiologic comparison and long-term observation of changes in dominant genotypes among porcine RVA population. It might be helpful to make further efforts on the infectious mechanisms of RVs to better understand the frequent finding of specific genotypes and their combinations. The lack of a licensed porcine vaccine for the immunization against RVA is affecting the German pig breeding profoundly since animal welfare and piglet rearing are negatively influenced by RV diarrhoea. Thus, epidemiologic studies on RVA are a crucial step to evaluate possible vaccination strains.

Funding

This work was supported by the Vaxxinoa GmbH.

Conflict of interest

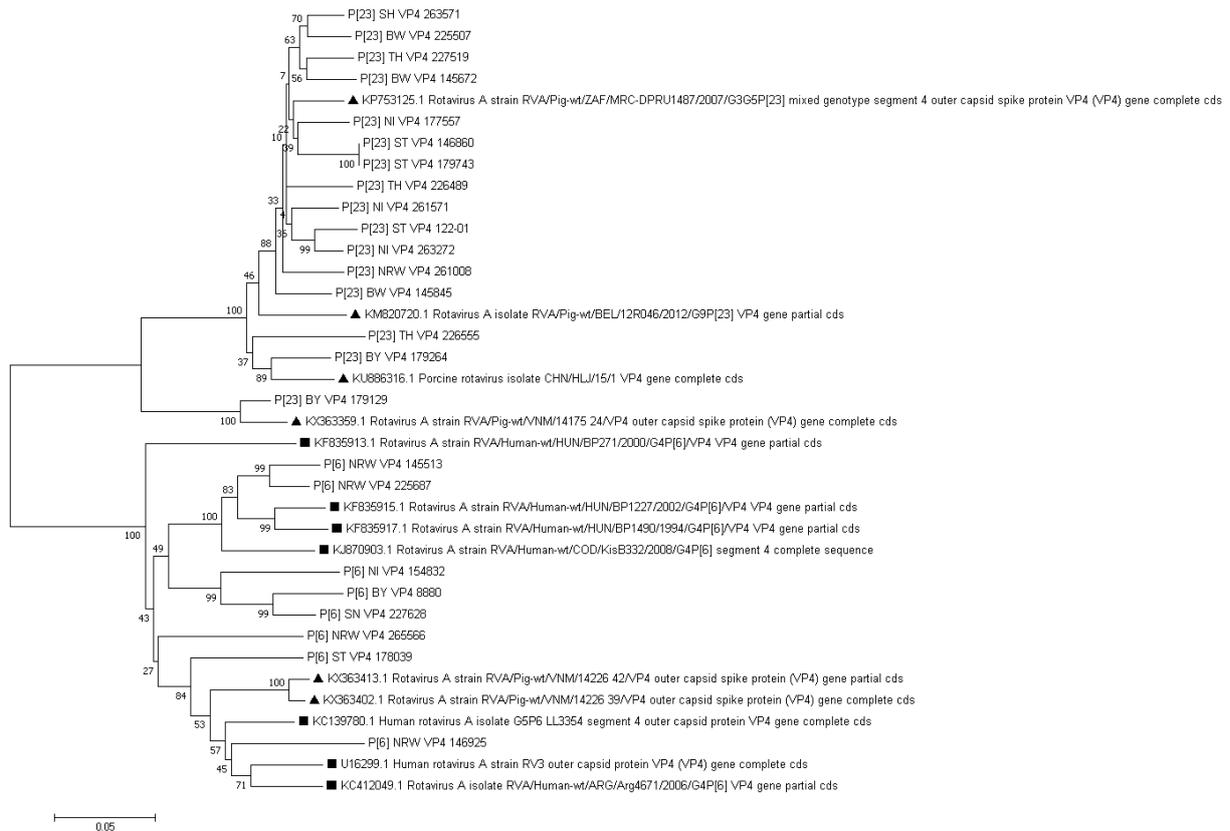
The authors declare that they have no conflict of interest.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.12.014>.

References

- Agbembiese, Chantal Ama, Toyoko, Nakagomi, Punita, Gauchan, Jeevan Bahadur, Sherchand, Pandey Basu, Dev, Nigel, A. Cunliffe, Osamu, Nakagomi, 2017. Whole genome characterisation of a porcine-like human reassortant G26P19 Rotavirus A strain detected in a child hospitalised for diarrhoea in Nepal, 2007. *Infect. Genet. Evol.* 54, 164–169. <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2017.06.026>.
- Agriculture forestry and fishery statistics (op. 2016), 2016. Luxembourg: Publications Office of the European Union (Agriculture, Forestry and Fishery Statistics). Available online at <http://ec.europa.eu/eurostat/documents/3217494/7777899/KS-FK-16-001-EN-N.pdf/cae3c56f-53e2-404a-9e9e-fb5f57ab49e3>, Checked on 9/5/2017.
- Amimo, J.O., Vlasova, A.N., Saif, L.J., 2013. Detection and genetic diversity of porcine group A rotaviruses in historic (2004) and recent (2011 and 2012) swine fecal samples in Ohio: predominance of the G9P[13] genotype in nursing piglets. *J. Clin. Microbiol.* 51 (4), 1142–1151. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.03193-12>.
- Anh, Pham Hong, Carrique-Mas Juan, J., van Nguyen, Cuong, Hoa, Ngo Thi, Anh, Nguyen Lam, Duy, Do Tien, et al., 2014. The prevalence and genetic diversity of group A rotaviruses on pig farms in the Mekong Delta region of Vietnam. *Vet. Microbiol.* 170 (3–4), 258–265. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.02.030>.
- Banyai, Krisztián, Kemenesi, Gabor, Budínski, Ivana, Foldes, Fanni, Zana, Brigitta, Marton, Szilvia, et al., 2017. Candidate new rotavirus species in Schreiber's bats, Serbia. *Infect. Genet. Evol.* 48, 19–26. <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2016.12.002>.
- Federal Statistical Office, 2017. Viehbestand – Fachserie 3 Reihe 4.1 – 3. Mai 2017 (endgültig). (p. 19). Available online at https://www.destatis.de/DE/Publikationen/Thematisch/LandForstwirtschaft/ViehbestandTierischeErzeugung/Viehbestand2030410175314.pdf?__blob=publicationFile, Checked on 9/5/2017).
- Yoshiki, Fujii, Takashi, Shimoike, Hirotsuka, Takagi, Kosuke, Murakami, Todaka-Takai, Reiko, Young Bin, Park, Kazuhiko, Katayama, 2012. Amplification of all 11 RNA segments of group A rotaviruses based on reverse transcription polymerase chain reaction. *Microbiol. Immunol.* 56 (9), 630–638. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1348-0421.2012.00479.x>.
- Gentsch, J.R., Glass, R.L., Woods, P., Gouvea, V., Gorziglia, M., Flores, J., et al., 1992. Identification of group A rotavirus gene 4 types by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 30 (6), 1365–1373 (Available online at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC265294/>).
- Isegawa, Y., Nakagomi, O., Nakagomi, T., Ishida, S., Uesugi, S., Ueda, S., 1993. Determination of bovine rotavirus G and P serotypes by polymerase chain reaction. *Mol. Cell. Probes* 7 (4), 277–284. <http://dx.doi.org/10.1006/mcpr.1993.1041>.
- Ituriza Gómara, Miren, Kang, Gagandeep, Mammen, Ajit, Kumar, Jana Atanu, Abraham, Mary, Desselberger, Ulrich, et al., 2004. Characterization of G10P[11] rotaviruses causing acute gastroenteritis in neonates and infants in Vellore, India. *J. Clin. Microbiol.* 42 (6), 2541–2547. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.42.6.2541-2547.2004>.
- Lentz, Hartmut, Koher, Andreas, Hövel, Philipp, Gethmann, Jörn, Sauter-Louis, Carola, Selhorst, Thomas, Franz, J. Conraths, 2016. Disease spread through animal movements: a static and temporal network analysis of pig trade in Germany. *PLoS One* 11 (5), e0155196. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0155196>.
- Maes Piet, Matthijnsens Jelle, Rahman Mustafizur, van Ranst Marc, 2009. RotaC: a web-based tool for the complete genome classification of group A rotaviruses. *BMC Microbiol.* 9 <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2180-9-238>. (p. 238).
- Douglas, Marthaler, Nitipong, Homwong, Kurt, Rossow, Marie, Culhane, Sagar, Goyal, James, Collins, et al., 2014. Rapid detection and high occurrence of porcine rotavirus A, B, and C by RT-qPCR in diagnostic samples. *J. Virol. Methods* 209, 30–34. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2014.08.018>.
- Matthijnsens Jelle, Ciarlet Max, Rahman Mustafizur, Attoui Houssam, Banyai Krisztián, Estes Mary, K., et al., 2008. Recommendations for the classification of group A rotaviruses using all 11 genomic RNA segments. *Arch. Virol.* 153 (8), 1621–1629. <http://dx.doi.org/10.1007/s00705-008-0155-1>.
- Midgley, E. Sofie, Banyai Krisztián, Buesa Javier, Halailhel Nabil, Hjulsgaer Charlotte, Jakob Ferenc, K., et al., 2012. Diversity and zoonotic potential of rotaviruses in swine and cattle across Europe. *Vet. Microbiol.* 156 (3–4), 238–245. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.10.027>.
- Mihalov-Kovács, Eszter, Gellért, Ákos, Marton, Szilvia, Farkas Szilvia, L., Fehér, Enikő, Oldal, Miklós, et al., 2015. Candidate new rotavirus species in sheltered dogs, Hungary. *Emerg. Infect. Dis.* 21 (4), 660–663. <http://dx.doi.org/10.3201/eid2104.141370>.
- My, Phan Vu Tra, Rabaa, A.Maia, Donato, Celeste, Cowley, Daniel, Phat, Voong Vinh, Dung, Tran Thi Ngoc, et al., 2014. Novel porcine-like human G26P[19] rotavirus identified in hospitalized paediatric diarrhoea patients in Ho Chi Minh City, Vietnam. *J. Gen. Virol.* 95 (Pt. 12), 2727–2733. <http://dx.doi.org/10.1099/vir.0.068403-0>.
- Papp, Hajnalka, László, Brigitta, Jakab, Ferenc, Ganesh, Balasubramanian, de Grazia, Simona, Matthijnsens, Jelle, et al., 2013. Review of group A rotavirus strains reported in swine and cattle. *Vet. Microbiol.* 165 (3–4), 190–199. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.03.020>.
- Patel, Manish M., Pitzer, Virginia E., Alonso, Wladimir J., Vera, David, Lopman, Ben, Jacqueline, Tate, et al., 2013. Global seasonality of rotavirus disease. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 32 (4), e134–47. <http://dx.doi.org/10.1097/INF.0b013e31827d3b68>.
- NCBI Resource Coordinators, 2016. Database resources of the national center for biotechnology information. *Nucleic Acids Res.* 45 <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkw1071>. (Database issue), pp. D12.
- Simmonds, Mirjam Kühne, Armah, George, Asmah, Richard, Banerjee, Indrani, Damanka, Susan, Esona, Mathew, et al., 2008. New oligonucleotide primers for P-typing of rotavirus strains: strategies for typing previously untypeable strains. *J. Clin. Virol.* 42 (4), 368–373. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcv.2008.02.011>.
- Tate, E. Jacqueline, Anthony, H. Burton, Bosch-Pinto, Cynthia, Parashar Umesh, D., 2016. Global, regional, and national estimates of rotavirus mortality in children. *Clin. Infect. Dis.* 62 (Suppl 2), 96–105. <http://dx.doi.org/10.1093/cid/civ1013>.
- Vlasova, N. Anastasia, Amimo Joshua, O., Saif Linda, J., 2017. Porcine rotaviruses: epidemiology, immune responses and control strategies. *Viruses* 9 (3). <http://dx.doi.org/10.3390/v9030048>.
- Zimmerman, Jeffrey J., 2012. *Diseases of Swine*, 10th. Wiley-Blackwell, Chichester, West Sussex.

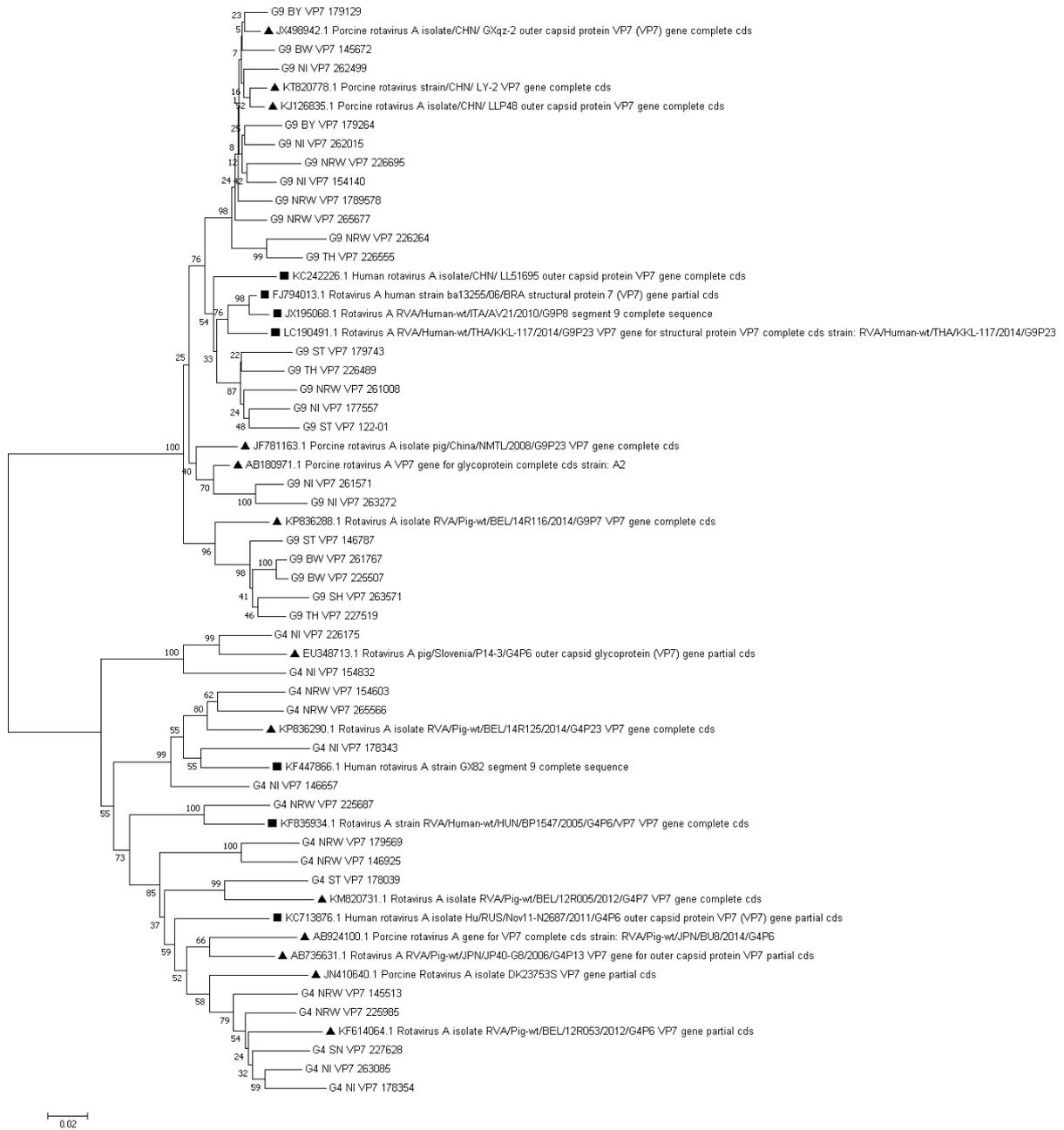


Supplement 1: Phylogenetic analysis of the partial nucleotide sequences available for structural protein VP4 from the porcine RVAs with the dual typing results G9P[23] and G4P[6] identified in our study. The **triangle** marks available porcine VP4 RVA sequences generated from NCBI. The **square** marks available human VP4 RVA sequences generated from NCBI.

Abbreviations federal states: SH: Schleswig-Holstein, BW: Baden-Württemberg, TH: Thuringia, NI: Lower Saxony, ST: Saxony-Anhalt, NRW: North Rhine-Westphalia, BY: Bavaria, SN: Saxony

The evolutionary history was inferred using the Neighbor-Joining method [1]. The optimal tree with the sum of branch length = 1.67226494 is shown. The percentage of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (800 replicates) are shown next to the branches [2]. The tree is drawn to scale, with branch lengths in the same units as those of the evolutionary distances used to infer the phylogenetic tree. The evolutionary distances were computed using the Kimura 2-parameter method [3] and are in the units of the number of base substitutions per site. The analysis involved 37 nucleotide sequences. All positions containing gaps and missing data were eliminated. There were a total of 679 positions in the final dataset. Evolutionary analyses were conducted in MEGA7 [4].

1. Saitou N. and Nei M. (1987). The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4:406-425.
2. Felsenstein J. (1985). Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783-791.
3. Kimura M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16:111-120.
4. Kumar S., Stecher G., and Tamura K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution* 33:1870-1874.



Supplement 2: Phylogenetic analysis of the partial nucleotide sequences available for structural protein VP7 from the porcine RVAs with the dual typing results G9P[23], G9P[32] and G4P[6] identified in our study. The **triangle** marks available porcine VP7 RVA sequences generated from NCBI. The **square** marks available human VP7 RVA sequences generated from NCBI.

Abbreviations federal states: SH: Schleswig-Holstein, BW: Baden-Württemberg, TH: Thuringia, NI: Lower Saxony, ST: Saxony-Anhalt, NRW: North Rhine-Westphalia, BY: Bavaria, SN: Saxony

The evolutionary history was inferred using the Neighbor-Joining method [1]. The optimal tree with the sum of branch length = 2.08173450 is shown. The percentage of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (800 replicates) are shown next to the branches [2]. The tree is drawn to scale, with branch lengths in the same units as those of the evolutionary distances used to infer the phylogenetic tree. The evolutionary distances were computed using the Kimura 2-parameter method [3] and are in the units of the number of base substitutions per site. The analysis involved 58 nucleotide sequences. All positions containing gaps and missing data were eliminated. There were a total of 579 positions in the final dataset. Evolutionary analyses were conducted in MEGA7 [4].

1. Saitou N. and Nei M. (1987). The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4:406-425.

2. Felsenstein J. (1985). Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783-791.

3. Kimura M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16:111-120.

4. Kumar S., Stecher G., and Tamura K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution* 33:1870-1874.

4 Geleitwort zu Publikation 2 (Manuskript, unveröffentlicht)

Nachdem die epidemiologische Situation von RVA in Deutschland analysiert wurde (siehe 3.1 Publikation 1), sollten vergleichend die Charakteristika der Epidemiologie von RVC untersucht und beschrieben werden. Da wie eingangs bereits beschrieben (siehe Kapitel 1 Einleitung) die Verbreitung und Relevanz von RVC beim Schwein weitestgehend unklar ist, sollte erst das generelle Vorkommen von RVC in Schweinen verschiedenen Alters untersucht werden. Dabei wurden 2596 Proben mittels quantitativer Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) auf das Vorkommen von RVA, RVC und der Koinfektion RVA/RVC untersucht. Diese Untersuchung liefert die Grundlage für die Einschätzung von Vorkommen, Relevanz und betroffenen Altersgruppen in Deutschland. Erstmals wurden in so großem Probenumfang Kot- und Organproben von deutschen Schweinen auf RVA und RVC analysiert, sodass der Vergleich mit international erhältlichen Ergebnissen anderer Schweinepopulationen möglich wird. Darüber hinaus liefern die Daten die Grundlage zur Abschätzung des Vorkommens von RVC. Dies ermöglicht einen absoluten Vergleich mit Nachweisraten von RVA und somit eine Einschätzung der diagnostischen Relevanz, ein Typisierungssystem für RVC flächendeckend zu etablieren.

Ergebnisse

- 760 untersuchte Schweinebestände
- 1032 Proben RV-positiv
- 42,1 % RVA positiv // 49,0 % RVC positiv // 8,9 % RVA/RVC Koinfektion
- Signifikante Korrelation zwischen Alter der Tiere und Infektionsstatus im Chi-Quadrat-Test (Steigende Relevanz von RVC, je älter die Tiere werden; Ausnahme: Einbruch bei Gruppe „Absatzferkel“)
- RVA & RVC von vergleichbarer Relevanz bei Saugferkeln
 - Saugferkel zeigen RVC-*Peak* in der ersten Lebenswoche
 - Generell häufigste RVC-Detektion in Gruppe Mast/Jungsau/Sau
- Koinfektion RVA/RVC bei abgesetzten Ferkeln am häufigsten → abnehmende Relevanz in älteren Altersgruppen

Schlussfolgerung

Der frequente Nachweis von RVC, in vergleichbaren Dimensionen wie RVA, belegt die weite Verbreitung von RVC in Schweinebeständen. Unter den Saugferkeln weisen insbesondere sehr junge Ferkel in der ersten Lebenswoche hohe RVC Infektionsraten auf. Die hohe Zahl von Tieren im Flatdeck und auch bei Masttieren und Jungsauen/Sauen mit RVC-Infektion und RVA/RVC Koinfektion ist auffällig. Unsere Ergebnisse belegen die Notwendigkeit weiterer Untersuchungen, eventuell mit Probenmaterial von asymptomatischen Tieren. Des Weiteren verdeutlichen die Ergebnisse die Sinnhaftigkeit von RVC-Untersuchungen als wichtigen Bestandteil von Durchfallprofilen für Schweine.

Arbeitsanteil des Promovenden:

Proben-/Datenauswahl, Zusammenfassen der vorliegenden qPCR-Ergebnisse, Interpretation der Infektionsraten in den Altersklassen (in Absprache mit den anderen Autoren), Auswahl, Durchführung und Interpretation der statistischen Tests (in Absprache mit der Statistikberatung am Institut für Medizinische Informatik, Statistik und Epidemiologie (IMISE)), Erstellen sämtlicher Grafiken, Verfassen des Manuskripts

4.1 Manuskript zu Publikation 2 (unveröffentlicht):

Prevalence of rotavirus group A but not of group C decreases with age in fecal samples of diarrheic pigs

Bibliographische Angaben: 14 Seiten, 3 Abbildungen

Prevalence of rotavirus group A but not of group C decreases with age in fecal samples of diarrheic pigs

Oliver Wenske^{1*}_a, Daniel Piehler_a, Bernd-Andreas Schwarz_a, Thomas W. Vahlenkamp_b, Antje Rückner_b

_aVaxxinova GmbH, Deutscher Platz 5e, 04103 Leipzig, Germany

(E-Mail: oliver.wenske@web.de; daniel.piehler@vaxxinova.com; bernd-andreas.schwarz@vaxxinova.com)

_bInstitute of Virology, Center for Infectious Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, University of Leipzig, An den Tierkliniken 29, 04103 Leipzig, Germany

(E-Mail: vahlenkamp@vetmed.uni-leipzig.de; antje.rueckner@vetmed.uni-leipzig.de)

¹Present address: BERLIN-CHEMIE AG, Glienicke Weg 125, 12489 Berlin, Germany

*Corresponding author: Oliver Wenske; oliver.wenske@web.de

Abstract

Porcine rotaviruses (RVs) are one of the major causes for diarrhea among pigs of all ages, especially in suckling and weaned pigs. We examined a total of 2596 diarrheic fecal samples for the presence of porcine rotavirus A (RVA) and rotavirus C (RVC) using RT-qPCR. Evaluating the pigs' age data we assessed the presence of RV infections in different age groups. Among all 1032 RV-positive samples (39.8% of total samples) we found 435 samples positive for RVA (42.1%), 506 samples (49.0%) positive for RVC and 91 samples (8.9%) positive for both viruses. We demonstrate frequent detection of RVA and RVC in diarrheic pigs with balanced importance of both RV groups A and C in suckling piglets. With increase in age RVC is more often detected in fecal samples from diarrheic pigs pointing towards a more continuous clinical relevance of RVC versus RVA. The frequent finding of RVC gives ample evidence for this virus to be involved in pig diarrhea directly or as a cofactor for other pathogens. The correlation between age and RV excretion of pigs with was inquired with a Chi-Square Test with highly significant results. Investigations on RVA and RVC detection among pigs in different age groups in other countries gave partly inconsistent and/or inconclusive results. Here we present representative data concerning the large pig population of Germany.

Keywords

Porcine, rotavirus, A, C, prevalence, diarrhea

Introduction

Rotaviruses (RVs) affect the health of children worldwide and are also responsible for 215.000 child deaths per year globally (Tate et al. 2016). In addition to rotavirus (RV) infections in humans, a wide range of animals, including piglets and pigs, are also susceptible. Suckling and weaned pigs suffer the most from clinical signs of diarrhea. RV infections in piglets provoke dehydration and consequently might even lead to death. This impairs animal welfare and also accounts for economic losses in pig breeding and pig fattening units. RVs feature a segmented and double-stranded RNA genome and belong to the family of *Reoviridae*. The viral capsid is triple-layered in which the both outer structural proteins VP7 and VP4 are employed for the definition of the different viral G- and P-types. The antigenic and genomic characteristics of the inner viral capsid protein 6 (VP6), however, are applied for the classification of RVs. This classification encompasses ten RV groups (A-J), in which the groups I and J are still tentative (Bányai et al. 2017; Mihalov-Kovács et al. 2015). Detected RV species in pigs are A, B, C, E and H (Marthaler et al. 2014). Group A rotaviruses (RVAs) have been described to be associated with the highest clinical importance for pigs and humans (Marthaler et al. 2014; Theuns et al. 2016). In addition, group C rotaviruses (RVCs) are also causing viral gastroenteritis in different animal species (Marthaler et al. 2013) including pigs (Collins et al. 2008). Clinical and economical relevance is highest in suckling and weaned pigs. The first description of group C rotavirus (RVC) was from a diarrheic piglet more than 30 years ago (Saif et al. 1980). RVC is prospectively to be of increasing importance for human infections (Bányai et al. 2006; Sanchez-Fauquier et al. 2003) and a potential emerging pathogen. RVC fails to replicate in cell culture for the most part. Therefore, research on RVC is less comprehensive compared to studies on group A rotavirus (RVA). Being unattended in the past, RV diagnostic was expanded to also include RVC in routine examinations. As investigations on RVA and RVC detection frequencies among pigs in different age groups in other countries gave partly inconsistent and/or inconclusive results (Katsuda et al. 2006; Marthaler et al. 2012), we set up a study to assess the proportion of RVA, RVC and dual infections RVA/RVC among pigs of different age groups in Germany to better understand RVC's clinical relevance and age correlation. The results of the study with high prevalence of RVC among fecal samples from pigs with diarrhea in different age groups underscores the necessity to include RVC in routine diagnostic analyses in order to increase the accuracy in finding relevant pathogens for diarrheic events.

Materials and methods

Our investigations embraced a total of 2596 samples which arrived the diagnostic laboratory (Vaxxinova GmbH) in Leipzig (Germany) between February 2016 and October 2017 for routine diagnostic analyses. These samples originated from 760 different stables. Considering the preliminary reports from the sending veterinarians and the fact that the samples weren't part of monitoring examinations all samples were from diarrheic pigs. The sample matrices ranged from fecal swabs over feces to intestine tissue containing feces. All samples were solved in Phosphate-Buffered Saline and underwent nucleic acid extraction using the Qiagen MagAttract 96 cador Pathogen Kit (Qiagen, Hilden, Germany) following the manufacturer's instructions. Tissue samples were treated in a ball mill before nucleic acid extraction.

The extracted nucleic acids were examined for the presence of RVA and RVC RNA executing the modified method which was described by Marthaler et al. (2014). The statistical evaluation using a Chi-Square Test was performed with the software IBM SPSS Statistics.

Results

Total detection rates

Analyzing a total of 2596 samples from diarrheic pigs for the presence of RVA and RVC revealed that 1032 samples were positive for at least one of the two tested RV groups. The positive samples originated from 429 different stables. Of all samples tested positive for porcine RVA and/or RVC RNA, 435 samples (42,1%) were positive for RVA, 506 samples (49,0%) were positive for RVC and 91 samples (8,9%) contained RVA and RVC RNA. These data were further arranged by age of the sampled animals.

Statistical analysis: Chi-Square Test

For the further investigation we performed a Chi-Square Test to examine a possible correlation between the pigs' age and the RV infection status. We differentiated three age groups as depicted in figure 1 to calculate the test. The Chi-Square Test revealed a highly significant correlation between age and infection status with RVA and RVC as single or coinfection (Chi-Square (4) = 75,04, $p < 0,001$, $n = 1032$).

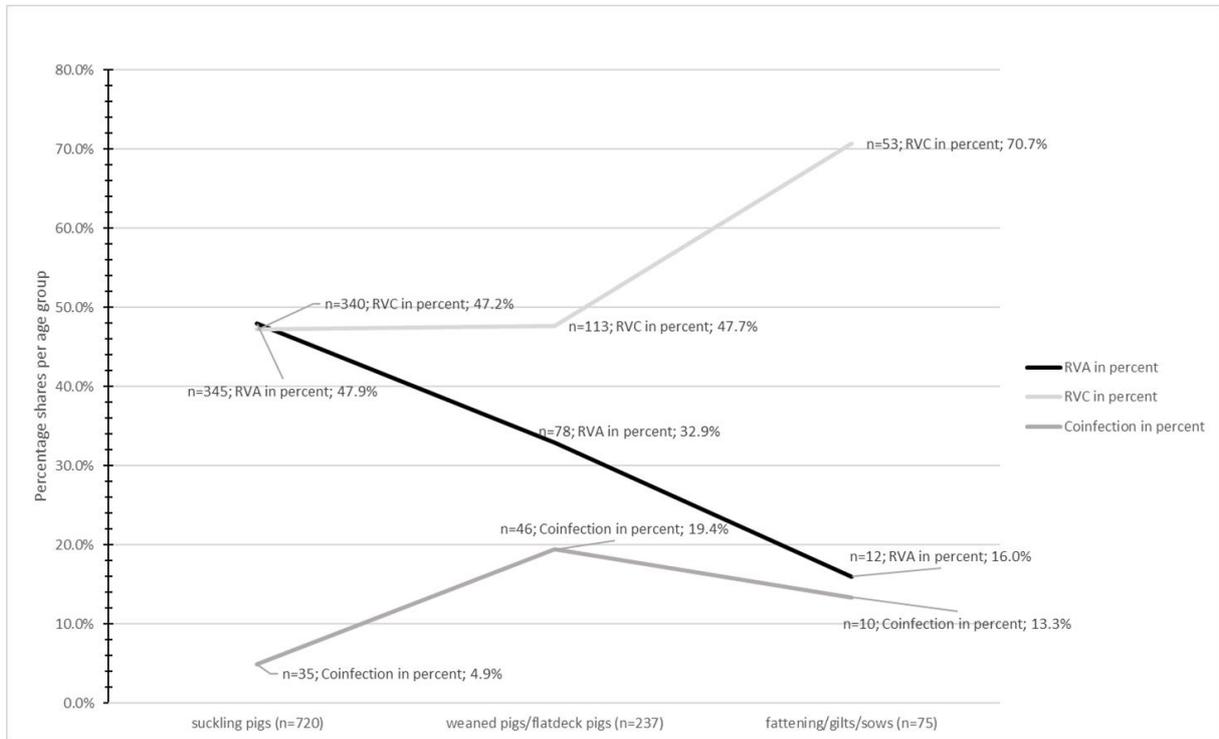


Figure 1 Age group aggregation for Chi-Square Test (n=1032)

Lines represent the rotavirus A, C, and coinfection A/C shares in samples from different age groups. Percentages refer to the portions in the particular age group. Numbers refer to absolute sample numbers detected positive in the particular age group. Numbers of suckling pigs refer to total numbers of suckling pigs investigated.

Infections among different age groups

In this statistical calculation context, it was necessary to summarize the age groups as displayed in figure 1 to compare groups of adequate case numbers. Discovering the highly significant correlation of age and infection we subdivided the age groups subsequently as detailed as possible. Numerous samples were very well characterized by the veterinarians with particular age data from the examined pigs. This enabled the dissection of the suckling pigs into smaller groups of animals (day 1-3, week 1, weeks 2-4). (Fig. 2) This classification supports the highly important approach to monitor RV infection status in the course of growing suckling piglets shortly after birth (1-3 days of age) and during their first week of life. This group is followed by samples of pigs 2-4 weeks of age. The fifth and also most extensive group are the suckling pigs in general which are of unknown age but per definition either younger than 21 or 28 days (grosse Beilage and Wendt 2013) depending on the breeding schedules within the different farms. The next older group consists of weaned pigs and results from samples derived from flatdeck pigs. The oldest group we analyzed encompasses fattening pigs, gilts and sows. Among all tested samples we defined three status groups: RVA positive, RVC positive, coinfection of RVA and RVC. The results are depicted in figures 1 to 3.

Not only the detailed age group aggregation (Fig. 2 and 3) but also the classification used for the initial statistical examination (Fig. 1) illustrate the equal prevalence of RVA and RVC in fecal samples of diarrheal suckling pigs and in general a more and more opposed detection frequency among these two viruses in older age groups. The further the pigs proceed in the production/breeding process the more often RVC was found. The peak is reached among fatteners, gilts and sows where RVC is almost five times more frequently found than RVA and coinfections RVA/RVC (Fig. 1).

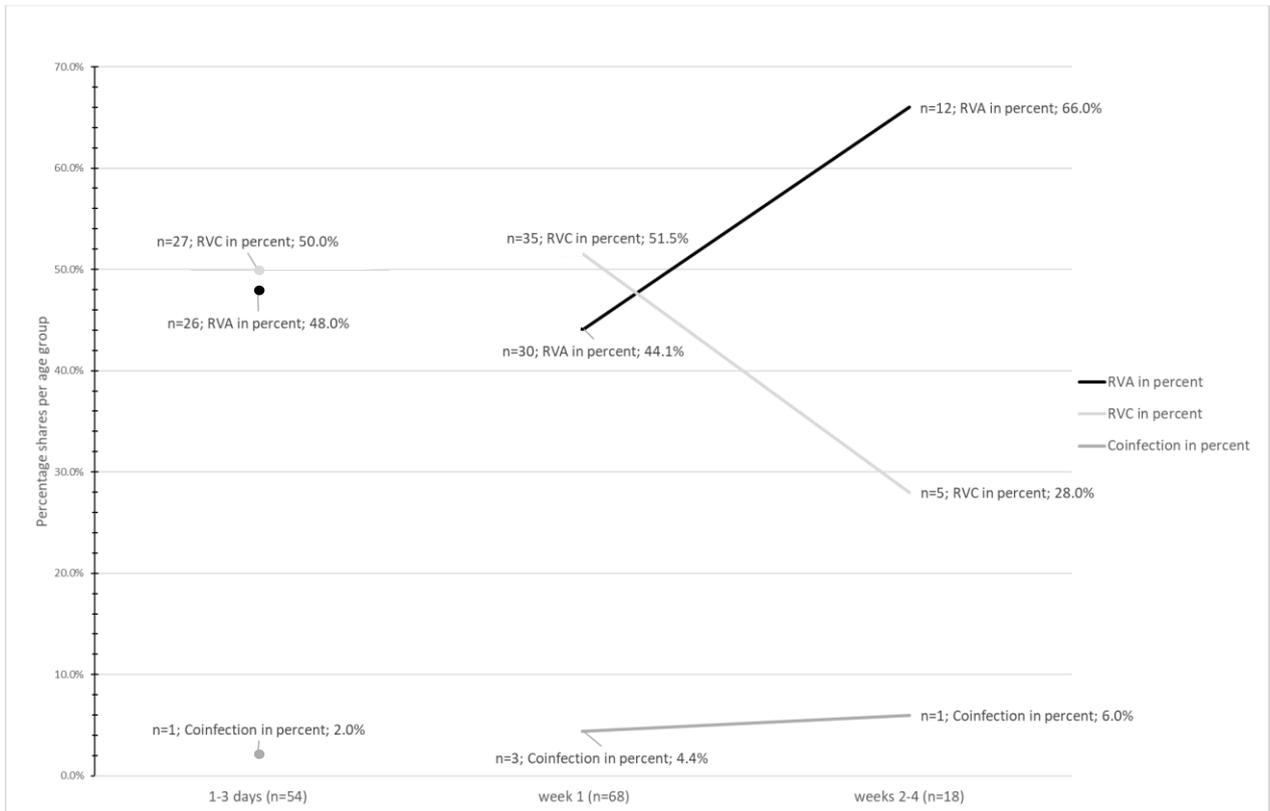


Figure 2 Detailed rotavirus infection status among suckling pigs (n=140)

Detailed presentation of rotavirus infections in different age groups of suckling pigs. Percentages refer to the portions in the particular age group. Numbers refer to absolute sample numbers detected positive. Age group "1-3 days" is depicted with circles since it encompasses a short and definite period. All other groups are represented with lines since they comprise wider periods in animal breeding.

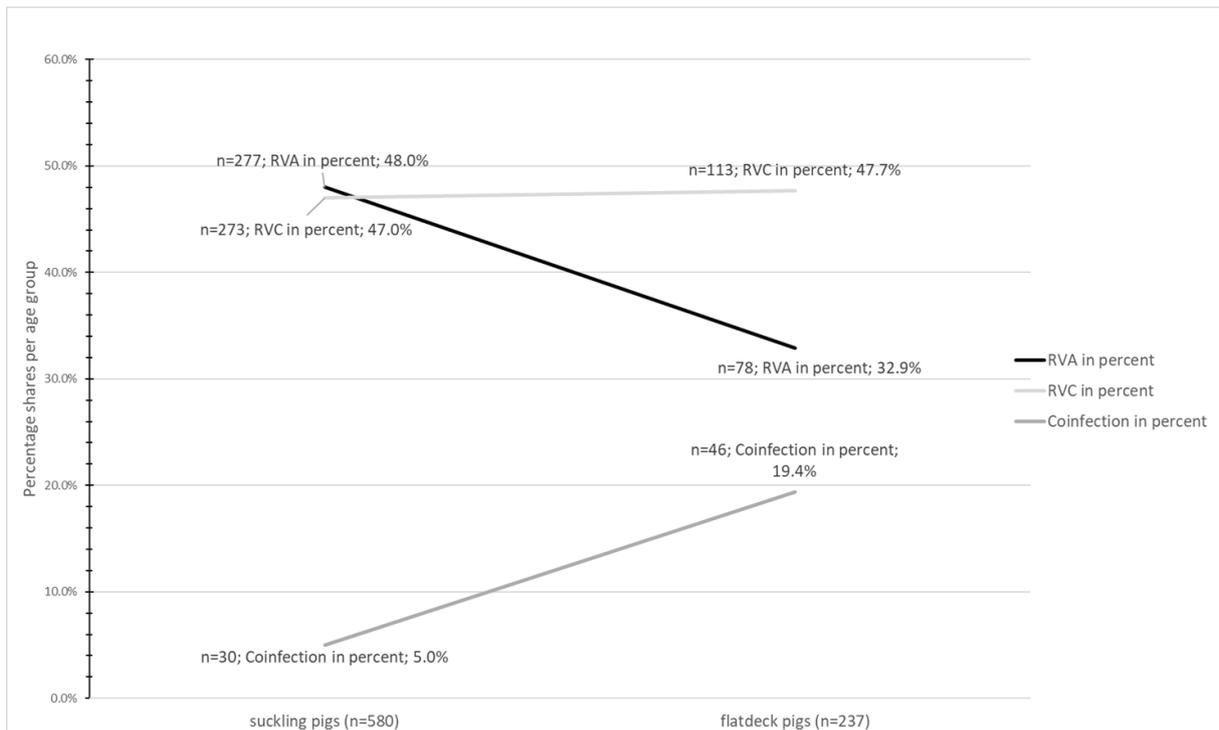


Figure 3 Rotavirus infections among suckling and flatdeck pigs (n=817)

Detailed presentation of rotavirus infections. Percentages refer to the portions in the particular age group. Numbers refer to absolute sample numbers detected positive in the particular age group. Numbers of suckling pigs refer to samples without the detailed age information from figure 1 but defined as suckling pig.

Discussion

RVA infections

Analyzing the infection status among the suckling piglets we found a proportion of 48% to 66% RVA positive in the RV positive samples in this age group (Fig. 2 and 3). Comparable results were also found by other investigators (Janke et al. 1990; Marthaler et al. 2014; Theuns et al. 2016). Nonetheless, the infection status with RVA seems to be dependent on the clinical status of the sampled animals. Collins et al. (2008) examined asymptomatic piglets, Moutelíková et al. (2014) surveyed among clinical and non-clinical animals and Lorenzetti et al. (2014) analyzed samples from Brazil where a RVA vaccine is commercially available in pigs and thus RVA is less frequently found. After weaning we found a particular excretion pattern: The older the pigs are, the less important becomes RVA in comparison to RVC. (Fig. 3) More recent studies from Marthaler et al. (2012) indicated growing RVA positive sample numbers the older the pigs with 100% positive RVA results in the samples from animals older than 55 days. Contrary to these results we reported a decrease in RVA positive samples from weaning to the group fattening/gilt/sow (Fig. 1 & 3).

Due to different definitions among veterinarians, weaned pigs are most likely in the flatdeck, but age definition encompasses a period of up to 6 weeks. As a result, we summarized weaned and flatdeck pigs. Future study design could focus on detailed age data in weaned pigs and older flatdeck pigs to analyse infection dynamics over time in the flatdeck.

RVC infections

Our examinations of RVC in suckling piglets found RVC as frequent as RVA with a peak in piglets in the first week and a temporary decrease of frequency from the second week of life (Fig. 2). Examinations from Marthaler et al. (2014) and Lorenzetti et al. (2014) had comparable conditions to our study. We found RVC in diarrheal suckling piglets with a percentage of 47% (Fig. 1) which was also alike in the above-mentioned studies. However, Marthaler et al. (2013; 2014) registered the most RVC infections in very young piglets (1-3 days of age) whereas we located a peak some days later (Fig. 2). Unfortunately, we might have missed some RVC positive cases in very young piglets due to improper age information due to our study design. Katsuda et al. (2006), however, described a generally lower importance of RVC in suckling piglets. It is possible, that the greater number of samples in our study lead into a more precise analysis. Alternatively, RV group distribution could differ from continent to continent or even between different countries as it was shown for RVA genotypes in Germany and neighboring countries (Wenske et al. 2018). In contrast to the development of RVA percentages, RVC portions become more and more important the further pigs grow. In numbers, RVC prevalence ranged from 47,7% in the flatdeck to 70,7% in the group fattening/gilts/sows (Fig. 1). Marthaler et al. (2012; 2013; 2014) found inverse RVC detection rates which decreased from weaned pigs to pigs older 55 days of age. Since our study listed the additional groups flatdeck and fattening/gilts/sows data is difficult to

compare. Another study also observed increasing numbers of RVC infections from nursing to finisher group (Moutelíková et al. 2014) comparable to our results. Interestingly, these samples were mainly from asymptomatic pigs. In contrast, we included samples which were sent to our lab due to diarrheic events and RVC detection could be involved as a reason for diarrhea. Moreover, one might assume a regionally lower incidence of RVC as shown in Thailand (Tuanthap et al. 2018). Nonetheless, RVs must always be considered as a promoting factor for bacterial diarrhea. But also sole importance of RVC can be assumed. Hence, Bohl et al. (1982) showed shortly after the first description of RVC, formerly called Porcine Pararotavirus, high morbidity and mortality rates in piglets less than 72 h old. Even though this study was performed with gnotobiotic pigs, clinical relevance of RVC must be strongly assumed.

RVA/RVC coinfections

Observing RVA and RVC infections automatically leads to the specific case of coinfections with RVA/RVC. These coinfections among suckling piglets were detected in 5% of our positive samples and mounted up to 20% in weaned pigs. (Fig. 1) In older pigs, coinfection percentages decreased again. Data from Janke et al. (1990) and Marthaler et al. (2012; 2014) also revealed highest RVA/RVC coinfection numbers in weaned pigs. Data from Germany on RVA and RVC infection status in pigs from Otto et al. (2015) underline the frequent finding of RVA and RVC in German piglets. The clinical relevance can be assumed since Collins et al. (2008) found no RVA/RVC coinfections in asymptomatic pigs. Moreover, infection studies of gnotobiotic calves with bovine RVA and RVC lead to more severe histopathological lesions (Chang et al. 1999) than single infections which substantiates the above mentioned thesis.

Comparison with RV infections among specific age groups of pigs with other published data illustrates differences but also similarities to our study. On the one hand, study design might play an important role in causing differences in RVA and RVC detection rates. On the other hand, viral infections in humans promote bacterial infections and the other way around (Bhavnani et al. 2012). However, correlation between rotaviral infections and other pathogens could not be proven by Unicomb et al. (1996). Therefore, the role of bacterial factors in RV infections and the mechanisms possibly involved must be investigated in further studies.

Noticeable in our set of samples is a remarkably high proportion from RVA and/or RVC positive samples to all examined samples (1032 positive/2596 general sample number). Currently some companies in Germany offer autologous vaccines against RVA. No vaccine is in use against RVC. The influence of RVA vaccination can reach such an extent that RVC could double in importance in pigs younger 21 days (Marthaler et al. 2012). It is, however, unknown if so – how many pigs investigated in this study were derived from farms with currently applied RVA vaccinations which might have influenced the outcome of the results in these particular animals. Seeing the high number of investigated fecal samples in the present study we believe that the possible influence of RVA vaccination on the

results are of minor relevance. In general, we found remarkably high numbers of RVC positive samples or RVA/RVC coinfections. Considering the fact that our samples were mostly from diarrheic pigs we must consider the involvement of RVC as a diarrhea causing agent or a cofactor for other pathogens. Since RVA and RVC do not induce cross protectivity (Bohl et al. 1982) both RV groups must be seen as independent pathogens with discrete infection dynamics. In the future, investigations could combine samples from symptomatic and asymptomatic pigs as proposed by Theuns et al. (2014). Hence, one could evaluate the role of subclinical pigs as a permanent reservoir for RVC.

Conclusion

With this study, we contribute novel data on RVA and RVC infections in German pigs in the context of age. This resilient data was generated with a high number of samples. Statistical calculations showed a highly significant correlation of age and RV infections. Since Germany is an important pig breeding country with a big pig livestock (The German pig livestock comprises 26.4 million pigs with a proportion of 7.6 million piglets (Federal Statistical Office 2019)), our data can be seen representative. Thus, we could show the frequent detection of RVA and RVC in diarrheic pigs with balanced importance of both RV groups A and C in suckling piglets. The older the pigs are, the more frequent RVC is found in the samples. Albeit, among suckling pigs RVC detections are highest in the first week of age (Fig. 2). This is in accordance with clinical experience, which indicates importance of RVC in very young piglets. Older pigs' immunity might degrade the clinical importance to a subclinical but epidemiologic important permanent excretion status. Hence, we see the strong advantage to include RVC in virological examinations of diarrheic events. The frequent finding of RVC gives ample evidence for the clinical relevance in pig diarrhea directly or as a cofactor for other pathogens. Since bacterial factors were out of the scope of our study these could be an important approach for further investigations in Germany following the example of studies which detected RV species in correlation with bacteria. Hence, interaction between RV and bacterial pathogens is not terminally proven yet. Limited cell culture growth of some RV groups confines in vitro and in vivo studies. Hence, further investigation of these groups must be gained from field samples. With this study we proved the contribution of RVC diagnostic to the investigation of diarrheic events and showed the urgent need to include RVC in standard examination protocols.

Abbreviations

RVA: Rotavirus of group A; RVC: Rotavirus of group C; RVAs: Rotaviruses of group A; RVCs: Rotaviruses of group C

Competing interests

The authors DP and BAS are current employees of the funding company. At no point, the funding company tried to influence or bias the study or the results. OW is a former employee.

Funding

The study was supported by the Vaxxinova GmbH.

Ethical approval

This article does not contain any studies with animals performed by any of the authors.

References

- Bányai K, Jiang B, Bogdan A, Horvath B, Jakab F, Meleg E, Martella V, Magyari L, Meleg B, Szucs G (2006) Prevalence and molecular characterization of human group C rotaviruses in Hungary. *J Clin Virol* 37(4):317–322. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2006.08.017>
- Bányai K, Kemenesi G, Budinski I, Foldes F, Zana B, Marton S, Varga-Kugler R, Oldal M, Kurucz K, Jakab F (2017) Candidate new rotavirus species in Schreiber's bats, Serbia. *Infect Genet Evol* 48:19–26. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.12.002>
- Bhavnani D, Goldstick JE, Cevallos W, Trueba G, Eisenberg JNS (2012) Synergistic Effects Between Rotavirus and Coinfecting Pathogens on Diarrheal Disease: Evidence from a Community-based Study in Northwestern Ecuador. *Am J Epidemiol* 176(5):387–395. <https://doi.org/10.1093/aje/kws220>
- Bohl EH, Saif LJ, Theil KW, Agnes AG, Cross RF (1982) Porcine pararotavirus: detection, differentiation from rotavirus, and pathogenesis in gnotobiotic pigs. *J Clin Microbiol* 15(2):312–319
- Chang KO, Nielsen PR, Ward LA, Saif LJ (1999) Dual infection of gnotobiotic calves with bovine strains of group A and porcine-like group C rotaviruses influences pathogenesis of the group C rotavirus. *J Virol* 73(11):9284–9293
- Collins PJ, Martella V, O'Shea H (2008) Detection and characterization of group C rotaviruses in asymptomatic piglets in Ireland. *J Clin Microbiol* 46(9):2973–2979. <https://doi.org/10.1128/JCM.00809-08>
- Federal Statistical Office (2019) German pig population 2018. <https://www.destatis.de/DE/Themen/Branchen-Unternehmen/Landwirtschaft-Forstwirtschaft-Fischerei/Tiere-Tierische-Erzeugung/Tabellen/betriebe-schweine-bestand.html>. Accessed 03 April 2019
- grosse Beilage E, Wendt M (2013) Diagnostik und Gesundheitsmanagement im Schweinebestand. UTB, Stuttgart
- Janke BH, Nelson JK, Benfield DA, Nelson EA (1990) Relative Prevalence of Typical and Atypical Strains among Rotaviruses from Diarrheic Pigs in Conventional Swine Herds. *J Vet Diagn Invest* 2(4):308–311. <https://doi.org/10.1177/104063879000200410>
- Katsuda K, Kohmoto M, Kawashima K, Tsunemitsu H (2006) Frequency of Enteropathogen Detection in Suckling and Weaned Pigs with Diarrhea in Japan. *J Vet Diagn Invest* 18(4):350–354. <https://doi.org/10.1177/104063870601800405>
- Lorenzetti E, Stipp DT, Possatti F, Campanha JET, Alfieri AF, Alfieri AA (2014) Diarrhea outbreaks in suckling piglets due to rotavirus group C single and mixed (rotavirus groups A and B) infections. *Pesqui. Vet. Bras.* 34(5):391–397

- Marthaler D, Homwong N, Rossow K, Culhane M, Goyal S, Collins J, Matthijnsens J, Ciarlet M (2014) Rapid detection and high occurrence of porcine rotavirus A, B, and C by RT-qPCR in diagnostic samples. *J Virol Methods* 209:30–34. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2014.08.018>
- Marthaler D, Rossow K, Culhane M, Collins J, Goyal S, Ciarlet M, Matthijnsens J (2013) Identification, phylogenetic analysis and classification of porcine group C rotavirus VP7 sequences from the United States and Canada. *Virology* 446(1-2):189–198. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2013.08.001>
- Marthaler D, Rossow K, Gramer M, Collins J, Goyal S, Tsunemitsu H, Kuga K, Suzuki T, Ciarlet M, Matthijnsens J (2012) Detection of substantial porcine group B rotavirus genetic diversity in the United States, resulting in a modified classification proposal for G genotypes. *Virology* 433(1):85–96. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2012.07.006>
- Mihalov-Kovács E, Gellért Á, Marton S, Farkas SL, Fehér E, Oldal M, Jakab F, Martella V, Bányai K (2015) Candidate new rotavirus species in sheltered dogs, Hungary. *Emerg Infect Dis.* 21(4):660–663. <https://doi.org/10.3201/eid2104.141370>
- Moutelíková R, Prodělalová J, Dufková L (2014) Prevalence study and phylogenetic analysis of group C porcine rotavirus in the Czech Republic revealed a high level of VP6 gene heterogeneity within porcine cluster II. *Arch Virol* 159(5):1163–1167. <https://doi.org/10.1007/s00705-013-1903-4>
- Otto PH, Rosenhain S, Elschner MC, Hotzel H, Machnowska P, Trojnar E, Hoffmann K, John R (2015) Detection of rotavirus species A, B and C in domestic mammalian animals with diarrhoea and genotyping of bovine species A rotavirus strains. *Vet. Microbiol.* 179(3-4):168–176. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.07.021>
- Saif LJ, Bohl EH, Theil KW, Cross RF, House JA (1980) Rotavirus-like, calicivirus-like, and 23-nm virus-like particles associated with diarrhea in young pigs. *J Clin Microbiol* 12(1):105–111
- Sanchez-Fauquier A, Roman E, Colomina J, Wilhelmi I, Glass RI, Jiang B (2003) First detection of group C rotavirus in children with acute diarrhea in Spain. *Arch Virol* 148(2):399–404. <https://doi.org/10.1007/s00705-002-0921-4>
- Tate JE, Burton AH, Boschi-Pinto C, Parashar UD (2016) Global, Regional, and National Estimates of Rotavirus Mortality in Children 5 Years of Age, 2000-2013. *Clin Infect Dis* 62 Suppl 2:S96-S105. <https://doi.org/10.1093/cid/civ1013>
- Theuns S, Desmarests LMB, Heylen E, Zeller M, Dedeurwaerder A, Roukaerts IDM, van Ranst M, Matthijnsens J, Nauwynck HJ (2014) Porcine group A rotaviruses with heterogeneous VP7 and VP4 genotype combinations can be found together with enteric bacteria on Belgian swine farms. *Vet. Microbiol.* 172(1-2):23–34. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.04.002>
- Theuns S, Vyt P, Desmarests LMB, Roukaerts IDM, Heylen E, Zeller M, Matthijnsens J, Nauwynck HJ (2016) Presence and characterization of pig group A and C rotaviruses in feces of Belgian diarrheic suckling piglets. *Virus Res* 213:172–183. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2015.12.004>

- Tuanthap S, Phupolphan C, Luengyosluechakul S, Duang-In A, Theamboonlers A, Wattanaphansak S, Vongpunsawad S, Amonsin A, Poovorawan Y (2018) Porcine rotavirus C in pigs with gastroenteritis on Thai swine farms, 2011-2016. *PeerJ* 6:e4724. <https://doi.org/10.7717/peerj.4724>
- Unicomb LE, Faruque SM, Malek MA, Faruque AS, Albert MJ (1996) Demonstration of a lack of synergistic effect of rotavirus with other diarrheal pathogens on severity of diarrhea in children. *J Clin Microbiol* 34(5):1340–1342
- Wenske O, Rückner A, Piehler D, Schwarz B-A, Vahlenkamp TW (2018) Epidemiological analysis of porcine rotavirus A genotypes in Germany. *Vet. Microbiol.* 214:93–98. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.12.014>

5 Diskussion

Infektionskrankheiten sind ein zentrales Thema der modernen Schweinehaltung. Neben Fütterung, Stallbau und parasitären Erkrankungen wird dieser Problematik zu Recht eine große Relevanz beigemessen. Dabei muss unterschieden werden zwischen bakteriellen und viralen Erregern. Bakteriologisch ist bei der richtigen Auswahl von passenden Nährmedien eine zuverlässige Erregeridentifikation mit hoher Sensitivität zu erreichen. Je nach zu untersuchendem Material können verschiedene Übersichts- und Selektivmedien genutzt werden. Im Gegensatz dazu ist virologische Diagnostik immer zielgerichtet und identifiziert nur Erreger, nach denen auch gesucht wird. Die Ursache dafür findet sich in der Notwendigkeit von molekularbiologischen oder immunologischen Verfahren zum Virusnachweis. Diese können nur verdachtsweise im Diagnostikumumfang definiert werden. Der Einsatz von Elektronenmikroskopie soll hier einmal außer Acht gelassen werden, da diese Methode in der klinischen Diagnostik nur selten durchgeführt wird.

Wie wichtig die Auswahl des geeigneten Nachweissystems tatsächlich ist, zeigt der Vergleich mit Studienergebnissen anderer Autoren. MACHNOWSKA et al. (2014) beschrieben 0,8 % RVA positive Proben aus Deutschland und damit eine deutlich geringere Nachweisrate als unsere Untersuchungen. Allerdings fand die Probenahme in der genannten Studie an Schlachthöfen statt. Somit ist generell zu erwarten, dass keine klinisch erkrankten Tiere dort eintreffen und in der Regel ältere und somit immunkompetente Tiere dort angeliefert werden. Unsere Untersuchungen hingegen basieren auf einer Vorauswahl klinisch erkrankter Tiere.

Andere Autoren (ZHOU et al. 2016) fanden gar keine RVAs und nur sehr wenige RVCs in deutschen Schweineproben. Bei der Interpretation muss jedoch berücksichtigt werden, dass weniger Proben als in der hier vorliegenden Studie untersucht wurden und zudem das Alter der untersuchten Tiere in der oben genannten Publikation nicht klar einzugrenzen ist. Möglicherweise wurden somit überwiegend ältere und somit immunkompetentere mit geringeren Ausscheidungsraten in die Studie einbezogen. Interessanterweise basierten die Untersuchungen von ZHOU et al. (2016) und MACHNOWSKA et al. (2014) zudem auch auf anderen Primer-/Sondensätzen als die unserer Methode. Somit wäre auch, unabhängig von möglichen Einflüssen der beprobten Schweinepopulationen, ein Einfluss der Spezifität und Sensitivität der RT-qPCR zu berücksichtigen. Die aber wohl gravierendsten Faktoren bilden Probenumfang und Anzahl der beprobten Betriebe. MACHNOWSKA et al. (2014) untersuchten 120 Proben aus 12 Betrieben. ZHOU et al. (2016) untersuchten 44 Proben diarrhöischer Schweine aus Deutschland aus 3 verschiedenen Betrieben. In den vier anderen beprobten Ländern waren die Probenzahlen im ähnlichen zweistelligen Rahmen. Bezieht man nun die Ergebnisse von MARTHALER et al. (2014) ein, ergibt sich ein logisches Bild. Dort wurden 7508 Proben von Schweinen aus Kanada, Mexiko und den USA unter anderem auf das Vorhandensein von RVA und RVC untersucht. Die dabei genutzten Primer- und SONDENSEQUENZEN waren auch Grundlage unserer PCR zum Nachweis von RVA

und RVC. Folglich scheint es einen erheblichen Einfluss des Probenumfangs auf die Nachweisrate von RVA und RVC zu geben. Dies lässt sich daraus ableiten, dass sowohl die hier vorliegende Studie als auch die von MARTHALER et al. (2014) einen hohen Probenumfang und vergleichbare Nachweisraten für RVA und RVC aufwiesen. Der distinkte Einfluss der Primer-/Sondensequenzen hingegen wäre ein geeigneter Ansatzpunkt für weitere Untersuchungen. Eine denkbare Studienreihe könnte einen festgelegten Probensatz mit den RT-qPCR-Protokollen der zuvor beschriebenen Publikationen auf das Vorhandensein von RVA und RVC hin untersuchen. Die erhaltenen Daten könnten zur Festlegung der Sensitivität der jeweiligen Protokolle genutzt werden. Dazu wäre methodisch eine Verdünnungsreihe mit absteigender Konzentration der RV-RNA herzustellen, um anschließend die kleinste zu detektierende RNA-Konzentration zu bestimmen. Am zuverlässigsten wäre dabei der Einsatz von Plasmid-DNA, da im Gegensatz zu Feldmaterial die Ausgangskonzentration an DNA bekannt wäre. Beachtet werden muss jedoch, dass die Basensequenz für jede zu untersuchende Primersequenz passend synthetisiert werden müsste. Da es sich bei Rotaviren bekanntermaßen um RNA-Viren handelt, beinhaltet jede PCR eine vorangestellte Reverse Transkription, die aus der Basensequenz der RNA der RVs komplementäre DNA (cDNA) synthetisiert. In einem wie zuvor beschriebenen Versuchsaufbau unter Einsatz von Plasmiden würde der Einfluss dieser Reversen Transkription vernachlässigt. Faktisch wird er keinen bedeutenden Einfluss haben, da theoretisch ein einziger erfolgreich synthetisierter cDNA-Strang genügt, um die nachfolgende PCR durchzuführen. Nichtsdestotrotz wirkt sich die Sensitivität der Reversen Transkription limitierend auf die nachfolgende PCR aus und muss bei falsch negativen Ergebnissen als möglicher Ansatz für Optimierungen bedacht werden. Dementsprechend sollte auch dieser Faktor in einem Versuchsaufbau analysiert werden, der spezifisch die Nachweisrate verschiedener Primersätze untersuchen würde.

5.1 Genotypisierung von RVA

Die Typisierung von RVA gewinnt zunehmend an Bedeutung. Dies resultiert aus den zuvor beschriebenen genetischen Variabilitäten der RVs. Dementsprechend ergibt sich insbesondere im internationalen Vergleich der Nachweisraten von RVA und RVC in Schweinebeständen ein sehr diverses Bild. Vor diesem Hintergrund wurde im Rahmen der vorliegenden Studie eine deutschlandweite Typisierung und geografische Einordnung der RVA-Typen vorgenommen. Die Eingrenzung der Typisierungen auf RVA ergab sich aus den folgenden zwei Gründen. Einerseits existiert lediglich für RVA ein etabliertes Typisierungstool (MAES et al. 2009), andererseits liegen für RVA deutlich mehr Daten in Form von Publikationen und Sequenzen genotypisierter RVs vor, die zum internationalen Abgleich genutzt werden können. Neben den in Publikation 1 (siehe 3.1) beschriebenen RVA-Genotypen, die sich im europäischen Vergleich zahlreich wiederholen, offenbarten die hier vorliegenden Untersuchungen das häufige Vorkommen von RVAs mit der Typenkombination G9P[32], welche zuvor in Europa nicht beschrieben wurden. Darüber hinaus erfolgte in der vorliegenden Studie der Nachweis von G26 und P[34], die jeweils nur in Vietnam beschrieben wurden. Das gleichzeitige

Vorkommen von RVAs mit exklusiv nationalen und auch solchen mit auffallend geografisch weit entfernt auftretenden G- und P-Typen führt zu der Frage, wie eine derart hohe Variabilität zu begründen ist. Insbesondere diese seltenen, nicht regulären RVA-Typen verdienen besonderes Augenmerk, da sie potenzielle Reservoirs neuen Erbguts sind und zur Varianz beitragen könnten. Im Gegensatz zu den verbreiteten und gängigen RVs stellen diese eine Quelle völlig neuer und merklich abweichender Basensequenzen dar. Im Falle von Rekombinationen tragen diese seltenen Basensequenzen zu merklicher Veränderung in den Genomen bei.

5.2 RVs als Zoonoseerreger

Wie im vorhergehenden Abschnitt bereits thematisiert wurde, ist eines der auffallendsten Merkmale der RVAs ihre hohe genetische Diversität. Fraglos können im Rahmen der dualen Typisierung (G- und P-Typen) lediglich Rückschlüsse auf die Diversität der beiden dafür kodierenden Genomsegmente gezogen werden. Neben der Möglichkeit der spontanen Mutation sind Rotaviren aufgrund ihres segmentierten Genoms einer höheren Wahrscheinlichkeit des *Reassortments* ausgesetzt. Dabei werden Genabschnitte unterschiedlicher RV-Populationen untereinander ausgetauscht. Je nachdem, welche Genomsegmente ausgetauscht werden, verändert sich auch die antigenetische Eigenschaft der RVs. Dieses *Reassortment* kann dabei in zwei verschiedenen Szenarien stattfinden. Einerseits kann der Genomaustausch stattfinden, wenn zwei verschiedene RV-Populationen in einer Schweineherde zirkulieren oder Tiere mit unterschiedlichen RV-Infektionen aufgrund von Zukäufen oder Umstellungen in Kontakt kommen. Andererseits können auch RV-Populationen, die in unterschiedliche Tierarten oder dem Menschen vorkommen, Genomsegmente austauschen. Die Entstehung von human-animalen Reassortanten beeinflusst die speziesübergreifende Infektiosität maßgeblich (STEYER et al. 2008). Unter Umständen wird ein RV plötzlich für eine Spezies infektiös bzw. pathogen, für die es zuvor apathogen war oder die es vorher nicht infizieren konnte. Untersuchungen anderer Autoren belegen dies eindrucksvoll. Die *Transmission events* bilden dabei einen erheblichen evolutiven Vorteil für die RVAs. Die entscheidenden Faktoren sind insbesondere die verbesserte Adaptation an den Wirt in Verbindung mit einem naiven Immunsystem (MARTELLA et al. 2010). Eine Transmission ist dabei einerseits zwischen unterschiedlichen Tierarten möglich, wie von GHOSH et al. (2012) von Schwein auf Pferd beschrieben wurde. Andererseits konnte aber auch die RV-Transmission von Tieren auf Menschen in diversen Studien gezeigt werden, wie es zum Beispiel für den Wechsel von RVs mit P-Typ [6] von Schweinen auf Menschen dokumentiert wurde (HWANG et al. 2012; MUKHERJEE et al. 2009; STEYER et al. 2008; ZELLER et al. 2012). Neben dem Kontakt von Mitarbeitern in der Landwirtschaft und Tierhaltung mit RVs spielt auch die Ausbringung von Schweinedung und -mist eine Rolle bei der Verbreitung von RVs (MARTHALER et al. 2013; MIYAZAKI et al. 2012; STEYER et al. 2008). Unterstützend wirkt hier auch die hohe Tenazität der RVs in Fäkalien mit Beständigkeit der Infektiosität von mehr als sechs Monaten (RAMOS et al. 2000). Zudem findet man vor allem in Entwicklungsländern eine ungenügende Trennung von Stall- und Wohnbereichen vor. Darüber hinaus werden Wasserquellen

von Mensch und Tier gleichermaßen genutzt, sodass ein regelmäßiger Kontakt und somit Austausch von RVs höchstwahrscheinlich ist.

Die hier vorliegenden Untersuchungen belegten bereits das häufige Auftreten von RVA mit dem Genotyp G4P[6] bei Schweinen. Dass diese Transmissionen jedoch nicht nur in Entwicklungsländern stattfinden, zeigen Untersuchungen aus Ungarn, in denen ebendiese Typen bei Kindern identifiziert wurden. Die Autoren gehen von einer *interspecies transmission* aus, da Sequenzähnlichkeiten zu porzinen und porzin-abgeleiteten Stämmen bestehen (PAPP et al. 2013a). PAPP et al. stellen die Hypothese auf, dass Transmissionen, entgegen dem sonst häufig angenommenen Szenario, von Menschen auf Schweine stattfinden. Somit wiederum wird die Infektion von Menschen mit porzinen Stämmen erleichtert, da in Folge des *Reassortments* RVs in Schweinen Genomabschnitte von RVs aus Menschen besitzen. Diese Eigenschaft erleichtert porzinen RVs die Humaninfektion.

Folglich ist ein Monitoring der vorkommenden oder gar dominierenden Genotypen, wie man es in der vorliegenden Arbeit für G-/P-Typen in der deutschen Schweinepopulation durchgeführt hat, angebracht. Dies ist unerlässlich, um die relevanten RVs und ihre Genotypen zu bestimmen. Dieses Monitoring sollte in mehreren Tierarten, insbesondere den Nutz- und Begleittieren, stattfinden. In der Konsequenz können Genotypen ausgemacht werden, welche in auffallend vielen Fällen von Transmissionsereignissen auftreten. Diese Erkenntnisse sind auf der einen Seite wichtig für die Identifikation häufig vorkommender RV-Genotypen. Auf der anderen Seite lässt dies auch Rückschlüsse auf jene Genotypen der RVAs zu, welche besonders relevant sind für Transmissionsereignisse und somit als Reservoir neuen Erbmaterials anzusehen sind. Folglich sind RVs dieser Genotypen dann auch als Triebkraft in der weiteren genetischen Variabilität anzusehen. In der Konsequenz können diese Ergebnisse zur Auswahl potenzieller Stämme für den Einsatz in animalen und humanen Impfstoffen (siehe 5.7 Vakzinierung) eingesetzt werden.

5.3 Klinische Relevanz und asymptomatische Träger

Im Rahmen dieser Studie lag der Fokus auf der Untersuchung von Probenmaterial, welches von Tieren mit klinischer Diarrhö stammt. Zukünftig wäre auch die Beprobung von asymptomatischen Schweinen aus Deutschland interessant. Asymptomatische Trägertiere können gute Hinweise auf zukünftig relevant werdende Genotypen der RVs geben, sogenannte „*emerging genotypes*“ (COLLINS et al. 2010; STEYER et al. 2008). Besonders interessant ist die Betrachtung asymptomatischer Tiere darüber hinaus vor allem deswegen, weil dort mehrere RV Populationen in ähnlicher Ausprägung nebeneinander existieren und somit das *Reassortment* ermöglicht wird (MIYAZAKI et al. 2011). Im Gegensatz zu Tieren mit klinischer Diarrhö ist bei asymptomatischen Individuen davon auszugehen, dass sich keine RV-Population dominierend behauptet und somit eine größere Vielfalt an RVs unterschiedlicher Eigenschaften existiert. In einem geeigneten Versuchsaufbau würden gesunde Tiere aus verschiedenen, nicht zusammenhängenden Populationen über einen definierten Zeitraum beprobt werden. Sollte mittels qPCR ein positiver RVA-Nachweis erbracht worden sein, ist eine Sequenzierung des Mikrobioms die optimale Lösung. Diese Methode stellt sicher, dass alle RVs in den Proben erfasst werden. Herkömmliche PCR-Methoden hingegen weisen tendenziell nur die dominierende respektive größte RV-Population nach. Die regelmäßige Wiederholung der Probenahme bei denselben Tieren verfolgt dann das Ziel, etwaige Veränderungen in den vorkommenden RVs zu erkennen. Mittels Sequenzabgleichen könnte dann untersucht werden, ob *Reassortments* stattgefunden haben.

Generell gilt, dass die Erfassung und Überwachung von RV-Typen in Schweinepopulationen konstant und regelmäßig erfolgen sollte, da die genetischen Eigenschaften und somit die Typenzugehörigkeit der zirkulierenden Viruspopulationen einer großen Dynamik unterliegen. Verdeutlicht wird dies durch Untersuchungen von MIYAZAKI et al. (2012), deren Studie gar wechselnde RVA Typen bei denselben Schweinen in verschiedenen Stallabschnitten im Laufe der Aufzucht/Mast zeigen konnte. Es konnten durch repräsentative Probenumfänge neben individuell vereinzelt auch dominierende RVA-Typen identifiziert werden.

5.4 Nicht-typisierbare Rotaviren

Genau wie auch von anderen Autoren beschrieben, konnte mittels der Untersuchungen ein gewisser Anteil (22 %) nicht-typisierbarer RVAs nachgewiesen werden. Die Tatsache, dass mindestens die für VP4 und VP7 kodierenden Segmente (in der 11-Segment-Typisierung sogar aller 11 Genomsegmente) in der PCR erfasst werden müssen, um eine Typisierung durchführen zu können, limitiert die Anzahl typisierbarer RVAs. Unter der Anforderung einer dualen Typisierung, wie in der vorliegenden Arbeit angestrebt, führt der Ausfall des G- oder P-Typs zum Ausbleiben eines Typisierungsergebnisses, da dementsprechend nur einer der beiden Typen erfasst werden konnte. Dabei definiert vor allem die Probenmatrix und die Probenherkunft die Erfolgsquote der Typisierung. Zum einen befinden sich

erwartungsgemäß viele PCR-Inhibitoren in den Matrices Kot und Darmgewebe. Da die Typisierung von RVAs aus zellkultureller Vermehrung fast ausnahmslos gelingt, scheint die Rolle der Inhibitoren aus der Originalmatrix relevant zu sein. Eine Adaptation der RVAs an die Zellkultur ist jedoch nicht immer möglich. Des Weiteren sind bei der Vielzahl an Proben, die in dieser Studie untersucht worden sind, verschiedenste Viruslasten von RVA zu erwarten. Dies wird vor allem durch verschiedene Immunitätsstadien der beprobten Tiere bedingt, da diese zu mehr oder weniger starker Virusreplikation in den Enterozyten führen.

Auf der Ebene des Virusgenoms entstehen weitere Einflüsse durch die RNA-Qualität. Aufgrund der nachgewiesenen Stabilität der Rotaviren (SOLBERG et al. 2009), bedingt durch das dreifach gekapselte Doppelstrang-RNA-Genom, können Typisierungsausfälle in Folge von Degradation bei RVs jedoch vernachlässigt werden. Neben den eben beschriebenen Faktoren muss jedoch vielmehr auch die molekularbiologische Typisierung an sich als Ursache fehlgeschlagener Typisierungen erwogen werden.

Die Vielzahl an publizierten Optimierungsansätzen und dem Design neuer Primer zur Typisierung belegt zweifelsohne, wie divers RVAs sind und dementsprechend schwierig die Typisierung direkt aus Originalmaterial ist. Im Rahmen dieser Studie wurden drei VP4 und zwei VP7 Primerpaare eingesetzt, um die Anzahl der Ausfälle in der Typisierung zu minimieren. SOLBERG et al. (2009) beschrieben für humane RVAs in Ecuador für VP4 7-98 % und für VP7 3-65 % Ausfälle in der Typisierung. Diese Ergebnisse zeigen eindrucksvoll, welche großen Einflüssen die Nachweisraten unterliegen. In der zuvor genannten Studie wird eine hohe Diversität und somit schwankende Sequenzhomologie der Feldproben und der eingesetzten Primer postuliert. Bei Typisierungsuntersuchungen von Schweineproben aus Argentinien beschrieben PARRA et al. (2008) 73 % nicht-typisierbare RVAs. Auffällig sind dabei einerseits der große Anteil, andererseits auch die großen Schwankung in der Zahl nicht-typisierbarer RVAs. Unter diesen Aspekten sind die hier dokumentierten Typisierungsausfälle mit einem Anteil von 22 % (22/101) vergleichsweise selten. Dies spricht für die Eignung der Primerauswahl und die Eignung einer Typisierung mittels mehrerer Primer.

5.5 RVA Nachweise

Neben der zuvor beschriebenen Typisierung von RVAs wurden in der vorliegenden Arbeit die Nachweisraten von RVA und RVC in klinisch erkrankten Schweinen verschiedener Altersklassen untersucht. Die Ergebnisse belegen annähernd gleiche Häufigkeiten von RVA und RVC (42,1 % RVA; 49,0 % RVC; 8,9 % RVA/RVC-Koinfektion). Zur genaueren epidemiologischen Untersuchung werden Typisierungsdaten benötigt. Damit ist es möglich, Verbreitung und Dynamik von RVA-Populationen zu erfassen. Dies ist der Tatsache geschuldet, dass der reine Nachweis von RVA keinen Rückschluss auf einen Wechsel bzw. die genetischen Eigenschaften der erfassten RVAs zulässt. Die dualen Typisierungsergebnisse jedoch erlauben eine verbesserte Zuordnung. Folglich ist die duale

Typisierung geeignet, epidemiologische Zusammenhänge, etwaige Neuinfektionen oder Verschiebungen vorkommender RV-Typen zu erkennen. Demnach sollten im Besonderen die Verbreitung sowie vorherrschende Genotypen-Kombinationen in regionalen RVA-Populationen überwacht werden. Die Quelle neuen Genommaterials oder ganzer RVAs ist u.a. der globale Tier- und Warenhandel sowie wachsende Reiseaktivitäten, auch von Menschen mit Tierkontakt. Speziesübergreifende Infektionen führen zur Entstehung neuer RVs (durch Rekombination von Genmaterial) und können nur erkannt werden, wenn humane und animale RV-Infektionen überwacht werden. Für das veterinärmedizinische Monitoring ist mindestens die Überwachung der Nutztierbestände anzuraten, da diese große, epidemiologisch vernetzte Populationen mit hohen Tierzahlen darstellen. Unter veterinärmedizinischen Aspekten gilt es außerdem, potenzielle RVA Stämme zu identifizieren, die geeignete Kandidaten für eine Impfstoffentwicklung sein könnten (siehe 5.7 Vakzinierung).

5.6 RVC Nachweise

Im Vergleich zu Untersuchungen porzines RVA betreffend liegen zu porzinem RVC relativ wenige Untersuchungen vor. Für die deutsche Schweinepopulation gibt es überhaupt keine aktuellen publizierten Daten. Vor diesem Hintergrund galt das Interesse dem Vorkommen sowie der Altersverteilung klinischer RVC Infektionen. Diese Untersuchungen bilden die Grundlage für weitere Typisierungen porziner RVCs. Im Gegensatz zu RVA gibt es Hinweise darauf, dass porzine und humane RVCs geringe genetische Übereinstimmungen in den Sequenzen von VP4 und VP7 aufweisen (RAHMAN et al. 2005). Ähnlich starke Unterschiede zwischen porzinen und humanen Stämmen zeigten PHAN et al. (2016) für Sequenzen des Virusproteins 6. Weiteres Monitoring ist trotzdem ausgesprochen wichtig, da die Relevanz von RVC für die deutsche Schweinepopulation von Bedeutung zu sein scheint. Darüber hinaus bleibt aufzuklären, inwieweit porzine RVCs evolutionär jünger sind und erst mit der Zeit häufiger artenübergreifend infizieren oder generell eher artspezifisch sind. Einen denkbaren Ansatz zur weiteren Aufklärung dieser Frage könnten phylogenetische Untersuchungen geben. Zu diesem Zweck sollten Sequenzdaten von RVAs und RVCs verglichen werden. Eine entsprechende Isolateauswahl entstammt sinnvollerweise einerseits Beständen mit Doppelinfektionen RVA/RVC sowie Beständen mit ausschließlichem Nachweis von RVA oder RVC. Die Proben sollten des Weiteren von asymptomatischen und klinisch erkrankten Tieren stammen. Die mit den Genomsequenzen durchgeführten phylogenetischen Untersuchungen würden die genetische Distanz zwischen den RVAs und RVCs erfassen. Sollten die RVCs in engem phylogenetischen Zusammenhang stehen, würde dies für eine geringere Diversität sprechen. Dies würde darüber hinaus entweder geringere genetische Variabilität oder sogar evolutionär gesehen kürzere Existenz, im Vergleich zu RVA, bedeuten. Die erhaltenen Informationen müssten dann weiterhin mit der klinischen Relevanz in Verbindung gesetzt werden. Insbesondere RVCs aus Monoinfektionen mit klinischer Symptomatik

sollten einem weiteren phylogenetischen Sequenzvergleich mit Isolaten aus anderen Tierarten und Menschen unterzogen werden. Die erhaltenen Daten würden Auskunft über die speziesübergreifende Relevanz geben. Allerdings ist eine sinnvolle Umsetzung derzeit nicht möglich. In Ermangelung eines harmonisierten Typisierungsschemas für RVC könnten keine RVCs desselben Genotyps ausgewählt werden. Folglich ist eine große genetische Varianz zu erwarten, da eine Vorauswahl von RVCs des gleichen Genotyps nicht möglich wäre.

Die hier vorliegende RVC-Studie sowie auch andere bereits erwähnte Publikationen haben jedoch den häufigen Nachweis von RVC bei Mensch und Tier beschrieben. Zukünftig ist also zunehmende Forschung auf dem Bereich der RVC-Typisierung zu erwarten. Nicht zuletzt, da auch in der Humanmedizin RVC als potenziell pathogenes RV angesehen wird.

5.7 Vakzinierung

Das ubiquitäre Vorkommen von RVs in Stallumgebungen von Schweinen bedeutet ein allgegenwärtiges pathogenes Potenzial. Ursächlich sind die hohen Viruskonzentrationen im Kot infizierter Tiere, geringe Infektionsdosen sowie die außergewöhnlich hohe Tenazität und Langzeitstabilität. Eine Elimination aus der Haltungsumgebung ist annähernd unmöglich (SAIF und THEIL 1990). Da Schweine jedoch agammaglobulinämisch geboren werden (SAIF und FERNANDEZ 1996), ist die Aufnahme kolostraler Antikörper unabdingbar. Entgegen der möglichen Vermutung, das ubiquitäre Vorkommen stimuliere das maternale Immunsystem ausreichend, reichen Antikörpertiter bei Rindern regelmäßig nicht aus, um die Kälber langfristig vor RV-Durchfällen zu schützen (SAIF und FERNANDEZ 1996). Diese Tatsache lässt sich vergleichbar auf Sauen und ihre Ferkel übertragen. Da Ferkel jedoch kurze Zeit nach der Geburt mit RVs infiziert werden können, ist eine protektive Immunität erforderlich. Bestenfalls wird diese initial durch passive Immunisierung über Kolostrum gewährleistet. Die immunologische Konfrontation mit weiteren RV-Antigenen erfolgt anschließend optimalerweise unter dieser passiven Immunität (SAIF und FERNANDEZ 1996). Möglich wäre diese Boosterung mit der gezielten Antigenpräsentation mittels einer mono- oder multivalenten Vakzine. Somit können auch Sauen mittels Impfstoff in Umfang und Ausprägung der Kolostrumqualität beeinflusst werden. Darüber hinaus ist die RV-Vakzinierung der Sauen der Ferkelimpfung überlegen, da sie einen geringeren Arbeitsaufwand und Materialeinsatz bedeutet. Derzeit gibt es in Deutschland jedoch keinen zugelassenen RV-Impfstoff für Schweine. Dieses Fehlen hat massive ethische und ökonomische Konsequenzen zur Folge. Im Detail erleiden somit unnötig viele Ferkel massive Diarrhö, welche mit Störungen des Allgemeinbefindens einhergehen kann. Ökonomisch bedeutet der Mangel an Immunprophylaxe verringerte Gewichtszunahme und erhöhten Personalaufwand. Die intensive Ferkelbetreuung und gegebenenfalls verzögerte Umstallung aus Infektionsschutzgründen bedeuten weitere Kosten. Zudem weisen die Ferkel durch Diarrhö regelmäßig inhomogene Gewichtsprofile auf, die für die Stallgegebenheiten und Vermarktung nachteilig sind.

Für Rinder hingegen sind derzeit sieben RV-Impfstoffe zugelassen (PEI 2019a). Es ist nicht verwunderlich, dass diese häufig umgewidmet werden. Problematisch ist jedoch, dass in vielen Fällen die im Impfstoff eingesetzten RVAs nicht angegeben oder einige Jahrzehnte alt sind und teilweise von anderen Kontinenten stammen. Eine antigenetische Ähnlichkeit zu regional vorherrschenden RVAs ist sehr unwahrscheinlich. Hierbei muss jedoch unterschieden werden zwischen G- und P-Typ. KOBAYASHI et al. (2007) diskutieren die höhere Spezifität von P-Typen im Vergleich zu G-Typen unter Betrachtung der Verbreitung in verschiedenen Tierarten. Aufgrund dieser Theorie wäre eine Wirkung des bovinen Impfstoffs basierend auf G-Typ-Immunität denkbar. Eine Infektionsstudie ergab zwar die Wirkungslosigkeit eines bovinen Lebendimpfstoffs bei Ferkeln und konnte eine wirksame Vermehrung des Impfstammes ausschließen (LECCE und KING 1979), jedoch lassen sich diese Ergebnisse nicht ohne weiteres auf die zahlreichen Impfstämme in bovinen Impfstoffen in zahllosen Kombinationen mit Feldstämmen übertragen. Dies unterstreichen die Studienergebnisse von ZISSIS et al. (1983), welche durchaus eine verringerte Virusausscheidung von Ferkeln, welche mit bovinem RV immunisiert wurden, zeigen konnten. Erwähnt werden sollte jedoch, dass die *Challenge*-Versuche mit humanen RVs durchgeführt wurden. Zusammenfassend bleibt festzustellen, dass keine allgemeingültige Bewertung von speziessfremden Impfstämmen möglich ist.

Grundlegend für die Entwicklung eines RVA-Impfstoffs ist folglich die Erfassung der zirkulierenden RVAs und ihrer entsprechenden antigenetischen Charakteristika. Aufgrund ihrer immunogenen Eigenschaften sind die Gensequenzen der Genomsegmente, die für VP4 und VP7 kodieren, dafür sehr geeignet. Nach der Identifikation relevanter Genotypen können entsprechende RVAs identifiziert werden, welche für einen Impfstoff verwendet werden könnten. Die weitere Auswahl dürfte dann jedoch von der Adaptation an die Zellkultur abhängen. Diese ist unabhkmmlich zur Virusvermehrung. Die bevorzugte Eignung eines attenuierten Lebendimpfstoffs wurde bereits in der humanen RV-Forschung gezeigt. Dabei fielen insbesondere die Vorteile der wiederholten Infektion, ähnlich einer Infektion mit Wildtyp-RVs, simuliert durch Lebendvakzine, auf (KAPIKIAN et al. 1996). Aber auch konkret in einer Studie mit Ferkeln konnte die Überlegenheit einer Lebendvakzine gegenüber einem Totimpfstoff gezeigt werden. Demnach resultierte die starke Virusausscheidung trotz Vakzinierung mit einem Totimpfstoff vermutlich aus der mangelhaften Ausbildung intestinaler Immunität (WELTER und WELTER 1990).

Sind entsprechende RVA-Isolate ausgewählt, könnte ein porziner RVA-Impfstoff hergestellt werden. Dieser wäre trotz der nachgewiesenen hohen Diversität der RVs einige Zeit nutzbar. Hinweisend sind Erfahrungen aus der humanen RV-Impfstoffentwicklung, in welchen eine Kreuzimmunität beobachtet wurde, die auch bei heterologen G-/P-Typen zu wirksamem Schutz führt (DESSELBERGER 2014; VESIKARI et al. 2007). Wie bereits zuvor diskutiert, fehlten bisher flächendeckende Daten zu RVAs in der deutschen Schweinepopulation. Nicht zuletzt deswegen mag es bisher keinen zugelassenen RVA-Impfstoff für Schweine geben. Zudem schränkt die häufig angewandte Umwidmung des bovinen RV-Impfstoffs die ökonomische Attraktivität der porzinen Impfstoffentwicklung ein.

Die Etablierung von autogenen Impfstoffen wird vor allem durch Hindernisse in der zellkulturellen Vermehrung aufgehalten. Zudem erfordern die gesetzlichen Anforderung die Virusinaktivierung in autogenen Impfstoffen. Wie zuvor beschrieben lassen jedoch Totimpfstoffe eine sehr begrenzte Wirksamkeit, vor allem im Hinblick auf intestinale Immunität, bei RVs erwarten. Bedingt ist dies vor allem durch die Notwendigkeit der wiederholten Infektion mit RVs derselben Population zur Ausbildung belastbarer Immunität. Inwiefern autogene Impfstoffe zur kolostralen Immunität gegenüber RVs beitragen würden und entsprechend passive Immunität an die Ferkel vermitteln ist aus Mangel an wissenschaftlichen Untersuchungen unklar.

6 Zusammenfassung

Verfasser: Oliver Wenske

Titel: Epidemiologische Charakterisierung porziner Rotaviren der Gruppe A und Untersuchungen zur altersspezifischen Relevanz der Gruppen A und C

Institut für Virologie

Eingereicht im April 2019

Bibliografische Angaben: 51 Seiten, 9 Abbildungen, 1 Tabelle, 82 Literaturangaben

Schlüsselwörter: Rotavirus, Infektion, Ferkel, Schwein, Deutschland, Genotyp, Regionalität, G-Typ, P-Typ, Alter

Einleitung

Die deutsche Schweinepopulation ist eine der größten in Europa und ist überwiegend als Intensivtierhaltung angelegt. Als Konsequenz daraus haben Jungtiererkrankungen eine große Bedeutung im Hinblick auf Tierwohl und ökonomische Aspekte. Eine dieser Erkrankungen ist die Infektion mit porzinen Rotaviren (RVs). Diese können Schweine aller Altersgruppen infizieren, führen jedoch insbesondere bei Saugferkeln zu massivem Durchfall und in Folge dessen zu Dehydratation bis hin zum Tod. Da porzine RVs ubiquitär vorhanden sind, ist eine Infektion der neugeborenen Ferkel durch Muttersauen oder die Umgebung beinahe unvermeidbar. Hinzu kommt die hohe antigenetische Vielfalt, insbesondere der immunogen wichtigen Proteine VP4 und VP7 der RVs, welche die Schutzwirkung der laktogenen, also Sauenmilch-vermittelten, Immunität begrenzt. Neben guter Hygiene und professionellem Futtermanagement bliebe noch die Möglichkeit einer Impfung. Derzeit gibt es allerdings in Deutschland keinen zugelassenen Impfstoff gegen porzine RVs.

Ziele der Untersuchungen

Die hohe Variabilität und Diversität der RVs ist bekannt, allerdings lagen keine Untersuchungen zum Vorkommen in deutschen Schweinen vor. Diese Studie hatte einerseits das Ziel, zirkulierende, regional dominierende Rotavirus-Typen der Gruppe A (RVAs) zu identifizieren. Zusätzlich traten Rotaviren der Gruppe C (RVCs) vermehrt in den Fokus der Labordiagnostik. Bisher war jedoch unklar, in welchem Umfang und welchen Altersgruppen RVCs bei Schweinen vorkamen. Auch diese Fragestellung sollte, auch im Hinblick auf weltweit wachsendes Interesse an dieser Gruppe, beantwortet werden.

Material und Methoden

Für die Typisierung der in Deutschland regional zirkulierenden RVAs wurden 101 Kot- und Organproben von Schweinen mit klinischem Durchfall aus 10 Bundesländern mit Hilfe des dualen Typisierungssystems (G-/P-Typen) typisiert. Die dafür notwendigen Amplifikate der Genomabschnitte, die für die Virusproteine VP4 und VP7 kodieren, wurden unter Einsatz mehrerer Primerpaare aus Publikationen anderer Autoren gewonnen und zur externen Sequenzierung weitergeleitet.

Zusätzlich zur Typisierung wurde das Vorkommen von Rotaviren der Gruppe A (RVA) und C (RVC) innerhalb verschiedener Altersgruppen von Schweinen untersucht. 2596 Proben von Schweinen mit klinischer Diarrhö wurden mittels Realtime-Multiplex-Polymerase-Kettenreaktion analysiert. Die gewonnenen Daten wurden mit Hilfe eines Chi-Quadrat-Tests auf den Zusammenhang zwischen Alter und RVA/RVC-Infektionsstatus getestet.

Ergebnisse

In Deutschland konnten regional unterschiedliche VP4/VP7 Kombinationen von RVA gezeigt werden, welche sich teilweise zwischen den verschiedenen Bundesländern unterschieden, aber insbesondere in der schweinedichten Region im Nordwesten Deutschlands sehr ähnlich waren. Generell gesehen dominierten die G-/P-Typen-Kombinationen G4P[6], G9P[32], G9P[23]. In weiteren Analysen wurde das Vorkommen von RVA und RVC in verschiedenen Altersgruppen untersucht.

Dieses war bei Saugferkeln vergleichbar aufgeteilt. In den etwas älteren Absatzferkeln verschiebt sich dieses Verhältnis zu Gunsten von RVA. Gleichzeitig steigt der Anteil von Absatzferkeln mit der Doppelinfektion RVA/RVC. Bei Mastschweinen, Jungsauen und Sauen konnten wiederum überwiegend RVC-positive Proben identifiziert werden; annähernd fünfmal so hoch wie die Monoinfektion mit RVA oder RVA/RVC als Doppelinfektion. Die statistische Bewertung des Chi-Quadrat-Tests ergab einen hochsignifikanten Zusammenhang zwischen dem Alter der Tiere und dem Infektionsstatus mit RVA/RVC als Einzel- oder Doppelinfektion.

Schlussfolgerungen

Die G-/P-Typen und Typen-Kombinationen zeigen regionale Dominanzen, die durch örtlich hohe Schweinedichten begünstigt bzw. verstärkt werden. Der Vergleich mit anderen europäischen Ländern offenbart weit verbreitet vorkommende G- und P-Typen. Davon unberührt bleiben jedoch exklusiv in Deutschland vorkommende oder sogar dominierende porcine RVs bestimmter Typen. Als Folge der starken Vernetzung der Schweinebetriebe durch die Aufteilung in verschiedene Produktionsstufen scheint die regionale Ausprägung dominierender RVA-Populationen mit bestimmten G-/P-Typen logisch. Aber auch überregionale Übereinstimmungen scheinen angesichts des intensiven Handels logisch.

Bei der Analyse des RVA/RVC-Vorkommens in verschiedenen Altersgruppen fällt vor allem bei sehr jungen Ferkeln das hohe RVC-Vorkommen auf. Leider treten diese RVC-Durchfälle so früh auf, dass häufig aus Kostengründen noch keine Diagnostik angestrebt wird, da Jungtierdurchfälle in der intensiven Schweinehaltung regelmäßig toleriert und abgewartet werden. Möglicherweise wird das RVC-Vorkommen in jungen Ferkeln somit sogar unterschätzt. Der deutliche Nachweis von RVC in der deutschen Schweinepopulation lässt allerdings auf einen sehr hohen Durchseuchungsgrad schließen. Eine Infektion der Jungtiere mit RVC subklinisch erkrankter adulter Tiere ist somit sehr wahrscheinlich. RVC muss somit nachweislich bei allen Durchfallgeschehen mit in Erwägung gezogen werden und dementsprechend diagnostisch in Untersuchungsprofile integriert sein.

7 Summary

Editor: Oliver Wenske

Title: Epidemiological characterisation of porcine group A rotaviruses and examinations on age-specific relevance of groups A and C

Institute of Virology

Submitted in April 2019

Bibliographical data: 51 pages, 9 figures, 1 table, 82 bibliographical references

Keywords: Rotavirus, Infection, Piglet, Pig, Germany, Genotype, Regionality, G-Type, P-Type, Age

Introduction

The German pig population is one of the biggest in Europe and predominantly realised as industrial livestock farming. As a consequence, piglet diseases have a high relevance under the aspects of animal welfare and also economic aspects. One of these diseases is the infection with porcine rotaviruses (RVs). These infect pigs of all ages, but mainly suckling piglets leading into massive diarrhea and, consequently, into dehydration and even death. Porcine RVs are ubiquitous and thus infections from sows or the environment to the piglets are almost inevitable. In addition, the high antigenic diversity, especially of the immunogenic important proteins VP4 and VP7, limits the protection of lactogenic induced immunity. Besides good hygiene and professional feed management, vaccines could be applied. However, currently no licensed vaccine for porcine RVs is available in Germany.

Aims of the study

The high variability and diversity of RVs is well-known, however, no data for German pigs were existent. This study aimed on the identification of circulating, regionally dominating porcine rotaviruses of group A (RVAs). Additionally, rotaviruses of group C (RVCs) were in the focus since extent and distribution in different age groups of German pigs was unclear. In the context of globally growing interest in RVC this question should also be examined.

Materials and methods

For the typing of regionally circulating RVAs in Germany, 101 fecal and organ samples from pigs with clinical diarrhea were analysed. The samples stemmed from 10 federal states and were typed with the dual typing system (G-/P-types). The required genome sequence amplicates coding for the viral proteins VP4 and VP7 were obtained using several pairs of primers described from other authors. Afterwards external sequencing was performed.

In addition to typing, the occurrence of RVA and rotavirus of group C (RVC) among different age groups of pigs was examined. Hence, 2596 samples from diarrheic pigs underwent realtime-multiplex-

Polymerase chain reaction analysis. Gathered data were investigated with a Chi-Square Test for the correlation of age and RVA/RVC infection status.

Results

Regionally differing VP4/VP7 combinations of RVA could be shown for Germany, which were partly different among variable federal states. However, in the northwestern region with high pig population densities, combinations were noticeably similar. Overall, the G-/P-type combinations G4P[6], G9P[32], and G9P[23] were dominating. In further analysis we focused on the distribution of RVA and RVC in different age groups.

Whereas shares were comparable in suckling pigs, the proportions shifted in the weaned pigs to RVA. Parallel, numbers of weaners with the double infection RVA/RVC increased. In fatteners, gilts, and sows, however, RVC was the dominating RV group. In numbers, almost five times as high as the single infection with RVA or the double infection RVA/RVC. The statistical evaluation of the Chi-Square Test revealed a highly significant correlation between the animals' age and the infection status RVA/RVC as single or double infection.

Conclusion

As well G-/P-types as type-combinations show regional dominancies, favoured respectively amplified and intensified by locally high pig population densities. Furthermore, comparison with other European countries reveals widespread G- and P-types. Additionally, there are also porcine RVA types exclusively found and some even dominating in Germany. This regional specificity of distinct G-/P-types could be a logical consequence of the partitioned but cross-linked pig production system. Nonetheless, supraregional similarities are also logical due to distinct pig trade.

The analysis of RVA/RVC incidence in different age groups reveals the remarkably high RVC presence in very young piglets. Unfortunately, these RVC diarrhea occur very early and diagnostic is obsolete due to financial reasons. Hence, diarrhea episodes are tolerated and temporised regularly. Possibly, RVC relevance in young piglets might be underestimated. However, the explicit RVC detection rates in the German pig population suggest infestation. Infections from subclinical sickened adult pigs to piglets are therefore highly probable. Consequently, RVC must be verifiably considered in every diarrheal case and thus must be included in diagnostic profiles.

8 Literaturverzeichnis

- Adams WR, Kraft LM. Epizootic diarrhea of infant mice: identification of the etiologic agent. *Science*. 1963;141(3578):359–360.
- Aiyegbo MS, Eli IM, Spiller BW, Williams DR, Kim R, Lee DE, Liu T, Li S, Stewart PL, Crowe Jr. JE. Differential accessibility of a rotavirus VP6 epitope in trimers comprising type I, II, or III channels as revealed by binding of a human rotavirus VP6-specific antibody. *J Virol*. 2014;88(1):469–476. DOI <https://doi.org/10.1128/JVI.01665-13>.
- Aiyegbo MS, Sapparapu G, Spiller BW, Eli IM, Williams DR, Kim R, Lee DE, Liu T, Li S, Woods Jr. VL, Nannemann DP, Meiler J, Stewart PL, Crowe Jr. JE. Human rotavirus VP6-specific antibodies mediate intracellular neutralization by binding to a quaternary structure in the transcriptional pore. *PLoS ONE*. 2013;8(5):e61101. DOI <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061101>.
- Beer M und Pfeffer M. Doppelstrang-RNA-Viren. In: Selbitz H-J, Truyen U, Valentin-Weigand P. *Tiermedizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre*. 10. Aufl. Stuttgart: Enke Verlag; 2011. p. 494-496.
- Bishop RF, Davidson GP, Holmes IH, Ruck BJ. Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute non-bacterial gastroenteritis. *Lancet*. 1973;2(7841):1281–1283.
- Bohl EH, Saif LJ, Theil KW, Agnes AG, Cross RF. Porcine pararotavirus: detection, differentiation from rotavirus, and pathogenesis in gnotobiotic pigs. *J Clin Microbiol*. 1982;15(2):312–319.
- Bohl EH, Theil KW, Saif LJ. Isolation and serotyping of porcine rotaviruses and antigenic comparison with other rotaviruses. *J Clin Microbiol*. 1984;19(2):105–111.
- Bridger JC, Brown JF. Prevalence of antibody to typical and atypical rotaviruses in pigs. *Vet Rec*. 1985;116(2):50.
- Bridger JC, Woode GN. Neonatal calf diarrhoea: identification of a reovirus-like (rotavirus) agent in faeces by immunofluorescence and immune electron microscopy. *Br Vet J*. 1975;131(5):528–535.
- Browning GF, Snodgrass DR, Nakagomi O, Kaga E, Sarasini A, Gerna G. Human and bovine serotype G8 rotaviruses may be derived by reassortment. *Arch Virol*. 1992;125(1-4):121–128.
- Chasey D, Bridger JC, McCrae MA. A new type of atypical rotavirus in pigs. *Arch Virol*. 1986;89(1-4):235–243.
- Collins PJ, Martella V, Sleator RD, Fanning S, O'Shea H. Detection and characterisation of group A rotavirus in asymptomatic piglets in southern Ireland. *Arch Virol*. 2010;155(8):1247–1259. DOI <https://doi.org/10.1007/s00705-010-0713-1>.
- De Cássia Linares R, Barry AF, Alfieri AF, Cristina K. Frequency of Group A Rotavirus in Piglet Stool Samples from Non-Vaccinated Brazilian Pig Herds. *Braz Arch Biol Technol*. 2009;52(SPE):63–68.
- Degiuseppe JI, Beltramino JC, Millán A, Stupka JA, Parra GI. Complete genome analyses of G4P[6] rotavirus detected in Argentinean children with diarrhoea provides evidence of interspecies transmission from swine. *Clin Microbiol Infect*. 2013;19(8):E367-71. DOI <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12216>.
- Desselberger U. Rotaviruses. *Virus Res*. 2014;190:75–96. DOI <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2014.06.016>.
- Estes MK und Kapikian AZ. Rotaviruses. In: Knipe DM und Howley PM. *Fields Virology*. 5. Aufl. Philadelphia: Lippincott Williams; 2007. p. 1917-1974.
- Fu ZF, Hampson DJ. Group A rotavirus excretion patterns in naturally infected pigs. *Res Vet Sci*. 1987;43(3):297–300.
- Gentsch JR, Glass RI, Woods P, Gouvea V, Gorziglia M, Flores J, Das BK, Bhan MK. Identification of group A rotavirus gene 4 types by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*. 1992;30(6):1365–1373.

- Ghosh S, Shintani T, Kobayashi N. Evidence for the porcine origin of equine rotavirus strain H-1. *Vet. Microbiol.* 2012;158(3-4):410–414. DOI <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.02.037>.
- Goecke NB, Hjuulsager CK, Kongsted H, Boye M, Rasmussen S, Granberg F, Fischer TK, Midgley SE, Rasmussen LD, Angen O, Nielsen JP, Jorsal SE, Larsen LE. No evidence of enteric viral involvement in the new neonatal porcine diarrhoea syndrome in Danish pigs. *BMC Vet Res.* 2017;13(1):315. DOI <https://doi.org/10.1186/s12917-017-1239-5>.
- Gouvea V, Santos N, do Carmo Timenetsky M. Identification of bovine and porcine rotavirus G types by PCR. *J Clin Microbiol.* 1994;32(5):1338–1340.
- Greenberg HB, Estes MK. Rotaviruses: from pathogenesis to vaccination. *Gastroenterology.* 2009;136(6):1939–1951. DOI <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2009.02.076>.
- Hoshino Y, Kapikian AZ. Rotavirus serotypes: classification and importance in epidemiology, immunity, and vaccine development. *J Health Popul Nutr.* 2000;18(1):5–14.
- Hoshino Y, Saif LJ, Sereno MM, Chanock RM, Kapikian AZ. Infection immunity of piglets to either VP3 or VP7 outer capsid protein confers resistance to challenge with a virulent rotavirus bearing the corresponding antigen. *J Virol.* 1988;62(3):744–748.
- Hwang K-P, Wu F-T, Banyai K, Wu H-S, Yang DC, Huang Y-C, Lin J-S, Hsiung CA, Huang JC, Jiang B, Gentsch JR. Identification of porcine rotavirus-like genotype P [6] strains in Taiwanese children. *J. Med. Microbiol.* 2012;61:990–997.
- Isegawa Y, Nakagomi O, Nakagomi T, Ishida S, Uesugi S, Ueda S. Determination of bovine rotavirus G and P serotypes by polymerase chain reaction. *Mol. Cell. Probes.* 1993;7(4):277–284. DOI <https://doi.org/10.1006/mcpr.1993.1041>.
- Janke BH, Nelson JK, Benfield DA, Nelson EA. Relative Prevalence of Typical and Atypical Strains among Rotaviruses from Diarrheic Pigs in Conventional Swine Herds. *J Vet Diagn Invest.* 1990;2(4):308–311. DOI <https://doi.org/10.1177/104063879000200410>.
- Kapikian AZ, Hoshino Y, Chanock RM, Perez-Schael I. Jennerian and modified Jennerian approach to vaccination against rotavirus diarrhea using a quadrivalent rhesus rotavirus (RRV) and human-RRV reassortant vaccine. *Arch Virol Suppl.* 1996;12:163–175.
- Kim H-H, Park J-G, Matthijnsens J, Kim H-J, Kwon H-J, Son K-Y, Ryu E-H, Kim D-S, Lee WS, Kang M-I, Yang D-K, Lee J-H, Park S-J, Cho K-O. Pathogenicity of porcine G9P[23] and G9P[7] rotaviruses in piglets. *Vet. Microbiol.* 2013;166(1-2):123–137. DOI <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.05.024>.
- Kobayashi N, Ishino M, Wang YH, Chawla-Sarkar M, Krishnan T, Naik TN. Diversity of G-type and P-type of human and animal rotaviruses and its genetic background. *Communicating Curr Res Educ Top Trends Appl Microbiol.* 2007:847–858.
- Lecce JG, King MW. The calf reo-like virus (rotavirus) vaccine: an ineffective immunization agent for rotaviral diarrhea of piglets. *Can J Comp Med.* 1979;43(1):90–93.
- Lentz H, Koher A, Hövel P, Gethmann J, Sauter-Louis C, Selhorst T, Conraths FJ. Disease Spread through Animal Movements: A Static and Temporal Network Analysis of Pig Trade in Germany. *PLoS ONE.* 2016;11(5):e0155196. DOI <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0155196>.
- Lorenzetti E, da Silva Medeiros TN, Alfieri AF, Alfieri AA. Genetic heterogeneity of wild-type G4P[6] porcine rotavirus strains detected in a diarrhea outbreak in a regularly vaccinated pig herd. *Vet. Microbiol.* 2011;154(1-2):191–196. DOI <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.06.026>.
- Machnowska P, Ellerbroek L, Johne R. Detection and characterization of potentially zoonotic viruses in faeces of pigs at slaughter in Germany. *Vet. Microbiol.* 2014;168(1):60–68. DOI <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.10.018>.

- Maes P, Matthijnsens J, Rahman M, Van Ranst M. RotaC: a web-based tool for the complete genome classification of group A rotaviruses. *BMC Microbiol.* 2009;9(1):238. DOI <https://doi.org/10.1186/1471-2180-9-238>.
- Martella V, Bányai K, Matthijnsens J, Buonavoglia C, Ciarlet M. Zoonotic aspects of rotaviruses. *Vet. Microbiol.* 2010;140(3-4):246–255. DOI <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.08.028>.
- Marthaler D, Homwong N, Rossow K, Culhane M, Goyal S, Collins J, Matthijnsens J, Ciarlet M. Rapid detection and high occurrence of porcine rotavirus A, B, and C by RT-qPCR in diagnostic samples. *J Virol Methods.* 2014;209:30–34. DOI <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2014.08.018>.
- Marthaler D, Rossow K, Culhane M, Collins J, Goyal S, Ciarlet M, Matthijnsens J. Identification, phylogenetic analysis and classification of porcine group C rotavirus VP7 sequences from the United States and Canada. *Virology.* 2013;446(1-2):189–198. DOI <https://doi.org/10.1016/j.virol.2013.08.001>.
- Matsui SM, Mackow ER, Greenberg HB. Molecular determinant of rotavirus neutralization and protection. *Adv Virus Res.* 1989;36:181–214.
- Matthijnsens J, Ciarlet M, McDonald SM, Attoui H, Bányai K, Brister JR, Buesa J, Esona MD, Estes MK, Gentsch JR, Iturriza-Gómara M, Johne R, Kirkwood CD, Martella V, Mertens PP, Nakagomi O, Parreño V, Rahman M, Ruggeri FM, Saif LJ, Santos N, Steyer A, Taniguchi K, Patton JT, Desselberger U, Van Ranst M. Uniformity of rotavirus strain nomenclature proposed by the Rotavirus Classification Working Group (RCWG). *Arch Virol.* 2011;156(8):1397–1413. DOI <https://doi.org/10.1007/s00705-011-1006-z>.
- Matthijnsens J, Ciarlet M, Rahman M, Attoui H, Bányai K, Estes MK, Gentsch JR, Iturriza-Gómara M, Kirkwood CD, Martella V, Mertens PP, Nakagomi O, Patton JT, Ruggeri FM, Saif LJ, Santos N, Steyer A, Taniguchi K, Desselberger U, Van Ranst M. Recommendations for the classification of group A rotaviruses using all 11 genomic RNA segments. *Arch Virol.* 2008;153(8):1621–1629. DOI <https://doi.org/10.1007/s00705-008-0155-1>.
- McDonald SM, Matthijnsens J, McAllen JK, Hine E, Overton L, Wang S, Lemey P, Zeller M, Van Ranst M, Spiro DJ, Patton JT. Evolutionary dynamics of human rotaviruses: balancing reassortment with preferred genome constellations. *PLoS Pathog.* 2009;5(10):e1000634. DOI <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000634>.
- Miyazaki A, Kuga K, Suzuki T, Kohmoto M, Katsuda K, Tsunemitsu H. Genetic diversity of group A rotaviruses associated with repeated outbreaks of diarrhea in a farrow-to-finish farm: identification of a porcine rotavirus strain bearing a novel VP7 genotype, G26. *Vet Res.* 2011;42:112. DOI <https://doi.org/10.1186/1297-9716-42-112>.
- Miyazaki A, Kuga K, Suzuki T, Kohmoto M, Katsuda K, Tsunemitsu H. Annual changes in predominant genotypes of rotavirus A detected in the feces of pigs in various developmental stages raised on a conventional farm. *Vet. Microbiol.* 2013;163(1-2):162–166. DOI <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.11.044>.
- Miyazaki A, Kuga K, Suzuki T, Tsunemitsu H. Analysis of the excretion dynamics and genotypic characteristics of rotavirus A during the lives of pigs raised on farms for meat production. *J Clin Microbiol.* 2012;50(6):2009–2017. DOI <https://doi.org/10.1128/JCM.06815-11>.
- Mukherjee A, Dutta D, Ghosh S, Bagchi P, Chattopadhyay S, Nagashima S, Kobayashi N, Dutta P, Krishnan T, Naik TN, Chawla-Sarkar M. Full genomic analysis of a human group A rotavirus G9P [6] strain from Eastern India provides evidence for porcine-to-human interspecies transmission. *Arch Virol.* 2009;154(5):733–746.

- Offit PA, Clark HF, Blavat G, Greenberg HB. Reassortant rotaviruses containing structural proteins vp3 and vp7 from different parents induce antibodies protective against each parental serotype. *J Virol.* 1986a;60(2):491–496.
- Offit PA, Shaw RD, Greenberg HB. Passive protection against rotavirus-induced diarrhea by monoclonal antibodies to surface proteins vp3 and vp7. *J Virol.* 1986b;58(2):700–703.
- Otto P, Schulze P, Herbst W. Demonstration of group C rotaviruses in fecal samples of diarrheic dogs in Germany. *Arch Virol.* 1999;144(12):2467–2473.
- Papp H, Borzák R, Farkas S, Kisfali P, Lengyel G, Molnár P, Melegh B, Matthijnsens J, Jakab F, Martella V, Bányai K. Zoonotic transmission of reassortant porcine G4P[6] rotaviruses in Hungarian pediatric patients identified sporadically over a 15-year period. *Infect Genet Evol.* 2013a;19:71–80. DOI <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2013.06.013>.
- Papp H, László B, Jakab F, Ganesh B, Grazia S de, Matthijnsens J, Ciarlet M, Martella V, Bányai K. Review of group A rotavirus strains reported in swine and cattle. *Vet. Microbiol.* 2013b;165(3-4):190–199. DOI <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.03.020>.
- Parashar UD, Bresee JS, Gentsch JR, Glass RI. Rotavirus. *Emerging Infect Dis.* 1998;4(4):561–570. DOI <https://doi.org/10.3201/eid0404.980406>.
- Parra GI, Vidales G, Gomez JA, Fernandez FM, Parreño V, Bok K. Phylogenetic analysis of porcine rotavirus in Argentina: increasing diversity of G4 strains and evidence of interspecies transmission. *Vet. Microbiol.* 2008;126(1-3):243–250. DOI <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.06.006>.
- Paul PS und Stevenson GW. Rotavirus and reovirus. In: Leman AD, Straw BE, Mengeling WL, D'Allaire S, Taylor DJ. *Diseases of Swine*. 7. Aufl. Ames, Iowa: Iowa State Univ Pr; 1992. p. 331–348.
- Paul-Ehrlich-Institut (PEI) 2019a. Rinderimpfstoffe vom 15. Februar 2019 (zitiert vom 24.03.2019), https://www.pei.de/DE/arzneimittel/impfstoff-impfstoffe-fuer-tiere/rinder/rinder-node.html?gts=3263790_list%253DpeiHeader_text_sort%252Basc>p=3263790_list%253D3.
- Paul-Ehrlich-Institut (PEI) 2019b. Schweineimpfstoffe vom 28. März 2019 (zitiert vom 05.04.2019), https://www.pei.de/DE/arzneimittel/impfstoff-impfstoffe-fuer-tiere/schweine/schweine-node.html?gts=3263774_list%253DpeiHeader_text_sort%252Bdesc.
- Phan MV, Anh PH, van Cuong N, Munnink BB, van der Hoek L, My PT, Tri TN, Bryant JE, Baker S, Thwaites G, Woolhouse M, Kellam P, Rabaa MA, Cotten M. Unbiased whole-genome deep sequencing of human and porcine stool samples reveals circulation of multiple groups of rotaviruses and a putative zoonotic infection. *Virus Evol.* 2016;2(2):vew027. DOI <https://doi.org/10.1093/ve/vew027>.
- Rahman M, Banik S, Faruque AS, Taniguchi K, Sack DA, Van Ranst M, Azim T. Detection and characterization of human group C rotaviruses in Bangladesh. *J Clin Microbiol.* 2005;43(9):4460–4465. DOI <https://doi.org/10.1128/JCM.43.9.4460-4465.2005>.
- Ramig RF. Genetics of the rotaviruses. *Annu Rev Microbiol.* 1997;51:225–255. DOI <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.51.1.225>.
- Ramos AP, Stefanelli CC, Linhares RE, de Brito BG, Santos N, Gouvea V, de Cassia Lima R, Nozawa C. The stability of porcine rotavirus in feces. *Vet. Microbiol.* 2000;71(1-2):1–8.
- Saif LJ, Bohl EH, Theil KW, Cross RF, House JA. Rotavirus-like, calicivirus-like, and 23-nm virus-like particles associated with diarrhea in young pigs. *J Clin Microbiol.* 1980;12(1):105–111.
- Saif LJ, Fernandez FM. Group A rotavirus veterinary vaccines. *J Infect Dis.* 1996;174 Suppl 1:S98–106.
- Saif LJ, Jiang B. Nongroup A rotaviruses of humans and animals. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1994;185:339–371.

- Saif LJ, Rosen B, Parwani A. Animal rotaviruses. In: Kapikian AZ. Virus Infections of the Gastrointestinal Tract. 2. Aufl. New York: Marcel-Dekker; 1994. p. 279-367.
- Saif LJ und Theil KW. Viral diarrheas of man and animals. Boca Raton, FL: CRC Press; 1990.
- Santos N, Lima RC, Nozawa CM, Linhares RE, Gouvea V. Detection of porcine rotavirus type G9 and of a mixture of types G1 and G5 associated with Wa-like VP4 specificity: evidence for natural human-porcine genetic reassortment. *J Clin Microbiol.* 1999;37(8):2734–2736.
- Solberg OD, Hasing ME, Trueba G, Eisenberg JN. Characterization of novel VP7, VP4, and VP6 genotypes of a previously untypeable group A rotavirus. *Virology.* 2009;385(1):58–67. DOI <https://doi.org/10.1016/j.virol.2008.11.026>.
- Statistisches Amt der Europäischen Union (Eurostat) 2019. Number of pigs vom 19. März 2019 (zitiert vom 24.03.2019), <http://appsso.eurostat.ec.europa.eu/nui/submitViewTableAction.do>.
- Statistisches Bundesamt (DESTATIS) 2018. Viehbestand, Fachserie 3 Reihe 4.1 vom 03. November 2018 (zitiert vom 24.03.2019): 21, https://www.destatis.de/DE/Themen/Branchen-Unternehmen/Landwirtschaft-Forstwirtschaft-Fischerei/Tiere-Tierische-Erzeugung/_inhalt.html#sprg239762.
- Steyer A, Poljšak-Prijatelj M, Barlic-Maganja D, Marin J. Human, porcine and bovine rotaviruses in Slovenia: evidence of interspecies transmission and genome reassortment. *J Gen Virol.* 2008;89:1690–1698.
- Svensmark B. Prevalence rate of porcine rotavirus in Danish swine herds. *Ann Rech Vet.* 1983;14(4):433–436.
- Theuns S, Desmarests LM, Heylen E, Zeller M, Dedeurwaerder A, Roukaerts ID, Van Ranst M, Matthijnsens J, Nauwynck HJ. Porcine group A rotaviruses with heterogeneous VP7 and VP4 genotype combinations can be found together with enteric bacteria on Belgian swine farms. *Vet. Microbiol.* 2014;172(1-2):23–34. DOI <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.04.002>.
- Torres-Medina A. Isolation of an atypical rotavirus causing diarrhea in neonatal ferrets. *Lab Anim Sci.* 1987;37(2):167–171.
- Trojnar E, Sachsenröder J, Twardziok S, Reetz J, Otto PH, Johne R. Identification of an avian group A rotavirus containing a novel VP4 gene with a close relationship to those of mammalian rotaviruses. *J Gen Virol.* 2013;94(Pt 1):136–142. DOI <https://doi.org/10.1099/vir.0.047381-0>.
- Tsunemitsu H, Saif LJ, Jiang BM, Shimizu M, Hiro M, Yamaguchi H, Ishiyama T, Hirai T. Isolation, characterization, and serial propagation of a bovine group C rotavirus in a monkey kidney cell line (MA104). *J Clin Microbiol.* 1991;29(11):2609–2613.
- Vesikari T, Karvonen A, Prymula R, Schuster V, Tejedor JC, Cohen R, Meurice F, Han HH, Damaso S, Bouckennooghe A. Efficacy of human rotavirus vaccine against rotavirus gastroenteritis during the first 2 years of life in European infants: randomised, double-blind controlled study. *Lancet.* 2007;370(9601):1757–1763. DOI [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(07\)61744-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(07)61744-9).
- Wakuda M, Ide T, Sasaki J, Komoto S, Ishii J, Sanekata T, Taniguchi K. Porcine rotavirus closely related to novel group of human rotaviruses. *Emerging Infect Dis.* 2011;17(8):1491–1493. DOI <https://doi.org/10.3201/eid1708.101466>.
- Welter MW, Welter CJ. Evaluation of killed and modified live porcine rotavirus vaccines in cesarean derived colostrum deprived pigs. *Vet. Microbiol.* 1990;22(2-3):179–186.
- Wenske O, Rückner A, Piehler D, Schwarz B-A, Vahlenkamp TW. Epidemiological analysis of porcine rotavirus A genotypes in Germany. *Vet. Microbiol.* 2018;214:93–98. DOI <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.12.014>.

- Zeller M, Heylen E, De Coster S, Van Ranst M, Matthijnsens J. Full genome characterization of a porcine-like human G9P[6] rotavirus strain isolated from an infant in Belgium. *Infect Genet Evol.* 2012;12(7):1492–1500. DOI <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2012.03.002>.
- Zhou W, Ullman K, Chowdry V, Reining M, Benyeda Z, Baule C, Juremalm M, Wallgren P, Schwarz L, Zhou E, Pedrero SP, Hennig-Pauka I, Segales J, Liu L. Molecular investigations on the prevalence and viral load of enteric viruses in pigs from five European countries. *Vet. Microbiol.* 2016;182:75–81. DOI <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.10.019>.
- Zisis G, Lambert JP, Marbehant P, Marissens D, Lobmann M, Charlier P, Delem A, Zygraich N. Protection studies in colostrum-deprived piglets of a bovine rotavirus vaccine candidate using human rotavirus strains for challenge. *J Infect Dis.* 1983;148(6):1061–1068.

Danksagung

Abschließend und mit großer Dankbarkeit möchte ich nun die Menschen nennen, die mir diese Arbeit überhaupt erst ermöglicht haben und mir die ganze Bandbreite emotionaler, technischer und fachlicher Unterstützung haben zukommen lassen. Große Dankbarkeit gebührt Herrn Professor Vahlenkamp für seine Bereitschaft zur Betreuung meiner Promotion und der stets unkomplizierten und ermunternden Zusammenarbeit mit ihm. Darüber hinaus danke ich Frau Dr. Antje Rückner für die jederzeit zuverlässige, ehrliche und durchgehend fachlich herausragende Betreuung und die zahllosen Treffen und Beratschlagungen.

Großen Dank möchte ich auch an meine Kollegen von Vaxxinoa richten, ohne deren methodische, technische, fachliche und organisatorische Mithilfe diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre und von denen ich so viel lernen konnte. Namentlich möchte ich Dr. Bernd-Andreas Schwarz für seine unbeschreibliche Loyalität und sein Vertrauen danken. Dr. Daniel Piehler danke ich für seine wissenschaftliche Expertise und jederzeit ehrliche und hochproduktive Diskussionsbereitschaft. Anne Stark verdanke ich meine technischen Fähigkeiten und zahlreiche Problemlösungen sowie eine stets motivierende Arbeitsweise.

Frau Anne Kießling gebührt besonderer Dank für ihre stets unkonventionellen und doch sehr wertvollen Anmerkungen und Lösungsvorschläge jeglicher Art. Hervorheben möchte ich auch ihre unermüdliche Kraft, stets das Positive in jeder Situation zu erkennen und hervorzuheben. Viele Namen bleiben hier unerwähnt und doch bin ich mir sicher, dass jede und jeder Einzelne sich in diesem Text wiederfindet und weiß, wie groß meine Dankbarkeit ist und wie sehr ich die Unterstützung zu schätzen wusste und weiß.

Schlussendlich danke ich meiner Familie dafür, dass sie immer an mich geglaubt hat.