

Aus der Medizinischen Kleintierklinik
Lehrstuhl für Innere Medizin der kleinen Haustiere und Heimtiere
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Prof. Dr. Katrin Hartmann

**Untersuchungen zum Vorkommen aviärer Influenza-A-Viren
bei Freiläuferkatzen
in Gebieten mit Auftreten hochpathogener aviärer Influenza A H5N1
bei Wildvögeln**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Julia Christine Marschall
aus Tübingen

München 2008

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Hartmann

Korreferent/en: Univ.-Prof. Dr. Kaspers
Univ.-Prof. Dr. Klee

Tag der Promotion: 18. Juli 2008

Für Polly und Amber

Inhaltsverzeichnis

I	Einleitung.....	9
II	Literaturübersicht.....	10
1	Influenza-A-Viren.....	10
1.1	Taxonomie und Vorkommen.....	10
1.2	Aufbau und Eigenschaften.....	10
1.3	Virusreservoir.....	12
1.4	Influenza-A-Pandemien des Menschen.....	13
1.4.1	Spanische Grippe 1918/19.....	13
1.4.2	Asiatische Grippe 1957/58.....	14
1.4.3	Hongkong-Grippe 1968/69.....	15
2	Hochpathogene aviäre Influenza-A-Viren Subtyp H5N1.....	15
2.1	Entstehung und Entwicklung.....	15
2.2	Auftreten bei Säugetieren.....	16
2.2.1	Genetische Grundlage von Wirtsspezifität und Pathogenität....	16
2.2.2	Säugetierwirte.....	18
2.2.2.1	Menschen.....	18
2.2.2.2	Affen.....	21
2.2.2.3	Mäuse.....	22
2.2.2.4	Frettchen.....	22
2.2.2.5	Schweine.....	22
2.2.2.6	Hunde.....	23
2.2.2.7	Schleichkatzen.....	24
2.2.2.8	Feliden.....	24
2.2.3	Pandemiegefahr durch aviäre Influenza-A-H5N1-Viren.....	25
3	Hochpathogene aviäre Influenzaviren H5N1 bei Katzen.....	26
3.1	Epidemiologie.....	26
3.1.1	Bislang beschriebene Infektionen.....	27
3.1.2	Herkunft des Virus.....	28
3.1.3	Virusübertragung.....	28
3.2	Pathogenese.....	30
3.2.1	Virusaufnahme.....	30
3.2.2	Virusausbreitung.....	30
3.2.3	Virusausscheidung.....	32

3.3	Klinik	33
3.3.1	Inkubationszeit	33
3.3.2	Symptome	33
3.3.3	Laborwertveränderungen	35
3.4	Pathologie.....	35
3.5	Diagnose.....	37
3.5.1	Probenentnahme	37
3.5.2	Diagnostische Verfahren.....	38
3.5.2.1	Direkter Erregernachweis.....	38
3.5.2.2	Indirekter Erregernachweis	38
3.6	Therapie	39
3.7	Prophylaxe	40
III	Kapitel 1: Prevalence of influenza A H5N1 virus in cats from areas with occurrence of highly pathogenic avian influenza in birds	43
IV	Kapitel 2: Evaluation of a Point-of-Care Influenza Antigen Test for the Detection of Highly Pathogenic Avian Influenza A H5N1 in Cats	48
V	Kapitel 3: Avian influenza A H5N1 infections in cats	52
VI	Diskussion	60
1	Ziel der Studie	60
2	Probensammelgebiete	61
3	Prävalenz	64
4	Schnelltest	67
5	Limitationen der Studie.....	69
6	Relevanz der Studie	69
7	Vorgehen im Verdachtsfall	70
8	Schlussfolgerungen	70
VII	Zusammenfassung.....	72
VIII	Summary.....	74
IX	Literaturverzeichnis.....	76

Abkürzungsverzeichnis

627K	Mutation mit Lysin an Position 627 des basischen Polymerase-Proteins 2
ALT	Alanin-Aminotransferase
AST	Aspartat-Aminotransferase
AT	Amtlicher Teil
BGBI.	Bundesgesetzblatt
bzw.	beziehungsweise
CI	Konfidenzintervall (confidence interval)
CNR	Nationales Referenzlabor (Centre National de Référence)
Dipl. ECVIM-CA	Diplomate des European College of Veterinary Internal Medicine – Companion Animals
Dr.	Doktor
Dr. med. vet.	Doktor der Veterinärmedizin (<i>Doctor medicinae veterinariae</i>)
eBAnz.	elektronischer Bundesanzeiger
EID ₅₀	50 % Ei-infektiöse Dosis
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EMA	European-Middle Eastern-African
et al.	und andere (<i>et alii</i>)
EU	Europäische Union (European Union)
GmbH & Co. KG	Gesellschaft mit beschränkter Haftung und Compagnie Kommanditgesellschaft
H1, H2, ... H16	Hämagglutinin des Subtyps 1, 2 ... 16
HA	Hämagglutinin
HA0	Hämagglutinin-Vorläuferglykoprotein
HA1	Hämagglutinin-Untereinheit 1
HA2	Hämagglutinin-Untereinheit 2
habil.	<i>habilitatus</i>
HAH-Test	Hämagglutinationshemmungstest
HA-Test	Hämagglutinationstest
HPAIV	hochpathogenes aviäres Influenzavirus (highly pathogenic avian influenza virus)
HPAIV H5N1	hochpathogenes aviäres Influenzavirus Subtyp H5N1

IFN	Interferon
kg	Kilogramm
km	Kilometer
LDH	Laktatdehydrogenase
LPAIV	niedrigpathogenes aviäres Influenzavirus (low-pathogenicity avian influenza virus)
M1	Matrixprotein 1
M2	Matrixprotein 2
mg	Milligramm
MODS	Multiorganversagen (multiple organ dysfunction syndrome)
N1, N2, ... N9	Neuraminidase des Subtyps 1, 2, ... 9
NA	Neuraminidase
NeuAc α 2,3Gal	α -2,3-glykosidische Bindung von Sialinsäure (= N-Acetylneuraminsäure) an Galaktose
NeuAc α 2,6Ga	α -2,6-glykosidische Bindung von Sialinsäure (= N-Acetylneuraminsäure) an Galaktose
nm	Nanometer
NP	Nukleoprotein
Nr.	Nummer
NS1	Nichtstruktur-Protein 1
NS2	Nichtstruktur-Protein 2
NS-Gen	für Nichtstruktur-Proteine 1 und 2 codierendes Gen
O.I.E.	Weltorganisation für Tiergesundheit (Office International des Epizooties)
<i>p. i.</i>	<i>post infectionem</i>
PA	saures Polymerase-Protein
PB1	basisches Polymerase-Protein 1
PB1-F2	basisches Polymerase-Protein 1-F2
PB2	basisches Polymerase-Protein 2
PCR	Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction)
PhD	<i>Philosophiae Doctor</i>
Priv.-Doz.	Privatdozent
Prof.	Professor
RNA	Ribonukleinsäure

RRT-PCR	Real-Time-Reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (real time reverse transcriptase polymerase chain reaction)
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (reverse transcriptase polymerase chain reaction)
S.	Seite
TCID ₅₀	50 % Kultur-infektiöse Dosis (tissue culture infectious dose)
TM	Marke (trademark)
TNF	Tumornekrosefaktor
USA	Vereinigte Staaten von Amerika (United States of America)
V	Verkündung
WHO	Weltgesundheitsorganisation (World Health Organization)

I Einleitung

Hochpathogenes aviäres Influenzavirus des Subtyps H5N1 (HPAIV H5N1) wurde erstmals 1996 isoliert und hat seitdem nahezu weltweit zu verheerenden Ausbrüchen bei Wildvögeln und Hausgeflügel geführt (CHEN et al., 2006). Aufgrund seiner Eigenschaft, ohne vorherige Anpassung die Speziesbarriere zu überspringen und viele Säugetierarten einschließlich des Menschen infizieren zu können, löste HPAIV H5N1 Besorgnis als möglicher Auslöser einer neuen weltweiten Influenzapandemie aus (SUBBARAO et al., 1998).

Besonders Katzen erwiesen sich unter natürlichen und experimentellen Bedingungen als empfänglich für HPAIV H5N1; sowohl Großkatzen als auch Hauskatzen können durch die Infektion schwer erkranken und daran sterben (KEAWCHAROEN et al., 2004; KUIKEN et al., 2004; KLOPFLEISCH et al., 2007b). Respiratorische Symptome stellen hierbei ein Hauptmerkmal dar (SONGSERM et al., 2006b); es wurden aber auch subklinische Infektionen beobachtet (LESCHNIK et al., 2007). Alle bislang beschriebenen natürlichen Infektionen bei Katzen standen in räumlichem und zeitlichem Zusammenhang mit Ausbrüchen bei Vögeln (THANAWONGNUWECH et al., 2005; YINGST et al., 2006; KLOPFLEISCH et al., 2007b; LESCHNIK et al., 2007). Katzen können sich nicht nur durch direkten Kontakt mit infizierten Vögeln anstecken, sondern das Virus kann auch von Katze zu Katze übertragen werden (KUIKEN et al., 2004; THANAWONGNUWECH et al., 2005). Experten befürchten daher, dass Katzen eine Rolle in der Epidemiologie von H5N1 spielen könnten (KUIKEN et al., 2004; KUIKEN et al., 2006; SONGSERM et al., 2006b).

Bislang ist unbekannt, welche Bedeutung Katzen bei der Verbreitung von H5N1 tatsächlich zukommt, zum Beispiel, ob sie Virus auf Menschen übertragen, welche Gefahr sie für Nutzgeflügelbestände oder andere Tierarten darstellen, oder wie sehr Katzen in Gebieten mit Ausbrüchen hochpathogener aviärer Influenza H5N1 bei Vögeln selbst gefährdet sind. Ziele der vorliegenden Arbeit waren daher die Ermittlung der Prävalenz von aviärem Influenzavirus H5N1 und der Prävalenz von Antikörpern bei Katzen sowie die Untersuchung einer potentiellen Abhängigkeit von Erregernachweis, Antikörpernachweis und klinischer Symptomatik. Des Weiteren sollte ein humaner Influenza-Antigen-Schnelltest in seiner Sensitivität und Spezifität bei der Katze beurteilt werden, um Hinweise für eine Eignung des Tests für die Influenzadiagnostik bei Katzen zu bekommen.

II Literaturübersicht

1 Influenza-A-Viren

Influenzaviren sind bereits seit Beginn des 20. Jahrhunderts bekannt. Das erste Influenza-A-Virus wurde 1902 von Hühnern isoliert (A/chicken/Brescia/1902 [H7N7]) (KLIMOV et al., 1992). Ende der Zwanzigerjahre wurden Influenzaviren beim Schwein entdeckt (SHOPE, 1931); die erste Isolierung eines humanen Influenzavirus erfolgte im Jahr 1933 (SMITH et al., 1933).

1.1 Taxonomie und Vorkommen

Influenzaviren gehören zur Familie *Orthomyxoviridae*. Die Familie der Orthomyxoviren umfasst die Genera *Influenzavirus A*, *Influenzavirus B*, *Influenzavirus C* und ferner die Genera *Thogotovirus* und *Isavirus* (KAWAOKA et al., 2005).

Während Influenza-B- und -C-Viren als Krankheitserreger hauptsächlich beim Menschen auftreten und nur vereinzelt bei Schweinen und Seehunden isoliert wurden (GUO et al., 1983; OSTERHAUS et al., 2000), spielen Influenza-A-Viren auch in der Veterinärmedizin eine große Rolle. Sie sind weltweit verbreitet; neben dem Menschen fungieren vor allem Schweine, Pferde, Marderartige, Meeressäuger und Vögel als Wirtsspezies für Influenza-A-Viren (WEBSTER et al., 1992; VAHLENKAMP & HARDER, 2006).

1.2 Aufbau und Eigenschaften

Influenza-A-Viren sind behüllte, pleomorphe Partikel mit filamentöser oder sphärischer Gestalt. Sie haben einen Durchmesser von 80–120 nm (WEBSTER et al., 1978). Ihre Hülle besteht aus einer Lipiddoppelmembran, in die die Glykoproteine Hämagglutinin (HA) und Neuraminidase (NA) und das Matrixprotein 2 (M2) eingebaut sind. Innerhalb der Virushülle befindet sich eine Schicht aus Matrixprotein 1 (M1); im Zentrum liegt das helikale Nukleokapsid aus Nukleoprotein (NP), Ribonukleinsäure (RNA) und Polymerasen (PB1, PB2, PA) (LAMB & KRUG, 2004). Das Genom der Influenza-A-Viren besteht aus acht Segmenten negativ polarisierter Einzelstrang-RNA (PONS, 1976). Diese codieren für mindestens zehn virale Proteine (PB1, PB2, PA, HA, NA, NP, M1, M2, NS1, NS2), von denen das HA und die NA eine wichtige Rolle für die

Variabilität der Influenza-A-Viren, die Einteilung in verschiedene Subtypen und ihre Funktion spielen (LAMB, 1989; WEBSTER et al., 1992). Ein elftes Protein (PB1-F2), welches nicht bei allen Influenza-A-Viren ausgebildet wird, wurde vor kurzem beschrieben (CHEN et al., 2001).

HA wird vom Virus für die Bindung an sialinsäurehaltige Rezeptoren der Wirtszelle und für die Aufnahme der Viruspartikel in die Zelle benötigt. Zusätzlich stellt es das Hauptoberflächenantigen dar, gegen das vom Wirt neutralisierende Antikörper gebildet werden (SKEHEL & WILEY, 2000). NA spaltet Sialinsäurereste von Glykoproteinen und Glykolipiden auf der Wirtszelloberfläche ab und führt so zur Freisetzung der neu gebildeten Viruspartikel aus der Zelle. Es ist ebenfalls ein wichtiges Oberflächenantigen (WEBSTER et al., 1988; WEBSTER et al., 1992).

Die Einteilung der Influenza-A-Viren in Subtypen erfolgt aufgrund unterschiedlicher HA- und NA-Antigene. Derzeit sind 16 HA-Subtypen (H1–H16) und neun NA-Subtypen (N1–N9) bekannt (FOUCHIER et al., 2005).

Aufgrund des besonderen Aufbaus ihres Genoms zeigen Influenza-A-Viren eine sehr hohe Variabilität, die es ihnen ermöglicht, der Immunabwehr des Wirtes zu entkommen. Hierbei spielen mehrere Mechanismen eine Rolle; am bedeutsamsten sind Antigendrift und Antigen shift. Das Fehlen effektiver Korrekturlesemechanismen der RNA-Polymerase führt zu einer hohen Anzahl an Punktmutationen bei der Replikation der Virus-RNA (STEINHAEUER & HOLLAND, 1987). Dadurch entstehen neue Varianten innerhalb eines Subtyps (Antigendrift) (WEBSTER et al., 1992). Durch die Segmentierung des Genoms kann es bei Doppelinfektion einer Zelle zum Austausch von Gensegmenten der verschiedenen Influenzaviren kommen. Dieses Phänomen des „genetic reassortment“ tritt zwischen Viren derselben Wirtsspezies (intraspezifisch) oder unterschiedlicher Spezies (interspezifisch) auf und führt beim Austausch von HA- und NA-Genen zur Bildung neuer Subtypen (Antigen shift) (WEBSTER et al., 1992). Diese neuen Subtypen besitzen gegenüber bereits vorhandenen Subtypen einen Selektionsvorteil, da die Immunabwehr des Wirtes nicht darauf vorbereitet ist. Bei ausreichender Infektiosität können diese neuen Viren Ursprung verheerender Pandemien sein (SCHOLTISSEK et al., 1978).

1.3 Virusreservoir

Wasservogel, hauptsächlich Arten der Ordnungen *Anseriformes* (Gänsevögel) und *Charadriiformes* (Watvögel) stellen das natürliche Reservoir aller Influenza-A-Viren dar (KAWAOKA et al., 1988; WEBSTER et al., 1992). Bei ihnen kommen Influenza-A-Viren aller bekannten HA- und NA-Subtypen in einem Großteil der möglichen Kombinationen vor (FOUCHIER et al., 2005; OLSEN et al., 2006). Die Infektion verläuft bei ihnen normalerweise asymptomatisch (WEBSTER et al., 1992); sie scheiden aber hohe Virusmengen mit dem Kot aus (WEBSTER et al., 1978).

Die meisten Vogelarten gelten als empfänglich für aviäre Influenzaviren, einige Hausgeflügelarten, wie Huhn und Truthahn, sind besonders empfindlich (ALEXANDER, 2000). Niedrigpathogene aviäre Influenzaviren (LPAIV – low-pathogenicity avian influenza virus) führen auch beim Hausgeflügel meist nur zu milden klinischen Symptomen (CAMPITELLI et al., 2002). Sie können sich allerdings durch eine Reihe von Mutationen an die neue Spezies anpassen und dann auch stärkere Krankheitssymptome verursachen (LI et al., 2005a). Influenza-A-Viren der Subtypen H5 und H7 können sich außerdem nach ihrer Übertragung auf hochempfindliche Vogelarten zu hochpathogenen Varianten (HPAIV – highly pathogenic avian influenza virus) entwickeln, welche dann (per)akute schwere Erkrankungen mit bis zu 100 % Letalität auslösen können (PERDUE et al., 1997; CAPUA et al., 2000).

Der wichtigste Faktor für diesen Pathogenitätswandel ist die Spaltbarkeit des HA durch verschiedene Proteasen (KLENK & GARTEN, 1994). HA wird vom Virus zunächst als Vorläuferglykoprotein HA0 gebildet, welches von Proteasen des Wirts in seine beiden Bestandteile HA1 und HA2 gespalten werden muss, um funktionsfähig zu sein (CHEN et al., 1998; SKEHEL & WILEY, 2000). Niedrigpathogene aviäre Influenzaviren besitzen an der Spaltstelle des HA0 ein einzelnes Arginin (WOOD et al., 1993; SENNE et al., 1996). Sie werden von extrazellulären Proteasen („trypsin-like proteases“) gespalten, die vor allem im Respirationstrakt und Gastrointestinaltrakt des Wirts vorkommen (KIDO et al., 1992; SKEHEL & WILEY, 2000). Die Replikation der niedrigpathogenen Influenzaviren ist daher auf diese Gewebe beschränkt und führt dort zu lokalen Infektionen. Im Gegensatz dazu enthält die Spaltstelle des HA0 hochpathogener aviärer Influenzaviren mehrere basische Aminosäuren (Arginin, Lysin) (VEY et al., 1992; PERDUE et al., 1997). HA0 dieser Viren kann deshalb durch ubiquitäre

intrazelluläre Proteasen gespalten werden; dadurch können diese Viren nicht nur zu lokalen, sondern auch zu systemischen Infektionen führen (STIENEKE-GROBER et al., 1992).

Hochpathogene Influenzaviren können vom Hausgeflügel zurück auf Wildvögel übertragen werden. Dies geschah bislang nur sporadisch und meist lokal begrenzt (ALEXANDER, 2000). Auch Ausbrüche hochpathogener aviärer Influenza bei Hausgeflügel waren relativ selten; zwischen 1959 und 1997 wurden insgesamt 17 Ausbrüche registriert (ALEXANDER, 2000).

Dies änderte sich grundlegend mit dem Auftreten des HPAIV H5N1 Typ Asia. Dieser Subtyp breitete sich innerhalb kurzer Zeit nahezu weltweit aus und infizierte in großem Maße auch Wildvögel (CHEN et al., 2005). Eine weitere besorgniserregende Besonderheit des HPAIV H5N1 ist seine Fähigkeit, die Speziesbarriere zu überspringen und ohne vorherige Anpassung an Säugetiere eine Vielfalt an Säugetierspezies einschließlich Menschen zu infizieren. Daher befürchten Experten, dass HPAIV H5N1 zu einer weltweiten Pandemie führen könnte (WEBSTER et al., 2006).

1.4 Influenza-A-Pandemien des Menschen

Pandemieauslösende Influenzaviren können auf zwei verschiedene Arten entstehen (WEBSTER et al., 1992). Zum einen kann sich ein aviäres Influenzavirus (oder ein Influenzavirus einer anderen Tierart) durch Mutationen so an den Menschen anpassen, dass es von Mensch zu Mensch übertragen werden kann (TAUBENBERGER et al., 2005). Zum anderen können sie durch Reassortierung im Vogel, im Menschen oder in einem Zwischenwirt (zum Beispiel dem Schwein) bei gleichzeitiger Infektion dieses Wirts mit humanen und aviären Influenzaviren entstehen (SCHOLTISSEK et al., 1978). Im Verlauf des 20. Jahrhunderts gab es drei Pandemien, die durch Influenza-A-Viren ausgelöst wurden.

1.4.1 Spanische Grippe 1918/19

Die Spanische Grippe wurde durch ein Influenza-A-Virus des Subtyps H1N1 mit extrem hoher Virulenz ausgelöst (TAUBENBERGER et al., 1997). Weltweit erkrankte rund ein Drittel der Weltbevölkerung (TAUBENBERGER & MORENS, 2006); die Zahl der Toten wird auf 50 bis 100 Millionen Menschen geschätzt (JOHNSON & MUELLER, 2002). Im Gegensatz zu anderen

Influenzaausbrüchen starben vor allem junge, gesunde Erwachsene im Alter zwischen 20 und 40 Jahren an der Spanischen Grippe (SIMONSEN et al., 1998). Neuere Erkenntnisse, die durch Sequenzierung und Rekonstruktion des Virus von 1918 gewonnen wurden, deuten darauf hin, dass es sich bei dem Auslöser der Spanischen Grippe nicht um ein rekombinantes Virus handelt, sondern dass es durch direkten Übergang eines aviären Influenzavirus auf den Menschen und nachfolgende Anpassung an den Menschen entstand (TAUBENBERGER et al., 2005; TUMPEY et al., 2005).

Das H1N1-Virus zirkulierte nach 1918/19 weiterhin in der menschlichen Bevölkerung. Warum es dabei zu weit geringerer Morbidität und Mortalität führte, ist nicht endgültig geklärt. Es wird vermutet, dass es zum einen durch Mutationen attenuiert wurde, zum anderen ein Großteil der Bevölkerung durch Antikörper gegen H1N1 geschützt war (NAKAJIMA et al., 1978; TAUBENBERGER & MORENS, 2006). Mit dem Auftreten der Asiatischen Grippe im Jahr 1957 verschwand das H1N1-Virus aus der menschlichen Bevölkerung und trat 1977 nahezu unverändert wieder auf. Als wahrscheinlichste Erklärung dafür, dass das Virus sich in der Zwischenzeit nicht genetisch verändert hatte, gilt, dass es die Zeit über in gefrorenem Zustand konserviert war (NAKAJIMA et al., 1978). Seither zirkuliert es beim Menschen und ist für Influenzaepidemien verantwortlich (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2007).

1.4.2 Asiatische Grippe 1957/58

Auslöser der Asiatischen Grippe war ein H2N2-Influenzavirus, welches durch Rekombination eines aviären H2N2-Virus mit dem humanen H1N1-Virus von 1918 entstand. Das neue Virus enthielt drei Gensegmente des aviären Influenzavirus (HA, NA, und PB1) und fünf Segmente des humanen Influenzavirus (SCHOLTISSEK et al., 1978; KAWAOKA et al., 1989; WEBSTER et al., 1992). Die Asiatische Grippe zeigte mit weltweit etwa zwei Millionen Toten einen weniger verheerenden Verlauf als die Spanische Grippe (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2005). Mit dem Auftreten der Hongkong-Grippe im Jahr 1968 wurde das Influenzavirus H2N2 durch das neu aufgetretene Virus des Subtyps H3N2 ersetzt und verschwand aus der menschlichen Bevölkerung (SCHAFER et al., 1993).

1.4.3 Hongkong-Grippe 1968/69

Das H3N2-Influenzavirus, welches die Hongkong-Grippe auslöste, entstand durch Antigenshift des Virus der Asiatischen Grippe. Es besitzt zwei Gensegmente eines aviären H3-Influenzavirus (HA und PB1) und sechs Gensegmente des humanen H2N2-Virus der Asiatischen Grippe (SCHOLTISSEK et al., 1978; FANG et al., 1981; KAWAOKA et al., 1989). Die Hongkong-Grippe führte weltweit zu circa einer Million Toten (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2005). Der Subtyp H3N2 zirkuliert noch heute in der menschlichen Bevölkerung (LINDSTROM et al., 1998).

2 Hochpathogene aviäre Influenza-A-Viren Subtyp H5N1

Unter den momentan zirkulierenden Influenza-A-Subtypen stellt der Subtyp H5N1 die größte Gefahr als möglicher Auslöser einer neuen weltweiten Influenzapandemie dar (siehe Abschnitt 2.2.3).

2.1 Entstehung und Entwicklung

Ein hochpathogenes aviäres Influenza-A-Virus vom Subtyp H5N1 wurde in Asien erstmals 1996 bei Gänsen isoliert (A/Goose/Guangdong/1/96) (XU et al., 1999). Durch Rekombination, vermutlich mit einem H6N1 Virus (A/Teal/Hong Kong/W312/97), welches das NA-Gen und die Gene für die inneren Proteine beisteuerte, entstand das hochpathogene aviäre Influenzavirus H5N1 (XU et al., 1999; HOFFMANN et al., 2000), welches 1997 zu Ausbrüchen bei Geflügel in Hongkong führte und vom Geflügel auf den Menschen übertragen wurde (18 Erkrankungen, davon 6 Tote) (ANONYMUS, 1998; CLAAS et al., 1998; SUBBARAO et al., 1998). Dies war der erste Fall, in dem ein rein aviäres Influenzavirus schwerwiegende Erkrankungen beim Menschen auslöste (SUBBARAO et al., 1998).

Trotz umfangreicher Keulungsmaßnahmen zirkulierte das Virus weiterhin bei Wassergeflügel in China (CAUTHEN et al., 2000) und wurde in der Geflügelpopulation Asiens endemisch (LI et al., 2004). Durch verschiedene Reassortierungen und Antigendrift entstanden unterschiedliche Genotypen (GUAN et al., 2002; GUAN et al., 2004; LI et al., 2004; CHEN et al., 2006), darunter der dominante Genotyp „Z“ (LI et al., 2004). 2003/2004 kam es zu verheerenden Ausbrüchen in neun asiatischen Ländern (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2004), die durch genetisch und antigenetisch unterschiedliche

Virusstämme („Clades“) verursacht wurden. Clade-1-Viren wurden hauptsächlich in Vietnam, Thailand, Kambodscha, Laos und Malaysia gefunden, während Clade-2-Viren für Ausbrüche in China, Japan, Indonesien und Südkorea verantwortlich waren. Virusisolate aus Hongkong gehörten zu Clade 1' bzw. Clade 3 (WORLD HEALTH ORGANIZATION GLOBAL INFLUENZA PROGRAM SURVEILLANCE NETWORK, 2005).

2005 verursachte HPAIV H5N1 erstmals Ausbrüche in großem Umfang bei wildlebendem Wassergeflügel. Am Qinghai-See, einem großen Vogelschutzgebiet im Nord-Westen Chinas, an dem sich mehrere große Vogelzugrouten kreuzen, starben tausende Streifengänse (*Anser indicus*) und andere Zugvogelarten (CHEN et al., 2005; LIU et al., 2005). Anschließend breitete sich das Virus über die Mongolei, Russland und Kasachstan nach Westen aus und ist mittlerweile mit Ausnahme von Amerika nahezu weltweit verbreitet (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2008a, 2008b).

2.2 Auftreten bei Säugetieren

Experimentelle und natürliche Infektionen haben gezeigt, dass viele Säugetierarten empfänglich für HPAIV H5N1 sind und an der Infektion erkranken (VAHLENKAMP & HARDER, 2006).

2.2.1 Genetische Grundlage von Wirtsspezifität und Pathogenität

Die genetische Grundlage, die das Überwinden der Speziesbarriere ermöglicht, ist noch nicht ausreichend geklärt. Eine Reihe von Mutationen wurde identifiziert, aber keine davon scheint alleinig für die erhöhte Pathogenität bei Säugetieren verantwortlich zu sein (CHEN et al., 2004; LIPATOV et al., 2004; GOVORKOVA et al., 2005).

Ein wichtiger Faktor der Wirtsspezifität ist die Bindung an unterschiedliche Rezeptoren auf der Wirtszelloberfläche. Aviäre Influenzaviren binden (ebenso wie equine Influenzaviren) bevorzugt an α -2,3-glykosidisch gebundene Sialinsäurereste (NeuAc α 2,3Gal) des Rezeptors, während humane Influenzaviren α -2,6-glykosidisch gebundene Sialinsäurereste (NeuAc α 2,6Gal) bevorzugen (ROGERS & D'SOUZA, 1989; CONNOR et al., 1994). Die genetische Grundlage dieser Rezeptorspezifität beruht auf der Aminosäuresequenz des HA-Moleküls. Influenza-A-Viren mit bevorzugter Bindung an NeuAc α 2,6Gal-Rezeptoren besitzen Leucin und Serin an Position 226 bzw. 228 (H3-Nummerierung); Viren

mit bevorzugter NeuA α 2,3Gal-Bindung weisen dort die Aminosäuren Glutamin und Glyzin auf (CONNOR et al., 1994; VINES et al., 1998). Auch untersuchte hochpathogene humane H5N1-Isolate besaßen NeuA α 2,3Gal-Rezeptorpräferenz (MATROSOVICH et al., 1999; GUAN et al., 2004; CHUTINIMITKUL et al., 2006). Die Rezeptorpräferenz stellte also offenbar kein Hindernis für das Überspringen der Speziesbarriere dar. Allerdings wurde in neueren Studien nachgewiesen, dass sich im unteren Respirationstrakt des Menschen ebenfalls Zellen mit NeuA α 2,3Gal-Präferenz befinden (SHINYA et al., 2006). Die Möglichkeit der Wandlung der Rezeptorpräferenz im Verlauf einer Pandemie zu einer bevorzugten NeuA α 2,6Gal-Rezeptorbindung (MATROSOVICH et al., 1997; MATROSOVICH et al., 2000) stimmt mit der Beobachtung überein, dass humane H5N1-Isolate von 2003, 2004 und 2005 sowohl an α -2,3- als auch an α -2,6-glykosidisch gebundene Sialinsäurereste binden können (SHINYA et al., 2006; YAMADA et al., 2006).

Als wichtige Voraussetzung für die Pathogenität beim Säugetier besitzen alle bislang bei Säugetieren isolierten H5N1-Viren eine polybasische Aminosäuresequenz an der Spaltstelle des HA0-Moleküls, die bei Vögeln definitionsgemäß eine hohe Pathogenität charakterisiert (VEY et al., 1992; PERDUE et al., 1997). HATTA und Mitarbeiter (2001) zeigten, dass diese Aminosäuresequenz auch bei Mäusen eine essentielle Voraussetzung für hohe Virulenz darstellt.

Des Weiteren konnte eine Mutation am PB2-Gen identifiziert werden, die zu erhöhter Pathogenität von H5N1-Viren bei Säugetieren führen kann. Der Austausch von Glutamin durch Lysin an Position 627 des PB2-Proteins (627K) war verantwortlich für eine starke Virulenzsteigerung bei Mäusen (HATTA et al., 2001). 627K führte zu einer effektiveren Replikation der H5N1-Viren in murinen Geweben (SHINYA et al., 2004). Auch beim Menschen wurden H5N1-Isolate mit Lysin an Position 627 des PB2-Proteins gefunden (CHUTINIMITKUL et al., 2006); die Mehrheit der Virusisolate von Feliden besitzt ebenfalls diese Mutation (KEAWCHAROEN et al., 2004; AMONSIN et al., 2006b; SONGSERM et al., 2006b; AMONSIN et al., 2007). Allerdings scheint sie keine essentielle Voraussetzung für hohe Pathogenität bei Säugetieren darzustellen, da auch Isolate mit Glutamin an Position 627 des PB2-Proteins eine hohe Virulenz bei Frettchen (ZITZOW et al., 2002; GOVORKOVA et al., 2005) und Mäusen (LIPATOV et al., 2003; CHEN et al., 2004) zeigten.

Ein weiterer Faktor der Säugetierpathogenität von HPAIV H5N1 scheint eine Mutation am NS-Gen zu sein. Das NS1-Protein ist ein Interferon (IFN)- α/β -Antagonist und schwächt somit die antivirale Antwort infizierter Zellen ab. Normalerweise überwiegt die Interferonwirkung, so dass die Virusreplikation begrenzt wird (KRUG et al., 2003). In Zellkulturen und bei experimentellen Infektionen von Schweinen konnte gezeigt werden, dass eine Mutation an Position 92 des NS1-Proteins (Glutaminsäure statt Asparaginsäure) das H5N1-Virus gegenüber IFN- α , IFN- γ und Tumornekrosefaktor (TNF)- α resistent macht und somit die antivirale Wirkung von IFN und TNF ausbleibt (SEO et al., 2002). Auch diese Mutation ist aber keine essentielle Voraussetzung für eine hohe Pathogenität des H5N1-Virus; Isolate ohne Mutation von Asparaginsäure zu Glutaminsäure an Position 92 des NS1-Proteins besitzen ebenfalls hohe Pathogenität bei Mäusen (CHEN et al., 2004) und auch Isolate von gestorbenen Tigern und Leoparden zeigten keine Mutation an dieser Stelle (AMONSIN et al., 2006b).

In Zellkulturen aus humanen Makrophagen wurde eine erhöhte Aktivität proinflammatorischer Zytokine nach Infektion mit hochpathogenen H5N1-Viren nachgewiesen (CHEUNG et al., 2002; GUAN et al., 2004), die ebenfalls dem NS-Gen zugeschrieben wird (CHEUNG et al., 2002). Es wurde postuliert, dass diese erhöhte Zytokinaktivität die Pathogenese der Virusinfektion beim Menschen beeinflusst, da hohe Konzentrationen proinflammatorischer Zytokine auch *in vivo* bei HPAIV-H5N1-infizierten Menschen gefunden wurden. Die Patienten waren an hämophagozytischer Lymphohistiozytose als Komplikation der Infektion gestorben (TO et al., 2001; PEIRIS et al., 2004) – einem Syndrom, welches mit Hyperzytokinämie in Verbindung gebracht wird (FISMAN, 2000).

2.2.2 Säugetierwirte

Im folgenden Abschnitt wird auf Infektionen bei Säugetierarten eingegangen, die sich bislang als empfänglich für HPAIV H5N1 erwiesen haben.

2.2.2.1 Menschen

Humane Influenza-A-Viren gehören den Subtypen H1, H2 und H3 an (WRIGHT & WEBSTER, 2004). Momentan zirkulieren H3N2-Viren, H1N1-Viren und H1N2-Viren, sowie unterschiedliche Influenza-B-Viren, die jedes Jahr

Grippeepidemien beim Menschen auslösen (NAKAJIMA et al., 1978; LINDSTROM et al., 1998; XU et al., 2002; LIN et al., 2004).

In den letzten Jahren gab es einige Fälle von Übertragungen aviärer Influenza-A-Subtypen auf den Menschen. 1996 wurde in Großbritannien bei einer Frau mit Konjunktivitis nach Kontakt mit gesundem Wassergeflügel ein niedrigpathogenes aviäres H7N7-Virus isoliert (KURTZ et al., 1996). 1999 wurden bei sieben Personen aus China Influenzaviren des Subtyps H9N2 isoliert, der zur gleichen Zeit bei Geflügel und Schweinen in der Gegend zirkulierte. Das aviäre Virus hatte zu milden Grippe-symptomen geführt; in allen Fällen erholten sich die Patienten (PEIRIS et al., 1999; GUO et al., 2000). Während eines Ausbruchs von HPAIV H7N7 bei Geflügel in den Niederlanden im Jahr 2003 infizierten sich 86 Personen, die mit erkranktem Geflügel in Kontakt gekommen waren, mit dem aviären Virus. Die meisten entwickelten lediglich Konjunktivitis, sieben Personen zeigten milde influenzaähnliche Symptome. Bei einem Tierarzt allerdings führte das H7N7-Virus zu einer schweren Pneumonie mit Todesfolge. Außerdem gab es Hinweise auf limitierte Mensch-zu-Mensch-Übertragung, da auch drei Familienangehörige erkrankten, die keinen direkten Kontakt zu Geflügel gehabt hatten (FOUCHIER et al., 2004). 2004 führte HPAIV H7N3 bei zwei Personen zu Konjunktivitis und milden influenzaähnlichen Symptomen. Die beiden Männer waren bei einem Ausbruch hochpathogener aviärer Influenza H7N3 in Kanada an der Keulung der Vögel beteiligt gewesen (TWEED et al., 2004).

Keiner dieser Subtypen führte allerdings in dem Maße zu Erkrankungen und Todesfällen beim Menschen wie der hochpathogene Subtyp H5N1. Die ersten Fälle menschlicher Erkrankungen aufgrund einer Infektion mit HPAIV H5N1 traten 1997 in Hongkong auf. Insgesamt erkrankten 18 Menschen aus unterschiedlichen Regionen Hongkongs, sechs (33 %) davon starben (CLAAS et al., 1998; YUEN et al., 1998; TO et al., 2001). Aufgrund umfangreicher Geflügelkeulungsmaßnahmen in Hongkong konnten zunächst weitere Erkrankungen verhindert werden. Die nächsten menschlichen Infektionen wurden im Jahr 2003 nachgewiesen (CHAN, 2002; PEIRIS et al., 2004). Seitdem sind 373 von der Weltgesundheitsorganisation (WHO) bestätigte Fälle bekannt, von denen 236 zum Tode führten. Der Großteil der Fälle trat in (Südost-)Asien auf (Indonesien, Vietnam, China, Thailand, Kambodscha, Laos, Myanmar, Pakistan), aber auch in Afrika (Ägypten, Dschibuti, Nigeria), im Kaukasus (Aserbaidschan)

und in Vorderasien (Türkei, Irak) waren bislang Fälle zu verzeichnen (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2008c) (Stand: 29.03.2008).

Bei den meisten infizierten Personen war ein direkter Kontakt zu erkranktem Geflügel als Infektionsursache nachzuweisen (MOUNTS et al., 1999; APISARNTHANARAK et al., 2004; TRAN et al., 2004; CHOTPITAYASUNONDH et al., 2005). Allerdings gibt es auch Hinweise auf eine limitierte Übertragung des Virus von Mensch zu Mensch. Die Mutter und die Tante eines an Pneumonie verstorbenen Mädchens erkrankten nach mehrtägigem engem Kontakt zu dem Kind im Krankenhaus an einer Infektion mit HPAIV H5N1; die Mutter verstarb. Sie hatte keinen Kontakt zu Geflügel gehabt (UNGCHUSAK et al., 2005). Des Weiteren wurden bei dem Vater eines anderen an H5N1-Infektion erkrankten Kindes Antikörper gegen H5N1-Viren nachgewiesen (KATZ et al., 1999), und zwei Personen des Krankenhauspersonals entwickelten Antikörper gegen H5N1 nach Kontakt zu H5N1-Patienten (BUXTON BRIDGES et al., 2000). Bei allen dreien bestand kein Kontakt mit Geflügel. Mensch-zu-Mensch-Übertragungen sind allerdings begrenzt, da viele Personen mit ungeschütztem Kontakt zu infizierten Personen weder erkrankten noch Antikörper entwickelten (KATZ et al., 1999; BUXTON BRIDGES et al., 2000; APISARNTHANARAK et al., 2004; TRAN et al., 2004; CHOTPITAYASUNONDH et al., 2005). Alle bislang untersuchten H5N1-Isolate vom Menschen sind aviären Ursprungs; es hat keine Reassortierung zwischen aviären und humanen Influenzaviren stattgefunden (CLAAS et al., 1998; SUBBARAO et al., 1998; UIPRASERTKUL et al., 2005; UNGCHUSAK et al., 2005; AMONSIN et al., 2006a).

Klinische Symptome beim Menschen beinhalten meist respiratorische Symptome (Dyspnoe, Husten) aufgrund einer interstitiellen Pneumonie und diffuser Alveolarschädigungen, Fieber sowie gastrointestinale Symptome (Bauchschmerzen, Erbrechen, Durchfall) (YUEN et al., 1998; TO et al., 2001; APISARNTHANARAK et al., 2004; TRAN et al., 2004; CHOTPITAYASUNONDH et al., 2005; UIPRASERTKUL et al., 2005; UNGCHUSAK et al., 2005). Zusätzlich wurde von Krämpfen und Koma bei einem Patienten mit H5N1-Infektion berichtet (DE JONG et al., 2005). Das Ausmaß der klinischen Symptome umfasst sowohl milde, selbstlimitierende Infektionen als auch schwere Erkrankungen mit Todesfolge (YUEN et al., 1998; CHAN, 2002; BEIGEL et al., 2005), aber auch subklinische Infektionen sind

nachgewiesen (KATZ et al., 1999; BUXTON BRIDGES et al., 2000). Vor allem Patienten mit schwerwiegendem Verlauf zeigten labordiagnostisch massive Lymphopenie, Thrombozytopenie, verlängerte Blutgerinnungszeiten, erhöhte Leberenzymaktivitäten und Anzeichen von Nierenversagen (YUEN et al., 1998; APISARNTHANARAK et al., 2004; TRAN et al., 2004; CHOTPITAYASUNONDH et al., 2005). Diese Symptome wurden pathophysiologisch einem Multiorganversagen durch hämophagozytische Lymphohistiozytose aufgrund massiver infektionsbedingter Zytokinausschüttung zugeordnet (TO et al., 2001; PEIRIS et al., 2004).

In den meisten Fällen gelang ein Virusnachweis nur in respiratorischen Organen (CHAN, 2002). DE JONG und Mitarbeiter (2005) konnten hochpathogenes H5N1-Virus zusätzlich aus Serum, Liquor und Rektaltupfer eines Jungen aus Vietnam isolieren, der neben gastrointestinalen und respiratorischen Symptomen auch neurologische Symptome gezeigt hatte. Bei einem weiteren Patienten aus Thailand konnte HPAIV H5N1 im Serum gefunden werden (CHUTINIMITKUL et al., 2006). UIPRASERTKUL und Mitarbeiter (2005) wiesen RNA mit (+)-Polarität, welche mit Virusreplikation assoziiert ist, in der Lunge und im Dünn- und Dickdarm eines an einer H5N1-Infektion verstorbenen Menschen nach.

2.2.2.2 Affen

Langschwanzmakaken (*Macaca fascicularis*) wurden experimentell mit einem humanen H5N1-Isolat von 1997 [A/Hong Kong/156/97 (H5N1)] infiziert (RIMMELZWAAN et al., 2001; KUIKEN et al., 2003). Die Tiere zeigten schwere akute respiratorische Symptome aufgrund einer nekrotisierenden bronchio-interstitiellen Pneumonie und Fieber (RIMMELZWAAN et al., 2001). Zwar wurde mittels Reverser-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) Influenza-A-H5N1-Virus nicht nur im Respirationstrakt, sondern auch in extra-respiratorischen Organen (Milz, Herz, Gehirn) und im Plasma nachgewiesen, doch es konnte kein Hinweis auf systemische Replikation von H5N1-Virus mittels Immunhistochemie gefunden werden (RIMMELZWAAN et al., 2001). Nekrotische Läsionen in Niere, Leber, Milz und Lymphknoten wurden auf Multiorganversagen („multiple organ dysfunction syndrome“ – MODS) zurückgeführt (KUIKEN et al., 2003). Dies ist eine Komplikation, die auch bei H5N1-Fällen beim Menschen beschrieben wurde (YUEN et al., 1998).

2.2.2.3 *Mäuse*

Mäuse erwiesen sich in experimentellen Infektionen als empfänglich für HPAIV H5N1 und dienen als Tiermodell zur Untersuchung der Pathogenität von H5N1-Isolaten (GAO et al., 1999; LU et al., 1999; HATTA et al., 2001; LI et al., 2005b; MAINES et al., 2005). Bei ihnen wurde erstmals systemische Replikation eines Influenza-A-Virus bei einem Säugetier ohne vorherige Adaptation an die Spezies nachgewiesen (GAO et al., 1999; LU et al., 1999). Es wurde gezeigt, dass einige HPAIV-H5N1-Isolate neurotrop sind und sich in Neuronen und Gliazellen des Gehirns vermehren (GAO et al., 1999; LU et al., 1999; LIPATOV et al., 2003).

2.2.2.4 *Frettchen*

Frettchen (*Mustela putorius furo*) sind natürlicherweise empfänglich für humane Influenza-A- und auch -B-Viren; der Krankheitsverlauf ähnelt dem beim Menschen. Sie stellen daher ein beliebtes Tiermodell für die Influenzaforschung dar (SMITH & SWEET, 1988; RENEGAR, 1992; MAHER & DESTEFANO, 2004). In experimentellen Infektionsversuchen waren Frettchen empfänglich für HPAIV H5N1 (ZITZOW et al., 2002; GOVORKOVA et al., 2005; MAINES et al., 2005). Es wurde eine systemische Infektion mit respiratorischen und neurologischen Symptomen, Lethargie, Fieber, Gewichtsverlust, Durchfall und Lymphopenie ausgelöst (ZITZOW et al., 2002; GOVORKOVA et al., 2005; MAINES et al., 2005). Vor allem humane H5N1-Isolate zeigten einen deutlichen Neurotropismus mit höheren Virustitern im Gehirn als in der Lunge (GOVORKOVA et al., 2005).

Während des ersten Ausbruchs von hochpathogener aviärer Influenza H5N1 in Deutschland im Frühjahr 2006 wurde HPAIV H5N1 außerdem bei einem Steinmarder (*Martes foina*) mit neurologischen Symptomen nachgewiesen. Der Steinmarder gehört wie das Frettchen ebenfalls der Familie der Marder (*Mustelidae*) an (KLOPFLEISCH et al., 2007a).

2.2.2.5 *Schweine*

Natürlicherweise zirkulieren beim Schwein (*Sus scrofa*) gegenwärtig klassische H1N1-Viren, die bereits 1930 bei Schweinen isoliert wurden, H1N1-Viren aviären Ursprungs (BROWN et al., 1997), H3N2-Viren humanen Ursprungs (CASTRUCCI et al., 1994), ein human-aviäres-rekombinantes Virus vom Subtyp H1N2 (BROWN et al., 1998) und H3N2-Viren mit Genen des klassischen H1N1-

Subtypes, des humanen H3N2-Subtyps sowie von aviären Subtypen (OLSEN et al., 2000; ZHOU et al., 2000). Ein aviäres H9N2-Virus zirkuliert seit einigen Jahren in der Schweinepopulation Chinas (XU et al., 2004).

Schweine besitzen an den Zellen ihres Respirationstrakts Rezeptoren für humane (NeuAc α 2,6Gal) und für aviäre Influenzaviren (NeuAc α 2,3Gal) (ITO et al., 1998). Sie können daher bei gleichzeitiger Infektion mit humanen und aviären Influenzaviren als „mixing vessel“ fungieren und zur Entstehung neuer Subtypen beitragen (SCHOLTISSEK et al., 1985; CLAAS et al., 1994).

In der Ausbreitung und Entwicklung des HPAIV H5N1 scheint Schweinen momentan allerdings keine wichtige Rolle zuzukommen. Bei Antikörperuntersuchungen in Vietnam wurden nur bei 0,25 % der Schweine (8/3175) Antikörper gegen H5N1-Viren gefunden (CHOI et al., 2005). In experimentellen Infektionsversuchen mit humanen und aviären H5N1-Virusisolaten schieden die Schweine moderate Virusmengen aus (SHORTRIDGE et al., 1998; CHOI et al., 2005) und zeigten mit Husten, erhöhter Körpertemperatur und Anorexie mäßig starke klinische Symptome (CHOI et al., 2005) oder blieben sogar symptomlos (SHORTRIDGE et al., 1998). Das Virus wurde nicht von infizierten Schweinen auf Schweine, die in Kontakt mit den infizierten Tieren gehalten wurden, übertragen (SHORTRIDGE et al., 1998; CHOI et al., 2005).

2.2.2.6 Hunde

Ein Bericht von SONGSERM und Mitarbeitern (2006a) gibt an, dass Hunde (*Canis lupus familiaris*) ebenfalls empfänglich für HPAIV H5N1 sind. Ein Hund aus Thailand, der laut Aussage seines Besitzers tote Enten gefressen hatte, zeigte fünf Tage später hohes Fieber und Dyspnoe und verstarb am darauffolgenden Tag. HPAIV H5N1 konnte aus Lunge, Leber, Niere und Urin isoliert werden. Mittels Immunhistochemie wurde Virusreplikation in Alveolarzellen, in Leberzellen, im Nierentubulusepithel und in Glomerulumzellen nachgewiesen. Das Virus war aviären Ursprungs und zeigte eine enge Verwandtschaft mit zeitgleich in der Region zirkulierenden Viren von Hühnern, Enten, Menschen und Tigern (SONGSERM et al., 2006a).

Experimentell infizierte Hunde zeigten ab dem zweiten Tag *post infectionem* (*p. i.*) bis maximal zum sechsten Tag *p. i.* lediglich geringgradig erhöhte

Körpertemperatur und Konjunktivitis. Einer von vier Hunden entwickelte Antikörper (GIESE et al., 2008).

Laut einer bisher unveröffentlichten Studie des National Institute of Animal Health in Bangkok sollen 160 von 629 in Thailand untersuchten streunenden Hunden (25 %) Antikörper gegen H5N1-Virus besitzen (BUTLER, 2006). Sollten sich diese Ergebnisse bestätigen, spricht dies dafür, dass HPAIV H5N1 beim Hund auch zu subklinischen Infektionen führen kann.

Direkter Kontakt gesunder Hunde zu experimentell infizierten (und daraufhin schwer erkrankten) Katzen führte nicht zu Virusübertragung auf die Hunde. Bei den Hunden konnten weder klinische Symptome noch Virusausscheidung oder Antikörperentwicklung festgestellt werden (GIESE et al., 2008).

Außer Influenzaviren des Subtyps H5N1 gibt es noch einen weiteren Subtyp, der die Speziesbarriere übersprungen hat und direkt auf den Hund übertragen wurde. 2004 wurde in den USA bei Greyhounds mit respiratorischer Erkrankung Influenza-A-Virus H3N8 isoliert, welches direkt vom Pferd auf den Hund übertragen worden war (CRAWFORD et al., 2005). Es hat sich inzwischen an die neue Spezies angepasst und zirkuliert seither in der Hundepopulation. Ein hoher Prozentsatz der Greyhounds hat Antikörper, aber auch als Haustiere gehaltene Hunde anderer Rassen mit respiratorischen Symptomen besitzen inzwischen Antikörper (CRAWFORD et al., 2005).

2.2.2.7 *Schleichkatzen*

Mit dem Nachweis von HPAIV H5N1 bei drei Fleckenrollern (*Chrotogale owstoni*), einer vom Aussterben bedrohten Schleichkatzenart, wurde eine weitere empfängliche Raubtierspezies gefunden (ROBERTON et al., 2006). Die in einem Nationalpark in Vietnam gehaltenen Tiere zeigten vor allem neurologische Symptome und verstarben kurze Zeit später. In der Sektion wurde eine systemische Infektion mit Neurotropismus nachgewiesen. Die genaue Infektionsquelle blieb unbekannt (ROBERTON et al., 2006).

2.2.2.8 *Feliden*

Sowohl Großkatzen (Tiger, Leoparden) als auch Hauskatzen sind empfänglich für Infektionen mit HPAIV H5N1 (KEAWCHAROEN et al., 2004; SONGSERM et al., 2006b). Das Auftreten natürlicher Infektionen ist sowohl in Asien als auch in Europa beschrieben (THANAWONGNUWECH et al., 2005; YINGST et al.,

2006; KLOPFLEISCH et al., 2007b). Infizierte Katzen können schwer erkranken und an der Infektion sterben (KEAWCHAROEN et al., 2004; SONGSERM et al., 2006b), aber auch subklinische Infektionen treten auf (LESCHNIK et al., 2007; VAHLENKAMP et al., 2008) (siehe Abschnitt 3).

2.2.3 Pandemiegefahr durch aviäre Influenza-A-H5N1-Viren

Der seit 1997 zirkulierende Subtyp H5N1 hat Besorgnis als möglicher nächster Verursacher einer weltweiten Pandemie ausgelöst. Grund hierfür ist seine Fähigkeit, direkt – ohne Anpassung in einem Zwischenwirt oder Reassortierung – auf den Menschen übertragbar zu sein und schwerwiegende Erkrankungen auslösen zu können (CLAAS et al., 1998; YUEN et al., 1998; MATROSOVICH et al., 1999).

Bislang handelt es sich bei HPAIV H5N1 um ein aviäres Virus. Obwohl bereits hunderte Millionen Vögel weltweit der Seuche zum Opfer gefallen sind, gibt es mit 373 labordiagnostisch bestätigten Fällen vergleichsweise wenige H5N1-Infektionen beim Menschen (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2008c) (Stand: 29.03.2008), und die Übertragung von Mensch zu Mensch ist begrenzt (KATZ et al., 1999; BUXTON BRIDGES et al., 2000).

Anlass zur Sorge bereitet die sehr hohe Letalität der Infektion beim Menschen von 63 % (im Zeitraum von 2003 bis 2008) (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2008c). Allerdings ist das Ausmaß milder und subklinischer Infektionen unbekannt, so dass die eigentliche Letalitätsrate niedriger sein könnte (YUEN et al., 1998; TRAN et al., 2004; BEIGEL et al., 2005).

Eine mögliche Ursache der Limitierung der Mensch-zu-Mensch-Übertragung besteht darin, dass bisherige H5N1-Isolate NeuAca2,3Gal-Zellrezeptoren bevorzugen, welche beim Menschen nur im unteren, nicht aber im oberen Respirationstrakt vorkommen (MATROSOVICH et al., 1999; GUAN et al., 2004; AMONSIN et al., 2006a; SHINYA et al., 2006). Daher ist beim Menschen die Virusreplikation im oberen Atemtrakt – und damit die Virusausscheidung – begrenzt (SHINYA et al., 2006; VAN RIEL et al., 2006). Allerdings wurde gezeigt, dass Influenza-A-Viren die Fähigkeit zur Bindung an Rezeptoren im oberen Atemtrakt des Menschen im Laufe der Zeit entwickeln können und dadurch eventuell leicht von Mensch zu Mensch übertragbar werden (MATROSOVICH et al., 1997; MATROSOVICH et al., 2000). Damit wären drei von drei bedeutenden Kriterien eines Pandemievirus erfüllt, nämlich die Fähigkeit

zur Replikation im Menschen, das Fehlen eines Antikörperschutzes in großen Teilen der menschlichen Bevölkerung und die leichte Übertragbarkeit von Mensch zu Mensch (CLAAS et al., 1998). Eine weitere Gefahr besteht darin, dass bei gleichzeitiger Infektion eines Menschen oder eines anderen Säugetiers (zum Beispiel eines Schweins oder einer Katze) mit einem H5N1-Virus und einem humanen Influenza-A-Virus ein rekombinantes Virus entsteht, welches die Fähigkeit zur effektiven Mensch-zu-Mensch-Übertragung besitzt (BELSHE, 2005).

3 Hochpathogene aviäre Influenzaviren H5N1 bei Katzen

In älteren Studien wurde gezeigt, dass Katzen empfänglich für verschiedene Influenzaviren sind, allerdings ohne zu erkranken (PANIKER & NAIR, 1970, 1972; ONTA et al., 1978; HINSHAW et al., 1981). Nach experimenteller Infektion mit humanen Virusisolaten (H3N2, Influenza-B-Virus) schieden Katzen Viren über den Atemtrakt aus und entwickelten Antikörper (PANIKER & NAIR, 1970, 1972; HINSHAW et al., 1981). Auch bei Kontaktkatzen konnten Viren isoliert und Antikörper nachgewiesen werden (PANIKER & NAIR, 1970, 1972). Experimentelle Infektionen mit einem aviären Isolat (H7N3) und einem Seehund-Isolat (H7N7) führten zwar zu Virusausscheidung, aber nicht zu Antikörper-Produktion (HINSHAW et al., 1981). Des Weiteren wurden bei einem Katzenwelpen nach direktem Kontakt zu einem Menschen, der an Influenza erkrankt war, Virus isoliert und Antikörper nachgewiesen (PANIKER & NAIR, 1970). Bei Untersuchungen in Japan besaßen drei von 52 Katzen Antikörper gegen humane Influenzaviren (ONTA et al., 1978).

In keinem dieser Fälle entwickelten die Katzen klinische Symptome. Umso überraschender waren daher Berichte über Erkrankungen bei Feliden nach Infektion mit Influenzavirus H5N1.

3.1 Epidemiologie

Bisherige Erkenntnisse zur Epidemiologie der HPAIV-H5N1-Infektion bei Feliden stammen aus beobachteten natürlichen Infektionen und Untersuchungen der dort isolierten Viren sowie aus experimentellen Infektionsversuchen.

3.1.1 Bislang beschriebene Infektionen

Die ersten Hinweise, dass Feliden an HPAIV H5N1 erkranken können, kamen aus Asien. Ein chinesischer Artikel berichtete von einem Tiger, der bereits 2002 an einer Infektion mit einem Influenza-A-Virus gestorben war (XIA et al., 2003; PROMED-MAIL, 2004c). Im Dezember 2003 starben in einem Zoo in Suphanburi, Thailand, zwei Tiger (*Panthera tigris*) und zwei Leoparden (*Panthera pardus*) an einer Infektion mit HPAIV H5N1, nachdem sie hohes Fieber und Atemnot gezeigt hatten (KEAWCHAROEN et al., 2004). Im Januar 2004 starb ein Nebelparder (*Neofelis nebulosa*) in einem Zoo in Chonburi, Thailand, an der Infektion; kurze Zeit später erkrankte ein weißer Tiger im selben Zoo, er erholte sich aber von der Infektion (ENSERINK & KAISER, 2004; PROMED-MAIL, 2004b, 2004a). Im Oktober 2004 führte HPAIV H5N1 zu einem verheerenden Ausbruch in einem Tigerzoo in Sri Racha, Thailand. Insgesamt 147 Tiger starben oder mussten euthanasiert werden (THANAWONGNUWECH et al., 2005).

Neben diesen Berichten von Erkrankungen bei Großkatzen, gab es auch Hinweise auf eine Empfänglichkeit von Hauskatzen (*Felis catus*). Im Februar 2004 wurde HPAIV H5N1 bei einer Katze in Thailand isoliert, die an hohem Fieber, Atemnot, Krämpfen und Ataxie gestorben war (SONGSERM et al., 2006b). Des Weiteren wurde das Virus bei drei Katzen in einem thailändischen Haushalt nachgewiesen, in dem 14 von 15 Katzen gestorben waren (ENSERINK & KAISER, 2004; PROMED-MAIL, 2004a).

Diese Erkenntnisse wurden durch experimentelle Versuche bestätigt. KUIKEN und Mitarbeiter (2004) zeigten, dass Katzen nach intratrachealer Applikation von HPAIV H5N1 und nach Fressen infizierter Küken schwer erkranken können.

All diese Infektionen wurden auf Infektionen mit Clade-1-Viren zurückgeführt. Im Februar 2006 wurden bei einem Ausbruch im Irak erstmals Infektionen von Katzen mit Clade-2-Viren beschrieben (YINGST et al., 2006). HPAIV-H5N1-Clade-2 ist ebenfalls verantwortlich für die Infektion dreier Hauskatzen, die während des Ausbruchs von HPAIV H5N1 bei Wildvögeln im Frühjahr 2006 auf der Insel Rügen, Deutschland, gestorben waren (KLOPFLEISCH et al., 2007b). Außerdem wurde HPAIV H5N1 bei drei Katzen ohne klinische Symptome in einem Tierheim in Graz, Österreich, nachgewiesen, nachdem dort ein infizierter Schwan eingeliefert worden war (LESCHNIK et al., 2007).

3.1.2 Herkunft des Virus

In allen Fällen standen die Infektionen bei Feliden in räumlichem und zeitlichem Zusammenhang mit Ausbrüchen hochpathogener aviärer Influenza H5N1 bei Hausgeflügel oder Wildvögeln. Während der Zeit, in der die Ausbrüche bei den Tigern, Leoparden und Katzen auftraten, waren stets Vögel in der Umgebung erkrankt (KEAWCHAROEN et al., 2004; THANAWONGNUWECH et al., 2005; SONGSERM et al., 2006b; WOLF et al., 2006; YINGST et al., 2006; KLOPFLEISCH et al., 2007b; LESCHNIK et al., 2007).

Genomsequenzierungen und phylogenetische Analysen zeigten, dass die Virusisolate von Feliden in ihrer Nukleotid- und Aminosäuresequenz einen hohen Übereinstimmungsgrad mit Isolaten aufwiesen, welche zu der Zeit bei Geflügel oder Wildvögeln zirkulierten. Alle untersuchten Isolate waren aviären Ursprungs, Hinweise auf Reassortierung mit Säugetierinfluenzaviren wurden nicht gefunden. (KEAWCHAROEN et al., 2004; AMONSIN et al., 2006b; YINGST et al., 2006; AMONSIN et al., 2007; WEBER et al., 2007).

Das HA1-Molekül der Viren wies eine Aminosäuresequenz auf, die mit bevorzugter Bindung an aviäre Zellrezeptoren (NeuAc α 2,3Gal) in Verbindung gebracht wird (CONNOR et al., 1994); daher wird deutlich, dass auch Influenzaviren mit aviärer Rezeptorpräferenz Feliden infizieren können (KEAWCHAROEN et al., 2004; AMONSIN et al., 2006b; AMONSIN et al., 2007). Diese Tatsachen sprechen dafür, dass HPAIV H5N1 direkt ohne vorherige Anpassung von Vögeln auf die Katzen übergegangen ist. Der bei Influenzavirusinfektionen von Feliden bevorzugte Rezeptortyp ist bislang nicht ausreichend charakterisiert (AMONSIN et al., 2006b). Da HPAIV H5N1 bei der Katze das gleiche Verteilungsmuster in den Zellen des Atemtrakts zeigt wie beim Menschen, ist davon auszugehen, dass Katzen ebenfalls im oberen Respirationstrakt Zellen mit NeuAc α 2,6Gal-Rezeptoren besitzen, und lediglich Zellen des unteren Atemtrakts α -2,3-gebundene Sialinsäurerezeptoren aufweisen (VAN RIEL et al., 2006).

3.1.3 Virusübertragung

In den meisten Fällen erfolgte die Infektion der Katzen durch direkten Kontakt mit infizierten Vögeln, vor allem durch das Fressen von Geflügelfleisch oder verendeten Vögeln. Entweder wurden die Tiere mit infiziertem Geflügelfleisch gefüttert (KEAWCHAROEN et al., 2004; THANAWONGNUWECH et al., 2005)

oder die Besitzer berichteten eine Aufnahme verendeter Vögel (SONGSERM et al., 2006b). Diese Infektionsroute wurde auch experimentell bestätigt. KUIKEN und Mitarbeiter (2004) fütterten drei Katzen mit zuvor künstlich infizierten Küken. Alle Katzen erkrankten und schieden Virus aus.

Im Fall der drei Katzen in einem Grazer Tierheim wurde eine indirekte Übertragung durch am Katzenfell haftendes Virus und anschließendes Ablecken vermutet. Mehrere Katzen waren über einen Zaun in das Vogelgehege des Tierheims gelangt und können so mit Kot des infizierten Schwans in Kontakt gekommen sein (LESCHNIK et al., 2007).

Experimentell kann eine Infektion durch intratracheale oder oculo-nasopharyngeale Applikation von HPAIV H5N1 hervorgerufen werden. Drei Katzen, die in einem Infektionsversuch intratracheal mit dem Virusisolat eines an hochpathogener aviärer Influenza verstorbenen Menschen infiziert wurden, erkrankten und schieden Virus aus (KUIKEN et al., 2004) – ebenso Katzen, welche oculo-nasopharyngeal mit einem Katzen-H5N1-Isolat infiziert wurden (GIESE et al., 2008; VAHLENKAMP et al., 2008).

Katzen können das Virus auch horizontal auf Kontaktkatzen übertragen. Im Infektionsversuch von KUIKEN und Mitarbeitern (2004) wurden zwei Katzen mit den intratracheal infizierten Katzen in einem gemeinsamen Käfig gehalten. Beide Katzen erkrankten und schieden Virus aus. Eine horizontale Übertragung wurde höchstwahrscheinlich auch unter natürlichen Bedingungen beobachtet. Im Sri-Racha-Tigerzoo wurde einige Tage nach Beginn des Ausbruchs die Futterquelle von rohem Geflügelfleisch auf gekochtes Geflügel oder Schweinefleisch umgestellt. Trotzdem erkrankten weitere Tiger, bis zwölf Tage später alle Tiger der betroffenen Abteilung des Zoos euthanasiert wurden, um eine weitere Ausbreitung zu verhindern. Proben anderer Tierarten des Zoos und des Bodens waren negativ für HPAIV (THANAWONGNUWECH et al., 2005). Ein direkter Kontakt von Katzen zu experimentell infizierten Hunde führte nicht zu einer Infektion der Katzen (GIESE et al., 2008).

Bislang ist kein Fall bekannt, in dem Katzen HPAIV H5N1 auf andere Tierarten oder auf den Menschen übertragen hätten. Von den Personen, die bei dem Ausbruch im Sri-Racha-Tigerzoo Kontakt mit infizierten Tigern hatten, entwickelten zwei Personen (2/58) Antikörper gegen H5N1-Virus, zeigten aber keine klinischen Symptome (THANAWONGNUWECH et al., 2005). Allerdings kann nicht sicher bestimmt werden, ob die Antikörperentwicklung auf Kontakt

mit den Tigern oder mit anderen Virusquellen, wie zum Beispiel rohem Geflügelfleisch, zurückzuführen ist. Hunde, die in direktem Kontakt zu experimentell infizierten Katzen gehalten wurden, zeigten weder klinische Symptome, noch konnten Virusausscheidung oder Antikörperbildung bei den Hunden festgestellt werden (GIESE et al., 2008).

3.2 Pathogenese

Aufgrund der geringen Zahl der beschriebenen Fälle ist bislang noch wenig zur Pathogenese der HPAIV-H5N1-Infektion der Katze bekannt. Vor allem die für den Verlauf der Erkrankung bestimmenden Faktoren sind bislang noch weitgehend ungeklärt.

3.2.1 Virusaufnahme

Die genaue Infektionsroute konnte bislang nicht vollständig geklärt werden. Dass eine Infektion über den Respirationstrakt möglich ist, zeigten experimentelle Infektionsversuche mit intratrachealer Inokulation (KUIKEN et al., 2004; RIMMELZWAAN et al., 2006). Das Verhalten von Katzen beim Fressen toter Vögel lässt sowohl Inhalation als auch Ingestion des Virus zu (YINGST et al., 2006). Im Infektionsversuch konnte nur bei intratracheal inokulierten Katzen H5N1-Virus in den Tracheobronchial-Lymphknoten nachgewiesen werden; Tracheobronchial-Lymphknoten der Katzen, die mit infizierten Küken gefütterten worden waren, waren nicht infiziert. Andererseits wiesen nur die mit infizierten Küken gefütterten Katzen, nicht aber die anderen Gruppen, eine H5N1-Virus-assoziierte Ganglioneuritis der Darmnervenplexus auf. Dies deutet darauf hin, dass diese Strukturen direkt vom Darmlumen aus infiziert worden waren (RIMMELZWAAN et al., 2006). Die minimale infektiöse Dosis lag bei oculonasopharyngealer experimenteller Infektion zwischen 10^2 und 10^4 50 % Ei-infektiöser Dosen (EID_{50}) (VAHLENKAMP et al., 2008).

3.2.2 Virusausbreitung

Das Virus breitet sich nach der Infektion vermutlich lokal auf den unteren Atemtrakt aus. Es befällt bei der Katze vor allem Typ-II-Pneumozyten und Alveolarmakrophagen (VAN RIEL et al., 2006) und kann dadurch zu einer schweren Pneumonie führen (KEAWCHAROEN et al., 2004; RIMMELZWAAN et al., 2006; SONGSERM et al., 2006b; KLOPFLEISCH et al., 2007b).

Im Gegensatz zu anderen Influenzaviren, die bei Säugetieren normalerweise auf den Respirationstrakt beschränkt bleiben, führt HPAIV H5N1 auch zu systemischen Infektionen (RIMMELZWAAN et al., 2006). Das Virus vermehrt sich bei der Katze in vielen extra-respiratorischen Geweben und verursacht dort Entzündung und Nekrose (RIMMELZWAAN et al., 2006; SONGSERM et al., 2006b; KLOPFLEISCH et al., 2007b).

Außerhalb des Atemtrakts wurde eine Virusvermehrung mittels Immunhistochemie vor allem in der Leber (Hepatozyten), im Gehirn (Neuronen, Gliazellen), im Herz (Myozyten, endokardiale Endothelzellen), in den Nebennieren (Kortexzellen, Phäochromozyten), in der Niere (Glomerulumzellen, Tubulusepithelzellen), in der Milz (mononukleäre Zellen der weißen Pulpa), in mesenterialen und pulmonalen Lymphknoten (mononukleäre Zellen), in den Peyerschen Platten (mononukleäre Zellen) und in den Ganglienzellen der Darmnervenplexus nachgewiesen. Kein Antigen konnte bislang nachgewiesen werden in Epithelzellen des Darms (THANAWONGNUWECH et al., 2005; RIMMELZWAAN et al., 2006; SONGSERM et al., 2006b; KLOPFLEISCH et al., 2007b).

RIMMELZWAAN und Mitarbeiter (2006) zeigten, dass die Virusausbreitung in extra-respiratorische Organe des Körpers auf zwei Arten erfolgen kann. Obwohl bislang kein Virus im Blut einer Katze nachgewiesen wurde, wird angenommen, dass HPAIV H5N1 sich meist über eine Virämie im Körper ausbreitet. Sie schlossen dies aus dem Verteilungsmuster des Virusantigens im Körper; die Verteilung in Glomerula, Leber und Nebennieren ähnelt derjenigen von hämatogenen bakteriellen Infektionen. Außerdem waren virusassoziierte Myokardläsionen am stärksten in den an die Ventrikel grenzenden Myokardbereichen, und Virusantigen wurde in Endothelzellen der Pulmonalvenen und des Endokards nachgewiesen (RIMMELZWAAN et al., 2006).

Eine zweite Möglichkeit der Virusausbreitung besteht vermutlich in direktem Übergang von HPAIV H5N1 aus dem Darmlumen in die Darmwand. Nur mit infizierten Küken gefütterte Katzen, nicht aber intratracheal inokulierte Katzen oder Kontaktkatzen, entwickelten eine virusassoziierte Ganglioneuritis des Meißner- und Auerbachplexus in der Darmwand (RIMMELZWAAN et al., 2006). Dieser Weg war bislang nie bei Influenzaviren nachgewiesen worden, von anderen Viren, zum Beispiel Herpes-simplex-Viren ist aber bekannt, dass sie an

Nervenfasern in die Darmnervenplexus wandern können (GESSER & KOO, 1996).

3.2.3 Virusausscheidung

Infizierte Katzen können das Virus über den Respirationstrakt, den Gastrointestinaltrakt und den Harntrakt ausscheiden, denn Virus konnte in Nasen- und Rachentupfern (RIMMELZWAAN et al., 2006; KLOPFLEISCH et al., 2007b), in Rektaltupfern (THANAWONGNUWECH et al., 2005; RIMMELZWAAN et al., 2006), Kotproben (YINGST et al., 2006) und im Urin (SONGSERM et al., 2006b) nachgewiesen werden. Bei asymptomatischen Katzen wurde HPAIV H5N1 bislang nur in Rachentupfern nachgewiesen (LESCHNIK et al., 2007; VAHLENKAMP et al., 2008).

Die Höhe der ausgeschiedenen Virusmenge ist anhängig von der Infektionsdosis. Bei Katzen, die experimentell mit 10^6 EID₅₀ infiziert worden waren und schwer erkrankten, wurden Virustiter von bis zu $10^{4,4}$ 50 % Kultur-infektioser Dosen (TCID₅₀)/ml im Rachentupfer nachgewiesen. Mit 10^4 EID₅₀ infizierte Katzen blieben asymptomatisch und schieden nur geringe Virusmengen aus, während bei Katzen, die mit 10^2 oder 1 EID₅₀ infiziert wurden, keine Virusausscheidung nachweisbar war (VAHLENKAMP et al., 2008).

Die Dauer der Virusausscheidung ist kurz. Bei einer experimentell infizierten Katze, bei der sich die Symptome ab dem fünften Tag *p. i.* besserten, wurde nur am vierten Tag *p. i.* Virus im Rachentupfer nachgewiesen, während der Virusnachweis am zweiten und am siebten Tag negativ verlief (VAHLENKAMP et al., 2008). Im Infektionsversuch begann die Ausscheidung bei intratracheal infizierten und mit infizierten Küken gefütterten Katzen im Allgemeinen am dritten Tag nach der Infektion und hielt bis zur Euthanasie der Katzen am siebten Tag an (RIMMELZWAAN et al., 2006). Einige Katzen schieden bereits vor dem Auftreten klinischer Symptome Virus aus (KUIKEN et al., 2006). Horizontal infizierte Katzen schieden erst ab Tag 5 nachweisbare Virusmengen aus (RIMMELZWAAN et al., 2006). Bei natürlich subklinisch infizierten Katzen konnte bei erneuter Probennahme nach zwei Wochen keine Virusausscheidung mehr festgestellt werden, so dass bei diesen Katzen die Ausscheidung offenbar kürzer als zwei Wochen dauert (LESCHNIK et al., 2007). Im Infektionsversuch wurde bei subklinisch infizierten Katzen Virusausscheidung bis Tag 7 nachgewiesen (VAHLENKAMP et al., 2008).

3.3 Klinik

Der folgende Abschnitt beschreibt Symptome und Verlauf bislang beobachteter H5N1-Infektionen bei Feliden.

3.3.1 Inkubationszeit

Die Inkubationszeit liegt zwischen einem und fünf Tagen. Bei experimentellen Versuchen entwickelten intratracheal inokulierte Katzen und mit infizierten Küken gefütterte Katzen nach einem Tag Fieber und nach zwei Tagen weitere Symptome (KUIKEN et al., 2004; RIMMELZWAAN et al., 2006). In Kontakt mit den infizierten Tieren gehaltene Katzen zeigten nach fünf Tagen klinische Symptome (RIMMELZWAAN et al., 2006). THANAWONGNUWECH und Mitarbeiter (2005) schätzten die Inkubationszeit bei den Tigern des Sri-Racha-Tigerzoos auf etwa drei Tage. Im Falle einer Katze, die bei der Aufnahme einer toten Taube beobachtet wurde, vergingen fünf Tage bis zum Auftreten klinischer Symptome (SONGSERM et al., 2006b).

3.3.2 Symptome

Die Schwere der klinischen Symptome ist anhängig von der Infektionsdosis. Experimentell mit hohen Dosen (10^6 EID₅₀) infizierte Katzen erkrankten schwer, während eine Inokulation von niedrigeren Dosen (10^4 EID₅₀) eine asymptomatische Infektion auslöste. Infektion mit sehr geringen Virusmengen (1 oder 10^2 EID₅₀) führte nicht zu einer Infektion der Katzen (VAHLENKAMP et al., 2008).

Sowohl erkrankte Großkatzen als auch Hauskatzen zeigten vor allem respiratorische Symptome (Dyspnoe, Maulatmung) und Fieber (KEAWCHAROEN et al., 2004; KUIKEN et al., 2004; THANAWONGNUWECH et al., 2005; SONGSERM et al., 2006b). Außerdem wurde sowohl bei Tigern als auch bei Hauskatzen von neurologischen Symptomen (Krämpfe, Ataxie) berichtet (THANAWONGNUWECH et al., 2005; SONGSERM et al., 2006b). Im Fall einer der auf Rügen gefundenen infizierten Katzen berichtete der Besitzer von sonderbarem Verhalten des Katers und Drehspuren am Boden des Fundorts. Ob diese auf neurologische Symptome zurückzuführen sind oder durch agonale Bewegungen verursacht wurden, ist allerdings unklar (VAHLENKAMP, 2006; WOLF et al., 2006). Viele der infizierten Tiger des Sri-Racha-Tigerzoos entwickelten blutigen Nasenausfluss

(THANAWONGNUWECH et al., 2005). KUIKEN und Mitarbeiter (2004) beobachteten bei experimentell infizierten Katzen Konjunktivitis und Vorfall des dritten Augenlids. Durchfall, ein Hauptsymptom bei infiziertem Geflügel (PERKINS & SWAYNE, 2001), und auch bei H5N1-Infektionen des Menschen beschrieben (APISARNTHANARAK et al., 2004; TRAN et al., 2004), wurde bei Katzen nicht beobachtet.

Die Infektion mit HPAIV H5N1 kann bereits zwei Tage nach Beginn der Symptome zum Tod führen (SONGSERM et al., 2006b). Allerdings sterben nicht alle der erkrankten Katzen. Ein in einem Zoo in Thailand erkrankter weißer Tiger (ENSERINK & KAISER, 2004; PROMED-MAIL, 2004b, 2004a) und experimentell infizierte Katzen (GIESE et al., 2008; VAHLENKAMP et al., 2008) erholten sich nach schwerem Krankheitsverlauf. Im Sri-Racha-Tigerzoo starben 45 der 124 erkrankten Tiere (36 %), die restlichen Tiger der entsprechenden Abteilung des Zoos wurden aufgrund neurologischer Symptome und zur Verhinderung einer weiteren Ausbreitung euthanasiert (THANAWONGNUWECH et al., 2005). Von acht experimentell infizierten Katzen starb ein Tier sechs Tage nach der Infektion; da die anderen Katzen am siebten Tag euthanasiert wurden, ist nicht bekannt, ob sie gestorben wären oder überlebt hätten (RIMMELZWAAN et al., 2006).

Eine Infektion mit HPAIV H5N1 muss nicht immer zu einer Erkrankung führen. Subklinische Infektionen sind ebenfalls beschrieben (LESCHNIK et al., 2007; VAHLENKAMP et al., 2008). In einem Tierheim in Graz, Österreich, wurde ein mit HPAIV H5N1 infizierter Schwan eingeliefert, dieser starb innerhalb von 24 Stunden. Dreizehn andere Vögel, die mit dem Schwan zusammen gehalten worden waren, wurden ebenfalls positiv für H5N1 getestet. Daraufhin wurde ein Teil der Katzenpopulation des Tierheims routinemäßig mittels PCR aus Rachentupfern auf HPAIV H5N1 getestet. Drei von 40 getesteten Tieren schieden Virus aus, und zwei Katzen entwickelten Antikörper gegen H5N1. Bei einer erneuten Untersuchung nach zwei Wochen schied keine der getesteten Katzen mehr Virus aus. Keine der Katzen des Tierheims zeigte Symptome, die verdächtig für Influenza waren (LESCHNIK et al., 2007). Im Infektionsversuch konnten subklinische Infektionen durch Inokulation mit einer geringeren Virusmenge (10^4 EID₅₀) ausgelöst werden. Die Tiere schieden Virus im Rachentupfer aus und entwickelten Antikörper, zeigten aber keine Symptome (VAHLENKAMP et al., 2008).

Eventuelle weitere Hinweise auf subklinische Infektionen ergeben sich aus unveröffentlichten Studien in Thailand und Indonesien. In einer Untersuchung des National Institute of Animal Health in Bangkok, Thailand, wiesen acht von 111 Katzen (7,2 %) Antikörper gegen H5N1 auf (BUTLER, 2006). In einer weiteren Untersuchung wurden in Indonesien 500 streunende Katzen auf Antikörper gegen H5N1 getestet. Ein Fünftel der Tiere (20 %) besaß Antikörper gegen H5N1 (MACKENZIE, 2007; PROMED-MAIL, 2007).

3.3.3 Laborwertveränderungen

Über Laborwertveränderungen nach Infektion mit HPAIV H5N1 gibt es bislang nur wenige Angaben. Bei Tigern des Sri-Racha-Tigerzoos wurden eine ausgeprägte Leukopenie und Thrombozytopenie, sowie erhöhte Aktivitäten der Leberenzyme Alanin-Aminotransferase (ALT) und Aspartat-Aminotransferase (AST) nachgewiesen (THANAWONGNUWECH et al., 2005). Bei den drei auf Rügen tot aufgefundenen Katzen wurde eine labordiagnostische Analyse des Augen-Kammerwassers vorgenommen. Alle drei Katzen wiesen stark erhöhte Aktivitäten der ALT, AST und der Laktatdehydrogenase (LDH) auf (KLOPFLEISCH et al., 2007b).

3.4 Pathologie

Die auffälligsten makroskopischen Befunde finden sich im Bereich des Atmungstrakts. Die Lunge von Großkatzen und Hauskatzen wies eine hochgradige Pneumonie auf mit multiplen dunkelroten erhabenen verfestigten Herden, einer starken Stauungshyperämie und diffusen Lungenblutungen sowie Konsolidierung des Lungengewebes (KEAWCHAROEN et al., 2004; THANAWONGNUWECH et al., 2005; RIMMELZWAAN et al., 2006; SONGSERM et al., 2006b; KLOPFLEISCH et al., 2007b). Des Weiteren bestand ein alveoläres Lungenödem mit serosanguinösem Exsudat in Bronchien und Trachea (KEAWCHAROEN et al., 2004; THANAWONGNUWECH et al., 2005; RIMMELZWAAN et al., 2006; SONGSERM et al., 2006b; KLOPFLEISCH et al., 2007b). Außerdem wurde das Vorliegen von Pleuralerguss beschrieben (THANAWONGNUWECH et al., 2005; KLOPFLEISCH et al., 2007b). Histopathologisch fand sich eine multifokale bronchio-interstitielle Pneumonie, die durch Entzündungs- und Nekroseherde mit Zerstörung und Verlust des bronchialen und alveolären Epithels und Füllung der Alveolen mit

Alveolarmakrophagen, neutrophilen Granulozyten, Erythrozyten, Fibrin und Zelldetritus gekennzeichnet war (KEAWCHAROEN et al., 2004; THANAWONGNUWECH et al., 2005; RIMMELZWAAN et al., 2006; SONGSERM et al., 2006b; KLOPFLEISCH et al., 2007b). Zum Teil waren die Alveolarwände auch durch Hyperplasie des Epithels verdickt (KEAWCHAROEN et al., 2004; RIMMELZWAAN et al., 2006).

Als weitere makroskopische Befunde fanden sich petechiale Blutungen in vielen Organen (KEAWCHAROEN et al., 2004; RIMMELZWAAN et al., 2006; SONGSERM et al., 2006b; KLOPFLEISCH et al., 2007b) sowie eine hämorrhagische Pankreatitis (YINGST et al., 2006). In der Leber wurden stecknadelkopfgroße beige-graue Herde beschrieben (KLOPFLEISCH et al., 2007b), die auf multifokale nekrotisierende Hepatitis mit Hepatozytennekrose, Infiltration mit Makrophagen und neutrophilen Granulozyten, lymphozytärer Demarkation und Hämorrhagie zurückzuführen waren (RIMMELZWAAN et al., 2006; SONGSERM et al., 2006b; KLOPFLEISCH et al., 2007b). Bei einer experimentell infizierten Katze wurde ein generalisierter Ikterus beschrieben (RIMMELZWAAN et al., 2006).

RIMMELZWAAN und Mitarbeiter (2006) konnten Vergrößerung von Tonsillen, mandibulären und retropharyngealen Lymphknoten sowie petechiale Blutungen in diesen Organen und in der Leber nur bei der Gruppe nachweisen, die mit infizierten Küken gefüttert worden waren. Bei intratracheal infizierten Katzen und Kontaktkatzen traten diese Veränderungen nicht auf.

Des Weiteren wurden Stauungen in Milz (KLOPFLEISCH et al., 2007b), Niere und Gehirn (SONGSERM et al., 2006b) beschrieben. Histologisch wurde im Gehirn sowohl bei Großkatzen als auch bei Hauskatzen eine Meningoenzephalitis beschrieben. Sie war gekennzeichnet durch multiple Nekrose- und Entzündungsherde mit Infiltration von Neutrophilen, Makrophagen und Gliazellen, neuronaler Nekrose sowie Vaskulitis mit perivaskulären mononukleären Infiltraten (KEAWCHAROEN et al., 2004; THANAWONGNUWECH et al., 2005; RIMMELZWAAN et al., 2006; SONGSERM et al., 2006b).

An der Niere wurde eine Tubulonephritis und Tubulusepithelnekrose beschrieben, sowie das Vorliegen von Proteinexsudat in der Bowman'schen Kapsel der Glomerula (RIMMELZWAAN et al., 2006; SONGSERM et al., 2006b). Am Myokard waren besonders im Bereich, der an die Ventrikel angrenzt, multiple

Herde mit Myozytennekrose und Ansammlung mononukleärer Zellen zu erkennen (RIMMELZWAAN et al., 2006). Auch die Nebennieren wiesen multiple Entzündungs- und Nekroseherde auf, wobei kortikale Zellen stärker betroffen waren als das Nebennierenmark (RIMMELZWAAN et al., 2006; KLOPFLEISCH et al., 2007b). In Milz und Peyerschen Platten des Dünndarms war eine Nekrose der Lymphozyten zu erkennen (SONGSERM et al., 2006b; KLOPFLEISCH et al., 2007b). RIMMELZWAAN und Mitarbeiter (2006) wiesen bei Katzen, die mit infizierten Küken gefüttert worden waren, multifokale bis diffuse entzündliche und nekrotische Veränderungen in den Nervenplexus des Dünndarms nach, die durch Verlust und Nekrose der Ganglienzellen und Infiltration mit neutrophilen Granulozyten und mononukleären Zellen charakterisiert waren.

Alle genannten Veränderungen – außer der hämorrhagischen Pankreatitis – stimmten mit immunhistochemischem Antigennachweis in den entsprechenden Geweben überein, so dass die Ursache der Läsionen auf Infektion mit HPAIV H5N1 zurückgeführt werden konnte. Bei den Katzen, bei denen eine Pankreatitis beschrieben worden war, wurde keine Immunhistochemie durchgeführt. Es wurde aber H5N1-Virus mittels PCR im Pankreas nachgewiesen (YINGST et al., 2006).

3.5 Diagnose

Die Klinik und das pathologische Bild ergeben bei der Katze keine pathognomonischen Hinweise auf aviäre Influenza. Ein Verdacht auf das Vorliegen einer Infektion mit HPAIV H5N1 sollte gestellt werden bei Vorliegen der beschriebenen Symptome, vor allem respiratorischen Symptomen und Fieber, wenn die Katze Freigang hat – insbesondere in einer Gegend, in der Fälle hochpathogener aviärer Influenza H5N1 bei Geflügel oder Wildvögeln aufgetreten sind (YINGST et al., 2006; THIRY et al., 2007).

3.5.1 Probenentnahme

Der Virusnachweis kann aus Abstrichtupfern von Rachen, Nase, Trachea oder Rektum erfolgen (THANAWONGNUWECH et al., 2005; RIMMELZWAAN et al., 2006; KLOPFLEISCH et al., 2007b; LESCHNIK et al., 2007). Vor allem eine oropharyngeale Tupferprobe ist *in vivo* gut zur Diagnose einer Infektion mit HPAIV H5N1 geeignet, obwohl bei Katzen vorrangig der untere Respirationstrakt betroffen ist (KLOPFLEISCH et al., 2007b).

Des Weiteren konnte HPAIV H5N1 in Kotproben, im Urin und in Pleuralerguss nachgewiesen werden (SONGSERM et al., 2006b; YINGST et al., 2006). Post mortem ist auch der Nachweis an Organhomogenaten gut zur Diagnose geeignet (RIMMELZWAAN et al., 2006; SONGSERM et al., 2006b).

3.5.2 Diagnostische Verfahren

Folgende diagnostischen Verfahren wurden bislang zum Nachweis von H5N1-Infektionen bei Katzen angewendet.

3.5.2.1 Direkter Erregernachweis

Der direkte Virusnachweis kann mittels Virusisolation im embryonierten Hühnerei (KEAWCHAROEN et al., 2004; AMONSIN et al., 2006b; SONGSERM et al., 2006b) oder in Zellkultur (RIMMELZWAAN et al., 2006) erfolgen, mit nachfolgender Identifizierung des Virus mittels RT-PCR (KEAWCHAROEN et al., 2004; AMONSIN et al., 2006b) oder Hämagglutinations(hemmungs)test (HA(H)-Test) (SONGSERM et al., 2006b). Virus-RNA kann auch direkt mittels RT-PCR aus Abstrichupferproben oder Organhomogenaten nachgewiesen werden (YINGST et al., 2006; KLOPFLEISCH et al., 2007b; LESCHNIK et al., 2007; GIESE et al., 2008).

Virusantigen wird zum Nachweis einer Virusreplikation im Gewebe mittels Immunhistochemie an betroffenen Organen dargestellt. Dazu werden sowohl monoklonale Antikörper gegen NP von Influenza-A-Viren (KEAWCHAROEN et al., 2004; THANAWONGNUWECH et al., 2005; RIMMELZWAAN et al., 2006) als auch polyklonales Anti-H5N1-Ziegen Serum (SONGSERM et al., 2006b) und Anti-Influenza-NP-Kaninchenserum verwendet (KLOPFLEISCH et al., 2007b; VAHLENKAMP et al., 2008).

3.5.2.2 Indirekter Erregernachweis

Antikörper gegen H5N1-Virus im Serum können mittels HAH-Test nachgewiesen werden (KARACA et al., 2005; LESCHNIK et al., 2007; GIESE et al., 2008). Auch mittels kompetitiven Enzyme-Linked Immunosorbent Assays (ELISA) können Antikörper (gegen Influenza-A-NP) nachgewiesen werden (VAHLENKAMP et al., 2008). Zum Nachweis H5N1-spezifischer neutralisierender Antikörper ist der Virusneutralisationstest geeignet (VAHLENKAMP et al., 2008).

In nur wenigen Studien wurde bislang der Verlauf der Antikörperbildung bei H5N1-Infektionen bei Katzen untersucht. Zwei natürlich subklinisch infizierte Katzen entwickelten hämagglutinierende Antikörper gegen H5N1 mit einem Titer zwischen 1:64 (ungefähr 22. Tag *p. i.*) und 1:256 (ungefähr 50. Tag *p. i.*) (LESCHNIK et al., 2007). In einem experimentellen Versuch wies eine Katze, die mit einer hohen Dosis eines Katzen-H5N1-Isolats infiziert worden war, am 14. Tag *p. i.* einen hämagglutinierenden Antikörpertiter von 1:64 und am 21. Tag *p. i.* von 1:512 auf. Eine mit niedrigerer Dosis infizierte Katze (asymptomatisch) entwickelte einen Titer von 1:128 am 14. Tag und 1:1024 am 21. Tag, während bei einer andere Katze (ebenfalls asymptomatisch) erst am 21. Tag Antikörper nachgewiesen wurden (1:64) (VAHLENKAMP et al., 2008). Fünf Katzen, die mit einem inaktivierten aviären H5N6-Virus geimpft wurden, entwickelten zunächst niedrige H5N1-spezifische hämagglutinierende Antikörpertiter (bis 1:8 bzw. 1:32 am 14. Tag bzw. 28. Tag nach der zweiten Impfung). Nach Challenge-Infektion mit einem Katzen-H5N1-Isolat stiegen die Antikörper auf 1:32 bis 1:128 am Tag 21 *p. i.* an. Die Katzen wiesen ebenfalls einen H5N1-spezifischen neutralisierenden Antikörpertiter von 1:160 bis 1:640 (Tag 21 *p. i.*) auf (VAHLENKAMP et al., 2008). Da die Tiere in beiden Studien zur weiteren Diagnostik euthanasiert wurden, kann bislang nichts zum langfristigen Verlauf gesagt werden.

3.6 Therapie

Bislang gibt es nur sehr wenige Angaben zu Therapieversuchen bei hochpathogener aviärer Influenza bei Katzen. Während des Ausbruchs im Sri-Racha-Tigerzoo wurde allen Tigern der betroffenen Abteilung des Zoos – sowohl kranken als auch gesunden – ab dem zehnten Tag zur Behandlung und Prophylaxe Oseltamivir verabreicht (THANAWONGNUWECH et al., 2005; AMONSIN et al., 2006b). Oseltamivir, ein Medikament aus der Gruppe der NA-Inhibitoren, hemmt die NA-Aktivität durch Bindung an die NA gebildeter Viruspartikel und verhindert so deren effektive Freisetzung aus der Wirtszelle (MOSCONA, 2005). Die Dosierung von 2 x täglich 75 mg/kg *per os* entsprach der für die Behandlung von H5N1-Infektionen des Menschen empfohlenen Dosis (SCHUNEMANN et al., 2007).

Obwohl *in vitro* und bei Experimenten mit Mäusen und Frettchen eine Wirksamkeit von Oseltamivir gegen H5N1-Viren nachgewiesen ist (YEN et al.,

2005; GOVORKOVA et al., 2007; HURT et al., 2007), blieb die Behandlung der Tiger erfolglos. Als mögliche Ursachen für das Versagen der Therapie wurden verschiedene Faktoren in Betracht gezogen, wie falsche Dosierung, falsche Verabreichungszeit und -dauer, Abweichungen in Pharmakokinetik und Verstoffwechslung der Substanz bei Katzen (THANAWONGNUWECH et al., 2005; AMONSIN et al., 2006b). Hinweise auf eine Resistenzbildung gegenüber NA-Hemmern konnten nicht gefunden werden (AMONSIN et al., 2006b). In experimentellen Behandlungsversuchen bei Mäusen und Frettchen wurde gezeigt, dass die Dosis, der Zeitpunkt der ersten Verabreichung und die Dauer der Therapie mit Oseltamivir einen signifikanten Einfluss auf die Wirksamkeit des NA-Hemmers haben (YEN et al., 2005; GOVORKOVA et al., 2007).

3.7 Prophylaxe

Bislang gibt es keinen zugelassenen Impfstoff gegen HPAIV H5N1 für Katzen. In zwei Studien wurden mögliche Vektorimpfstoffe für Katzen getestet.

KARACA und Mitarbeiter (2005) impften zehn Katzen mit Hühnerpockenviren, die das HA-Gen eines aviären H5N8-Virus (A/Turkey/Ireland/1378/83) exprimierten. Nach spätestens 14 Tagen konnten im HAH-Test bei allen Katzen Antikörper gegen das homologe H5N8-Virus nachgewiesen werden. Nach einer zweiten Injektion am Tag 29 kam es zu einem signifikanten Anstieg der Antikörpertiter. Die Antikörper zeigten auch eine Kreuzreaktion mit heterologem H5-Antigen eines H5N1-Virusisolats (A/Chicken/Indonesia/7/03). Diese trat allerdings erst nach der zweiten Impfung auf und fiel weniger stark aus. Der Unterschied in der Titerhöhe wurde auf unterschiedliche Aminosäuresequenzen der beiden HA1-Moleküle zurückgeführt (KARACA et al., 2005).

In einer chinesischen Studie wurde eine Katze mit einem caninen Adenovirus-2 geimpft, welches das HA-Gen eines H5N1-Tiger-Isolats exprimierte. Die Katze entwickelte einen niedrigen Anti-H5N1-Antikörpertiter (GAO et al., 2006).

In einer anderen Studie waren Katzen nach Impfung mit einem heterologen inaktivierten H5N6-Impfstoff effektiv gegen eine Infektion mit hohen Dosen HPAIVs H5N1 geschützt. Die Tiere wurden zweimalig im Abstand von vier Wochen mit der Vollvirus-Vakzine geimpft. Bei einem Challenge-Versuch vier Wochen nach der zweiten Impfung zeigte keine der fünf geimpften Katzen klinische Symptome während alle ungeimpften Kontrollkatzen erkrankten und starben. Nur zwei der fünf geimpften Katzen schieden Virus aus; bei einer Katze

konnte in der anschließenden pathohistologischen Untersuchung keinerlei Virus in den untersuchten Organen nachgewiesen werden. Alle geimpften Katzen entwickelten H5N1-neutralisierende Antikörper (VAHLENKAMP et al., 2008).

Da alle bisherigen Fälle von Infektionen bei Katzen in Zusammenhang mit dem Auftreten hochpathogener aviärer Influenza bei Vögeln in der Umgebung standen, stellt die Vermeidung von Kontakt zwischen Katzen und infizierten Vögeln oder ihren Ausscheidungen sowie der Verzicht auf Verfütterung von rohem Geflügelfleisch eine wichtige Maßnahme zur Vorbeugung vor Infektionen von Katzen mit HPAIV H5N1 dar (THIRY et al., 2007). Die Europäische Union empfiehlt daher, Katzen in Gegenden mit Vorkommen von H5N1-Fällen bei Geflügel oder Wildvögeln im Haus zu halten (ANONYMUS, 2006). In Deutschland schreibt die Wildvogel-Geflügelpestschutzverordnung vor, dass Katzen in einem Sperrbezirk von drei Kilometern Radius um den Fundort eines infizierten Vogels für die Dauer von 21 Tagen nicht frei herumlaufen dürfen (§ 5 Absatz 3 Wildvogel-Geflügelpestschutzverordnung¹).

Beim Verdacht des Vorliegens einer H5N1-Infektion müssen entsprechende Vorsichtsmaßnahmen getroffen werden, um eine eventuelle Ausbreitung des Virus zu verhindern (THIRY et al., 2007). Im Gegensatz zu gesetzlichen Vorgaben bei betroffenem Geflügel (§§ 3, 7 und 9 Nutzgeflügel-Geflügelpestschutzverordnung²), gibt es keine Vorgaben, wie mit verdächtigen oder infizierten Katzen umgegangen werden muss. Die betreffende Katze sollte isoliert werden und der Kontakt auf das notwendige Minimum beschränkt werden. Kontaktpersonen müssen Schutzkleidung tragen, und gegebenenfalls sollte die Katze zur Probennahme sediert werden (ADVISORY BOARD ON CAT DISEASES, 2006). Influenza-A-Viren werden durch Desinfektion mit handelsüblichen Desinfektionsmitteln wie organischen und anorganischen Säuren, Aldehyden, Phenolen, Chlor- und Iodverbindungen, Wasserstoffperoxid oder

¹ Verordnung über Schutzmaßnahmen beim Auftreten der Geflügelpest bei einem wildlebenden Vogel (Wildvogel-Geflügelpestschutzverordnung) vom 8. September 2006 (eBAnz. 2006, AT 48 V1), geändert durch Artikel 2 und 3 der Verordnung vom 24. November 2006 (BGBl. 2006, I Nr. 54 S. 2663).

² Verordnung über Schutzmaßnahmen beim Auftreten von Geflügelpest bei Nutzgeflügel (Nutzgeflügel-Geflügelpestschutzverordnung) vom 10. August 2006 (eBAnz. 2006, AT 41 V1), geändert durch Artikel 1 der Verordnung vom 24. November 2006 (BGBl. 2006, I Nr. 54 S. 2663).

alkoholischen Desinfektionsmitteln zuverlässig abgetötet (DE BENEDICTIS et al., 2007).

III Kapitel 1: Prevalence of influenza A H5N1 virus in cats from areas with occurrence of highly pathogenic avian influenza in birds

Julia Marschall¹

Bianka Schulz, Dr. med. vet., Dipl. ECVIM-CA¹

Timm Harder, Priv.-Doz., Dr. med. vet., PhD²

Thomas W. Vahlenkamp, Priv.-Doz., Dr. med. vet., PhD³

Janine Huebner, Dr. med. vet.⁴

Elke Huisinga, Dr. med. vet.⁵

Katrin Hartmann, Prof., Dr. med. vet., Dr. med. vet. habil., Dipl. ECVIM-CA¹

¹ Medizinische Kleintierklinik, Ludwig-Maximilians-Universität München, Veterinärstrasse 13, 80539 München, Deutschland

² O.I.E. und Nationales Referenzlabor für Aviäre Influenza, Friedrich-Loeffler-Institut, Boddenblick 5a, 17489 Greifswald – Insel Riems, Deutschland

³ Institut für Molekularbiologie, Friedrich-Loeffler-Institut, Boddenblick 5a, 17489 Greifswald – Insel Riems, Deutschland

⁴ Laboklin GmbH & Co. KG, Steubenstrasse 4, 97688 Bad Kissingen, Deutschland

⁵ Vet Med Labor GmbH, Mörikestrasse 28/3, 71636 Ludwigsburg, Deutschland

Journal of Feline Medicine and Surgery 2008; 10: 355-8.



Prevalence of influenza A H5N1 virus in cats from areas with occurrence of highly pathogenic avian influenza in birds

Julia Marschall¹, Bianka Schulz¹ Dr Med Vet, Dipl ECVIM-CA¹,
Timm C Harder Priv-Doz Dr Med Vet, PhD²,
Thomas W Vahlenkamp Priv-Doz Dr Med Vet, PhD³,
Janine Huebner Dr Med Vet⁴, **Elke Huisinga** Dr Med Vet⁵,
Katrin Hartmann Dr Med Vet, Dr Habil, Dipl ECVIM-CA, Prof^{1*}

¹*Clinic of Small Animal Medicine, Ludwig Maximilian University, Veterinärstrasse 13, 80539 Munich, Germany*

²*Office International des Epizooties and National Reference Laboratory for Avian Influenza, Friedrich-Loeffler-Institute, Greifswald-Insel Riems, Germany*

³*Institute of Molecular Biology, Friedrich-Loeffler-Institute, Greifswald-Insel Riems, Germany*

⁴*Laboklin GmbH & Co KG, Bad Kissingen, Germany*

⁵*Vet Med Laboratory GmbH, Ludwigsburg, Germany*

Natural and experimental infections have shown that cats are susceptible to highly pathogenic avian influenza A virus subtype H5N1 (HPAIV H5N1). Cats can be severely affected and die from the disease, but subclinical infections have also been reported. To learn more about the role of cats in the spread of the virus and about the risk posed to cats, the prevalence of H5N1 virus was examined in 171 cats from areas in Germany and Austria in which birds infected with HPAIV H5N1 had been found. Pharyngeal swabs were examined for H5N1 virus using real-time polymerase chain reaction, and serum samples were tested for antibodies to influenza virus. None of the cats showed evidence of infection with H5N1 virus. Prevalence of H5N1 virus was determined to be <1.8% (95% confidence interval (CI): 0.000000–0.017366); prevalence of antibodies was <2.6% (95% CI: 0.000000–0.025068).

Date accepted: 13 March 2008

© 2008 ESFM and AAEP. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

Since its first appearance in 1996 (Xu et al 1999, Li et al 2004), highly pathogenic avian influenza virus of the subtype H5N1 (HPAIV H5N1) has spread nearly worldwide resulting in high mortality in poultry (World Health Organization 2007). Its ability to cross the species barrier without prior adaptation and to infect many mammal species including humans, has raised concerns about a new influenza pandemic (Subbarao et al 1998, Vahlenkamp and Harder 2006).

Among mammalian species, especially cats proved to be susceptible to natural and experimental infections with HPAIV H5N1

(Kuiken et al 2004, Songserm et al 2006). Large felids as well as domestic cats can be severely affected and die from the disease. Acute respiratory signs caused by severe pulmonary changes (interstitial pneumonia, diffuse alveolar damage, haemorrhage, and oedema) and pleural effusion are among the main features (Thanawongnuwech et al 2005, Rimmelzwaan et al 2006). Affected cats can also show pyrexia, depression, serosanguinous nasal discharge, conjunctivitis, protrusion of the nictitating membrane, and neurological signs (Thiry et al 2007). Subclinical infections, however, have also been reported (Leschnik et al 2007).

All natural infections described in cats so far, have been spatially and temporally associated with the occurrence of HPAIV H5N1 infections in poultry or wild birds in the surrounding area

*Corresponding author. Tel: +49-89-2180-2651. E-mail: hartmann@uni-muenchen.de

(Keawcharoen et al 2004, Klopffleisch et al 2007, Leschnik et al 2007). Cats cannot only be infected by direct or indirect contact with infected birds (Songserm et al 2006, Leschnik et al 2007); the virus can also be transmitted horizontally from cat to cat (Kuiken et al 2004, Thanawongnuwech et al 2005). Experts, therefore, think that cats might play a role in the epidemiology of HPAIV H5N1 (Kuiken et al 2004, 2006, Songserm et al 2006).

It is unknown, how high the actual risk is for pet cats to become infected in areas with highly pathogenic avian influenza in birds. It is also unknown if cats play a role in the spread of the virus. The aim of this study, therefore, was to determine the prevalence of H5N1 virus and antibodies in cats with access to outdoors in areas with occurrence of highly pathogenic avian influenza in birds.

Materials and methods

A total number of 171 cats were included in this prospective study. Inclusion criterion to enter the study was regular and current outdoor access. Additionally, cats had to meet at least one of the following criteria. Cats included either lived in a restriction zone, which is defined as an area within a 10 km radius around the location of a detected outbreak of avian influenza in birds, or they showed signs of acute respiratory disease in an area close to a restriction zone. Samples were taken between March and June 2006, in August and September 2006, and in July and August 2007. During these periods, cases of HPAIV H5N1 were observed in wild birds in Germany. Samples of cats from restriction zones were taken during the time of official declaration of the respective area as 'protection zone' or 'surveillance zone'. Cats with respiratory signs also came from areas relatively close to areas with prior or future outbreaks of avian influenza in birds (less than 100 km).

One hundred and thirty-two cats lived in restricted zones in Germany (131/132) and Austria (1/132), 28 cats were presented to a veterinarian because of acute respiratory signs, and 11 cats met both criteria. All cats underwent routine physical examination including auscultation of the chest. In 94 animals, complete blood count and serum biochemistry profiles were performed.

A real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction (RRT-PCR) for H5N1 virus detection was performed in all cats from pharyngeal swabs. Either dry rayon swabs were used (Copan innovation, Brescia, Italy) (36/171 animals)

or swabs were placed into virus transport medium containing antibiotics (Virocult, Medical Wire and Equipment, Corsham, UK) (135/171 cats). Swabs were stored at -70°C prior to further examination.

RNA was extracted with RNeasy Mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's protocol in 154 cats. In 17 cats, a modified protocol of QIAamp DNA blood mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) was used.

Three different RRT-PCR assays were used. Samples of 158 cats were examined using an RRT-PCR for the detection of influenza A matrix gene. Out of those, 141 samples were examined according to the method described by Spackman et al (2002) that was modified by inclusion of an internal control (Hoffmann et al 2006). In the other 17 cats, the commercially available kit 'Light Mix for the detection of Influenza Virus A M2' (TIB-Molbiol, Berlin, Germany) was used. H5- and N1-specific RRT-PCRs would have followed in positive samples for subtype confirmation. RRT-PCRs using primers for influenza A matrix gene and haemagglutinin gene (H5) were conducted in 13 cats with TaqMan Influenza A/H5 Detection Kit v1.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) according to the manufacturer's protocol.

Plasma samples were obtained from 118 cats and were stored at -20°C . They were tested for antibodies to avian influenza viruses of the subtypes H5 and H7 (H5N1, H5N2, H7N1, and H7N7) using a haemagglutination inhibition test according to the procedures of the World Organization for Animal Health (Alexander 2004).

Statistical analysis was performed using an exact binomial test for determination of exact confidence intervals (CIs) (Clopper and Pearson 1934). The exact binomial test was one-tailed and was used to prove the alternative hypotheses that the prevalence of H5N1 virus and the prevalence of antibodies are within the 95% CI. A significance level of <0.05 was chosen.

Results

Samples from all cats were negative for influenza A H5 virus-specific nucleic acid by RRT-PCR. Likewise, all serum samples obtained were negative for antibodies to the tested influenza virus subtypes. On the basis of these data, prevalence of H5N1 virus was determined between 0 and 1.8% (95% CI: 0.000000–0.017366). Prevalence of antibodies to H5N1 virus was between 0 and 2.6% (95% CI: 0.000000–0.025068).

Discussion

In this study, no evidence of infection with avian influenza virus H5N1 in cats was found. No symptomatic infections were detected; no antibodies to subclinical or past infections were present.

A limitation of the study is the relatively small number of animals. Nevertheless, it is important to publish these data, as very little is known about the epidemiological role of cats in avian influenza so far. When the first cases of avian influenza occurred in Germany, there was great uncertainty among cat owners and veterinarians, especially when the virus was detected in cats on the Isle of Rügen. Rectal swabs could have been examined instead of pharyngeal swabs, as it is now known that infected cats may excrete virus in their faeces (Rimmelzwaan et al 2006). In subclinically infected cats, however, virus has only been detected in pharyngeal swabs (Leschnik et al 2007). Despite the limited data, this study is able to show that in epidemiological situations, as they occurred in Germany and Austria, the risk of cats contracting influenza A H5N1 is low. In the cats examined in this study, the prevalence of H5N1 virus (171/171 cats negative) and antibodies (118/118 cats negative) was 0%. Hence, it can be concluded that, with a probability of 95%, the prevalence of H5N1 virus in cats in Germany and Austria is less than 1.8% and prevalence of antibodies less than 2.6%.

The majority of the samples (157/171) were collected in Bavaria, South-Eastern Germany. Bavaria was the German state exhibiting the largest number of birds (poultry and wild birds) that had died from HPAIV H5N1 infection. Until the time of writing, 92 infected wild birds have been found and two poultry farms have been affected. Sixty-two (62/171) samples were collected in the rural district of Landsberg am Lech, Bavaria, Germany. In this district, five dead wild aquatic birds had confirmed infections of HPAIV H5N1 between February and May 2006. Thirty-six (36/171) samples derived from an area around a lake north of Munich, Bavaria, Germany, where three dead diving ducks were found infected with HPAIV H5N1 in August 2007. Samples of 34 cats were collected in Nuremberg, Bavaria, Germany, where in June and July 2007 HPAIV H5N1 was found in 16 wild aquatic birds. According to EU legislation (Council of the European Union 2006), protection zones with a radius of 3 km were established for 21 days and surveillance zones with a 10 km radius were established

for 30 days around the places of discovery of the birds. Within these zones, cats were supposed to be kept indoors. All cats included in this study, however, were still allowed to roam outside despite this recommendation and thus certainly belonged to a high-risk group.

The fact that no evidence of subclinical or past infections was found in the cats included in this study is in contrast to the indication that in Asia a high percentage of cats may carry antibodies to H5N1 virus (Butler 2006, Mackenzie 2007). As the results of these Asian studies have not yet been scientifically evaluated, and there is no reference to the applied methods, it must be considered that the numbers are falsely high. On the other hand, experts think that the numbers could be even higher, as cats that were ill or had died had not been included (Mackenzie 2007). The virus strains circulating in Asia could possibly have a higher pathogenicity in cats than the European lineage. However, mainly isolates of the European–Middle Eastern–African (EMA) lineage, which circulates in Europe, show a mutation associated with high pathogenicity in mammals (Salzberg et al 2007), and EMA-type viruses were also responsible for fatal infections in previously healthy cats (Yingst et al 2006, Klopfleisch et al 2007). For a definite answer, however, experimental studies would be necessary. The difference may also be due to lower risk of exposure to the virus and lower infection pressure in Europe. Contrary to the situation in Asia, in Europe only single wild birds and just four poultry farms were affected. Cats included in this study were pet cats, which were fed by their owners and thus did not rely on hunting birds. A serological study in cats from Milan, Italy, also did not find any evidence of antibodies to influenza A viruses – neither to subtype H5N1 nor to other subtypes (Paltrinieri et al 2007). However, no outbreaks of avian influenza had occurred in this sampling area in Italy and thus, the likelihood of finding cats with antibodies there was extremely low.

Cats, at least in Europe, do not seem to play a major role in the transmission of the virus. This circumstance may change, however, as the virus can rapidly acquire new properties by genetic mutation and reassortment (Webster et al 1992).

This study may contribute to show cat owners and veterinarians that – in anticipation of further outbreaks of highly pathogenic avian influenza H5N1 virus – there is no reason to believe that cats pose a major risk to humans.

Acknowledgements

We thank all persons involved in the sample collection for their support and Monia Mahling and Prof Dr Helmut Küchenhoff from the Institute of Statistics, University of Munich, for statistical analysis.

References

- Alexander DJ (2004) Avian influenza. In: OIE International Committee (ed), *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (Mammals, Birds and Bees)* (5th edn). Paris: Office International des Epizooties. Available at: <http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A_00037.htm>.
- Butler D (2006) Thai dogs carry bird-flu virus, but will they spread it? *Nature* **439**, 773.
- Clopper CJ, Pearson ES (1934) The use of confidence or fiducial limits illustrated in the case of the binomial. *Biometrika* **26**, 404–413.
- Council of the European Union. (2006) Council directive 2005/94/EC of 20 December 2005 on community measures for the control of avian influenza and repealing directive 92/40/EEC. *Official Journal of the European Union* **L 10**, 16–65 (14.1.2006).
- Hoffmann B, Depner K, Schirmer H, Beer M (2006) A universal heterologous internal control system for duplex real-time RT-PCR assays used in a detection system for pestiviruses. *Journal of Virological Methods* **136**, 200–209.
- Keawcharoen J, Oraveerakul K, Kuiken T, Fouchier RA, Amonsin A, Payungporn S, Noppornpanth S, Wattanodorn S, Theambooniers A, Tantilertcharoen R, Pattanarangsarn R, Arya N, Ratanakorn P, Osterhaus AD, Poovorawan Y (2004) Avian influenza H5N1 in tigers and leopards. *Emerging Infectious Diseases* **10**, 2189–2191.
- Klopfleisch R, Wolf PU, Uhl W, Gerst S, Harder T, Starick E, Vahlenkamp TW, Mettenleiter TC, Teifke JP (2007) Distribution of lesions and antigen of highly pathogenic avian influenza virus A/Swan/Germany/R65/06 (H5N1) in domestic cats after presumptive infection by wild birds. *Veterinary Pathology* **44**, 261–268.
- Kuiken T, Rimmelzwaan GF, Van Riel D, Van Amerongen G, Baars M, Fouchier RA, Osterhaus AD (2004) Avian H5N1 influenza in cats. *Science* **306**, 241.
- Kuiken T, Fouchier RA, Rimmelzwaan GF, Osterhaus AD, Roeder P (2006) Feline friend or potential foe? *Nature* **440**, 741–742.
- Leschnik M, Weikel J, Möstl K, Revilla-Fernández S, Wodak E, Bagó Z, Vanek E, Benetka V, Hess M, Thalhammer JG (2007) Subclinical infection with avian influenza A (H5N1) virus in cats. *Emerging Infectious Diseases* **13**, 243–247.
- Li KS, Guan Y, Wang J, Smith GJ, Xu KM, Duan L, Rahardjo AP, Puthavathana P, Buranathai C, Nguyen TD, Estoepongastie AT, Chaisingh A, Auewarakul P, Long HT, Hanh NT, Webby RJ, Poon LL, Chen H, Shortridge KE, Yuen KY, Webster RG, Peiris JS (2004) Genesis of a highly pathogenic and potentially pandemic H5N1 influenza virus in eastern Asia. *Nature* **430**, 209–213.
- Mackenzie D (2007) Deadly H5N1 may be brewing in cats. *New Scientist* 6–7.
- Paltrinieri S, Spagnolo V, Giordano A, Martin AM, Luppi A (2007) Influenza virus type A serosurvey in cats. *Emerging Infectious Diseases* **13**, 662–664.
- Rimmelzwaan GF, Van Riel D, Baars M, Bestebroer TM, Van Amerongen G, Fouchier RA, Osterhaus AD, Kuiken T (2006) Influenza A virus (H5N1) infection in cats causes systemic disease with potential novel routes of virus spread within and between hosts. *American Journal of Pathology* **168**, 176–183.
- Salzberg SL, Kingsford C, Cattoli G, Spiro DJ, Janies DA, Mehrez Aly M, Brown IH, Couacy-Hymann E, De Mia DM, Dung DH, Guercio A, Joannis T, Maken Ali AS, Osmani A, Padalino I, Saad MD, Savić V, Sengamalay NA, Yingst SL, Zaborsky J, Zorman-Rojs O, Ghedin E, Capua I (2007) Genome analysis linking recent European and African influenza (H5N1) viruses. *Emerging Infectious Diseases* **13**, 713–718.
- Songserm T, Amonsin A, Jam-on R, Sae-Heng N, Meemak N, Pariyothorn N, Payungporn S, Theamboonlers A, Poovorawan Y (2006) Avian influenza H5N1 in naturally infected domestic cat. *Emerging Infectious Diseases* **12**, 681–683.
- Spackman E, Senne DA, Myers TJ, Bulaga LL, Garber LP, Perdue ML, Lohman K, Daum LT, Suarez DL (2002) Development of a real-time reverse transcriptase PCR assay for type A influenza virus and the avian H5 and H7 hemagglutinin subtypes. *Journal of Clinical Microbiology* **40**, 3256–3260.
- Subbarao K, Klimov A, Katz J, Regnery H, Lim W, Hall H, Perdue M, Swayne D, Bender C, Huang J, Hemphill M, Rowe T, Shaw M, Xu X, Fukuda K, Cox N (1998) Characterization of an avian influenza A (H5N1) virus isolated from a child with a fatal respiratory illness. *Science* **279**, 393–396.
- Thanawongnuwech R, Amonsin A, Tantilertcharoen R, Damrongwatanapokin S, Theamboonlers A, Payungporn S, Nanthapornphiphat K, Ratanamungklanon S, Tunak E, Songserm T, Vivatthanavanich V, Lekdumrongsak T, Kesdangsakonwut S, Tunhikorn S, Poovorawan Y (2005) Probable tiger-to-tiger transmission of avian influenza H5N1. *Emerging Infectious Diseases* **11**, 699–701.
- Thiry E, Zicola A, Addie D, Egberink H, Hartmann K, Lutz H, Poulet H, Horzinek MC (2007) Highly pathogenic avian influenza H5N1 virus in cats and other carnivores. *Veterinary Microbiology* **122**, 25–31.
- Vahlenkamp TW, Harder TC (2006) Influenza virus infections in mammals. *Berliner und Muenchener tierärztliche Wochenschrift* **119**, 123–131.
- Webster RG, Bean WJ, Gorman OT, Chambers TM, Kawaoka Y (1992) Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiological Reviews* **56**, 152–179.
- World Health Organization. (2007) Areas reporting confirmed occurrence of H5N1 avian influenza in poultry and wild birds since 2003. Available at: <http://gamapsserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Global_SubNat_H5N1inAnimalConfirmedCUMULATIVE_20070717.png>.
- Xu X, Subbarao, Cox NJ, Guo Y (1999) Genetic characterization of the pathogenic influenza A/Goose/Guangdong/1/96 (H5N1) virus: similarity of its hemagglutinin gene to those of H5N1 viruses from the 1997 outbreaks in Hong Kong. *Virology* **261**, 15–19.
- Yingst SL, Saad MD, Felt SA (2006) Qinghai-like H5N1 from domestic cats, northern Iraq. *Emerging Infectious Diseases* **12**, 1295–1297.

IV Kapitel 2: Evaluation of a Point-of-Care Influenza Antigen Test for the Detection of Highly Pathogenic Avian Influenza A H5N1 in Cats

Julia Marschall¹

Bianka Schulz, Dr. med. vet., Dipl. ECVIM-CA¹

Katrin Hartmann, Prof., Dr. med. vet., Dr. med. vet. habil., Dipl. ECVIM-CA¹

¹ Medizinische Kleintierklinik, Ludwig-Maximilians-Universität München, Veterinärstrasse 13, 80539 München, Deutschland

Transboundary and Emerging Diseases 2008; 55, 315-7.

SHORT COMMUNICATION

Evaluation of a Point-of-Care Influenza Antigen Test for the Detection of Highly Pathogenic Avian Influenza H5N1 Virus in Cats

J. Marschall, B. Schulz and K. Hartmann

Clinic of Small Animal Medicine, Ludwig Maximilian University Munich, Munich, Germany

Keywords:

In-house test; feline; diagnosis; influenza infection

Correspondence:

K. Hartmann, Medizinische Kleintierklinik, Veterinärstrasse 13, 80539 Muenchen, Germany. Tel.: +49 (89) 2180 2651; Fax: +49 (89) 2180 16501; E-mail: hartmann@uni-muenchen.de

Received for publication April 15, 2008

doi:10.1111/j.1865-1682.2008.01041.x

Summary

Quick diagnosis of H5N1 infection in cats is important because of the zoonotic and pandemic potential of this virus. Human rapid influenza antigen tests are also sold commercially to veterinarians for use in cats. The point-of-care test actim™ Influenza A&B (Medix Biochemica, Kauniainen, Finland) was evaluated for the diagnosis of H5N1 infection in cats. The test showed a very low sensitivity and did not detect virus in samples of experimentally infected cats, so that its application cannot be recommended for the diagnosis of H5N1 infection in cats.

The Study

Domestic cats are susceptible to infection with highly pathogenic avian influenza virus H5N1 (HPAIV H5N1) as demonstrated by experimental studies as well as natural infections (Kuiken et al., 2004; Songserm et al., 2006). Even though most feline cases have occurred in Southeast Asia, infected cats were also found in Central Europe (Klopfleisch et al., 2007; Leschnik et al., 2007). There has been great concern among the population since the virus was detected in wild birds throughout Germany and in three dead cats on the Isle of Rügen. For veterinary practitioners confronted with cats suspected of being infected with HPAIV H5N1, the possibility to detect H5N1 with a point-of-care test would be very helpful. The rapid test kit actim™ Influenza A&B (Medix Biochemica, Kauniainen, Finland) was originally developed for the diagnosis of influenza A and B virus infections in humans. Currently, it is also sold to veterinarians for the diagnosis of H5N1 infection in cats although there are no studies demonstrating the test's reliability in this regard. The aim of this study, therefore, was to evaluate this rapid test in regard to its usefulness for the diagnosis of HPAIV H5N1 infection in cats.

Pharyngeal swabs of two groups of cats were examined in this study. The first group (group A) included 114 pet cats that had outdoor access in areas where birds infected

with HPAIV H5N1 had been found. The cats either lived in a 'restriction zone' (area within a 10 km radius around the location of a detected outbreak of avian influenza in birds) or showed signs of acute respiratory disease in an area close to a restriction zone. The second group (group B) consisted of 12 samples from 12 cats that had been experimentally infected with 10^6 or 10^4 50% egg infectious doses (EID₅₀) of HPAIV H5N1 strain A/cat/Germany/R606/2006 (Giese et al., 2008). Cats infected with 10^6 EID₅₀ showed severe clinical signs, while cats infected with 10^4 EID₅₀ were subclinically infected.

Samples were taken on day 2 or day 4 post-infection. The rapid test actim™ Influenza A&B is an immunochromatographic point-of-care test that qualitatively detects influenza A and B antigens (nucleoprotein). It was performed on pharyngeal swabs according to the manufacturer's instructions. Swabs from cats in group A were examined immediately after sampling, swabs from group B were frozen at -20°C immediately after sampling for approximately 6 months. At least one positive control (included in the test kit) was performed from every batch for quality control purposes. As gold standard for the detection of HPAIV H5N1, pharyngeal swabs from group A and B were examined for the presence of viral RNA (influenza A matrix gene) by real-time reverse transcriptase PCR (RRT-PCR) (Spackman et al., 2002) at the

O.I.E. and National Reference Laboratory for Avian Influenza, Friedrich-Loeffler-Institute, Insel Riems, Germany. Statistical analysis was performed using a one-tailed exact binomial test for determination of exact confidence intervals.

In RRT-PCR, samples from all cats in group A (114/114) were negative for influenza A H5 virus-specific nucleic acid. Nine of the 12 samples in group B showed a positive result in the RRT-PCR, the other three samples were negative. In the rapid influenza antigen test, none of the samples from group A or B were positive. Specificity of the rapid test was therefore determined to be >97% (95% confidence interval (CI): 0.97–1.00), since all RRT-PCR negative samples tested negative in the rapid test (117/117); sensitivity was determined to be < 29% (95% CI: 0.00–0.29), since none of the RRT-PCR positive samples tested positive in the rapid test (0/9).

Although cats from areas with occurrence of avian influenza in birds were selected, none of the field cats showed evidence of infection with avian influenza virus H5N1. Risk for free-roaming cats living in areas with occurrence of highly pathogenic avian influenza in birds does not seem to be high (Marschall et al., 2008). Since the test detects nucleoprotein, an antigen present in all influenza A viruses (thus also in the H5N1 subtype), the test should theoretically work. For the detection of human influenza subtypes H3 and H1, the actimTM Influenza A&B rapid test shows a specificity of >99% and a sensitivity of 87% to 95% (Stuchbery et al., 2005). However, rapid influenza antigen tests seem to be less sensitive for the detection of H5N1 than for the detection of other influenza A subtypes in humans (Tran et al., 2004; Beigel et al., 2005). In an evaluation by the Institut Pasteur, Paris, cell cultures were infected with a human H1N1 and an avian H5N1 influenza virus (infectious titres 6.2×10^4 plaque forming units (PFU)/ml. The actimTM Influenza A&B rapid test detected antigen of the human H1N1 subtype at a dilution of the cell culture supernatant of 10^{-3} as strongly positive, while the avian H5N1 isolate was only strongly positive at a dilution of 10^{-2} and just faintly positive at 10^{-3} (CNR du virus influenzae de l'Institut Pasteur, 2005). One reason for the test's failure in detecting H5N1 in cats might be that excreted virus titers are too low. According to the product description, however, the cut-off value of the test is such that the lowest detectable amount is 1.0×10^4 50% tissue culture infectious dose (TCID₅₀)/ml for human H3N2 and H1N1 viruses. Viral titers quantified in the RRT-PCR reached 1×10^5 TCID₅₀/ml in some of the positive swabs from cats inoculated with 10^6 EID₅₀. Detection of nucleic acid by PCR does not infer, however, that viable virus is present, and detection of infectious virus by virus isolation was not performed in these

samples. Another limitation of the study is the fact that pharyngeal swabs of cats in group B were frozen prior to the examination. In the test instructions it is indicated that samples should be tested as soon as possible after collection, and no mention is made of testing previously frozen samples. In an evaluation carried out by the World Health Organization Collaborating Centre for Virus Reference and Research, National Influenza Centre, Lyon, France, however, the actimTM Influenza A&B rapid test still showed positive results after one month of freezing at -80°C and after 6 days at -20°C of H3N2 positive samples (Lina and Valette, 2005). A problem using pharyngeal swabs in cats might be that the sample volume may be too small if the swab is not completely moist. Thus, test results may be falsely negative as the virus concentration becomes too low. In practice, this difficulty cannot be overcome easily, as the amount of saliva is usually small in cats and nasal washes or nasal aspirates – as done in humans – are not feasible in unsedated cats. As none of the tested field cats were infected with HPAIV H5N1, sensitivity could only be determined from experimentally infected cats. It can be assumed, however, that naturally infected cats excrete smaller amounts of virus than experimentally infected cats. In consideration of the results available at this point, use of the actimTM Influenza A&B rapid test cannot be recommended for the diagnosis of HPAIV H5N1 infection in cats. Although more complicated and time consuming, PCR remains the diagnostic method of choice.

Acknowledgements

We thank Thomas W. Vahlenkamp and Timm C. Harder for the performance of RRT-PCRs and provision of samples from experimentally infected cats and Monia Mahling for help with statistical analysis.

References

- Beigel, J. H., J. Farrar, A. M. Han, F. G. Hayden, R. Hyer, M. D. de Jong, S. Lochindarat, T. K. Nguyen, T. H. Nguyen, T. H. Tran, A. Nicoll, S. Touch, and K. Y. Yuen, 2005: Avian influenza A (H5N1) infection in humans. *N. Engl. J. Med.*, 353, 1374–1385.
- CNR du virus influenzae de l'Institut Pasteur, 2005: *Evaluation de la trousse Medix Biochemica Influenza A&B Test pour la détection rapide des virus grippaux A et B, on the actimTM Influenza test*. Information package by Check Diagnostics GmbH, Westerau, Germany.
- Giese, M., T. C. Harder, J. P. Teifke, R. Klopffleisch, A. Breithaupt, T. C. Mettenleiter, and T. W. Vahlenkamp, 2008: Experimental infection and natural contact exposure of dogs with avian influenza virus (H5N1). *Emerg. Infect. Dis.* 14, 308–310.

Marschall et al.

Evaluation of a Point-of-Care Influenza Antigen Test in Cats

- Klopfleisch, R., P. U. Wolf, W. Uhl, S. Gerst, T. Harder, E. Starick, T. W. Vahlenkamp, T. C. Mettenleiter, and J. P. Teifke, 2007: Distribution of lesions and antigen of highly pathogenic avian influenza virus A/Swan/Germany/R65/06 (H5N1) in domestic cats after presumptive infection by wild birds. *Vet. Pathol.* 44, 261–268.
- Kuiken, T., G. F. Rimmelzwaan, D. van Riel, G. van Amerongen, M. Baars, R. A. Fouchier, and A. D. Osterhaus, 2004: Avian H5N1 influenza in cats. *Science* 306, 241.
- Leschnik, M., J. Weikel, K. Möstl, S. Revilla-Fernández, E. Wodak, Z. Bagó, E. Vanek, V. Benetka, M. Hess, and J. G. Thalhammer, 2007: Subclinical infection with avian influenza A (H5N1) virus in cats. *Emerg. Infect. Dis.* 13, 243–247.
- Lina, B., and M. Valette, 2005: *Test evaluation report - Medix Biochemica Influenza A&B (Ref 32832ETMB), Actim™ Influenza A&B (Ref 32832ETAC)*. Check Diagnostics Gesellschaft für Point-of-Care Testing mbH, Westerau, Germany. Available at: <http://www.check-poct.de/pdfs/actim%20Influenza%20Literatur/Test%20Evaluation%20Report.pdf> (accessed March 30, 2008).
- Marschall, J., B. Schulz, T. C. Harder, T. W. Vahlenkamp, J. Huebner, E. Huisinga, and K. Hartmann, 2008: Prevalence of influenza A H5N1 virus in cats from areas with occurrence of highly pathogenic avian influenza in birds. *J. Feline Med. Surg.* (in press).
- Songserm, T., A. Amonsin, R. Jam-on, N. Sae-Heng, N. Meemak, N. Pariyothorn, S. Payungporn, A. Theamboonlers, and Y. Poovorawan, 2006: Avian influenza H5N1 in naturally infected domestic cat. *Emerg. Infect. Dis.* 12, 681–683.
- Spackman, E., D. A. Senne, T. J. Myers, L. L. Bulaga, L. P. Garber, M. L. Perdue, K. Lohman, L. T. Daum, and D. L. Suarez, 2002: Development of a real-time reverse transcriptase PCR assay for type A influenza virus and the avian H5 and H7 hemagglutinin subtypes. *J. Clin. Microbiol.* 40, 3256–3260.
- Stuchbery, A., R. Telfer, B. Stone, E. Svens, and T. Kok, 2005: Evaluation of a one-step rapid immunochromatographic test for influenza A and B viruses. *National Conference of the Australian Society for Microbiology, Canberra, Australia (25.09.-29.09.2005), Poster*, Australian Society for Microbiology, Melbourne, Australia. Available at: <http://www.check-poct.de/pdfs/actim%20Influenza%20Literatur/Evaluation%20of%20a%20one-step%20rapid.pdf> (accessed 7 July 2008).
- Tran, T. H., T. L. Nguyen, T. D. Nguyen, T. S. Luong, P. M. Pham, V. C. Nguyen, T. S. Pham, C. D. Vo, T. Q. Le, T. T. Ngo, B. K. Dao, P. P. Le, T. T. Nguyen, T. L. Hoang, V. T. Cao, T. G. Le, D. T. Nguyen, H. N. Le, K. T. Nguyen, H. S. Le, V. T. Le, D. Christiane, T. T. Tran, J. Menno de, C. Schultsz, P. Cheng, W. Lim, P. Horby, and J. Farrar, 2004: Avian influenza A (H5N1) in 10 patients in Vietnam. *N. Engl. J. Med.*, 350, 1179–1188.

V Kapitel 3: Avian influenza A H5N1 infections in cats

Julia Marschall¹

Katrin Hartmann, Prof., Dr. med. vet., Dr. med. vet. habil., Dipl. ECVIM-CA¹

¹ Medizinische Kleintierklinik, Ludwig-Maximilians-Universität München, Veterinärstrasse 13, 80539 München, Deutschland

Journal of Feline Medicine and Surgery 2008; 10: 359-65.

Journal of Feline Medicine and Surgery (2008) 10, 359–365
doi:10.1016/j.jfms.2008.03.005



jfms

REVIEW ARTICLE

Avian influenza A H5N1 infections in cats

Julia Marschall, Katrin Hartmann Dr Med Vet, Dr Habil, Dipl ECVIM-CA, Professor*

*Clinic of Small Animal Medicine,
Ludwig Maximilian University,
Munich, Germany*

Although cats had been considered resistant to disease from influenza virus infection, domestic cats and large felids are now known to be naturally and experimentally susceptible to infection with highly pathogenic avian influenza virus H5N1 (HPAIV H5N1). The virus causes systemic infection, lung and liver being the mainly affected organs. Infected cats show fever, depression, dyspnoea, and neurological signs, but subclinical infections have also occurred. Mostly, cats have been infected by direct contact with affected birds, especially by eating raw poultry; transmission from cat to cat may also occur. Little is known about the role of cats in the epidemiology of the virus. So far, no reassortment between avian and mammalian influenza viruses has occurred in cats, but experts fear that cats might give the virus an opportunity to adapt to mammals. This publication gives a review on avian influenza in cats with a focus on practical aspects for veterinarians.

Date accepted: 20 March 2008

© 2008 ESFM and AAFP. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

Besides human infections, most known mammalian infections with highly pathogenic avian influenza virus H5N1 (HPAIV H5N1) have occurred in felids. Large felids and domestic cats can not only be infected by direct or indirect contact with infected birds (Keawcharoen et al 2004, Songserm et al 2006a, Leschnik et al 2007); the virus can also be transmitted horizontally from cat to cat (Kuiken et al 2004, Thanawongnuwech et al 2005). However, there are still a lot of open questions concerning the epidemiology and pathophysiology of this viral infection in cats. The close relationship between cats and humans is a cause for concern about the cat's role in the spread of H5N1 (Kuiken et al 2006). Even though most feline cases have occurred in Southeast Asia, infected cats were also found in Central Europe (Germany and Austria) (Leschnik et al 2007, Klopfleisch et al 2007a).

This article gives a review of the current literature to help veterinarians when confronted with a cat suspected of being infected with HPAIV H5N1, and to help answering cat owners'

questions that arise in areas where infected birds have been found.

Aetiology

Influenza viruses are negative sense, single-stranded, segmented RNA viruses belonging to the family Orthomyxoviridae. Whereas influenza viruses types B and C are mainly human pathogens, influenza A viruses act as pathogens in many mammalian species including humans and in birds (Webster et al 1992). Influenza A viruses are classified into distinct subtypes according to different haemagglutinin and neuraminidase glycoprotein molecules expressed on the surface (Fouchier et al 2005). In avian influenza viruses, all different subtypes described until today are found. They can either lead to subclinical infection or cause serious systemic disease, depending on their pathogenicity. Among the subtypes H5 and H7, highly pathogenic variants may develop out of low pathogenic avian influenza viruses by mutation (Alexander 2000).

HPAIV subtype H5N1 was first detected in 1996 in domestic geese in China (Xu et al 1999, Li et al 2004). After several reassortment events,

*Corresponding author. Tel: +49-89-2180-2651. E-mail: hartmann@uni-muenchen.de

this avian virus not only caused serious disease in poultry, but also crossed the species barrier infecting people in Hong Kong in 1997 (Subbarao et al 1998, Webster et al 2002, Li et al 2004). During the subsequent years, different H5N1 genotypes emerged after a series of genetic changes, leading to fatal outbreaks in Asia in poultry in 2003/2004 (Li et al 2004, Chen et al 2006). Since then, HPAIV H5N1 has spread to many countries worldwide (World Health Organization 2007) resulting in high mortality in poultry and fatal infections in mammalian species, including humans (Vahlenkamp and Harder 2006).

Mammalian species known to be susceptible to HPAIV H5N1 are humans (Claas et al 1998, Tran et al 2004), ferrets (Zitzow et al 2002, Govorkova et al 2005), dogs (Songserm et al 2006b, Giese et al 2008), mice (Gao et al 1999), stone martens (Klopfleisch et al 2007b), pigs (Choi et al 2005), cynomolgus monkeys (Rimmelzwaan et al 2001, Kuiken et al 2003), civets (Robertson et al 2006), domestic cats (Kuiken et al 2004, Thiry et al 2007), tigers, and leopards (Keawcharoen et al 2004).

Infections in felids

In felids, several outbreaks of infection with HPAIV H5N1 have been reported so far. The first outbreak was noted in 2003, when two tigers and two leopards suffering from high fever and respiratory distress died in a zoo in Suphanburi, Thailand (Keawcharoen et al 2004). Further evidence that felids are susceptible to influenza A H5N1 infection arose when in 2004 three domestic cats from a household in Thailand, where 14 cats had died, were tested positive for influenza A H5N1 and when a clouded leopard died in a zoo in Chonburi, Thailand, from infection with influenza A H5N1 (Enserink and Kaiser 2004, ProMED-mail 2004a,b). One month later, a tiger at the same zoo was found to be infected, but recovered from the disease (Enserink and Kaiser 2004, ProMED-mail 2004b). During an outbreak in a tiger zoo in Sriracha, Thailand, a total of 147 tigers died or were euthanased (Thanawongnuwech et al 2005). Furthermore, the virus was detected in a domestic cat in Thailand that had died showing high fever, dyspnoea, convulsions, and ataxia (Songserm et al 2006a). Experimental infections with H5N1 virus isolated from a fatal human case confirmed that cats can develop severe clinical signs after intratracheal inoculation or after

feeding on infected chicken (Kuiken et al 2004). These findings are remarkable, as clinical disease resulting from infection with influenza viruses had not been noticed in cats before (Paniker and Nair 1970, 1972, Hinshaw et al 1981).

The first cases of HPAIV H5N1 infection in domestic cats in Europe were detected during the outbreak of avian influenza on the German Isle of Rügen in February 2006, where three free-roaming cats were found dead harbouring the virus (Klopfleisch et al 2007a). At approximately the same time, three cats that did not show clinical signs of influenza tested positive for influenza A H5N1 in an animal shelter in Graz, Austria, after an infected swan had been brought to the shelter (Leschnik et al 2007).

Epidemiology

The incidence of avian influenza in felids seems to be associated with the occurrence of infections in poultry or wild birds in the surrounding area (Keawcharoen et al 2004, Leschnik et al 2007, Klopfleisch et al 2007a). Phylogenetic analyses have shown that the examined virus isolates from cats and tigers were highly similar to the virus circulating in poultry at the same time and that the viruses found in felids were of avian origin, indicating that no genetic reassortment with mammalian influenza viruses had occurred. Several point mutations have been identified that are associated with higher virulence in mammals, but none of them seems to be essential for an infection in felids (Keawcharoen et al 2004, Amonsin et al 2006, 2007, Weber et al 2007).

Within the H5N1 subtype, at least two genetically and antigenically distinct lineages (clades 1 and 2) exist in non-overlapping geographic distributions in Asia. Clade 1 was mainly isolated in Vietnam and Thailand, whereas clade 2 was mainly found in China and Indonesia (World Health Organization Global Influenza Program Surveillance Network 2005). From there, the 'Qinghai-like' sublineage spread westwards to the Middle East, Europe, and Africa and split up into three different subclusters (Yingst et al 2006, Salzberg et al 2007, Weber et al 2007). All Asian cases reported in felids were caused by infections with clade 1 viruses, until in February 2006, an outbreak in domestic cats in Iraq and the cases in Germany were attributed to Qinghai-like clade 2 viruses ('EMA' clade 2), demonstrating that cats may be susceptible to different circulating H5N1 viruses (Yingst et al 2006, Weber et al 2007).

Virus transmission

Virus transmission has mostly been ascribed to direct contact of felids with infected birds, particularly through eating of raw poultry (Keawcharoen et al 2004, Kuiken et al 2004, Songserm et al 2006a). Both inhalation and ingestion seem to be possible routes of virus entry there (Rimmelzwaan et al 2006, Yingst et al 2006). In addition, indirect viral transmission to cats may occur after contact with contaminated birds' faeces, as was suspected in the cases in Graz (Leschnik et al 2007). Kuiken et al (2004) showed that horizontal transmission from experimentally inoculated cats to other cats is possible by direct contact. Most likely, horizontal transmission also occurred under natural circumstances in the outbreak in Sriracha tiger zoo (Thanawongnuwech et al 2005).

So far, no case of virus transmission from cats to other species including humans has been observed. Antibody development without development of clinical signs, however, was found in two of 58 people who had been in contact with infected tigers (Thanawongnuwech et al 2005).

Infected felids were found to excrete virus via respiratory, digestive, and urinary tract, as shown by virus detection from pharyngeal, nasal, and rectal swabs as well as urine and faecal samples (Rimmelzwaan et al 2006, Yingst et al 2006, Songserm et al 2006a, Klopfleisch et al 2007a). Virus shedding may occur before the onset of clinical signs (Kuiken et al 2006, Rimmelzwaan et al 2006). In an experimental study, virus excretion started at day 3 after infection and lasted until day 7 when the animals were euthanased (Kuiken et al 2004, Rimmelzwaan et al 2006). Subclinically infected cats are assumed to excrete virus less than 2 weeks (Leschnik et al 2007).

Pathogenesis

After transmission, the virus spreads locally to the lower respiratory tract and can cause severe pneumonia (Keawcharoen et al 2004, Songserm et al 2006a, Klopfleisch et al 2007a). Predominant involvement of the lower respiratory tract and inability of the virus to attach to cells of the upper respiratory tract may be a reason why cats excrete virus at relatively low concentrations (Kuiken et al 2004, Van Riel et al 2006).

Unlike other influenza viruses, which are usually restricted to the respiratory tract in mammals, HPAIV H5N1 not only replicates in respiratory tissue, but can also lead to systemic infection causing severe necrosis and inflammation in many organs (Rimmelzwaan et al 2006). Two ways of virus

spread to extra-respiratory tissue are presumed. The pattern of virus distribution in the body provides evidence of virus entry via viraemia. Another route may be virus entry from the intestinal lumen via nerve fibres into intestinal tissue, which is indicated by the finding of ganglioneuritis of the intestinal nervous plexi in cats that had been fed on virus-infected chicks (Rimmelzwaan et al 2006).

Clinical signs

The incubation period is known to be shorter after direct experimental infection by respiratory and oral routes (1–2 days) than after cat-to-cat transmission (5 days) (Kuiken et al 2006, Rimmelzwaan et al 2006). Clinical signs observed in affected felids include pyrexia, depression, laboured breathing, conjunctivitis, protrusion of the third eyelid, and neurological signs such as convulsions and ataxia (Keawcharoen et al 2004, Kuiken et al 2004, Thanawongnuwech et al 2005, Songserm et al 2006a). Respiratory signs are caused by severe pulmonary changes (consolidation, haemorrhage, oedema) and pleural effusion, visible at necropsy (Keawcharoen et al 2004, Thanawongnuwech et al 2005, Songserm et al 2006a). Histopathology reveals extensive inflammation and necrosis in lung tissue leading to interstitial pneumonia and diffuse alveolar damage (Rimmelzwaan et al 2006, Songserm et al 2006a). Neurological signs result from cerebral and cerebellar congestion and non-suppurative meningoencephalitis accompanied by vasculitis (Thanawongnuwech et al 2005, Songserm et al 2006a). Diarrhoea, described in affected poultry (Perkins and Swayne 2001) and also in humans infected with HPAIV H5N1 (Apisarnthanarak et al 2004, Tran et al 2004), has not been observed in cats.

Laboratory abnormalities in tigers included severe leukopenia and thrombocytopenia and increased activities of the liver enzymes alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase (Thanawongnuwech et al 2005). Markedly increased liver enzyme activities have also been found in aqueous humour samples from cats taken during post-mortem examination (Klopfleisch et al 2007a). Histopathology of the liver shows multifocal necrotising hepatitis, explaining the increase in liver enzyme activities and the generalised icterus which can also be seen at necropsy (Thanawongnuwech et al 2005, Rimmelzwaan et al 2006, Klopfleisch et al 2007a). Serosanguinous nasal discharge observed in severely affected tigers may have been caused by severe thrombocytopenia (Thanawongnuwech et al 2005).

Multifocal haemorrhage has been described in numerous organs such as lungs, heart, thymus, stomach, intestine, liver, tonsils, lymph nodes, kidneys, and diaphragm, as well as pancreas (Keawcharoen et al 2004, Rimmelzwaan et al 2006, Yingst et al 2006, Klopffleisch et al 2007a). Sudden death may occur as soon as 2 days after onset of clinical signs (Songserm et al 2006a).

Infection with HPAIV H5N1 can also result in subclinical infection. In Graz, three cats excreted virus after contact with an infected swan and two cats developed antibodies to influenza A H5N1 virus, but none of them showed signs of influenza (Leschnik et al 2007). Anecdotal reports also support the existence of subclinical infections. In an unpublished study carried out by the National Institute of Animal Health in Bangkok, eight of 111 cats (7%) were found to carry antibodies to influenza A H5N1 (Butler 2006). An unpublished study by Nidom suggested that 20% of 500 cats tested in Indonesia had antibodies to influenza A H5N1 (Mackenzie 2007).

Diagnosis

Virus detection is possible from pharyngeal, nasal, and rectal swabs, from faecal and urine samples, from organ tissue, and pleural fluid (Rimmelzwaan et al 2006, Yingst et al 2006, Songserm et al 2006a). In subclinically infected cats, H5N1 has only yet been detected in pharyngeal swabs (Leschnik et al 2007). H5N1 virus RNA can be identified by real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction (RRT-PCR) using primers specific for the haemagglutinin and neuraminidase genes (Keawcharoen et al 2004, Klopffleisch et al 2007a). Virus can also be isolated by inoculation into embryonated chicken eggs (Songserm et al 2006a) or cell cultures (Rimmelzwaan et al 2006) and subsequently be identified by RRT-PCR or haemagglutination and haemagglutination inhibition assays (Songserm et al 2006a). Immunohistochemistry can be used for H5N1 virus antigen detection in affected organs (Rimmelzwaan et al 2006, Songserm et al 2006a). Antibodies to influenza A H5N1 in serum samples can be detected by an haemagglutination inhibition test (Karaca et al 2005, Leschnik et al 2007).

Treatment and prevention

Not much is known about the efficacy of antiviral treatment in cats infected with HPAIV H5N1. Although the neuraminidase inhibitor oseltamivir has shown potent antiviral activity against HPAIV

H5N1 *in vitro* (Hurt et al 2007) as well as in experimentally infected mice and ferrets (Leneva et al 2000, Govorkova et al 2007) and is recommended for treatment and prophylaxis of HPAIV H5N1 infection in people (Schunemann et al 2007), this treatment was unsuccessful in tigers during the outbreak in Sriracha tiger zoo in 2004. Oseltamivir (Tamiflu®; Roche) was administered to the tigers at a dose of 75 mg/60 kg twice daily (human dosage) for treatment and prophylaxis, but failed in symptomatic as well as asymptomatic animals. The treatment failure may have resulted from improper dosage or timing of drug administration; differences in pharmacokinetics and host metabolisms between humans and felids and even between large felids and domestic cats can be expected (Thanawongnuwech et al 2005, Amonsin et al 2006).

So far, there is no licensed influenza vaccine for cats on the market. However, there is some research in this regard. After experimental vaccination with fowlpox virus expressing avian influenza virus H5 haemagglutinin gene derived from an H5N8 influenza virus, cats developed high levels of antibodies to the homologous H5N8 antigen. After administration of a second dose, antibodies were shown to cross-react with a recent HPAIV H5N1 isolate (Karaca et al 2005). In another study, an anti-H5N1 antibody response was induced by injection of canine adenovirus expressing H5 haemagglutinin gene of a tiger isolate in one cat (Gao et al 2006).

As all known infections in cats were connected with the occurrence of HPAIV H5N1 in birds, contact with birds carrying the virus must be avoided to prevent infections in cats. It is, therefore, advised to keep cats indoors in areas with occurrence of highly pathogenic avian influenza in birds (Anonymous 2006, Duke 2006). Furthermore, cats should not be fed uncooked poultry meat (Advisory Board on Cat Diseases 2006).

Little is known about the actual risk for cats in the field to become infected with the virus and their role in the spread of H5N1. The risk of transmission from potentially infected cats to humans is unknown. One study showed, though, that there is no major risk for pet cats in areas with sporadic incidence of avian influenza in birds, as neither virus excretion nor antibodies were detected in 171 cats with outdoor access in areas in which infected birds had been found (Marschall et al 2008).

Preventive measures must still be taken to minimise the risk of transmission when confronted with a cat suspected of being infected

Table 1. Recommendations on the handling of cats suspected to be infected with HPAIV H5N1

Recommendations for cat owners	If HPAIV H5N1 occurs in birds, cat owners should receive information about the exact location of the outbreaks through media or internet		
Unrestricted area	Healthy indoor cat	No precautions necessary	
	Outdoor cat showing respiratory and/or other signs described above	Veterinarian should be consulted	
Restriction zone*	Healthy cat	Cat should be kept indoors	
	Cat showing acute respiratory signs and/or other signs described above	Veterinarian should be consulted immediately and be informed of the cat's outdoor access in a restriction zone	
Generally	Feeding of uncooked poultry meat should be avoided		
Recommendations for veterinarians	If HPAIV H5N1 occurs in birds, small animal practitioners should look for information about the exact location of the outbreaks through media or internet		
Unrestricted area	Healthy indoor cat	No further diagnostics	
	Outdoor cat showing respiratory and/or other signs described above	HPAIV H5N1 infection should be considered if no other cause for the signs is found. Pharyngeal swab should be taken for viral diagnosis (preferably PCR)	
Restriction zone*	Healthy indoor cat	No further diagnostics	
	Indoor cat showing respiratory and/or other signs described above	HPAIV H5N1 infection should be considered if no other cause for the signs is found. Pharyngeal swab should be taken for viral diagnosis (preferably PCR)	
	Healthy outdoor cat/cat with contact to poultry	HPAIV H5N1 infection should be considered. Pharyngeal swab should be taken for viral diagnosis (preferably PCR)	
	Outdoor cat showing respiratory and/or other signs described above	HPAIV H5N1 infection should be suspected, preventive measures should be taken when handling the cat (see text), and pharyngeal swabs should be taken for viral diagnosis	
*Restriction zone: area within 10 km radius around location of outbreak of avian influenza in birds for the duration of 30 days after discovery of infected birds.			

with H5N1. Recommendations on the handling of cats suspected to be infected with HPAIV H5N1 are given in Table 1. The cat should be isolated, and contact with the cat should be restricted to a minimum. People in contact with the cat must wear protective clothing; surfaces should be decontaminated with standard medical disinfectant (Thiry et al 2007). Uncooperative cats should be sedated before handling (Advisory Board on Cat Diseases 2006). Further studies are necessary to learn more about the epidemiology and pathophysiology of HPAIV H5N1 infection in cats.

References

- Advisory Board on Cat Diseases. (2006) Avian influenza H5N1—ABCD recommendations on the practical approach of infected and suspected cats. Guidelines on Feline Infectious Diseases, Available from: <http://www.abcd-vets.org/guidelines/pdf/avian_influenza_uk.pdf>.
- Alexander DJ (2000) A review of avian influenza in different bird species. *Veterinary Microbiology* 74, 3–13.
- Amonsin A, Payungporn S, Theamboonlers A, Thanawongnuwech R, Suradhat S, Pariyothorn N, Tantilertcharoen R, Damrongwantanapokin S, Buranathai C, Chaisingh A, Songserm T, Poovorawan Y (2006) Genetic characterization

- of H5N1 influenza A viruses isolated from zoo tigers in Thailand. *Virology* **344**, 480–491.
- Amonsin A, Songserm T, Chutinimitkul S, Jam-On R, Sae-Heng N, Pariyothorn N, Payungporn S, Theamboonlers A, Poovorawan Y (2007) Genetic analysis of influenza A virus (H5N1) derived from domestic cat and dog in Thailand. *Archives of Virology* **152**, 1925–1933.
- Anonymous. (2006) European advice on H5N1 avian influenza in cats. *Veterinary Record* **158**, 314.
- Apisarnthanarak A, Kitphati R, Thongphubeth K, Patoomant P, Anthanont P, Auwanit W, Thawatsupha P, Chittaganpitch M, Saeng-Aroon S, Waicharoen S, Apisarnthanarak P, Storch GA, Mundy LM, Fraser VJ (2004) Atypical avian influenza (H5N1). *Emerging Infectious Diseases* **10**, 1321–1324.
- Butler D (2006) Thai dogs carry bird-flu virus, but will they spread it? *Nature* **439**, 773.
- Chen H, Smith GJ, Li KS, Wang J, Fan XH, Rayner JM, Vijaykrishna D, Zhang JX, Zhang LJ, Guo CT, Cheung CL, Xu KM, Duan L, Huang K, Qin K, Leung YH, Wu WL, Lu HR, Chen Y, Xia NS, Naipospos TS, Yuen KY, Has-san SS, Bahri S, Nguyen TD, Webster RG, Peiris JS, Guan Y (2006) Establishment of multiple sublineages of H5N1 influenza virus in Asia: implications for pandemic control. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 2845–2850.
- Choi YK, Nguyen TD, Ozaki H, Webby RJ, Puthavathana P, Buranathai C, Chaisingh A, Auewarakul P, Hanh NT, Ma SK, Hui PY, Guan Y, Peiris JS, Webster RG (2005) Studies of H5N1 influenza virus infection of pigs by using viruses isolated in Vietnam and Thailand in 2004. *Journal of Virology* **79**, 10821–10825.
- Claas EC, Osterhaus AD, van Beek R, De Jong JC, Rimmelzwaan GF, Senne DA, Krauss S, Shortridge KF, Webster RG (1998) Human influenza A H5N1 virus related to a highly pathogenic avian influenza virus. *Lancet* **351**, 472–477.
- Duke K (2006) Germany says people in areas with bird flu should keep cats indoors. *British Medical Journal* **332**, 568.
- Enserink M, Kaiser J (2004) Virology. Avian flu finds new mammal hosts. *Science* **305**, 1385.
- Fouchier RA, Munster V, Wallensten A, Bestebroer TM, Herfst S, Smith D, Rimmelzwaan GF, Olsen B, Osterhaus AD (2005) Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls. *Journal of Virology* **79**, 2814–2822.
- Gao P, Watanabe S, Ito T, Goto H, Wells K, McGregor M, Cooley AJ, Kawaoka Y (1999) Biological heterogeneity, including systemic replication in mice, of H5N1 influenza A virus isolates from humans in Hong Kong. *Journal of Virology* **73**, 3184–3189.
- Gao YW, Xia XZ, Wang LG, Liu D, Huang G (2006) Construction and experimental immunity of recombinant replication-competent canine adenovirus type 2 expressing hemagglutinin gene of H5N1 subtype tiger influenza virus. *Wei Sheng Wu Xue Bao (Acta Microbiologica Sinica)* **46**, 297–300.
- Giese M, Harder TC, Teifke JP, Klopfeisch R, Breithaupt A, Mettenleiter TC, Vahlenkamp TW (2008) Experimental infection and natural contact exposure of dogs with avian influenza virus (H5N1). *Emerging Infectious Diseases* **14**, 308–310.
- Govorkova EA, Rehng JE, Krauss S, Yen HL, Guan Y, Peiris M, Nguyen TD, Hanh TH, Puthavathana P, Long HT, Buranathai C, Lim W, Webster RG, Hoffmann E (2005) Lethality to ferrets of H5N1 influenza viruses isolated from humans and poultry in 2004. *Journal of Virology* **79**, 2191–2198.
- Govorkova EA, Ilyushina NA, Boltz DA, Douglas A, Yilmaz N, Webster RG (2007) Efficacy of oseltamivir therapy in ferrets inoculated with different clades of H5N1 influenza virus. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **51**, 1414–1424.
- Hinshaw VS, Webster RG, Easterday BC, Bean WJ (1981) Replication of avian influenza A viruses in mammals. *Infection and Immunity* **34**, 354–361.
- Hurt AC, Selleck P, Komadina N, Shaw R, Brown L, Barr IG (2007) Susceptibility of highly pathogenic A (H5N1) avian influenza viruses to the neuraminidase inhibitors and adamantanes. *Antiviral Research* **73**, 228–231.
- Karaca K, Swayne DE, Grosenbaugh D, Bublöt M, Robles A, Spackman E, Nordgren R (2005) Immunogenicity of fowlpox virus expressing the avian influenza virus H5 gene (TROVAC AIV-H5) in cats. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* **12**, 1340–1342.
- Keawcharoen J, Oraveerakul K, Kuiken T, Fouchier RA, Amonsin A, Payungporn S, Noppornpanth S, Wattanodorn S, Theamboonlers A, Tantilertcharoen R, Pattanarangsarn R, Arya N, Ratanakorn P, Osterhaus AD, Poovorawan Y (2004) Avian influenza H5N1 in tigers and leopards. *Emerging Infectious Diseases* **10**, 2189–2191.
- Klopfeisch R, Wolf PU, Uhl W, Gerst S, Harder T, Starick E, Vahlenkamp TW, Mettenleiter TC, Teifke JP (2007a) Distribution of lesions and antigen of highly pathogenic avian influenza virus A/Swan/Germany/R65/06 (H5N1) in domestic cats after presumptive infection by wild birds. *Veterinary Pathology* **44**, 261–268.
- Klopfeisch R, Wolf PU, Wolf C, Harder T, Starick E, Niebuhr M, Mettenleiter TC, Teifke JP (2007b) Encephalitis in a stone marten (*Martes foina*) after natural infection with highly pathogenic avian influenza virus subtype H5N1. *Journal of Comparative Pathology* **137**, 155–159.
- Kuiken T, Rimmelzwaan GF, Van Amerongen G, Osterhaus AD (2003) Pathology of human influenza A (H5N1) virus infection in cynomolgus macaques (*Macaca fascicularis*). *Veterinary Pathology* **40**, 304–310.
- Kuiken T, Rimmelzwaan GF, Van Riel D, Van Amerongen G, Baars M, Fouchier RA, Osterhaus AD (2004) Avian H5N1 influenza in cats. *Science* **306**, 241.
- Kuiken T, Fouchier RA, Rimmelzwaan GF, Osterhaus AD, Roder P (2006) Feline friend or potential foe? *Nature* **440**, 741–742.
- Leneva IA, Roberts N, Govorkova EA, Goloubeva OG, Webster RG (2000) The neuraminidase inhibitor GS4104 (oseltamivir phosphate) is efficacious against A/Hong Kong/156/97 (H5N1) and A/Hong Kong/1074/99 (H9N2) influenza viruses. *Antiviral Research* **48**, 101–115.
- Leschnik M, Weikel J, Möstl K, Revilla-Fernández S, Wodak E, Bagó Z, Vanek E, Benetka V, Hess M, Thalhammer JG (2007) Subclinical infection with avian influenza A (H5N1) virus in cats. *Emerging Infectious Diseases* **13**, 243–247.
- Li KS, Guan Y, Wang J, Smith GJ, Xu KM, Duan L, Rahardjo AP, Puthavathana P, Buranathai C, Nguyen TD, Estoepan-gestie AT, Chaisingh A, Auewarakul P, Long HT, Hanh NT, Webby RJ, Poon LL, Chen H, Shortridge KF, Yuen KY, Webster RG, Peiris JS (2004) Genesis of a highly pathogenic and potentially pandemic H5N1 influenza virus in eastern Asia. *Nature* **430**, 209–213.
- Mackenzie D (2007) Deadly H5N1 may be brewing in cats. *New Scientist*, 6–7.
- Marschall J, Schulz B, Harder TC, Vahlenkamp TW, Huebner J, Huisinga E, Hartmann K (2008) Prevalence of influenza A H5N1 virus in cats from areas with occurrence of highly

Avian influenza in cats

365

- pathogenic avian influenza in birds. *Journal of Feline Medicine and Surgery* **10**, 355–358.
- Paniker CK, Nair CM (1970) Infection with A2 Hong Kong influenza virus in domestic cats. *Bulletin of the World Health Organization* **43**, 859–862.
- Paniker CK, Nair CM (1972) Experimental infection of animals with influenza virus types A and B. *Bulletin of the World Health Organization* **47**, 461–463.
- Perkins LE, Swayne DE (2001) Pathobiology of A/chicken/Hong Kong/220/97 (H5N1) avian influenza virus in seven gallinaceous species. *Veterinary Pathology* **38**, 149–164.
- ProMED-mail. (2004a) Avian influenza – Eastern Asia (24), leopard dies from bird flu in Thailand (archive number 20040213.0480). Available from: <http://www.promedmail.org/pls/promed/f?p=2400:1202:15537594326872449532::NO::F2400_P1202_CHECK_DISPLAY,F2400_P1202_PUB_MAIL_ID:X,24455>.
- ProMED-mail. (2004b) Avian influenza H5N1, mammals– East Asia (archive number 20040221.0560). Available from: <http://www.promedmail.org/pls/promed/f?p=2400:1001::NO::F2400_P1001_BACK_PAGE,F2400_P1001_PUB_MAIL_ID:1000%2C24549>.
- Rimmelzwaan GF, Kuiken T, Van Amerongen G, Bestebroer TM, Fouchier RA, Osterhaus AD (2001) Pathogenesis of influenza A (H5N1) virus infection in a primate model. *Journal of Virology* **75**, 6687–6691.
- Rimmelzwaan GF, Van Riel D, Baars M, Bestebroer TM, Van Amerongen G, Fouchier RA, Osterhaus AD, Kuiken T (2006) Influenza A virus (H5N1) infection in cats causes systemic disease with potential novel routes of virus spread within and between hosts. *American Journal of Pathology* **168**, 176–183.
- Robertson SL, Bell DJ, Smith GJ, Nicholls JM, Chan KH, Nguyen DT, Tran PQ, Streicher U, Poon LL, Chen H, Horby P, Guardo M, Guan Y, Peiris JS (2006) Avian influenza H5N1 in viverrids: implications for wildlife health and conservation. *Proceedings Biological Sciences/The Royal Society* **273**, 1729–1732.
- Salzberg SL, Kingsford C, Cattoli G, Spiro DJ, Janies DA, Mehrez Aly M, Brown IH, Couacy-Hymann E, De Mia DM, Dung DH, Guercio A, Joannis T, Maken Ali AS, Osmani A, Padalino I, Saad MD, Savić V, Sengamalay NA, Yingst SL, Zaborsky J, Zorman-Rojs O, Ghedin E, Capua I (2007) Genome analysis linking recent European and African influenza (H5N1) viruses. *Emerging Infectious Diseases* **13**, 713–718.
- Schunemann HJ, Hill SR, Kakad M, Bellamy R, Uyeki TM, Hayden FG, Yazdanpanah Y, Beigel J, Chotpitayasonndh T, Del Mar C, Farrar J, Tran TH, Ozbay B, Sugaya N, Fukuda K, Shindo N, Stockman L, Vist GE, Croisier A, Nagjdaliyev A, Roth C, Thomson G, Zucker H, Oxman AD (2007) WHO Rapid Advice Guidelines for pharmacological management of sporadic human infection with avian influenza A (H5N1) virus. *Lancet Infectious Diseases* **7**, 21–31.
- Songserm T, Amonsin A, Jam-on R, Sae-Heng N, Meemak N, Pariyothorn N, Payungporn S, Theamboonlers A, Poovorawan Y (2006a) Avian influenza H5N1 in naturally infected domestic cat. *Emerging Infectious Diseases* **12**, 681–683.
- Songserm T, Amonsin A, Jam-on R, Sae-Heng N, Pariyothorn N, Payungporn S, Theamboonlers A, Chutinimitkul S, Thanawongnuwech R, Poovorawan Y (2006b) Fatal avian influenza A H5N1 in a dog. *Emerging Infectious Diseases* **12**, 1744–1747.
- Subbarao K, Klimov A, Katz J, Regnery H, Lim W, Hall H, Perdue M, Swayne D, Bender C, Huang J, Hemphill M, Rowe T, Shaw M, Xu X, Fukuda K, Cox N (1998) Characterization of an avian influenza A (H5N1) virus isolated from a child with a fatal respiratory illness. *Science* **279**, 393–396.
- Thanawongnuwech R, Amonsin A, Tantilertcharoen R, Damrongwatanapokin S, Theamboonlers A, Payungporn S, Nanthapornphiphat K, Ratanamungklanon S, Tunak E, Songserm T, Vivatthanavanich V, Lekdumrongsak T, Kesdangsakonwut S, Tunhikorn S, Poovorawan Y (2005) Probable tiger-to-tiger transmission of avian influenza H5N1. *Emerging Infectious Diseases* **11**, 699–701.
- Thiry E, Zicola A, Addie D, Egberink H, Hartmann K, Lutz H, Poulet H, Horzinek MC (2007) Highly pathogenic avian influenza H5N1 virus in cats and other carnivores. *Veterinary Microbiology* **122**, 25–31.
- Tran TH, Nguyen TL, Nguyen TD, Luong TS, Pham PM, Nguyen VC, Pham TS, Vo CD, Le TQ, Ngo TT, Dao BK, Le PP, Nguyen TT, Hoang TL, Cao VT, Le TG, Nguyen DT, Le HN, Nguyen KT, Le HS, Le VT, Christiane D, Tran TT, Menno de J, Schultz C, Cheng P, Lim W, Horby P, Farrar J (2004) Avian influenza A (H5N1) in 10 patients in Vietnam. *New England Journal of Medicine* **350**, 1179–1188.
- Vahlenkamp TW, Harder TC (2006) Influenza virus infections in mammals. *Berliner und Muenchener tierärztliche Wochenschrift* **119**, 123–131.
- Van Riel D, Munster VJ, De Wit E, Rimmelzwaan GF, Fouchier RA, Osterhaus AD, Kuiken T (2006) H5N1 virus attachment to lower respiratory tract. *Science* **312**, 399.
- Weber S, Harder T, Starick E, Beer M, Werner O, Hoffmann B, Mettenleiter TC, Mundt E (2007) Molecular analysis of highly pathogenic avian influenza virus of subtype H5N1 isolated from wild birds and mammals in northern Germany. *Journal of General Virology* **88**, 554–558.
- Webster RG, Bean WJ, Gorman OT, Chambers TM, Kawaoka Y (1992) Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiological Reviews* **56**, 152–179.
- Webster RG, Guan Y, Peiris M, Walker D, Krauss S, Zhou NN, Covorkova EA, Ellis TM, Dyrting KC, Sit T, Perez DR, Shortridge KF (2002) Characterization of H5N1 influenza viruses that continue to circulate in geese in southeastern China. *Journal of Virology* **76**, 118–126.
- World Health Organization. (2007) Areas reporting confirmed occurrence of H5N1 avian influenza in poultry and wild birds since 2003. Available from: <http://gamapserv.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Global_SubNat_H5N1inAnimalConfirmedCUMULATIVE_20070717.png>.
- World Health Organization Global Influenza Program Surveillance Network. (2005) Evolution of H5N1 avian influenza viruses in Asia. *Emerging Infectious Diseases* **11**, 1515–1521.
- Xu X, Subbarao, Cox NJ, Guo Y (1999) Genetic characterization of the pathogenic influenza A/Goose/Guangdong/1/96 (H5N1) virus: similarity of its hemagglutinin gene to those of H5N1 viruses from the 1997 outbreaks in Hong Kong. *Virology* **261**, 15–19.
- Yingst SL, Saad MD, Felt SA (2006) Qinghai-like H5N1 from domestic cats, northern Iraq. *Emerging Infectious Diseases* **12**, 1295–1297.
- Zitzow LA, Rowe T, Morken T, Shieh WJ, Zaki S, Katz JM (2002) Pathogenesis of avian influenza A (H5N1) viruses in ferrets. *Journal of Virology* **76**, 4420–4429.

VI Diskussion

1 Ziel der Studie

Da Katzen eng mit dem Menschen zusammenleben, stellt sich bei ihnen besonders die Frage, welche Rolle sie in der Epidemiologie des HPAIV H5N1 spielen. Um Hinweise dafür zu bekommen, ob Katzen Virus auf den Menschen übertragen können, ob sie eine Rolle in der Anpassung des H5N1-Virus an Säugetiere spielen, ob Katzen in Gebieten mit Fällen von Geflügelpest bei Wildvögeln selbst einer Gefahr ausgesetzt sind oder ob sie eine Gefahr für Nutzgeflügelbestände darstellen, müssen folgende Fragestellungen beantwortet werden.

Wieviel Prozent der Katzen in Gebieten mit hochpathogener aviärer Influenza bei Wildvögeln scheiden H5N1-Virus aus oder besitzen Antikörper dagegen? Wie hoch ist bei Katzen mit verdächtigen Symptomen der Anteil, der Antikörper besitzt oder Virus ausscheidet? Gibt es Katzen, die nur Virus ausscheiden oder Antikörper bilden, ohne Symptome zu zeigen? Gibt es Katzen mit positivem Virusnachweis, die keine Antikörper gegen H5N1 bilden?

Ein gezielter Erregernachweis ist bei HPAIV H5N1 nur in Speziallabors durchführbar. Bei Vorliegen eines Verdachts auf HPAIV H5N1 bei einer Katze wäre es daher sinnvoll, wenn der behandelnde Tierarzt mittels Schnelltest bereits vor Ort einen Anhaltspunkt erhalten könnte, ob eine H5N1-Infektion vorliegt, um gegebenenfalls sofortige Schutz- und Quarantänemaßnahmen einleiten zu können. Also stellt sich die Frage, ob H5N1-Virus bei der Katze mittels Schnelltest aus Rachentupfern zuverlässig nachgewiesen werden kann.

Ziele der vorliegenden Arbeit waren daher die Ermittlung der Prävalenz von aviärem Influenzavirus des Subtyps H5N1 und der Prävalenz von Antikörpern bei Katzen aus Geflügelpest-Restriktionszonen und bei Katzen mit verdächtigen Symptomen sowie die Bestimmung eines Zusammenhangs von Erregernachweis, Antikörpernachweis und klinischer Symptomatik. Des Weiteren sollten Sensitivität und Spezifität eines humanen Influenza-Schnelltests für die H5N1-Diagnostik bei Katzen evaluiert werden.

In der vorliegenden Studie konnten keine Hinweise auf eine Infektion von Katzen mit H5N1-Viren, selbst bei Freiläufern, gefunden werden. Weder Katzen mit influenzaähnlichen Symptomen noch asymptomatische Katzen schieden H5N1-Virus aus oder besaßen Antikörper.

2 Probensammelgebiete

Der Großteil der Proben (157/171) wurde in Bayern, Deutschland, gesammelt (siehe Abbildung 1). Bayern ist das Bundesland mit der höchsten Gesamtzahl verendeter Vögel (Hausgeflügel und Wildvögel) und nach Sachsen-Anhalt und Mecklenburg-Vorpommern das Bundesland mit der drittgrößten Zahl HPAIV-H5N1-positiver Wildvögelfunde in Deutschland. Bisher wurden in Bayern 92 infizierte Wildvögel gefunden, und in zwei Geflügel haltenden Betrieben traten Fälle hochpathogener aviärer Influenza H5N1 auf (Stand 29.03.2008) (FRIEDRICH-LOEFFLER-INSTITUT, 2007, 2008).

Gemäß Geflügelpest-Verordnung wurden um die Fundorte HPAIV-H5N1-infizierter Vögel Geflügelpest-Restriktionsgebiete eingerichtet. Sperrbezirke mit einem 3-km-Radius um den Fundort wurden für die Dauer von 21 Tagen festgelegt; Beobachtungsgebiete hatten einen Radius von 10 km um den Fundort und blieben 30 Tage nach Feststellung der Infektion bestehen (§§ 15 und 16 Geflügelpest-Verordnung³).

Die Proben von 62 (62/171) Katzen stammen aus dem Landkreis Landsberg am Lech. Im Zeitraum von Februar bis Mai 2006 waren dort fünf mit HPAIV infizierte Wildvögel gefunden worden. Die Probennahme erfolgte in dem Sperrbezirk und Beobachtungsgebiet, welche nach dem Fund eines Gänsesägers (*Mergus merganser*) in Kaufering im Mai 2006 eingerichtet worden waren. Teile des Beobachtungsgebiets, in denen Proben gesammelt wurden, hatten bei früheren Funden zusätzlich zu Sperrbezirken gehört. Sechsenddreißig Proben (36/171) stammen aus dem Gebiet um den Ismaninger Speichersee im Landkreis München. Dort waren nach dem Fund dreier mit HPAIV infizierter Taucherenten (*Aythya*) im August 2007 ein Sperrbezirk und Beobachtungsgebiet eingerichtet worden. Proben von 34 (34/171) Katzen stammen aus Nürnberg. Im Juni und Juli 2007 wurden bei einem Ausbruch von HPAIV H5N1 an zwei Nürnberger Seen 13 Höckerschwäne (*Cygnus olor*), eine Kanadagans (*Branta canadensis*), eine Graugans (*Anser anser*) und eine Stockente (*Anas platyrhynchos*) gefunden.

³ Verordnung zum Schutz gegen die Geflügelpest und die Newcastle-Krankheit (Geflügelpest-Verordnung) vom 20. Dezember 2005 (BGBl. 2005, I Nr. 74 S. 3538-46).

Im Sperrbezirk müssen Katzen laut Gesetz eigentlich im Haus gehalten werden (§ 5 Absatz 3 Wildvogel-Geflügelpestschutzverordnung⁴). Alle Katzen in dieser Studie wurden dennoch weiterhin von ihren Besitzern ins Freie gelassen, sodass sie einem erhöhten Risiko ausgesetzt waren.

Katzen aus der Gruppe der Tiere mit nur respiratorischen Symptomen stammten nicht unmittelbar aus einem Geflügelpest-Restriktionsgebiet. Sie lebten aber im Umkreis von maximal 100 km von Gebieten, in denen bereits vorher Geflügelpest-Fälle aufgetreten waren oder später auftraten.

⁴ Verordnung über Schutzmaßnahmen beim Auftreten der Geflügelpest bei einem wildlebenden Vogel (Wildvogel-Geflügelpestschutzverordnung) vom 8. September 2006 (eBAnz. 2006, AT 48 V1), geändert durch Artikel 2 und 3 der Verordnung vom 24. November 2006 (BGBl. 2006, I Nr. 54 S. 2663).

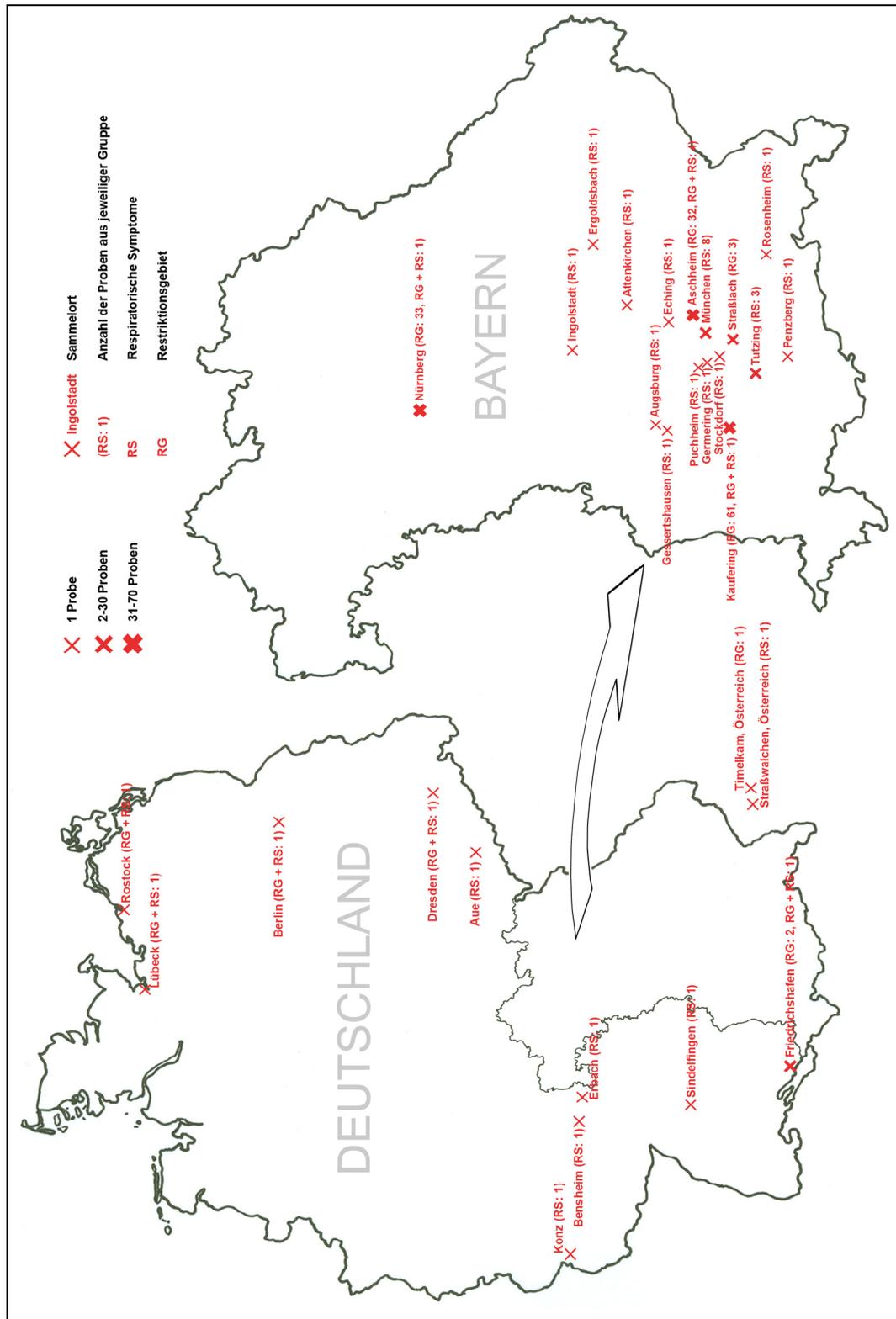


Abbildung 1: Überblick über Probensammelorte in Deutschland und Bayern

3 Prävalenz

Bei den Katzen, die in die vorliegende Studie eingeschlossen wurden, lag die Prävalenz von H5N1-Viren (171/171 Katzen negativ) und von Antikörpern (118/118 Katzen negativ) bei 0 %. Bezogen auf die Gesamtpopulation der Freiläuferkatzen in Deutschland kann damit die statistische Aussage gemacht werden, dass die Prävalenz von H5N1-Viren mit 95 %iger Wahrscheinlichkeit unter 1,8 % liegt. Die Antikörperprävalenz liegt mit 95 %iger Wahrscheinlichkeit unter 2,6 %. Aufgrund der relativ niedrigen Anzahl von Proben, ist das 95 %-Konfidenzintervall relativ groß. Bei einer höheren Probenzahl hätte der statistische Wert der Prävalenzen noch näher eingegrenzt werden können.

Das Fehlen von Antikörpern gegen H5N1 steht im Gegensatz zu Berichten aus Asien, in denen von hohen Antikörperprävalenzen (7 % und 20 %) bei Katzen in Thailand bzw. Indonesien die Rede war (BUTLER, 2006; MACKENZIE, 2007; PROMED-MAIL, 2007). Leider sind diese Berichte bislang nicht bestätigt, und es fehlen zuverlässige Angaben über den klinischen Zustand der Tiere.

Da die Ergebnisse bislang nicht überprüft wurden, muss in Betracht gezogen werden, dass die Zahlen aus Asien fälschlicherweise zu hoch sind. Es existiert kein Hinweis auf die angewendeten Methoden der Untersuchungen in Thailand und Indonesien. Bei Verwendung von Agar-Gel-Immundiffusionstest oder ELISA werden auch Antikörper gegen andere Influenza-A-Subtypen miterfasst, beim HAH-Test kann Testserum anderer Tierarten Hühnererythrozyten unspezifisch agglutinieren (ALEXANDER, 2004). Eine Tatsache, die nicht zu den hohen Prozentzahlen antikörper-positiver Katzen in Asien passt, besteht darin, dass nicht auch mehr Funde von an H5N1 verendeten Katzen im selben Gebiet bekannt wurden. Andererseits kann die hohe Antikörperprävalenz in Asien aber auch dafür sprechen, dass Katzen empfänglich sind, aber häufig nicht erkranken, sondern nur subklinisch infiziert werden. Laut Osterhaus wäre es aber ebenso denkbar, dass die in Thailand und Vietnam bestimmten Prävalenzen falsch niedrig sind und die eigentliche Zahl noch höher liegt, da erkrankte und an der Infektion gestorbene Tiere in den Untersuchungen nicht berücksichtigt sind (MACKENZIE, 2007; PROMED-MAIL, 2007).

Der Unterschied zwischen den Berichten aus Asien und der hier festgestellten Antikörperprävalenz kann aber auch durch ungleiche Seuchensituationen bedingt sein. Während in Südost-Asien sehr viele Vögel betroffen waren, und ein enger

Kontakt mit freilaufendem Hausgeflügel bestand (TIENSIN et al., 2005), waren in Europa weniger Vögel infiziert; zumeist handelte es sich um wildlebende Wasservögel (METTENLEITER, 2007). Bei den hier untersuchten Katzen handelte es sich in der Mehrheit um als Haustiere gehaltene Katzen, die nicht auf Wildtiere als Futterquelle angewiesen sind. Daher ergibt sich eine geringere Expositionsgefahr gegenüber H5N1-Viren und ein niedrigerer Infektionsdruck.

Denkbar wäre auch, dass die in Asien zirkulierenden H5N1-Stämme eine höhere Pathogenität für Säugetiere aufweisen als die in Europa isolierten Stämme. Dagegen spricht, dass vor allem Stämme der in Europa zirkulierenden EMA-Linie (European-Middle Eastern-African lineage) Aminosäuresequenzen aufweisen, die mit erhöhter Säugerpathogenität in Verbindung gebracht werden (SALZBERG et al., 2007). EMA-H5N1-Viren stammen von Vorläufern, die die 627K-Mutation am PB2-Protein besitzen, und tatsächlich traf die Ausbreitung der EMA-Stämme mit dem rasanten Auftreten von Infektionen bei Säugetieren einschließlich Menschen zusammen (SALZBERG et al., 2007). Beim Menschen scheinen EMA-H5N1-Viren ebenfalls sehr virulent zu sein. Von 72 Fällen außerhalb Asiens verliefen 27 tödlich (38 %) (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2008c) (Stand: 29.03.2008). Außerdem spricht dagegen, dass auch durch EMA-H5N1-Viren Infektionen bei Katzen mit tödlichem Ausgang ausgelöst wurden, ohne dass Hinweise auf eine Immunsuppression dieser Katzen durch Vorerkrankungen bestanden (YINGST et al., 2006; KLOPFLEISCH et al., 2007b). Um dies allerdings genauer klären zu können, wären experimentelle Infektionsversuche nötig.

In einer italienischen Studie wurden bei Katzen aus der Gegend von Mailand zwischen 1999 und 2005 ebenfalls keine Antikörper gegen Influenza-A-Viren (weder gegen H5N1 noch gegen andere Subtypen) nachgewiesen (PALTRINIERI et al., 2007). Allerdings waren in diesem Gebiet keine Fälle aviärer Influenza bei Vögeln aufgetreten, so dass die Wahrscheinlichkeit eines Vorkommens von Antikörpern gegen H5N1-Viren viel geringer war als in der vorliegenden Studie.

Sowohl bei Katzen mit influenzaverdächtigen Symptomen als auch bei Katzen ohne respiratorische Symptome konnte in dieser Studie keine Virusausscheidung nachgewiesen werden. Obwohl bei der Katze vorrangig die unteren Atemwege bei einer H5N1-Infektion betroffen sind und somit im oberen Respirationstrakt nur eine geringe Virusreplikation stattfindet, ist die Untersuchung oropharyngealer Abstrichtupferproben eine gut geeignete Methode zum Nachweis von HPAIV

H5N1 mittels Real-Time-Reverser-Transkriptase-PCR (RRT-PCR) (KLOPFLEISCH et al., 2007b). Sowohl bei experimentell als auch bei natürlich infizierten Katzen sowie bei subklinisch infizierten Katzen wurde in verschiedenen Studien mittels Rachtupfer eine H5N1-Virusausscheidung nachgewiesen (KUIKEN et al., 2004; KLOPFLEISCH et al., 2007b; LESCHNIK et al., 2007) und die Proben zeigten zum Teil erhebliche Virusmengen (KLOPFLEISCH et al., 2007b). KLOPFLEISCH und Mitarbeiter (2007b) vermuten, dass aufgehusteter Bronchialschleim mit Zellbestandteilen für die oronasale Virusausscheidung verantwortlich ist.

Bei den Katzen dieser Studie mit influenzaverdächtigen Symptomen konnten zumeist nachträglich andere Ursachen für die Symptomatik gefunden werden. Infektiöse Ursachen umfassten Thoraxerguss aufgrund feliner infektiöser Peritonitis, Pyothorax, bakterielle Bronchopneumonie, Katzenschnupfen, Streptokokken-Rhinitis, Verdacht auf Infektion mit hochpathogenen Caliciviren und Toxoplasmenpneumonie. Primär nicht-infektiöse Ursachen beinhalteten felines Asthma, Pneumothorax, Aspirationspneumonie, Fremdkörper oder Neoplasie im Nasopharynx bzw. am Larynx. Die Studie zeigt also, dass die Wahrscheinlichkeit des Vorliegens einer H5N1-Infektion bei Katzen mit akuten respiratorischen Symptomen gering ist. Eine Infektion mit H5N1-Viren sollte zwar weiterhin als Differentialdiagnose bei akuten respiratorischen Symptomen bei Katzen in Betracht gezogen werden, kann jedoch bei der momentan vorliegenden Seuchensituation weiter hinten angestellt werden.

Bisherige Untersuchungen subklinisch infizierter Katzen haben gezeigt, dass diese Katzen nur über einen kurzen Zeitraum Virus ausschieden (LESCHNIK et al., 2007). Falls bei den untersuchten Katzen subklinisch infizierte Tiere dabei waren, ist es möglich, dass bei der Probenentnahme der Zeitraum der Virusausscheidung verpasst wurde. Da die Katzen aber außerdem antikörper-negativ waren, ist es unwahrscheinlich, dass subklinische Infektionen vorgelegen haben. Allerdings entwickelte in der Studie von LESCHNIK und Mitarbeitern (2007) eine Katze, die Virus ausgeschieden hatte, bis zur letzten Untersuchung am Tag 36 *p. i.* keine Antikörper. Eine andere Erklärung wäre, dass der Zeitraum der Probenentnahme – die Proben wurden gesammelt während des Status des Gebiets als Beobachtungsgebiet, also bis 30 Tage nach dem letzten Fund eines H5N1-positiven Vogels – zu früh war. In einer Studie wies eine experimentell infizierte Katze (1/4) am Tag 14 *p. i.* noch keine Antikörper auf, sondern erst bei erneuter

Untersuchung am Tag 21 (VAHLENKAMP et al., 2008). Trotz allem ist es jedoch am wahrscheinlichsten, dass keine der Katzen infiziert war.

4 Schnelltest

Der untersuchte Influenza-Schnelltest actimTM Influenza A&B (Medix Biochemica, Kauniainen, Finnland) (siehe Abbildung 2) wurde für die Influenzadiagnostik beim Menschen entwickelt. Er wird von der Herstellerfirma kommerziell zum Nachweis von Influenza A H5N1 beim Menschen und auch beim Tier angeboten, ohne dass jedoch Studien zu seiner Sensitivität und Spezifität vorliegen. Aufgrund der großen Nachfrage werden humanmedizinische Influenza-Schnelltests auch für die Diagnostik von Influenzavirusinfektionen beim Tier angeboten, deren Aussagekraft bei Katzen nicht bekannt ist. Virusisolation und H5N1-PCR sind Speziallabors vorbehalten. Sie benötigen Zeit bis zum Vorliegen des Testergebnisses und erfordern höchste Sicherheitsstandards und Fachkenntnis. Daher wäre es sehr vorteilhaft, wenn der Tierarzt, der mit einer verdächtigen Katze konfrontiert ist, mittels eines Schnelltests vor Ort erste Hinweise bekommen könnte, wie mit der Katze weiter verfahren werden sollte.

Aufgrund der Tatsache, dass der Test ein hochkonserviertes Antigen (NP) nachweist, welches bei allen Influenza-A-Viren (und somit auch bei Influenza A H5N1) vorhanden ist, und der Tatsache, dass bei Katzen H5N1-Virus in Rachentupfern nachweisbar ist (KUIKEN et al., 2004; RIMMELZWAAN et al., 2006; KLOPFLEISCH et al., 2007b; LESCHNIK et al., 2007), ist theoretisch davon auszugehen, dass der Schnelltest auch bei Katzen funktionieren müsste. Beim Menschen scheinen Influenza-Antigen-Schnelltests für den Nachweis von H5N1 aber weniger sensitiv zu sein als für humane Subtypen (TRAN et al., 2004; BEIGEL et al., 2005). Um die Einsetzbarkeit in der Tiermedizin besser beurteilen zu können, sollten daher in dieser Studie Sensitivität und Spezifität des Schnelltests actimTM Influenza A&B im Vergleich zum Virusnachweis durch PCR evaluiert werden.

Die ermittelte hohe Spezifität von > 97,4 % stimmt mit den Herstellerangaben für die Spezifität beim Nachweis von humanen Influenzaviren beim Menschen überein (STUCHBERY et al., 2005). Aufgrund der niedrigen Sensitivität von < 28,4 % (0 % in der untersuchten Stichprobe), ist dieser Antigen-Schnelltest allerdings nicht für die Diagnostik von H5N1-Infektionen bei Katzen einsetzbar.

Weshalb die Sensitivität des Tests zum Nachweis von H5N1 bei der Katze deutlich schlechter ist, als zur Diagnose humaner Influenzavirusinfektionen (Sensitivität von 87 %–95 %) (STUCHBERY et al., 2005), ist schwer zu sagen. Eine Möglichkeit wäre, dass die ausgeschiedene Virusmenge bei Katzen zu gering ist. Der Test ist sicherlich nicht für Screening-Untersuchungen asymptomatischer Katzen geeignet, da diese nur geringe Virusmengen ausscheiden (VAHLENKAMP et al., 2008). Für den Nachweis humaner H3- und H1-Subtypen wird der Schwellenwert des Tests vom Hersteller allerdings mit einer Konzentration von 1×10^4 TCID₅₀/ml angegeben. Einige der untersuchten Katzen-Proben wiesen Virustiter von 10^5 TCID₅₀/ml auf.

Ein Nachteil der Studie ist, dass die Proben der experimentell infizierten Katzen vor der Durchführung des Schnelltests bei -20 °C eingefroren waren. In einer Validierung des Tests durch das World Health Organization Collaborating Centre for Virus Reference and Research, National Influenza Centre, Lyon, Frankreich, wurden allerdings auch tiefgefrorene Proben (-80 °C für einen Monat bzw. -20 °C für einige Tage) untersucht, welche trotzdem positiv waren (LINA & VALETTE, 2005). Ein Problem des Schnelltests, auf das auch der Hersteller hinweist, liegt darin, dass die Probenmenge bei unvollständig benetzten Tupfern zu gering sein kann. Diese Schwierigkeit ist aber kaum zu beheben, da Katzen häufig nur geringe Mengen an Speichelflüssigkeit aufweisen, und Nasenspülproben oder gar bronchoalveoläre Lavage bei Katzen in der Praxis nicht durchführbar sind, so dass Virusisolation oder PCR die diagnostischen Mittel der Wahl bleiben. Sollte man dennoch mit einem positiven Testergebnis konfrontiert sein, so ist dies auf jeden Fall Anlass zur Ergreifung von Vorsichtsmaßnahmen im Umgang mit der Katze und zu weiterer Diagnostik, da falsch positive Ergebnisse sehr unwahrscheinlich sind.



Abbildung 2: Influenza Schnelltest actim™ Influenza A & B (Medix Biochemica, Kauniainen, Finnland), negatives Testergebnis (unterer Teststreifen), Positivkontrolle (oberer Teststreifen)

5 Limitationen der Studie

Ursprünglich war die Studienplanung so angelegt, dass neben der Bestimmung der Prävalenz von H5N1-Viren und Antikörpern und der Evaluierung des Influenza-Schnelltests noch weitere Untersuchungen zu klinischen und labordiagnostischen Befunden bei Katzen mit HPAIV-H5N1-Infektion und zum Zusammenhang von Erregerausscheidung, Antikörpernachweis und klinischer Symptomatik durchgeführt werden sollten. Aufgrund der ausschließlich negativen Befunde bei den untersuchten Feldkatzen konnte dieser Teil der Studie nicht verwirklicht werden.

Wünschenswert wäre außerdem eine noch größere Anzahl an untersuchten Proben gewesen, da damit die statistischen Aussagen über die Prävalenzen noch genauer eingrenzbar gewesen wären. Da allerdings im Zeitraum zwischen Juni 2006 und Juni 2007 (mit Ausnahme eines Sperrbezirks im August/September 2006) keine Geflügelpest-Sperrbezirke in Deutschland bestanden, und aufgrund der engen Einschlusskriterien, konnten nicht mehr Proben gewonnen werden.

6 Relevanz der Studie

Trotz der begrenzten Anzahl an Proben leisten die Ergebnisse der Studie einen wichtigen Beitrag zum bislang sehr limitierten Wissen über Infektionen mit HPAIV H5N1 bei Katzen. Die vorliegende Arbeit ist die bisher einzige, in der eine Prävalenz von Influenzaviren bei Katzen in Gebieten mit nachgewiesenem Vorkommen von HPAIV H5N1 untersucht wurde.

Beim Auftreten der ersten Fälle hochpathogener aviärer Influenza in Deutschland war die Verunsicherung bei Katzenhaltern und Tierärzten groß. Als auf der Insel Rügen mit HPAIV H5N1 infizierte Katzen gefunden wurden, wurden viele Katzen von ihren Besitzern in Tierheimen abgegeben (WESSEL, 2006).

7 Vorgehen im Verdachtsfall

Auch wenn die Wahrscheinlichkeit gering ist, sollte ein Verdacht auf Vorliegen einer HPAIV-H5N1-Infektion geäußert werden, wenn eine Katze mit den unter Abschnitt II3.3 genannten Symptomen vorgestellt wird, die als Freiläuferkatze Zugang zu Vögeln oder deren Ausscheidungen hat, vor allem dann, wenn sie aus einem Gebiet stammt, in dem bereits Fälle hochpathogener aviärer Influenza H5N1 bei Vögeln aufgetreten sind. In diesem Fall sollten zunächst Vorsichtsmaßnahmen getroffen werden. Die entsprechende Katze sollte isoliert werden, der Kontakt mit ihr auf ein Minimum reduziert werden, und Kontaktpersonen sollten Schutzkleidung tragen.

Widersetzliche Katzen sollten bei der Probennahme sediert werden, um die Gefahr für den Untersucher zu reduzieren und die Gewinnung einwandfreier Proben zu gewährleisten. Ein in-house Influenza-Antigen-Schnelltest kann aufgrund der niedrigen Sensitivität des hier untersuchten Schnelltests nicht empfohlen werden. Wie bereits erwähnt, muss aber bei Vorliegen eines positiven Schnelltest-Ergebnisses dringend mit einer HPAIV-H5N1-Infektion gerechnet werden.

Zur Bestätigung des Verdachts oder zum Ausschluss einer H5N1-Infektion ist bei lebenden Katzen die Entnahme von Rachentupferproben am besten geeignet. Der Nachweis von H5N1-RNA mittels RRT-PCR stellt ein schnelles und zuverlässiges Verfahren dar, eine Virusausscheidung bei der Katze festzustellen.

8 Schlussfolgerungen

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass das Risiko für Katzen, sich mit HPAIV H5N1 zu infizieren, unter epidemiologischen Bedingungen, wie sie bislang in Deutschland vorlagen, sehr gering ist. Katzen scheinen also keine große Rolle in der Verbreitung des Virus und in der Übertragung auf den Menschen zu spielen. Es ist allerdings nicht auszuschließen, dass sich dieser Umstand ändern kann, da Influenzaviren einer ständigen Variabilität unterworfen sind und sie dadurch schnell neue Eigenschaften erlangen können (WEBSTER et al., 1992).

Die Befürchtung von Experten, Katzen könnten HPAIV H5N1 eine Gelegenheit bieten, sich besser an Säugetiere anzupassen und damit die Gefahr der Entstehung einer humanen Influenzapandemie erhöhen (KUIKEN et al., 2004; KUIKEN et al., 2006; RIMMELZWAAN et al., 2006), scheint für die Katzenpopulation Deutschlands nicht zuzutreffen. Dies könnte aber in Asien der Fall sein, da dort Hinweise auf weit verbreitete Infektionen von Katzen bestehen (BUTLER, 2006; MACKENZIE, 2007; PROMED-MAIL, 2007).

Auch wenn das Risiko einer Infektion mit HPAIV H5N1 in Deutschland gering ist, sollte auch in Gegenden mit nur sporadischem Vorkommen von hochpathogener aviärer Influenza bei Wildvögeln ein Kontakt zwischen Katzen und Vögeln dadurch vermieden werden, dass Katzen im Haus gehalten werden. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie können aber dazu beitragen, die Panik bei Katzenhaltern und in der Bevölkerung bei neuen Ausbrüchen hochpathogener aviärer Influenza H5N1 zu mindern.

VII Zusammenfassung

Julia Marschall

Untersuchungen zum Vorkommen aviärer Influenza-A-Viren bei Freiläuferkatzen in Gebieten mit Auftreten hochpathogener aviärer Influenza A H5N1 bei Wildvögeln

Katzen sind sehr empfänglich für Infektionen mit hochpathogenem aviärem Influenzavirus des Subtyps H5N1 (HPAIV H5N1). Bislang ist allerdings nur wenig zur Rolle der Katze bei der Verbreitung des Virus und zur Pathogenese der Infektion bei der Katze, beispielsweise über die Häufigkeit des Vorkommens subklinischer Infektionen, bekannt.

Im ersten Teil der Arbeit (Publikation 1) wurde daher die Prävalenz von aviärem Influenzavirus H5N1 und die Prävalenz von Antikörpern bei Katzen aus Gebieten mit Auftreten von hochpathogener aviärer Influenza A H5N1 bei Vögeln untersucht. Dafür wurden zum einen Freiläuferkatzen aus Influenza-A-H5N1-Restriktionsgebieten in Deutschland und Österreich untersucht. Restriktionsgebiete (jeweils Sperrbezirk und Beobachtungsgebiet) wurden für die Dauer von 30 Tagen im Umkreis von insgesamt 10 km um den Fundort von HPAIV-H5N1-infizierten Vögeln eingerichtet. Zum anderen wurden Freiläuferkatzen mit akuten respiratorischen Symptomen untersucht, die einen Verdacht auf HPAIV-H5N1-Infektion bedingten. Diese Katzen stammten nicht direkt aus einem Restriktionsgebiet, lebten aber maximal 100 km von Gebieten entfernt, in denen bereits vorher Geflügelpest-Fälle aufgetreten waren oder später auftraten.

Bei insgesamt 171 Katzen, davon 132 Katzen aus Restriktionsgebieten, 28 Katzen mit respiratorischen Symptomen und elf Katzen, bei denen beide Kriterien zutrafen, wurden Rachentupfer und Blutproben entnommen und die klinischen Symptome der Tiere erfasst. Die Rachentupfer wurden mittels Real-Time-Reverser-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RRT-PCR) auf das Vorhandensein von Influenza-A-Viren getestet, das Serum wurde mittels Hämagglutinationshemmungstest (HAH-Test) auf das Vorliegen von Antikörpern untersucht.

Im zweiten Teil der Studie (Publikation 2) wurde ein humaner Influenza-Schnelltest, der kommerziell für die H5N1-Diagnostik bei Katzen vertrieben wird,

evaluiert. Hierfür wurden zum einen Proben von 114 Freiläuferkatzen einbezogen, die entweder aus Influenza-A-H5N1-Restriktionsgebieten kamen oder akute respiratorische Symptome zeigten, zum anderen wurden zwölf Rachentupferproben experimentell mit H5N1 (A/cat/Germany/R606/2006) infizierter Katzen untersucht und die Ergebnisse des Antigen-Schnelltests mit den Ergebnissen der PCR verglichen. Die dritte Publikation gibt einen Überblick über feline HPAIV-H5N1-Infektionen mit besonderer Berücksichtigung praktischer Aspekte bei Vorliegen eines Infektionsverdachts bei Katzen.

Alle Proben der untersuchten Feldkatzen waren sowohl in der PCR als auch im Schnelltest negativ. Es bestanden somit keine Hinweise auf eine Infektion, weder klinisch apparent noch inapparent. Ebenso konnten keine Hinweise auf überstandene Infektionen gefunden werden; keine der untersuchten Katzen wies Antikörper auf. Die Prävalenz von HPAIV H5N1 lag somit bei $< 1,8\%$ (mit 95 %iger Sicherheit), die Prävalenz der Antikörper war mit 95 %iger Sicherheit $< 2,6\%$.

Von den zwölf in die Studie einbezogenen experimentell infizierten Katzen zeigten in der PCR neun Proben ein positives und drei ein negatives Ergebnis. Bei allen zwölf Tupferproben verlief der Antigen-Schnelltest negativ. Bei allen in der PCR negativen Feldkatzen verlief der Schnelltest ebenfalls negativ. Die Spezifität des Schnelltests lag somit mit 95 %iger Wahrscheinlichkeit bei $> 97,4\%$, die Sensitivität lag lediglich bei $< 28,4\%$ (95 %-Konfidenzintervall: 0,0000-0,2831).

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass das Risiko einer Infektion mit HPAIV H5N1 für Katzen unter Bedingungen wie sie bislang in Deutschland und Österreich vorlagen sehr gering ist. Katzen scheinen somit keine große Rolle in der Verbreitung des Virus und in der Übertragung auf den Menschen zu spielen. Zwar sollten weiterhin Vorsichtsmaßnahmen eingehalten werden und Katzen in Restriktionsgebieten im Haus gehalten werden; die Ergebnisse dieser Arbeit tragen aber dazu bei, die Panik bei Katzenhaltern und in der Bevölkerung zu reduzieren. Der untersuchte Influenza-Antigen-Schnelltest liefert keine zuverlässigen Ergebnisse bei der Diagnostik von H5N1-Infektionen bei Katzen, so dass sein Einsatz bei Vorstellung verdächtiger Katzen in der Praxis nicht empfohlen werden kann.

VIII Summary

Julia Marschall

Prevalence of avian influenza viruses in cats from areas with occurrence of highly pathogenic avian influenza H5N1 in birds

Cats have shown to be highly susceptible to highly pathogenic avian influenza A virus subtype H5N1 (HPAIV H5N1), but only little is known about their role in the spread of the virus and about its pathogenesis in cats. The extent of subclinical infections in cats, for example, remains to be investigated.

Therefore, prevalence of influenza A H5N1 virus and prevalence of antibodies in cats from areas with occurrence of highly pathogenic avian influenza H5N1 in wild birds were evaluated in this study (publication 1). Two groups of cats were included; cats either lived in a restriction zone (defined as an area within a 10 kilometre radius around the location of a detected outbreak of avian influenza H5N1 in birds) or they showed signs of acute respiratory disease. Only cats with outdoor access were included. Samples of cats from restriction zones were taken during the time of official declaration of the respective area as restriction zone (for 30 days after the discovery of HPAIV H5N1 in birds). Cats with respiratory symptoms also came from regions relatively close to prior or future outbreaks of avian influenza in birds (less than 100 kilometres).

A total of 171 cats were examined; 132 cats came from restriction zones, 28 cats showed respiratory signs, and 11 cats met both criteria. Pharyngeal swabs were examined for influenza A virus using real-time reverse transcriptase PCR (RRT-PCR); serum samples were tested for antibodies using haemagglutination inhibition test (HAH-Test).

In the second part of the study (publication 2), a rapid test for the in-house detection of influenza virus antigen in humans, which is also sold for the diagnosis of H5N1 infection in cats, was evaluated. On the one hand, samples from 114 cats with outdoor access in restriction zones or with acute respiratory signs were included; on the other hand, 12 swabs from experimentally infected cats (strain A/cat/Germany/R606/2006) were examined. Results of the influenza rapid detection test were compared to the PCR results. The third publication gives a review on feline HPAIV H5N1 infections with a focus on practical aspects for veterinarians.

All samples from field cats were negative in both PCR and rapid test, so none of the cats showed evidence of infection – neither symptomatic nor asymptomatic – with H5N1 virus. There was also no evidence of overcome infections, as antibodies were negative in all cats as well. Hence, prevalence of H5N1 virus was determined to be less than 1.8 % and prevalence of antibodies was less than 2.6 % (with a probability of 95 %). In the experimentally infected cats, nine samples were positive (9/12) and three samples (3/12) were negative in the RRT-PCR, while all samples showed negative results in the rapid antigen detection test. In all field cats that tested negative in the PCR, the rapid test was negative as well. Specificity of the rapid test was therefore determined to be higher than 97.4 %, whereas sensitivity was lower than 28.4 %.

The study shows that in epidemiologic situations as they occurred in Germany and Austria, the risk for cats of contracting HPAIV H5N1 is very low. Therefore, cats do not seem to play a major role in the epidemiology of H5N1 and its transmission to humans. Still, precautions should be taken and cats should be kept indoors in restriction zones, but the results of this study can help to prevent panic in the population and in cat owners when faced with another outbreak of highly pathogenic avian influenza in birds. The rapid antigen detection test which was evaluated in this study is not reliable for diagnosing H5N1 infection in cats nor can it be used to help the veterinarian decide how to proceed with a suspicious cat. Its application can therefore not be recommended.

IX Literaturverzeichnis

- Advisory Board on Cat Diseases. Avian influenza H5N1 - ABCD recommendations on the practical approach of infected and suspected cats. Guidelines on Feline Infectious Diseases The European Board on Cat Diseases 2006: http://www.abcd-vets.org/guidelines/pdf/avian_influenza_uk.pdf. 29.03.2008.
- Alexander DJ. A review of avian influenza in different bird species. *Vet Microbiol* 2000; 74: 3-13.
- Alexander DJ. Avian influenza. In: *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (Mammals, Birds and Bees)*. OIE International Committee, ed. Paris: Office International des Epizooties 2004: http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A_00037.htm. 29.03.2008.
- Amonsin A, Chutinimitkul S, Pariyothorn N, Songserm T, Damrongwantanapokin S, Puranaveja S, Jam-On R, Sae-Heng N, Payungporn S, Theamboonlers A, Chaisingh A, Tantilertcharoen R, Suradhat S, Thanawongnuwech R, Poovorawan Y. Genetic characterization of influenza A viruses (H5N1) isolated from 3rd wave of Thailand AI outbreaks. *Virus Res* 2006a; 122: 194-9.
- Amonsin A, Payungporn S, Theamboonlers A, Thanawongnuwech R, Suradhat S, Pariyothorn N, Tantilertcharoen R, Damrongwantanapokin S, Buranathai C, Chaisingh A, Songserm T, Poovorawan Y. Genetic characterization of H5N1 influenza A viruses isolated from zoo tigers in Thailand. *Virology* 2006b; 344: 480-91.
- Amonsin A, Songserm T, Chutinimitkul S, Jam-On R, Sae-Heng N, Pariyothorn N, Payungporn S, Theamboonlers A, Poovorawan Y. Genetic analysis of influenza A virus (H5N1) derived from domestic cat and dog in Thailand. *Arch Virol* 2007; 152: 1925-33.
- ANONYMUS. Update: isolation of avian influenza A (H5N1) viruses from humans - Hong Kong, 1997-1998. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1998; 46: 1245-7.
- ANONYMUS. European advice on H5N1 avian influenza in cats. *Vet Rec* 2006; 158: 314.
- Apisarnthanarak A, Kitphati R, Thongphubeth K, Patoomanunt P, Anthanont P, Auwanit W, Thawatsupha P, Chittaganpitch M, Saeng-Aroon S,

- Waicharoen S, Apisarnthanarak P, Storch GA, Mundy LM, Fraser VJ. Atypical avian influenza (H5N1). *Emerg Infect Dis* 2004; 10: 1321-4.
- Beigel JH, Farrar J, Han AM, Hayden FG, Hyer R, de Jong MD, Lochindarat S, Nguyen TK, Nguyen TH, Tran TH, Nicoll A, Touch S, Yuen KY. Avian influenza A (H5N1) infection in humans. *N Engl J Med* 2005; 353: 1374-85.
- Belshe RB. The origins of pandemic influenza - lessons from the 1918 virus. *N Engl J Med* 2005; 353: 2209-11.
- Brown IH, Ludwig S, Olsen CW, Hannoun C, Scholtissek C, Hinshaw VS, Harris PA, McCauley JW, Strong I, Alexander DJ. Antigenic and genetic analyses of H1N1 influenza A viruses from European pigs. *J Gen Virol* 1997; 78: 553-62.
- Brown IH, Harris PA, McCauley JW, Alexander DJ. Multiple genetic reassortment of avian and human influenza A viruses in European pigs, resulting in the emergence of an H1N2 virus of novel genotype. *J Gen Virol* 1998; 79: 2947-55.
- Butler D. Thai dogs carry bird-flu virus, but will they spread it? *Nature* 2006; 439: 773.
- Buxton Bridges C, Katz JM, Seto WH, Chan PK, Tsang D, Ho W, Mak KH, Lim W, Tam JS, Clarke M, Williams SG, Mounts AW, Bresee JS, Conn LA, Rowe T, Hu-Primmer J, Abernathy RA, Lu X, Cox NJ, Fukuda K. Risk of influenza A (H5N1) infection among health care workers exposed to patients with influenza A (H5N1), Hong Kong. *J Infect Dis* 2000; 181: 344-8.
- Campitelli L, Fabiani C, Puzelli S, Fioretti A, Foni E, De Marco A, Krauss S, Webster RG, Donatelli I. H3N2 influenza viruses from domestic chickens in Italy: an increasing role for chickens in the ecology of influenza? *J Gen Virol* 2002; 83: 413-20.
- Capua I, Mutinelli F, Marangon S, Alexander DJ. H7N1 avian influenza in Italy (1999 to 2000) in intensively reared chickens and turkeys. *Avian Pathol* 2000; 29: 537-43.
- Castrucci MR, Campitelli L, Ruggieri A, Barigazzi G, Sidoli L, Daniels R, Oxford JS, Donatelli I. Antigenic and sequence analysis of H3 influenza virus haemagglutinins from pigs in Italy. *J Gen Virol* 1994; 75: 371-9.
- Cauthen AN, Swayne DE, Schultz-Cherry S, Perdue ML, Suarez DL. Continued circulation in China of highly pathogenic avian influenza viruses encoding

- the hemagglutinin gene associated with the 1997 H5N1 outbreak in poultry and humans. *J Virol* 2000; 74: 6592-9.
- Chan PK. Outbreak of avian influenza A(H5N1) virus infection in Hong Kong in 1997. *Clin Infect Dis* 2002; 34 Suppl 2: 58-64.
- Chen H, Deng G, Li Z, Tian G, Li Y, Jiao P, Zhang L, Liu Z, Webster RG, Yu K. The evolution of H5N1 influenza viruses in ducks in southern China. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 10452-7.
- Chen H, Smith GJ, Zhang SY, Qin K, Wang J, Li KS, Webster RG, Peiris JS, Guan Y. Avian flu: H5N1 virus outbreak in migratory waterfowl. *Nature* 2005; 436: 191-2.
- Chen H, Smith GJ, Li KS, Wang J, Fan XH, Rayner JM, Vijaykrishna D, Zhang JX, Zhang LJ, Guo CT, Cheung CL, Xu KM, Duan L, Huang K, Qin K, Leung YH, Wu WL, Lu HR, Chen Y, Xia NS, Naipospos TS, Yuen KY, Hassan SS, Bahri S, Nguyen TD, Webster RG, Peiris JS, Guan Y. Establishment of multiple sublineages of H5N1 influenza virus in Asia: implications for pandemic control. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 2845-50.
- Chen J, Lee KH, Steinhauer DA, Stevens DJ, Skehel JJ, Wiley DC. Structure of the hemagglutinin precursor cleavage site, a determinant of influenza pathogenicity and the origin of the labile conformation. *Cell* 1998; 95: 409-17.
- Chen W, Calvo PA, Malide D, Gibbs J, Schubert U, Bacik I, Basta S, O'Neill R, Schickli J, Palese P, Henklein P, Bennink JR, Yewdell JW. A novel influenza A virus mitochondrial protein that induces cell death. *Nat Med* 2001; 7: 1306-12.
- Cheung CY, Poon LL, Lau AS, Luk W, Lau YL, Shortridge KF, Gordon S, Guan Y, Peiris JS. Induction of proinflammatory cytokines in human macrophages by influenza A (H5N1) viruses: a mechanism for the unusual severity of human disease? *Lancet* 2002; 360: 1831-7.
- Choi YK, Nguyen TD, Ozaki H, Webby RJ, Puthavathana P, Buranathal C, Chaisingh A, Auewarakul P, Hanh NT, Ma SK, Hui PY, Guan Y, Peiris JS, Webster RG. Studies of H5N1 influenza virus infection of pigs by using viruses isolated in Vietnam and Thailand in 2004. *J Virol* 2005; 79: 10821-5.

- Chotpitayasunondh T, Ungchusak K, Hanshaoworakul W, Chunsuthiwat S, Sawanpanyalert P, Kijphati R, Lochindarat S, Srisan P, Suwan P, Osotthanakorn Y, Anantasetagoon T, Kanjanawasri S, Tanupattarachai S, Weerakul J, Chaiwirattana R, Maneerattanaporn M, Poolsavathitikool R, Chokephaibulkit K, Apisarnthanarak A, Dowell SF. Human disease from influenza A (H5N1), Thailand, 2004. *Emerg Infect Dis* 2005; 11: 201-9.
- Chutinimitkul S, Bhattarakosol P, Srisuratanon S, Eiamudomkan A, Kongsomboon K, Damrongwatanapokin S, Chaisingh A, Suwannakarn K, Chieochansin T, Theamboonlers A, Poovorawan Y. H5N1 influenza A virus and infected human plasma. *Emerg Infect Dis* 2006; 12: 1041-3.
- Claas EC, Kawaoka Y, de Jong JC, Masurel N, Webster RG. Infection of children with avian-human reassortant influenza virus from pigs in Europe. *Virology* 1994; 204: 453-7.
- Claas EC, Osterhaus AD, van Beek R, De Jong JC, Rimmelzwaan GF, Senne DA, Krauss S, Shortridge KF, Webster RG. Human influenza A H5N1 virus related to a highly pathogenic avian influenza virus. *Lancet* 1998; 351: 472-7.
- Connor RJ, Kawaoka Y, Webster RG, Paulson JC. Receptor specificity in human, avian, and equine H2 and H3 influenza virus isolates. *Virology* 1994; 205: 17-23.
- Crawford PC, Dubovi EJ, Castleman WL, Stephenson I, Gibbs EP, Chen L, Smith C, Hill RC, Ferro P, Pompey J, Bright RA, Medina MJ, Johnson CM, Olsen CW, Cox NJ, Klimov AI, Katz JM, Donis RO. Transmission of equine influenza virus to dogs. *Science* 2005; 310: 482-5.
- De Benedictis P, Beato MS, Capua I. Inactivation of avian influenza viruses by chemical agents and physical conditions: a review. *Zoonoses Public Health* 2007; 54: 51-68.
- De Jong MD, Bach VC, Phan TQ, Vo MH, Tran TT, Nguyen BH, Beld M, Le TP, Truong HK, Nguyen VV, Tran TH, Do QH, Farrar J. Fatal avian influenza A (H5N1) in a child presenting with diarrhea followed by coma. *N Engl J Med* 2005; 352: 686-91.
- Enserink M, Kaiser J. Avian flu finds new mammal hosts. *Science* 2004; 305: 1385.
- Fang R, Min Jou W, Huylebroeck D, Devos R, Fiers W. Complete structure of A/duck/Ukraine/63 influenza hemagglutinin gene: animal virus as

- progenitor of human H3 Hong Kong 1968 influenza hemagglutinin. *Cell* 1981; 25: 315-23.
- Fisman DN. Hemophagocytic syndromes and infection. *Emerg Infect Dis* 2000; 6: 601-8.
- Fouchier RA, Schneeberger PM, Rozendaal FW, Broekman JM, Kemink SA, Munster V, Kuiken T, Rimmelzwaan GF, Schutten M, van Doornum GJ, Koch G, Bosman A, Koopmans M, Osterhaus AD. Avian influenza A virus (H7N7) associated with human conjunctivitis and a fatal case of acute respiratory distress syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 1356-61.
- Fouchier RA, Munster V, Wallensten A, Bestebroer TM, Herfst S, Smith D, Rimmelzwaan GF, Olsen B, Osterhaus AD. Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls. *J Virol* 2005; 79: 2814-22.
- Friedrich-Loeffler-Institut. Epidemiologisches Bulletin Nr. 01/2007 Lagebericht zur Aviären Influenza. 2007; 09. Februar: http://www.fli.bund.de/fileadmin/user_upload/Dokumente/News/aktuelle_Krankheitsgeschehen/avi_Flu/lb_rb_influenza070209.pdf. 29.03.2008.
- Friedrich-Loeffler-Institut. Epidemiologisches Bulletin Nr. 01/2008 Lagebericht zur Aviären Influenza. 2008; 08. Januar: http://www.fli.bund.de/fileadmin/user_upload/Dokumente/News/aktuelle_Krankheitsgeschehen/avi_Flu/080108_lb_influenza.pdf. 29.03.2008.
- Gao P, Watanabe S, Ito T, Goto H, Wells K, McGregor M, Cooley AJ, Kawaoka Y. Biological heterogeneity, including systemic replication in mice, of H5N1 influenza A virus isolates from humans in Hong Kong. *J Virol* 1999; 73: 3184-9.
- Gao YW, Xia XZ, Wang LG, Liu D, Huang G. [Construction and experimental immunity of recombinant replication-competent canine adenovirus type 2 expressing hemagglutinin gene of H5N1 subtype tiger influenza virus]. *Wei Sheng Wu Xue Bao* 2006; 46: 297-300.
- Gesser RM, Koo SC. Oral inoculation with herpes simplex virus type 1 infects enteric neuron and mucosal nerve fibers within the gastrointestinal tract in mice. *J Virol* 1996; 70: 4097-102.

- Giese M, Harder TC, Teifke JP, Klopffleisch R, Breithaupt A, Mettenleiter TC, Vahlenkamp TW. Experimental infection and natural contact exposure of dogs with avian influenza virus (H5N1). *Emerg Infect Dis* 2008; 14: 308-10.
- Govorkova EA, Rehg JE, Krauss S, Yen HL, Guan Y, Peiris M, Nguyen TD, Hanh TH, Puthavathana P, Long HT, Buranathai C, Lim W, Webster RG, Hoffmann E. Lethality to ferrets of H5N1 influenza viruses isolated from humans and poultry in 2004. *J Virol* 2005; 79: 2191-8.
- Govorkova EA, Ilyushina NA, Boltz DA, Douglas A, Yilmaz N, Webster RG. Efficacy of oseltamivir therapy in ferrets inoculated with different clades of H5N1 influenza virus. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51: 1414-24.
- Guan Y, Peiris JS, Lipatov AS, Ellis TM, Dyrting KC, Krauss S, Zhang LJ, Webster RG, Shortridge KF. Emergence of multiple genotypes of H5N1 avian influenza viruses in Hong Kong SAR. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 8950-5.
- Guan Y, Poon LL, Cheung CY, Ellis TM, Lim W, Lipatov AS, Chan KH, Sturm-Ramirez KM, Cheung CL, Leung YH, Yuen KY, Webster RG, Peiris JS. H5N1 influenza: a protean pandemic threat. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 8156-61.
- Guo YJ, Jin FG, Wang P, Wang M, Zhu JM. Isolation of influenza C virus from pigs and experimental infection of pigs with influenza C virus. *J Gen Virol* 1983; 64: 177-82.
- Guo YJ, Krauss S, Senne DA, Mo IP, Lo KS, Xiong XP, Norwood M, Shortridge KF, Webster RG, Guan Y. Characterization of the pathogenicity of members of the newly established H9N2 influenza virus lineages in Asia. *Virology* 2000; 267: 279-88.
- Hatta M, Gao P, Halfmann P, Kawaoka Y. Molecular basis for high virulence of Hong Kong H5N1 influenza A viruses. *Science* 2001; 293: 1840-2.
- Hinshaw VS, Webster RG, Easterday BC, Bean WJ. Replication of avian influenza A viruses in mammals. *Infect Immun* 1981; 34: 354-61.
- Hoffmann E, Stech J, Leneva I, Krauss S, Scholtissek C, Chin PS, Peiris M, Shortridge KF, Webster RG. Characterization of the influenza A virus gene pool in avian species in southern China: was H6N1 a derivative or a precursor of H5N1? *J Virol* 2000; 74: 6309-15.

- Hurt AC, Selleck P, Komadina N, Shaw R, Brown L, Barr IG. Susceptibility of highly pathogenic A (H5N1) avian influenza viruses to the neuraminidase inhibitors and adamantanes. *Antiviral Res* 2007; 73: 228-31.
- Ito T, Couceiro JN, Kelm S, Baum LG, Krauss S, Castrucci MR, Donatelli I, Kida H, Paulson JC, Webster RG, Kawaoka Y. Molecular basis for the generation in pigs of influenza A viruses with pandemic potential. *J Virol* 1998; 72: 7367-73.
- Johnson NPAS, Mueller J. Updating the accounts: global mortality of the 1918-1920 "Spanish" influenza pandemic. *Bull Hist Med* 2002; 76: 105-15.
- Karaca K, Swayne DE, Grosenbaugh D, Bublot M, Robles A, Spackman E, Nordgren R. Immunogenicity of fowlpox virus expressing the avian influenza virus H5 gene (TROVAC AIV-H5) in cats. *Clin Diagn Lab Immunol* 2005; 12: 1340-2.
- Katz JM, Lim W, Bridges CB, Rowe T, Hu-Primmer J, Lu X, Abernathy RA, Clarke M, Conn L, Kwong H, Lee M, Au G, Ho YY, Mak KH, Cox NJ, Fukuda K. Antibody response in individuals infected with avian influenza A (H5N1) viruses and detection of anti-H5 antibody among household and social contacts. *J Infect Dis* 1999; 180: 1763-70.
- Kawaoka Y, Chambers TM, Sladen WL, Webster RG. Is the gene pool of influenza viruses in shorebirds and gulls different from that in wild ducks? *Virology* 1988; 163: 247-50.
- Kawaoka Y, Krauss S, Webster RG. Avian-to-human transmission of the PB1 gene of influenza A viruses in the 1957 and 1968 pandemics. *J Virol* 1989; 63: 4603-8.
- Kawaoka Y, Cox N, Haller O, Hongo S, Kaverin N, Klenk HD, Lamb RA, McCauley J, Palese P, Rimstad E, Webby RJ. Orthomyxoviridae. In: *Virus Taxonomy: Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA, eds. San Diego: Academic Press 2005: 681-93.
- Keawcharoen J, Oraveerakul K, Kuiken T, Fouchier RA, Amonsin A, Payungporn S, Noppornpanth S, Wattanodorn S, Theambooniers A, Tantilertcharoen R, Pattanarangsarn R, Arya N, Ratanakorn P, Osterhaus AD, Poovorawan Y. Avian influenza H5N1 in tigers and leopards. *Emerg Infect Dis* 2004; 10: 2189-91.

- Kido H, Yokogoshi Y, Sakai K, Tashiro M, Kishino Y, Fukutomi A, Katunuma N. Isolation and characterization of a novel trypsin-like protease found in rat bronchiolar epithelial Clara cells. A possible activator of the viral fusion glycoprotein. *J Biol Chem* 1992; 267: 13573-9.
- Klenk HD, Garten W. Host cell proteases controlling virus pathogenicity. *Trends Microbiol* 1994; 2: 39-43.
- Klimov A, Prosch S, Schafer J, Bucher D. Subtype H7 influenza viruses: comparative antigenic and molecular analysis of the HA-, M-, and NS-genes. *Arch Virol* 1992; 122: 143-61.
- Klopfleisch R, Wolf PU, Wolf C, Harder T, Starick E, Niebuhr M, Mettenleiter TC, Teifke JP. Encephalitis in a stone marten (*Martes foina*) after natural infection with highly pathogenic avian influenza virus subtype H5N1. *J Comp Pathol* 2007a; 137: 155-9.
- Klopfleisch R, Wolf PU, Uhl W, Gerst S, Harder T, Starick E, Vahlenkamp TW, Mettenleiter TC, Teifke JP. Distribution of lesions and antigen of highly pathogenic avian influenza virus A/Swan/Germany/R65/06 (H5N1) in domestic cats after presumptive infection by wild birds. *Vet Pathol* 2007b; 44: 261-8.
- Krug RM, Yuan W, Noah DL, Latham AG. Intracellular warfare between human influenza viruses and human cells: the roles of the viral NS1 protein. *Virology* 2003; 309: 181-9.
- Kuiken T, Rimmelzwaan GF, van Amerongen G, Osterhaus AD. Pathology of human influenza A (H5N1) virus infection in cynomolgus macaques (*Macaca fascicularis*). *Vet Pathol* 2003; 40: 304-10.
- Kuiken T, Rimmelzwaan GF, van Riel D, van Amerongen G, Baars M, Fouchier RA, Osterhaus AD. Avian H5N1 influenza in cats. *Science* 2004; 306: 241.
- Kuiken T, Fouchier RA, Rimmelzwaan GF, Osterhaus AD, Roeder P. Feline friend or potential foe? *Nature* 2006; 440: 741-2.
- Kurtz J, Manvell RJ, Banks J. Avian influenza virus isolated from a woman with conjunctivitis. *Lancet* 1996; 348: 901-2.
- Lamb RA. Genes and proteins of the influenza viruses. In: *The Influenza Viruses*. Krug RM, ed. New York: Plenum Press 1989: 1-87.
- Lamb RA, Krug RM. Orthomyxoviridae: The viruses and their replication. In: *Fields Virology*, 4th edn. Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Lamb RA,

- Martin MA, Roizman B, Straus SE, eds. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins 2004: 1487-531.
- Leschnik M, Weikel J, Möstl K, Revilla-Fernández S, Wodak E, Bagó Z, Vanek E, Benetka V, Hess M, Thalhammer JG. Subclinical infection with avian influenza A (H5N1) virus in cats. *Emerg Infect Dis* 2007; 13: 243-7.
- Li C, Yu K, Tian G, Yu D, Liu L, Jing B, Ping J, Chen H. Evolution of H9N2 influenza viruses from domestic poultry in Mainland China. *Virology* 2005a; 340: 70-83.
- Li KS, Guan Y, Wang J, Smith GJ, Xu KM, Duan L, Rahardjo AP, Puthavathana P, Buranathai C, Nguyen TD, Estoepongastie AT, Chaisingh A, Auewarakul P, Long HT, Hanh NT, Webby RJ, Poon LL, Chen H, Shortridge KF, Yuen KY, Webster RG, Peiris JS. Genesis of a highly pathogenic and potentially pandemic H5N1 influenza virus in eastern Asia. *Nature* 2004; 430: 209-13.
- Li Z, Chen H, Jiao P, Deng G, Tian G, Li Y, Hoffmann E, Webster RG, Matsuoka Y, Yu K. Molecular basis of replication of duck H5N1 influenza viruses in a mammalian mouse model. *J Virol* 2005b; 79: 12058-64.
- Lin YP, Gregory V, Bennett M, Hay A. Recent changes among human influenza viruses. *Virus Res* 2004; 103: 47-52.
- Lina B, Valette M. Test evaluation report - Medix Biochemica Influenza A&B (Ref 32832ETMB), ActimTM Influenza A&B (Ref 32832ETAC). 2005: <http://www.check-poct.de/pdfs/actim%20Influenza%20Literatur/Test%20Evaluation%20Report.pdf>. 30.03.2008.
- Lindstrom SE, Hiromoto Y, Nerome R, Omoe K, Sugita S, Yamazaki Y, Takahashi T, Nerome K. Phylogenetic analysis of the entire genome of influenza A (H3N2) viruses from Japan: evidence for genetic reassortment of the six internal genes. *J Virol* 1998; 72: 8021-31.
- Lipatov AS, Krauss S, Guan Y, Peiris M, Rehg JE, Perez DR, Webster RG. Neurovirulence in mice of H5N1 influenza virus genotypes isolated from Hong Kong poultry in 2001. *J Virol* 2003; 77: 3816-23.
- Lipatov AS, Govorkova EA, Webby RJ, Ozaki H, Peiris M, Guan Y, Poon L, Webster RG. Influenza: emergence and control. *J Virol* 2004; 78: 8951-9.
- Liu J, Xiao H, Lei F, Zhu Q, Qin K, Zhang XW, Zhang XL, Zhao D, Wang G, Feng Y, Ma J, Liu W, Wang J, Gao GF. Highly pathogenic H5N1 influenza virus infection in migratory birds. *Science* 2005; 309: 1206.

- Lu X, Tumpey TM, Morken T, Zaki SR, Cox NJ, Katz JM. A mouse model for the evaluation of pathogenesis and immunity to influenza A (H5N1) viruses isolated from humans. *J Virol* 1999; 73: 5903-11.
- Mackenzie D. Deadly H5N1 may be brewing in cats. *New Scientist* 2007: 6-7.
- Maher JA, DeStefano J. The ferret: an animal model to study influenza virus. *Lab Anim (NY)* 2004; 33: 50-3.
- Maines TR, Lu XH, Erb SM, Edwards L, Guarner J, Greer PW, Nguyen DC, Szretter KJ, Chen LM, Thawatsupha P, Chittaganpitch M, Waicharoen S, Nguyen DT, Nguyen T, Nguyen HH, Kim JH, Hoang LT, Kang C, Phuong LS, Lim W, Zaki S, Donis RO, Cox NJ, Katz JM, Tumpey TM. Avian influenza (H5N1) viruses isolated from humans in Asia in 2004 exhibit increased virulence in mammals. *J Virol* 2005; 79: 11788-800.
- Matrosovich M, Zhou N, Kawaoka Y, Webster R. The surface glycoproteins of H5 influenza viruses isolated from humans, chickens, and wild aquatic birds have distinguishable properties. *J Virol* 1999; 73: 1146-55.
- Matrosovich M, Tuzikov A, Bovin N, Gambaryan A, Klimov A, Castrucci MR, Donatelli I, Kawaoka Y. Early alterations of the receptor-binding properties of H1, H2, and H3 avian influenza virus hemagglutinins after their introduction into mammals. *J Virol* 2000; 74: 8502-12.
- Matrosovich MN, Gambaryan AS, Teneberg S, Piskarev VE, Yamnikova SS, Lvov DK, Robertson JS, Karlsson KA. Avian influenza A viruses differ from human viruses by recognition of sialyloligosaccharides and gangliosides and by a higher conservation of the HA receptor-binding site. *Virology* 1997; 233: 224-34.
- Mettenleiter TC. Bewertung des Risikos zur Einschleppung von hochpathogenem aviären Influenzavirus H5N1 in Hausgeflügelbestände in Deutschland. Friedrich-Loeffler-Institut, ed. 2007; 17. Dezember: http://www.fli.bund.de/fileadmin/user_upload/Dokumente/News/aktuelle_Krankheitsgeschehen/avi_Flu/rb_influenza_071217.pdf. 29.03.2008.
- Moscona A. Neuraminidase inhibitors for influenza. *N Engl J Med* 2005; 353: 1363-73.
- Mounts AW, Kwong H, Izurieta HS, Ho Y, Au T, Lee M, Buxton Bridges C, Williams SW, Mak KH, Katz JM, Thompson WW, Cox NJ, Fukuda K. Case-control study of risk factors for avian influenza A (H5N1) disease, Hong Kong, 1997. *J Infect Dis* 1999; 180: 505-8.

- Nakajima K, Desselberger U, Palese P. Recent human influenza A (H1N1) viruses are closely related genetically to strains isolated in 1950. *Nature* 1978; 274: 334-9.
- Olsen B, Munster VJ, Wallensten A, Waldenstrom J, Osterhaus AD, Fouchier RA. Global patterns of influenza A virus in wild birds. *Science* 2006; 312: 384-8.
- Olsen CW, Carey S, Hinshaw L, Karasin AI. Virologic and serologic surveillance for human, swine and avian influenza virus infections among pigs in the north-central United States. *Arch Virol* 2000; 145: 1399-419.
- Onta T, Kida H, Kawano J, Matsuoka Y, Yanagawa R. Distribution of antibodies against various influenza A viruses in animals. *Nippon Juigaku Zasshi* 1978; 40: 451-4.
- Osterhaus AD, Rimmelzwaan GF, Martina BE, Bestebroer TM, Fouchier RA. Influenza B virus in seals. *Science* 2000; 288: 1051-3.
- Paltrinieri S, Spagnolo V, Giordano A, Martin AM, Luppi A. Influenza virus type A serosurvey in cats. *Emerg Infect Dis* 2007; 13: 662-4.
- Paniker CK, Nair CM. Infection with A2 Hong Kong influenza virus in domestic cats. *Bull World Health Organ* 1970; 43: 859-62.
- Paniker CK, Nair CM. Experimental infection of animals with influenzavirus types A and B. *Bull World Health Organ* 1972; 47: 461-3.
- Peiris JS, Yu WC, Leung CW, Cheung CY, Ng WF, Nicholls JM, Ng TK, Chan KH, Lai ST, Lim WL, Yuen KY, Guan Y. Re-emergence of fatal human influenza A subtype H5N1 disease. *Lancet* 2004; 363: 617-9.
- Peiris M, Yuen KY, Leung CW, Chan KH, Ip PL, Lai RW, Orr WK, Shortridge KF. Human infection with influenza H9N2. *Lancet* 1999; 354: 916-7.
- Perdue ML, Garcia M, Senne D, Fraire M. Virulence-associated sequence duplication at the hemagglutinin cleavage site of avian influenza viruses. *Virus Res* 1997; 49: 173-86.
- Perkins LE, Swayne DE. Pathobiology of A/chicken/Hong Kong/220/97 (H5N1) avian influenza virus in seven gallinaceous species. *Vet Pathol* 2001; 38: 149-64.
- Pons MW. A reexamination of influenza single- and double-stranded RNAs by gel electrophoresis. *Virology* 1976; 69: 789-92.
- ProMED-mail. Avian influenza H5N1, mammals - East Asia. ProMED-mail 2004a; 21. Februar: Archivnummer 20040221.0560.

- http://www.promedmail.org/pls/otn/f?p=2400:1001::NO::F2400_P1001_B_ACK_PAGE,F2400_P1001_PUB_MAIL_ID:1000%2C24549. 29.03.2008.
- ProMED-mail. Avian influenza - Eastern Asia (24), Leopard dies from bird flu in Thailand. ProMED-mail 2004b; 13. Februar: Archivnummer 20040213.0480.
- http://www.promedmail.org/pls/otn/f?p=2400:1001::NO::F2400_P1001_B_ACK_PAGE,F2400_P1001_PUB_MAIL_ID:1000%2C24455. 29.03.2008.
- ProMED-mail. Avian influenza - Eastern Asia (26), Avian influenza in felines. ProMED-mail 2004c; 16. Februar: Archivnummer 20040216.0510.
- http://www.promedmail.org/pls/otn/f?p=2400:1001::NO::F2400_P1001_B_ACK_PAGE,F2400_P1001_PUB_MAIL_ID:1000%2C24492. 29.03.2008.
- ProMED-mail. Avian influenza (17): Indonesia (feline), Afghanistan, Japan, Hungary. ProMED-mail 2007; 26. Januar: Archivnummer 20070126.0347.
- http://www.promedmail.org/pls/otn/f?p=2400:1001::NO::F2400_P1001_B_ACK_PAGE,F2400_P1001_PUB_MAIL_ID:1000%2C36080. 30.03.2008.
- Renegar KB. Influenza virus infections and immunity: a review of human and animal models. *Lab Anim Sci* 1992; 42: 222-32.
- Rimmelzwaan GF, Kuiken T, van Amerongen G, Bestebroer TM, Fouchier RA, Osterhaus AD. Pathogenesis of influenza A (H5N1) virus infection in a primate model. *J Virol* 2001; 75: 6687-91.
- Rimmelzwaan GF, van Riel D, Baars M, Bestebroer TM, van Amerongen G, Fouchier RA, Osterhaus AD, Kuiken T. Influenza A virus (H5N1) infection in cats causes systemic disease with potential novel routes of virus spread within and between hosts. *Am J Pathol* 2006; 168: 176-83.
- Robertson SI, Bell DJ, Smith GJ, Nicholls JM, Chan KH, Nguyen DT, Tran PQ, Streicher U, Poon LL, Chen H, Horby P, Guardo M, Guan Y, Peiris JS. Avian influenza H5N1 in viverrids: implications for wildlife health and conservation. *Proc Biol Sci* 2006; 273: 1729-32.
- Rogers GN, D'Souza BL. Receptor binding properties of human and animal H1 influenza virus isolates. *Virology* 1989; 173: 317-22.
- Salzberg SL, Kingsford C, Cattoli G, Spiro DJ, Janies DA, Mehrez Aly M, Brown IH, Couacy-Hymann E, De Mia DM, Dung DH, Guercio A, Joannis T, Maken Ali AS, Osmani A, Padalino I, Saad MD, Savić V, Sengamalay NA, Yingst SL, Zaborsky J, Zorman-Rojs O, Ghedin E, Capua I. Genome

- Analysis Linking Recent European and African Influenza (H5N1) Viruses. *Emerg Infect Dis* 2007; 13: 713-8.
- Schafer JR, Kawaoka Y, Bean WJ, Suss J, Senne D, Webster RG. Origin of the pandemic 1957 H2 influenza A virus and the persistence of its possible progenitors in the avian reservoir. *Virology* 1993; 194: 781-8.
- Scholtissek C, Rohde W, Von Hoyningen V, Rott R. On the origin of the human influenza virus subtypes H2N2 and H3N2. *Virology* 1978; 87: 13-20.
- Scholtissek C, Burger H, Kistner O, Shortridge KF. The nucleoprotein as a possible major factor in determining host specificity of influenza H3N2 viruses. *Virology* 1985; 147: 287-94.
- Schunemann HJ, Hill SR, Kakad M, Bellamy R, Uyeki TM, Hayden FG, Yazdanpanah Y, Beigel J, Chotpitayasunondh T, Del Mar C, Farrar J, Tran TH, Ozbay B, Sugaya N, Fukuda K, Shindo N, Stockman L, Vist GE, Croisier A, Nagjdaliyev A, Roth C, Thomson G, Zucker H, Oxman AD. WHO Rapid Advice Guidelines for pharmacological management of sporadic human infection with avian influenza A (H5N1) virus. *Lancet Infect Dis* 2007; 7: 21-31.
- Senne DA, Panigrahy B, Kawaoka Y, Pearson JE, Suss J, Lipkind M, Kida H, Webster RG. Survey of the hemagglutinin (HA) cleavage site sequence of H5 and H7 avian influenza viruses: amino acid sequence at the HA cleavage site as a marker of pathogenicity potential. *Avian Dis* 1996; 40: 425-37.
- Seo SH, Hoffmann E, Webster RG. Lethal H5N1 influenza viruses escape host anti-viral cytokine responses. *Nat Med* 2002; 8: 950-4.
- Shinya K, Hamm S, Hatta M, Ito H, Ito T, Kawaoka Y. PB2 amino acid at position 627 affects replicative efficiency, but not cell tropism, of Hong Kong H5N1 influenza A viruses in mice. *Virology* 2004; 320: 258-66.
- Shinya K, Ebina M, Yamada S, Ono M, Kasai N, Kawaoka Y. Avian flu: influenza virus receptors in the human airway. *Nature* 2006; 440: 435-6.
- Shope RE. Swine influenza: III. Filtration experiments and etiology. *J Exp Med* 1931; 54: 373-85.
- Shortridge KF, Zhou NN, Guan Y, Gao P, Ito T, Kawaoka Y, Kodihalli S, Krauss S, Markwell D, Murti KG, Norwood M, Senne D, Sims L, Takada A, Webster RG. Characterization of avian H5N1 influenza viruses from poultry in Hong Kong. *Virology* 1998; 252: 331-42.

- Simonsen L, Clarke MJ, Schonberger LB, Arden NH, Cox NJ, Fukuda K. Pandemic versus epidemic influenza mortality: a pattern of changing age distribution. *J Infect Dis* 1998; 178: 53-60.
- Skehel JJ, Wiley DC. Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin. *Annu Rev Biochem* 2000; 69: 531-69.
- Smith H, Sweet C. Lessons for human influenza from pathogenicity studies with ferrets. *Rev Infect Dis* 1988; 10: 56-75.
- Smith W, Andrewes CH, Laidlaw PP. A virus obtained from influenza patients. *Lancet* 1933; 222: 66-8.
- Songserm T, Amonsin A, Jam-on R, Sae-Heng N, Pariyothorn N, Payungporn S, Theamboonlers A, Chutinimitkul S, Thanawongnuwech R, Poovorawan Y. Fatal avian influenza A H5N1 in a dog. *Emerg Infect Dis* 2006a; 12: 1744-7.
- Songserm T, Amonsin A, Jam-on R, Sae-Heng N, Meemak N, Pariyothorn N, Payungporn S, Theamboonlers A, Poovorawan Y. Avian influenza H5N1 in naturally infected domestic cat. *Emerg Infect Dis* 2006b; 12: 681-3.
- Steinhauer DA, Holland JJ. Rapid evolution of RNA viruses. *Annu Rev Microbiol* 1987; 41: 409-33.
- Stieneke-Grober A, Vey M, Angliker H, Shaw E, Thomas G, Roberts C, Klenk HD, Garten W. Influenza virus hemagglutinin with multibasic cleavage site is activated by furin, a subtilisin-like endoprotease. *Embo J* 1992; 11: 2407-14.
- Stuchbery A, Telfer R, Stone B, Svens E, Kok T. Evaluation of a one-step rapid immunochromatographic test for influenza A and B viruses. National Conference of the Australian Society for Microbiology, Canberra, Australia 2005; 25.09.-29.09.2005: Poster.
- Subbarao K, Klimov A, Katz J, Regnery H, Lim W, Hall H, Perdue M, Swayne D, Bender C, Huang J, Hemphill M, Rowe T, Shaw M, Xu X, Fukuda K, Cox N. Characterization of an avian influenza A (H5N1) virus isolated from a child with a fatal respiratory illness. *Science* 1998; 279: 393-6.
- Taubenberger JK, Reid AH, Krafft AE, Bijwaard KE, Fanning TG. Initial genetic characterization of the 1918 "Spanish" influenza virus. *Science* 1997; 275: 1793-6.

- Taubenberger JK, Reid AH, Lourens RM, Wang R, Jin G, Fanning TG. Characterization of the 1918 influenza virus polymerase genes. *Nature* 2005; 437: 889-93.
- Taubenberger JK, Morens DM. 1918 Influenza: the mother of all pandemics. *Emerg Infect Dis* 2006; 12: 15-22.
- Thanawongnuwech R, Amonsin A, Tantilertcharoen R, Damrongwatanapokin S, Theamboonlers A, Payungporn S, Nanthapornphiphat K, Ratanamungklanon S, Tunak E, Songserm T, Vivatthanavanich V, Lekdumrongsak T, Kesdaangakonwut S, Tunhikorn S, Poovorawan Y. Probable tiger-to-tiger transmission of avian influenza H5N1. *Emerg Infect Dis* 2005; 11: 699-701.
- Thiry E, Zicola A, Addie D, Egberink H, Hartmann K, Lutz H, Poulet H, Horzinek MC. Highly pathogenic avian influenza H5N1 virus in cats and other carnivores. *Vet Microbiol* 2007; 122: 25-31.
- Tiensen T, Chaitaweesub P, Songserm T, Chaisingh A, Hoonsuwan W, Buranathai C, Parakamawongsa T, Premashthira S, Amonsin A, Gilbert M, Nielen M, Stegeman A. Highly pathogenic avian influenza H5N1, Thailand, 2004. *Emerg Infect Dis* 2005; 11: 1664-72.
- To KF, Chan PK, Chan KF, Lee WK, Lam WY, Wong KF, Tang NL, Tsang DN, Sung RY, Buckley TA, Tam JS, Cheng AF. Pathology of fatal human infection associated with avian influenza A H5N1 virus. *J Med Virol* 2001; 63: 242-6.
- Tran TH, Nguyen TL, Nguyen TD, Luong TS, Pham PM, Nguyen VC, Pham TS, Vo CD, Le TQ, Ngo TT, Dao BK, Le PP, Nguyen TT, Hoang TL, Cao VT, Le TG, Nguyen DT, Le HN, Nguyen KT, Le HS, Le VT, Christiane D, Tran TT, Menno de J, Schultsz C, Cheng P, Lim W, Horby P, Farrar J. Avian influenza A (H5N1) in 10 patients in Vietnam. *N Engl J Med* 2004; 350: 1179-88.
- Tumpey TM, Basler CF, Aguilar PV, Zeng H, Solorzano A, Swayne DE, Cox NJ, Katz JM, Taubenberger JK, Palese P, Garcia-Sastre A. Characterization of the reconstructed 1918 Spanish influenza pandemic virus. *Science* 2005; 310: 77-80.
- Tweed SA, Skowronski DM, David ST, Larder A, Petric M, Lees W, Li Y, Katz J, Krajdien M, Tellier R, Halpert C, Hirst M, Astell C, Lawrence D, Mak A.

- Human illness from avian influenza H7N3, British Columbia. *Emerg Infect Dis* 2004; 10: 2196-9.
- Uiprasertkul M, Puthavathana P, Sangsiriwut K, Pooruk P, Srisook K, Peiris M, Nicholls JM, Chokephaibulkit K, Vanprapar N, Auewarakul P. Influenza A H5N1 replication sites in humans. *Emerg Infect Dis* 2005; 11: 1036-41.
- Ungchusak K, Auewarakul P, Dowell SF, Kitphati R, Auwanit W, Puthavathana P, Uiprasertkul M, Boonnak K, Pittayawonganon C, Cox NJ, Zaki SR, Thawatsupha P, Chittaganpitch M, Khontong R, Simmerman JM, Chunsutthiwat S. Probable person-to-person transmission of avian influenza A (H5N1). *N Engl J Med* 2005; 352: 333-40.
- Vahlenkamp TW. Influenza bei Katzen. *Deutsches Tierärzteblatt* 2006; 4: 414-20.
- Vahlenkamp TW, Harder TC. Influenza virus infections in mammals. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 2006; 119: 123-31.
- Vahlenkamp TW, Harder TC, Giese M, Lin F, Teifke JP, Klopffleisch R, Hoffmann R, Tarpey I, Beer M, Mettenleiter TC. Protection of cats against lethal influenza H5N1 challenge infection. *J Gen Virol* 2008; 89: 968-74.
- van Riel D, Munster VJ, De Wit E, Rimmelzwaan GF, Fouchier RA, Osterhaus AD, Kuiken T. H5N1 virus attachment to lower respiratory tract. *Science* 2006; 312: 399.
- Vey M, Orlich M, Adler S, Klenk HD, Rott R, Garten W. Hemagglutinin activation of pathogenic avian influenza viruses of serotype H7 requires the protease recognition motif R-X-K/R-R. *Virology* 1992; 188: 408-13.
- Vines A, Wells K, Matrosovich M, Castrucci MR, Ito T, Kawaoka Y. The role of influenza A virus hemagglutinin residues 226 and 228 in receptor specificity and host range restriction. *J Virol* 1998; 72: 7626-31.
- Weber S, Harder T, Starick E, Beer M, Werner O, Hoffmann B, Mettenleiter TC, Mundt E. Molecular analysis of highly pathogenic avian influenza virus of subtype H5N1 isolated from wild birds and mammals in northern Germany. *J Gen Virol* 2007; 88: 554-8.
- Webster RG, Yakhno M, Hinshaw VS, Bean WJ, Murti KG. Intestinal influenza: replication and characterization of influenza viruses in ducks. *Virology* 1978; 84: 268-78.
- Webster RG, Reay PA, Laver WG. Protection against lethal influenza with neuraminidase. *Virology* 1988; 164: 230-7.

- Webster RG, Bean WJ, Gorman OT, Chambers TM, Kawaoka Y. Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiol Rev* 1992; 56: 152-79.
- Webster RG, Peiris M, Chen H, Guan Y. H5N1 outbreaks and enzootic influenza. *Emerg Infect Dis* 2006; 12: 3-8.
- Wessel C. Angst vorm Liebling; Viele Halter wollen ihre Katzen ins Tierheim bringen. *Süddeutsche Zeitung* 2006; 01. März: 33.
- Wolf PU, Uhl W, Gerst S, Wolf C, Gerst K, Klopries M, Teifke JP, Klopffleisch R, Harder T, Werner O, Hoffmann B, Starick E, Mundt E, Beer M, Mettenleiter T. Letal verlaufende Influenza bei Hauskatzen nach natürlicher Infektion mit H5N1/Asia in Deutschland. *Deutsches Tierärzteblatt* 2006; 4: 426-31.
- Wood GW, McCauley JW, Bashiruddin JB, Alexander DJ. Deduced amino acid sequences at the haemagglutinin cleavage site of avian influenza A viruses of H5 and H7 subtypes. *Arch Virol* 1993; 130: 209-17.
- World Health Organization. Avian influenza A (H5N1) - situation on 4 February 2004. *Wkly Epidemiol Rec* 2004; 79: 53-4.
- World Health Organization. Avian influenza: assessing the pandemic threat. 2005; Januar: <http://www.who.int/csr/disease/influenza/H5N1-9reduit.pdf>. 29.03.2008.
- World Health Organization. Influenza in the world. September 2006 - January 2007. *Wkly Epidemiol Rec* 2007; 82: 77-9.
- World Health Organization. H5N1 avian influenza: timeline of major events. 2008a; 25. März: http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/Timeline_08%2003%2025.pdf. 29.03.2008.
- World Health Organization. Areas reporting confirmed occurrence of H5N1 avian influenza in poultry and wild birds since 2003. 2008b; 17. März: http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Global_SubNat_H5N1inAnimalConfirmedCUMULATIVE_20080317.png. 29.03.2008.
- World Health Organization. Cumulative number of confirmed human cases of avian influenza A/(H5N1) reported to WHO. Epidemic and Pandemic Alert and Response 2008c; 18. März: http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/country/cases_table_2008_03_18/en/index.html. 29.03.2008.

- World Health Organization Global Influenza Program Surveillance Network. Evolution of H5N1 avian influenza viruses in Asia. *Emerg Infect Dis* 2005; 11: 1515-21.
- Wright PF, Webster RG. Orthomyxoviruses. In: *Fields Virology*, 4th edn. Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B, Straus SE, eds. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins 2004: 1533-79.
- Xia XZ, Gao YW, Hu RL. [The first finding of tiger influenza by virus isolation and specific gene amplification]. *Chin J Vet Sci* 2003; 23: 107-10.
- Xu C, Fan W, Wei R, Zhao H. Isolation and identification of swine influenza recombinant A/Swine/Shandong/1/2003(H9N2) virus. *Microbes Infect* 2004; 6: 919-25.
- Xu X, Subbarao, Cox NJ, Guo Y. Genetic characterization of the pathogenic influenza A/Goose/Guangdong/1/96 (H5N1) virus: similarity of its hemagglutinin gene to those of H5N1 viruses from the 1997 outbreaks in Hong Kong. *Virology* 1999; 261: 15-9.
- Xu X, Smith CB, Mungall BA, Lindstrom SE, Hall HE, Subbarao K, Cox NJ, Klimov A. Intercontinental circulation of human influenza A (H1N2) reassortant viruses during the 2001-2002 influenza season. *J Infect Dis* 2002; 186: 1490-3.
- Yamada S, Suzuki Y, Suzuki T, Le MQ, Nidom CA, Sakai-Tagawa Y, Muramoto Y, Ito M, Kiso M, Horimoto T, Shinya K, Sawada T, Kiso M, Usui T, Murata T, Lin Y, Hay A, Haire LF, Stevens DJ, Russell RJ, Gamblin SJ, Skehel JJ, Kawaoka Y. Haemagglutinin mutations responsible for the binding of H5N1 influenza A viruses to human-type receptors. *Nature* 2006; 444: 378-82.
- Yen HL, Monto AS, Webster RG, Govorkova EA. Virulence may determine the necessary duration and dosage of oseltamivir treatment for highly pathogenic A/Vietnam/1203/04 influenza virus in mice. *J Infect Dis* 2005; 192: 665-72.
- Yingst SL, Saad MD, Felt SA. Qinghai-like H5N1 from domestic cats, northern Iraq. *Emerg Infect Dis* 2006; 12: 1295-7.
- Yuen KY, Chan PK, Peiris M, Tsang DN, Que TL, Shortridge KF, Cheung PT, To WK, Ho ET, Sung R, Cheng AF. Clinical features and rapid viral diagnosis of human disease associated with avian influenza A H5N1 virus. *Lancet* 1998; 351: 467-71.

Zhou NN, Senne DA, Landgraf JS, Swenson SL, Erickson G, Rossow K, Liu L, Yoon KJ, Krauss S, Webster RG. Emergence of H3N2 reassortant influenza A viruses in North American pigs. *Vet Microbiol* 2000; 74: 47-58.

Zitzow LA, Rowe T, Morken T, Shieh WJ, Zaki S, Katz JM. Pathogenesis of avian influenza A (H5N1) viruses in ferrets. *J Virol* 2002; 76: 4420-9.

Danksagung

Sehr herzlich möchte ich mich bei Prof. Dr. Katrin Hartmann für die exzellente Betreuung und flexible Zusammenarbeit während der Anfertigung dieser Arbeit bedanken und nicht zuletzt für ihr Vertrauen in mich.

Dr. Bianka Schulz danke ich für die kompetente Beratung und hilfsbereite Unterstützung sowie die gute Zusammenarbeit.

Bei allen Kollegen der Medizinischen Kleintierklinik möchte ich mich herzlich für die nette Zusammenarbeit bedanken, besonders auch bei den Mitarbeitern des Labors für die Untersuchung der Blutproben.

Ein großer Dank geht an Dr. Thomas Vahlenkamp, Dr. Timm Harder und Dr. Martin Beer vom Friedrich-Loeffler-Institut für die Durchführung der PCR und der Antikörperanalyse sowie die Bereitstellung von Rachentupferproben experimentell infizierter Katzen für die Evaluierung des Schnelltests.

Dr. Janine Huebner und Dr. Elke Huisinga möchte ich für die gute Zusammenarbeit danken.

Ganz besonders möchte ich mich bei allen Tierärzten bedanken, ohne deren Hilfe das Sammeln der Proben nicht möglich gewesen wäre. Vielen Dank an Bernhard Gühne, Denny Baruch vom Tierheim Nürnberg, Dr. Christine Thyssen, Dr. Siegfried Graf, Dr. Silke Beckmann-Müller, Dr. Ilse Ertl, Dr. Christian Danzl, Dr. Achim Vogel, Dr. Uwe Ellger, Melanie Stehle, Dr. Hubertus Meyer, Dr. Nina Langenbeck, Dr. Ricardo Dohmann und Dr. Brigitte Schlesinger für die bereitwillige Unterstützung.

Monia Mahling und Prof. Dr. Helmut Küchenhoff danke ich vielmals für ihre geduldige Hilfe bei der statistischen Auswertung.

Balthes Katzenberger möchte ich nicht nur für die gute Betreuung in Computerfragen danken, sondern vor allem dafür, dass er immer für mich da ist.

Ein besonderer Dank geht an meine Familie für die enorme Unterstützung und Ermunterung und dafür, dass ich mich immer auf sie verlassen kann.