

Aus der Klinik für Vögel, Reptilien, Amphibien und Zierfische
der Ludwig-Maximilians-Universität München
(Leiter: Univ.-Prof. Dr. Rüdiger Korbel)

Arbeit angefertigt am Bayerischen Landesamt für Gesundheit und
Lebensmittelsicherheit in Oberschleißheim (Prof. Dr. Dr. Mathias Büttner)

Wildvogelmonitoring in Bayern: Vorkommen und Verbreitung aviärer Influenzaviren von 2007 bis 2009

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

von
Stephanie Rabl
aus Bad Kötzing

München 2010

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Korbelt

Korreferent: Priv.-Doz. Dr. Reese

Tag der Promotion: 13. Februar 2010

Meinen Eltern und Kurt in Dankbarkeit

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG	1
II.	LITERATURÜBERSICHT	2
1.	Diagnostik - Nachweis von Influenza-A-Virus-infektionen	2
1.1.	Klassische virologische Methoden	2
1.2.	Virusisolierung im embryonierten Hühnerei und in der Zellkultur	3
1.2.1.	Antigen- und Antikörper-Nachweisverfahren	5
1.3.	Molekularbiologische Methoden	9
1.3.1.	Reverse Transkriptions-PCR (RT-PCR)	10
1.3.2.	RT-Loop-Mediated Isothermal Amplification-PCR (RT-LAMP-PCR) und Nucleic acid sequence-based amplification (NASBA)	13
1.3.3.	DNA-Microarrays/Chiptechnologie	14
1.3.4.	Pyrosequencing-Technologie	15
1.4.	Detektion wichtiger Virulenzfaktoren	15
1.4.1.	Hämagglutinin (HA)	16
1.4.2.	Neuraminidase (N)	17
2.	Epidemiologie	18
2.1.	Vorkommen von Influenza-A-Virusinfektionen bei Wildvögeln	18
2.1.1.	Infektionsrouten	18
2.1.2.	Saisonalität	20
2.1.3.	Wirtsspezifität, Wirtsalter und Infektionsverlauf	20
2.1.4.	Geographische Verbreitung/Monitoringstudien	23
2.2.	Subtypverteilung	26
2.2.1.	Subtypverteilung LPAIV unter Wildvögeln	26
2.2.2.	Subtypen mit Gefährdungspotential für Nutzgeflügel	28
2.3.	Mischinfektionen	34
3.	Zielsetzung	35

III.	MATERIAL UND METHODEN	36
1.	Probenmaterial	36
1.1.	Beprobte Wildvogelspezies	36
1.2.	Beprobungszeitraum	37
1.3.	Beprobungsgebiet	38
2.	Labormaterial	39
2.1.	Zellen	39
2.2.	Chemikalien, Reagenzien und Nährmedien	39
2.3.	Puffer und Lösungen	41
2.4.	Enzyme	41
2.5.	Kits	42
2.6.	Primer	42
2.6.1.	Primer für die Real-time PCR	42
2.6.2.	Primer und Fragmentgrößen für die konventionelle PCR	44
2.7.	Sonden für die Real-time PCR	45
2.8.	Geräte und Laborhilfsmittel	46
2.9.	Software	47
3.	Methoden der Probenentnahme bei Wildvögeln	47
3.1.	Organisation	47
3.2.	Lebendmonitoring	47
3.3.	Jagdmonitoring	50
3.4.	Probenmanagement und –aufbereitung	50
3.5.	Statistik	51
4.	Molekularbiologische Methoden	52
4.1.	Nukleinsäureisolierung	52
4.2.	Reverse Transkription (RT)	53
4.3.	Real-time PCR	54
4.3.1.	Pan AIV RT-Real-time PCR (RT-rPCR)	54
4.3.2.	RT-rPCR zur H5-, H7- und N1-Subtypisierung	56
4.3.3.	Multiplex RT-rPCR zur Typisierung der Hämagglutinine H1-H4, H6 und H8-H13	57

4.4.	Konventionelle PCR	60
4.4.1.	Bestätigung der HA-Mischinfektionen	60
4.4.2.	Anwendung N2-Gen-spezifischer Primer	61
4.4.3.	Anwendung N3-Gen-spezifischer Primer	61
4.5.	Agarosegelelektrophorese	61
4.6.	Gelaufreinigung der DNA	62
4.7.	DNA-Sequenzierung und Sequenzanalyse	63
5.	Virologische Methoden.....	63
5.1.	Virusisolierung im embryonierten Hühnerei	63
5.2.	Zellkultur	64
5.2.1.	Virustitration in Madin Darby Canine Kidney (MDCK) -Zellen	64
IV.	ERGEBNISSE	66
1.	Prävalenzen des AIV-Genomnachweises bei Wildvögeln in Bayern.....	66
1.1.	Speziesspezifische Prävalenzen	66
1.2.	Saisonale Prävalenzen	67
1.3.	Regionale Prävalenzen	68
2.	AIV-Nachweise bei unterschiedlichen Proben-materialien	71
3.	Charakterisierung und Subtypisierung von AIV.....	73
3.1.	Subtypisierung der Hämagglutinkomponente	73
3.1.1.	Bestätigung der Mischinfektionen	76
3.2.	Subtypisierung der Neuraminidasekomponente	78
4.	Virusisolierung.....	82
4.1.	Virusisolierung im embryonierten Hühnerei	82
4.2.	Zellkulturinfektion und Virustiter	82
V.	DISKUSSION.....	85
1.	Angewandte Methoden.....	85
1.1.	Pan AIV RT-Real-time PCR (RT-rPCR)	85
1.2.	RT-rPCR zur H5-, H7- und N1-Subtypisierung	86
1.3.	Multiplex RT-rPCR zur Typisierung der Hämagglutinine H1-H4, H6 und H8-H13.....	87

1.4.	Neuraminidase-Subtypisierung von N1-N3	89
1.5.	Virusisolierung im embryonierten Hühnerei und Zellkulturinfektion	90
1.6.	AIV-Nachweise bei unterschiedlichen Probenmaterialien	91
2.	Vorkommen Aviärer Influenzaviren (AIV) bei Wildvögeln	92
2.1.	Speziesspezifische Prävalenzen	92
2.2.	Saisonale Prävalenzen	94
2.3.	Regionale Prävalenzen	95
3.	Vorkommen definierter Subtypkomponenten bei Wildvögeln	98
3.1.	Vorkommen der Hämagglutinininkomponenten H1 bis H13	98
3.2.	Vorkommen der Neuraminidasekomponenten N1 bis N3	103
4.	Schlussbetrachtung und Ausblick	104
VI.	ZUSAMMENFASSUNG	106
VII.	SUMMARY	108
VIII.	LITERATURVERZEICHNIS	110
IX.	ANHANG	127
1.	Tabellenverzeichnis	127
2.	Abbildungsverzeichnis	129
3.	Detaillierte Daten zu beprobten Wildvogelspezies, saisonaler, regionaler Verteilung AIV und Subtypverteilung	131
X.	DANKSAGUNG	145

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

a	Anzahl AIV-positiver Tiere
A	Landkreis Augsburg
AB	Landkreis Aschaffenburg
AIC	Landkreis Aichach-Friedberg
AIV	Aviäres Influenzavirus
AN	Landkreis Ansbach
AÖ	Landkreis Altötting
APMV	Aviäres Paramyxovirus
ATCC	American type culture collection
AS	Landkreis Amberg-Sulzbach
BA	Landkreis Bamberg
BHQ 1/2	black hole quencher 1/2
Bic	Bicarbonat
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Basenpaar
BT	Landkreis Bayreuth
cDNA	komplementäre DNA
CHA	Landkreis Cham
CO	Landkreis Coburg
cpE	Zytopathogener Effekt
cRNA	carrier RNA
ct	threshold cycle (Schwellenwertszyklus)
DAH	Landkreis Dachau
DEG	Landkreis Deggendorf
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DGF	Landkreis Dingolfing-Landau
DLG	Landkreis Dillingen an der Donau
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DON	Landkreis Donau-Ries
DTT	Dithiothreitol
EBE	Landkreis Ebersberg
EC	European Commission
ED	Landkreis Erding
EI	Landkreis Eichstätt
EK	Extraktionskontrolle

ERH	Landkreis Erlangen-Höchstadt
FAM	6-carboxy-Fluorescein
FBS	Fötales bovines Serum
FFB	Landkreis Fürstenfeldbruck
FLI	Friedrich-Loeffler-Institut
FO	Landkreis Forchheim
for	forward
FRG	Landkreis Freyung-Grafenau
FS	Landkreis Freising
FÜ	Landkreis Fürth
GAP	Landkreis Garmisch-Partenkirchen
GZ	Landkreis Günzburg
HA	Hämagglutinin; Hämagglutinationstest
HAH	Hämagglutinations-Hemmungstest
HAS	Landkreis Haßberge
HEX	Hexachloro-6-carboxy-Fluorescein
HPAI	high pathogenic avian influenza
HPAIV	high pathogenic avian influenza virus
IC2	Internes Kontrollsystem
IN	Landkreis Ingolstadt
IVPI	Intravenöser Pathogenitätsindex
K	Kloake
KEH	Landkreis Kehlheim
KG	Landkreis Bad Kissingen
KI	Konfidenzintervall
KID	Kulturinfektiöse Dosis
KU	Landkreis Kulmbach
LA	Landkreis Landshut
LBV	Landesbund für Vogelschutz
LI	Landkreis Lindau
LIF	Landkreis Lichtenfels
LL	Landkreis Landsberg am Lech
LMU	Ludwig-Maximilians-Universität
log	Logarithmus
LPAI	low pathogenic avian influenza
LPAIV	low pathogenic avian influenza virus
M	Mittelwert; Landkreis München
MB	Landkreis Miesbach

MDCK	Madin Darby Canine Kidney
MEM	Minimal Essential Medium
MIL	Landkreis Miltenberg
MN	Landkreis Unterallgäu
MSP	Landkreis Main-Spessart
Mü	Landkreis Mühldorf am Inn
n	Anzahl untersuchter Tiere
N	Neuraminidase; Landkreis Nürnberg
NaCl	Natriumchlorid
NAH	Neuraminidase-Hemmungstest
NCBI	National Center for Biotechnology Information
n. d.	nicht durchgeführt
ND	Landkreis Neuburg-Schrobenhausen
NDV	Newcastle disease virus
NEA	Nicht-essentielle Aminosäuren; Landkreis Neustadt an der Aisch
NES	Landkreis Rhön-Grabfeld
NM	Landkreis Neumarkt
n. n.	nicht nachgewiesen
NP	Nukleoprotein
NRL	Nationales Referenzlabor
NTC	no template control
NU	Landkreis Neu-Ulm
OA	Landkreis Oberallgäu
OAL	Landkreis Ostallgäu
O.I.E.	Office International des Epizooties
p	significance level
P	Prävalenz
PA	Landkreis Passau
PAF	Landkreis Pfaffenhofen an der Ilm
PAN	Landkreis Rottal-Inn
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
p. i.	post inoculation
PK	Positivkontrolle
R	Rachen; Landkreis Regensburg
r	Real-time
REG	Landkreis Regen

rev	reverse
RH	Landkreis Roth
RNA	Ribonukleinsäure
RO	Landkreis Rosenheim
ROX	6-carboxy-X-Rhodamin
RT	Reverse Transkription
SAD	Landkreis Schwandorf
SD	Standard deviation
SPF	spezifisch pathogenfrei
SR	Landkreis Straubing-Bogen
STA	Landkreis Starnberg
SW	Landkreis Schweinfurt
TAMRA	Tetramethyl-6-Carboxyrhodamine
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEX	Texas Red
TIR	Landkreis Tirschenreuth
TÖL	Landkreis Bad Tölz
TS	Landkreis Traunstein
U	Umdrehungen; Unit
UV	Ultraviolett
WM	Landkreis Weilheim-Schongau
WUG	Landkreis Weißenburg-Gunzenhausen
WUN	Landkreis Wunsiedel
WÜ	Landkreis Würzburg

I. EINLEITUNG

Wildvögel, und hier vor allem Mitglieder der Ordnung Anseriformes (Enten- und Gänsevögel) und Charadriiformes (Möwen- und Watvögel), repräsentieren das ursprüngliche und anhaltende Reservoir für alle bekannten aviären Influenza-A-Viren (WEBSTER et al., 1992; ALEXANDER, 2000). Sie bilden daher eine wichtige Infektionsquelle für Nutzgeflügel. Dass Wildvögel auch Reservoirfunktion für humanpathogene Viren haben, wurde in der Vergangenheit mehrfach gezeigt, zum Beispiel für den H1N1-Erreger der Spanischen Grippe im Jahr 1918 (TAUBENBERGER et al., 2005) oder für das aktuell noch zirkulierende hochpathogene Virus des Subtyps H5N1 asiatischer Herkunft.

Bei Wildvögeln verlaufen die meisten Influenzavirusinfektionen ohne klinische Symptome (WEBSTER et al., 1992). Das Monitoring von gesunden Wildvögeln kann deshalb im Sinne eines „Frühwarnsystems“ zur Erfassung des Vorkommens potentiell gefährlicher Influenza-A-Viren in einer bestimmten Region beitragen. Derzeit wird von der EU eine permanente Überwachung gefordert und kofinanziert. Dieses Monitoring wird auf nationaler Ebene durch das Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz (BMELV) und Nationale Referenzlabor für Aviäre Influenza am Friedrich-Loeffler-Institut koordiniert und von den jeweiligen Bundesländern durchgeführt. Die erhobenen Daten sollen Grundlage für eine verbesserte Risikoabschätzung für einen Eintrag aviärer Influenzaviren (AIV) in Nutzgeflügelbestände bilden.

II. LITERATURÜBERSICHT

Aviäre Influenza-A-Viren (AIV) gehören zur Familie der *Orthomyxoviridae* und besitzen ein segmentiertes RNA-Genom in Negativstrangorientierung. Sie werden anhand der Ausprägung ihrer Oberflächenproteine Hämagglutinin und Neuraminidase klassifiziert. Bisher wurden 16 verschiedene Hämagglutinin- (HA) und neun verschiedene Neuraminidase- (N) Komponenten beschrieben, die in multiplen Kombinationen, den sog. Subtypen vorkommen (FOUCHIER et al., 2005). Je nach Infektiosität werden sie in hoch- und niedrigvirulente AIV (HPAIV bzw. LPAIV) eingeteilt. In der Veterinärmedizin sind v. a. die Subtypkomponenten H5 und H7 von Bedeutung, da sie in ihrer hochvirulenten Form als Auslöser der Klassischen Geflügelpest gelten (ALEXANDER, 2000).

1. Diagnostik - Nachweis von Influenza-A-Virusinfektionen

1.1. Klassische virologische Methoden

Klassische virologische Methoden, wie die Virusisolierung oder der Nachweis viraler Antigene und Antikörper werden nach wie vor für die Identifizierung und Charakterisierung aviärer Influenzaviren (AIV) verwendet. Allerdings werden sie immer mehr durch molekulare Methoden verdrängt. Einen Überblick über den typischen Ablauf klassischer, sowie molekularer Methoden zur Diagnostik von AIV gibt die Abbildung II. 1 wider.

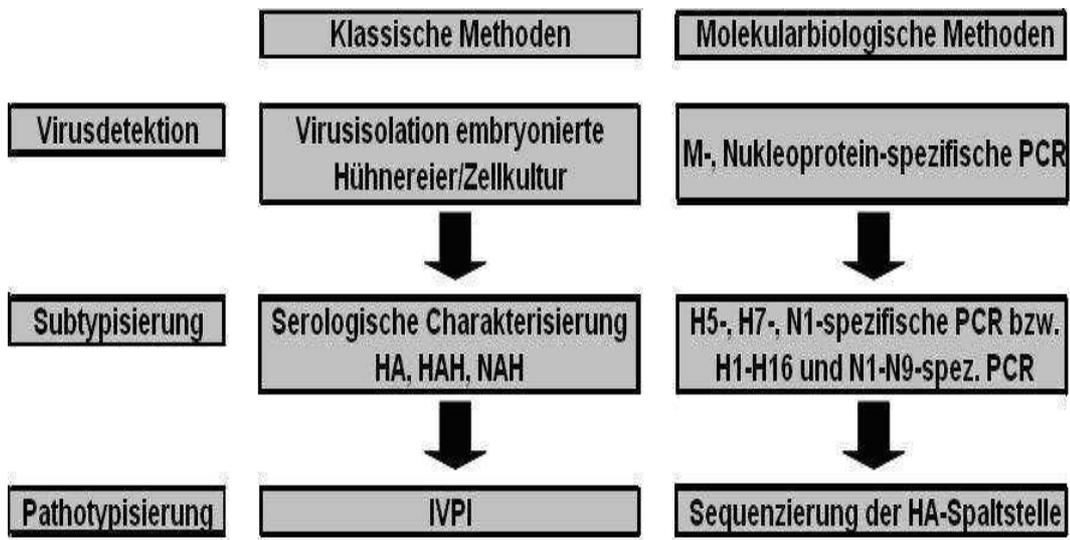


Abbildung II. 1: Diagnostik aviärer Influenzaviren: Ablauf klassischer und molekularbiologischer Methoden (EC, 2006).

1.2. Virusisolierung im embryonierten Hühnerei und in der Zellkultur

Die Virusisolierung (VI) im embryonierten Hühnerei und in der Zellkultur dient zum einen der Detektion infektiöser, vermehrungsfähiger Viren. Zum anderen können in diesen Wirtssystemen AIV, z. B. zur Impfstoffherstellung auch zielgerichtet vermehrt werden. Die Verimpfung AIV-haltiger Virussuspension findet entweder in die Amnion- oder Allantoishöhle zehn bis zwölf Tage alter embryonierter Hühnereier statt. Nach fünftägiger Bebrütung und täglichem Schieren auf abgestorbene Embryonen werden die restlichen Eier abgetötet. Anschließend kann eine stattgefundenen Virusvermehrung durch einen Hämagglutinationstest (HA) und einen Hämagglutinations-Hemmungstest (HAH) oder eine PCR mit der geernteten Allantoisflüssigkeit festgestellt werden.

Für die Vermehrung von Viren in der Zellkultur wird ein Zell-Monolayer mit der zu untersuchenden Virussuspension beimpft, mehrere Tage im Brutschrank inkubiert und täglich lichtmikroskopisch beurteilt. Eine Virusvermehrung kann z. B. durch Vorliegen eines zytopathogenen (cpE) Effekts oder mittels Immunfluoreszenz bestätigt werden.

Allerdings kann eine insgesamt zu geringe Menge vermehrungsfähigen Virus in der Probe oder eine bereits stattgefundenene Inaktivierung des Virus durch ungünstige Transportbedingungen (unterbrochene Kühlkette etc.) zu einem falsch negativen Ergebnis in der Kultur führen. Zudem werden zur Virusisolierung standardmäßig Hühnereier verwendet, die möglicherweise kein optimales Wirtssystem für Entenviren darstellen. Bei FOUCHIER et al. (2003) war eine Virusisolierung nur bei der Hälfte der in der RT-PCR AIV-positiven Proben erfolgreich. GAIDET et al. (2007) konnten sogar nur von 3,2 % der RT-PCR positiven Proben Virusisolate gewinnen. Darüber hinaus handelt es sich bei der VI um eine sehr zeitintensive Methode. Von offizieller Seite wird die Durchführung von mindestens zwei Blindpassagen mit jeweils 6 Bebrütungstagen gefordert, bevor eine definitive Aussage insbesondere über ein negatives Ergebnis getroffen werden kann (EC, 2006; O.I.E., 2009c).

Zur Virusvermehrung von Influenza-A-Viren in der Zellkultur werden Zelllinien verschiedenster Wirtsspezies genutzt, wie z. B. Madin Darby Canine Kidney (MDCK)-, Vero-Zellen und Hühner-Embryo-Fibroblasten (HEF). Influenza-A-Viren von Vogel, Mensch und Schwein verfügen aber über unterschiedliche zelluläre Rezeptorspezifitäten. Einen „Universal-Zelltyp“, der für alle Spezies gleich gut geeignet ist gibt es nicht (FOUCHIER et al., 2000). Darüber hinaus gelten Zellkulturen grundsätzlich als weniger sensitiv als SPF-Hühnereier (CATTOLI & TERREGINO, 2008).

Aus diesen Gründen stellt die VI im embryonierten Hühnerei bis heute immer noch den Goldstandard dar, was den Nachweis und die Vermehrung AIV betrifft (O.I.E., 2009c). Sie wird auch im AI-Diagnostik-Handbuch der OIE als bevorzugte Standardmethode dargestellt (O.I.E., 2009c). Die Gewinnung vermehrungsfähiger Virusisolate und deren detaillierte Charakterisierung wird auch in Zukunft für die Entwicklung von Impfstoffen von Bedeutung sein (CATTOLI & TERREGINO, 2008).

1.2.1. Antigen- und Antikörper-Nachweisverfahren

Hämagglutinationstest (HA)

Der Hämagglutinationstest (HA) nutzt die Eigenschaft bestimmter Oberflächenantigene (z. B. des Hämagglutinins), durch spezifische Rezeptoren an Erythrozyten binden und diese dadurch zu agglutinieren.

Beim HA wird in einer Mikrotiterplatte mit physiologischer NaCl-Lösung eine Verdünnungsreihe der zu untersuchenden Virussuspension hergestellt. Nach Zugabe der Hühnererythrozytensuspension und einer Inkubationsperiode erfolgt die Auswertung des Tests. Bei genügender Dichte hämagglutinierender Viruspartikel kommt es zur Agglutination (sog. Bodenhäutchen), im gegenteiligen Fall zur Sedimentation bzw. typischen Knopfbildung der Erythrozyten. Die Verdünnungsstufen ermöglichen eine Bestimmung des Antigengehaltes der Virussuspension (HA-Titer), wobei die höchste Virusverdünnung, bei der noch eine Agglutination erkennbar ist, einer hämagglutinierenden (HA)-Einheit entspricht. Ein positives Ergebnis muss allerdings nicht zwingend auf eine Infektion mit Influenza-A-Viren hindeuten. Neben den *Orthomyxoviridae* besitzen auch noch andere Virusfamilien (z. B. *Paramyxoviridae*, *Coronaviridae* und *Parvoviridae*) Oberflächenstrukturen, die über hämagglutinierende Eigenschaften verfügen.

Hämagglutinations-Hemmungstest (HAH)

Beim Hämagglutinations-Hemmungstest (HAH) wird das zu untersuchende Virusantigen auf vier HA-Einheiten eingestellt. Die Virussuspension wird nachfolgend mit spezifischen Antiseren gegen H1 bis H16 inkubiert und auf Hämagglutination untersucht. Bei einer positiven Reaktion bilden sich Antigen-Antikörper-Komplexe, wodurch die Agglutination der Erythrozyten gehemmt wird.

Neuraminidase-Hemmungstest (NAH)

Der Neuraminidase-Hemmungstest (NAH) nutzt die Eigenschaft der Neuraminidase, nach Zugabe von Fetuin N-Acetylneuraminsäure freizusetzen. Diese wird mittels Natriumperjodat zu beta-Formylbrenztraubensäure oxidiert. Nach Beendigung der Oxidation durch Natriumarsenit, wird Thiobarbitursäure zugegeben, das die Brenztraubensäure in ein Chromogen umsetzt (VAN DEUSEN et al., 1983). Die zu untersuchenden Virussuspensionen werden in Mikrotiterplatten mit spezifischen Referenzseren von N1 bis N9 inkubiert. Wenn die Subtypkomponente des Referenzserums mit der des Testserums übereinstimmt, kommt es zu einer Blockierung der Chromogenbildung.

Der HA und HAH sind im Gegensatz zum NAH gängige Laborpraxis, da sie einfacher anzuwenden sind und weniger Reagenzien benötigt werden. Nachteile gegenüber der PCR-Methodik sind neben dem größeren Probenaufwand die ständige Bereithaltung frischer Hühnererythrozyten und spezifischer Antiseren.

Agargelpräzipitationstest (AGP)

Beim Agargelpräzipitationstest (AGP) werden bestimmte Antigene (z. B. Nukleocapsid- oder Matrixprotein-Antigen) und das zu untersuchende Testserum auf einer Gelmatrix (Agar) aufgetragen. Im Falle einer spezifischen Antigen-Antikörper-Reaktion kommt es zur Präzipitation der Immunkomplexe, die als weiße Linien im Agar sichtbar werden. Der AGP wurde in der Vergangenheit v. a. zum Screening von Nutzgeflügel und Wildvögeln aus Monitoringstudien genutzt (OTTIS & BACHMANN, 1983; CATTOLI & TERREGINO, 2008). Für Serum von Wassergeflügel ist der AGP allerdings nicht geeignet, da sie keine präzipitierenden Antikörper ausbilden (HIGGINS, 1989). Der AGP wird heute kaum noch genutzt, er wurde durch moderne Immunoassays verdrängt (CATTOLI & TERREGINO, 2008).

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Beim ELISA wird entweder ein Antigen (indirekter ELISA, kompetitiver ELISA) oder ein Antikörper (Antigen Capture ELISA) auf einer Kunststoffoberfläche, z. B. einer Mikrotiterplatte immobilisiert. Nach Zugabe des zu testenden Serums bzw. Antigens kann die Bildung spezifischer Antigen-Antikörper-Komplexe mittels Enzym-konjugierter Antikörper detektiert werden.

Indirekter ELISA

Beim indirekten ELISA werden nach Zugabe des Testserums markierte Anti-Spezies-Antikörper, sog. Sekundäantikörper und eine Konjugat- und Substratlösung hinzugefügt. Das Vorliegen spezifischer Antikörper wird durch eine entstehende Farbreaktion angezeigt.

Die Problematik dieser Methodik besteht darin, dass nicht für alle Vogelarten spezies-spezifische Antikörper erhältlich sind. Die bisher kommerziell erhältlichen indirekten ELISAs eignen sich nur für Hühner- und Putenseren und werden hier v. a. für das Herdensingeingesetzt, eine Subtypisierung ist nicht möglich.

Kompetitiver (cELISA)

Der kompetitive ELISA (cELISA) bzw. Blocking-ELISA dient ebenfalls dem Antikörper-Nachweis. Daher ist auch hier ein definiertes Antigen auf einer Kunststoffoberfläche gebunden. Allerdings konkurrieren zwei Antikörper um die Bindungsstellen am Antigen, und zwar der Antikörper im zu untersuchenden Serum und ein markierter Kompetitions-Antikörper in einer definierten Menge. Zur maximalen Farbreaktion kommt es nur, wenn im Serum keine spezifischen Antikörper vorhanden sind, die den markierten Kompetitions-Antikörper verdrängen können. Entwickelt wurden cELISAs bisher v. a. zum Nachweis spezifischer Antikörper gegen das Nukleoprotein aviärer Influenzaviren (STARICK et al., 2006). Diese

Methoden sind speziesunabhängig, da keine spezies-spezifischen Sekundärantikörper benötigt werden.

Der Einsatz von cELISAs zum Nachweis von Antikörpern gegen AIV ist derzeit allerdings noch problematisch. Bei der Anwendung und Ergebnisauswertung wichen immer wieder, sowohl bei Nutzgeflügel, als auch bei Wildvögeln, die Testergebnisse der verschiedenen cELISAs deutlich voneinander ab (BÜTTNER & NEUBAUER-JURIC, 2007; HÄUSLAIGNER et al., 2009). Es gibt aber Bestrebungen die cELISA-Testkits für Wildvögel zu evaluieren (BROWN et al., 2009).

Antigen Capture ELISA

Beim Antigen Capture ELISA bzw. Sandwich ELISA ist an einer Oberfläche ein Antikörper gebunden, der spezifische Antigene bindet. Mit einem zweiten enzymmarkierten Antikörper kann das gebundene Antigen detektiert werden. Bisher wurde dieses Verfahren überwiegend zum Nachweis des Nukleoproteins von AIV, also nicht zur Subtypisierung, und für Screening-Untersuchungen von Nutzgeflügelbeständen eingesetzt (KODIHALLI et al., 1993). Zudem gibt es bereits Tests, die mit Hilfe monoklonaler Antikörper das H5-Antigen detektieren (HE et al., 2007; LUO et al., 2009). Vorteil dieser Methodik sind die relativ schnell verfügbaren Testergebnisse, daher findet diese Technik bei den sogenannten Schnelltests Anwendung. Darüber hinaus wird keine anspruchsvolle und teure Laborausstattung benötigt (CATTOLI & TERREGINO, 2008). Von Nachteil ist die unzufriedenstellende Sensitivität. So wurden vor einiger Zeit fünf verschiedene Testkits (Directigen Flu A (Becton Dickinson), QuickVue Influenza test kit (Quidel), FLU OIA (ThermoBiostar), Zstat Flu (ZymeTx, Inc.) and NOW FLU A Test (Binax)) bezüglich ihrer Sensitivität mit der VI im embryonierten Hühnerei verglichen. Die Testkits zeigten eine sehr unzufriedenstellende Sensitivität, v. a. beim Nachweis AIV aus Rachen- und Kloakaltupfern. So konnten beispielsweise 39 Rachentupfer mittels VI als AIV-positiv detektiert werden. Während das Directigen Flu A- und das FLU OIA-Kit nur zwei und das NOW FLU A-Testkit nur eines der 39 Virusisolate

bestätigten, waren die Ergebnisse für die restlichen Kits durchgehend negativ (WOOLCOCK & CARDONA, 2005).

1.3. Molekularbiologische Methoden

Bei den molekularbiologischen Methoden werden spezifische Genomabschnitte detektiert. Im Unterschied zur VI im embryonierten Hühnerei bzw. der Zellkultur, weisen molekulare Tests, neben den Immunoassays auch Infektionserreger nach, die nicht mehr vermehrungs- und infektiösfähig sind. Molekulare Methoden liefern im Gegensatz zur VI ein schnelleres Ergebnis (i. d. R. innerhalb eines Tages), da sie eine direkte Typisierung aus Probenmaterial ermöglichen. Darüber hinaus sind PCR-basierte Methoden im Vergleich zur VI in der Zellkultur um bis zu 100-fach sensitiver (FOUCHIER et al., 2000). Es ist eine uneingeschränkte Identifikation von Influenza-A-Viren aus unterschiedlichen Spezies möglich, was bei Zellkulturen aufgrund des unterschiedlichen Zelltropismus aviärer, humaner und porciner Viren erschwert wird (FOUCHIER et al., 2000). Darüber hinaus stellt das embryonierte Hühnerei vielleicht nicht für alle AIV das optimale Wirtssystem dar. Die hochgradige Sensitivität birgt aber auch Gefahren. So kann es durch Kreuzkontaminationen zu falsch positiven Ergebnissen kommen. Die One-step RT-PCR verringert allerdings das Kontaminationsrisiko etwas, da Reverse Transkription und PCR in einem Reaktionsgefäß ablaufen und somit kein Öffnen der Tubes mehr nötig ist (SPACKMAN et al., 2002).

Die Sensitivität und Spezifität der molekularen Tests wird allerdings von zwei kritischen Punkten mit bestimmt: Die Methodik der RNA-Extraktion und die Sequenzen der Primer und Sonden. Die RNA-Extraktionsmethoden spielen eine bedeutende Rolle, da einige Probenarten, z. B. Kloakaltupfer und Kotproben evtl. PCR-Inhibitoren beinhalten, die durch die einzelnen Extraktionsmethoden unterschiedlich gut eliminiert werden, und somit zu falsch negativen Ergebnissen führen können (SUAREZ et al., 2007). Zudem ist die RNA sehr instabil und kann sehr leicht durch ubiquitär vorkommende RNAsen degradiert werden (SPACKMAN et al., 2002). Darüber hinaus kann es aufgrund der Mutationsneigung von AIV zu

falsch negativen Ergebnissen kommen, wenn sich die Zielsequenzen der Primer und Sonden verändert haben (CATTOLI & TERREGINO, 2008).

1.3.1. Reverse Transkriptions-PCR (RT-PCR)

Zum Nachweis von Influenza-A-Viren mittels RT-PCRs werden meistens konservierte Bereiche des Matrix-, Nukleoprotein- oder Nichtstrukturgens genutzt (SUAREZ et al., 2007). Eine Zuordnung der Viren zu einem Subtyp ist mit diesen Tests allerdings nicht möglich. In der Vergangenheit wurden v. a. PCR-Methoden beschrieben, die Virusstämme aus dem Menschen und v. a. das Matrixgen sowie H1-, H3-, N1- und N2-spezifische Gene detektierten (ATMAR et al., 1996; SCHWEIGER et al., 2000). Zur Erweiterung des Spektrums nachzuweisender Viren, wurden schließlich auch PCRs entwickelt, die das Matrixgen genetisch unterschiedlicher Virusisolate, u. a. von Vogel, Mensch, Schwein und Pferd erkennen können (FOUCHIER et al., 2000; STARICK et al., 2000; SPACKMAN et al., 2002). Darüber hinaus wurden überwiegend PCRs etabliert, die entweder H5- und H7-spezifische Genabschnitte amplifizieren (STARICK et al., 2000; SPACKMAN et al., 2002) oder direkt HPAIV vom Subtyp H5N1 detektieren können (HOFFMANN et al., 2007).

Zudem gibt es schon seit längerem Bestrebungen, in Form einer Multiplex-PCR, mehrere Zielsequenzen mit mehreren Primerpaaren in einer einzigen PCR-Reaktion zu vervielfältigen. So wurde beispielsweise für die acht Genomsegmente aviärer Influenza-A-Viren vom Subtyp H5N1 eine Multiplex RT-PCR entwickelt, und zwar in Form zweier Triplex- (N, PB1, NP und HA, PA, PB2) und einer Duplex-PCR (NS, M) (AUEWARAKUL et al., 2007). Ein weiteres Beispiel stellt die Multiplex RT-PCR von CHEN et al. (2008) dar, die mit drei Primerpaaren H5, H9 und das Newcastle disease virus (NDV) in einer PCR detektiert.

Für eine erfolgreiche Multiplex-PCR sind die relativen Konzentrationen der spezifischen Primer, die Konzentration des PCR-Puffers, das Temperaturprofil und die Balance zwischen $MgCl_2$ - und dNTP-Konzentrationen sehr wichtig (HENEGARIU et al., 1997). HENEGARIU et

al. (1997) beschrieben in einem Step-by-Step Protokoll die bedeutendsten Schritte für die Etablierung und Optimierung einer Multiplex-PCR: In Schritt 1 und 2 stehen die Wahl der richtigen Primersequenzen und der Ausschluss repetitiver Primersequenzen durch Alignments im Vordergrund. Der Schritt 3 widmet sich der Erstellung von Singleplex-PCRs, die jedes Zielgen einzeln amplifizieren. Im vierten Schritt werden Multiplex-PCR-Protokolle erstellt, die zunächst äquimolare Mengen der verschiedenen Primerkonstellationen beinhalten. Im Anschluss erfolgt die Optimierung der einzelnen PCR-Komponenten.

Ein bedeutendes Unterscheidungsmerkmal PCR-basierter Methoden sind die verschiedenen Detektionssysteme:

Konventionelle RT-PCR

Die konventionelle RT-PCR nutzt zum Nachweis der PCR-Amplifikate die größenabhängige Auftrennung von DNA-Produkten mittels Agarosegelelektrophorese. Der AIV-Nachweis basiert auf Erscheinen einer PCR-Bande in der erwarteten Größe, die durch Sequenzierung bestätigt werden kann. Diese erhaltenen Sequenzen können auch in phylogenetischen Untersuchungen verwendet werden.

RT-PCR-ELISA

Der PCR-ELISA ist eine Kombination aus molekularen und immunologischen Methoden. Die nach der PCR vorliegenden doppelsträngigen PCR-Produkte werden durch Denaturierung in Einzelstränge zerlegt und an eine Mikrotiterplatte gebunden. Das PCR-Produkt kann nach Zugabe markierter, erregerspezifischer Sonden mit Hilfe enzymmarkierter Antikörper detektiert werden, wobei das Enzym nach Substratzugabe eine Farbveränderung bewirkt (SEIGNER & KNABEL, 2009). MUNCH et al. (2001) konnten für den PCR-ELISA, im Gegensatz zur konventionellen Detektion mittels Agarosegelelektrophorese, eine bis

zu 100-fach höhere Sensitivität feststellen. Der Nachweis von PCR-Produkten mittels ELISA oder Agarosegelelektrophorese wurde allerdings in den letzten Jahren immer mehr durch das Real-time PCR-Verfahren verdrängt, da sich die Anwendung kostengünstiger und unkomplizierter gestaltet.

RT Real-time PCR (RT-rPCR)

Seit 2006 werden in Deutschland für die Diagnostik der AIV überwiegend RT-rPCRs eingesetzt. Durch die Neufassung der EU-Rechtsgrundlagen (EC, 2005; EC, 2006) wurde die Anwendung offiziell ermöglicht. Im Vergleich zur konventionellen Detektion der PCR-Produkte, brachte das Real-time Verfahren erhebliche Vorteile mit sich. Durch die Verwendung sequenzspezifischer, fluoreszenzmarkierter Sonden (z. B. TaqMan-Sonden und Molecular Beacons) oder interkalierender, das heißt sich in doppelsträngige DNA einlagernde Fluoreszenzfarbstoffe wie SYBR Green, können die PCR-Produkte direkt während ihrer Amplifikation, anhand von Fluoreszenzsignalen erfasst werden (SCHRIMPF, 2002a; YACOUB et al., 2009). Allerdings bindet SYBR Green an alle doppelsträngigen DNA-Moleküle, somit auch an Primer-Dimere, was sich nachteilig auf die Spezifität auswirken kann (SCHRIMPF, 2002a). Daher ist eine Schmelzkurven-Analyse nötig, da jedes PCR-Produkt einen spezifischen Schmelzpunkt aufweist. Eine Agarosegelelektrophorese ist nicht nötig, wodurch die Durchsatzgeschwindigkeit an Proben erheblich gesteigert werden kann, was für die Routinediagnostik große Bedeutung hat. Zunächst wurden für den Humanbereich Real-time PCRs mit sequenzspezifischen Primern und TaqMan-Sonden für das Matrixgen von Influenza-A- und B-Viren und für die Subtypen H1N1 und H3N2 entwickelt (SCHWEIGER et al., 2000). In der Veterinärmedizin wurden spezifische TaqMan-Sonden, v. a. für das Matrixgen und für H5-, H7- und N1-Gensequenzen konstruiert (SPACKMAN et al., 2002; AGUERO et al., 2007b; AGUERO et al., 2007a). Da SPACKMAN et al. (2002) die H5- und H7-spezifischen Primer und Sonden nach nordamerikanischen Gensequenzen konstruierten, wurden diese bereits im Hinblick auf eurasische

H5-Genlinien modifiziert (HEINE et al., 2007) und mit internen heterologen Kontrollsystemen kombiniert (HOFFMANN et al., 2006). Nachteilig für einen allgemeinen Einsatz der Real-time PCR wirken sich sicherlich die zurzeit noch hohen Anschaffungskosten der Geräte aus. Als Vorteile der Real-time PCR gegenüber der konventionellen PCR sind, im Falle von SYBR Green, die kostengünstige Durchführbarkeit hinsichtlich der Verbrauchsmaterialien zu nennen, was für fluoreszenzmarkierte Sonden zumindest derzeit allerdings noch nicht zutrifft. Darüber hinaus wird das Kontaminationsrisiko gesenkt, da nach der Nukleinsäure-Amplifikation kein Öffnen der PCR-Tubes nötig ist.

1.3.2. RT-Loop-Mediated Isothermal Amplification–PCR (RT-LAMP-PCR) und Nucleic acid sequence-based amplification (NASBA)

Neben der PCR und RT-PCR wurden auch andere Tests zum Nachweis von Nukleinsäuren entwickelt, die bisher aber nur sehr begrenzt Anwendung fanden.

Die Loop-Mediated Isothermal Amplification-PCR (LAMP-PCR) kann mit Hilfe kommerziell erhältlicher Kits (Loopamp DNA Amplification Kit; Eiken Chemical Co., Ltd., Japan) und ohne Anwendung eines Thermocyclers durchgeführt werden. Zunächst wird eine Reverse Transkription durchgeführt, da als Template komplementäre DNA (cDNA) benötigt wird. Im Gegensatz zur PCR läuft die nachfolgende DNA-Amplifikation isothermal, d. h. nur auf einer Temperaturstufe ab (z. B. in einem Wasserbad, innerhalb einer Stunde, bei einer konstanten Temperatur von etwa 65 °C). Für die Amplifikation H5-spezifischer Influenza-A-RNA wurden bereits RT-LAMP-PCRs entwickelt, wobei die Detektion viraler RNA entweder durch Beurteilung der Trübung, die durch Präzipitation von Magnesiumpyrophosphat entsteht, oder durch Agarosegelelektrophorese stattfindet. Die Einfachheit der Anwendung soll diese Methodik v. a. für Entwicklungsländer interessant machen (MORI et al., 2001; IMAI et al., 2006; JAYAWARDENA et al., 2007).

Die Nucleic acid sequence-based amplification (NASBA)-Technologie funktioniert nach demselben Prinzip wie die LAMP-Methodik. Die RNA-Amplifikation läuft ebenfalls isothermal ab, allerdings bei Temperaturbedingungen von etwa 41 °C. Es wird wie bei der LAMP-PCR kein Thermocycler benötigt. Die Detektion des Amplifikationsproduktes findet nach Zugabe folgender Reagenzien statt: einer spezifischen Sonde, die an Streptavidin-beschichtete Kügelchen gekoppelt ist und einer Ruthenium-markierten Enhanced-Chemiluminescence (ECL)-Sonde (LAU et al., 2004). Anschließend findet die Messung der Lumineszenz-Intensität im NucliSense ECL Reader (Biomerieux) statt. Sie ist direkt proportional zur vorhandenen viralen RNA.

1.3.3. DNA-Microarrays/Chiptechnologie

Bei den DNA-Microarrays werden Oligonukleotide (DNA-Sonden) auf eine feste Phase (Glasträger oder Membranen) gespottet, d. h. immobilisiert. Die zu untersuchende RNA muss zunächst in cDNA umgeschrieben werden. Anschließend werden die Zielgene mittels PCR amplifiziert, mit Fluoreszenzfarbstoffen (z. B. Cy3, Cy5) markiert und mit den spezifischen DNA-Sonden auf dem Microarray hybridisiert. Anschließend erfolgen mehrere Waschschriffe, um nicht oder unspezifisch gebundene DNA zu entfernen. Die Detektion der Fluoreszenzsignale hybridisierter cDNA erfolgt mittels Array-Scannern (Laser) und einer speziellen Auswertungssoftware. Durch die Anwendung unterschiedlicher Fluoreszenzfarbstoffe können viele, verschiedene Genomabschnitte parallel analysiert werden (SCHRIMPF, 2002b). DNA-Microarrays wurden zunächst in erster Linie für die Subtypisierung humaner Influenza-A- und B-Viren entwickelt (LI et al., 2001; KESSLER et al., 2004). KESSLER et al. (2004) etablierten eine dreidimensionale Biochip-Plattform (Flow-Thru Chip; MetriGenix), die parallel die Subtypkomponenten H1, H3, H5, N1 und N2 detektiert. Für die veterinärmedizinische Diagnostik von AIV könnten in Zukunft zwei, vor kurzem publizierte, DNA-Microarrays von Bedeutung sein (GALL et al., 2009; LIN et al., 2009). GALL et al. (2009) etablierten einen DNA-Microarray, der parallel die Detektion AIV, die HA-Subtypisierung von H1

bis H16 und eine Pathotypisierung durch Detektion der HA-Spaltstelle ermöglicht. LIN et al. (2009) entwickelten „Resequencing pathogen microarrays“ (RPM), die ebenfalls zur Detektion und Subtypisierung aviärer Influenza-A-Viren dienen sollen. Darüber hinaus sollen sie auch weitere Informationen über die detektierten AIV, wie Pathogenität und Medikamentenresistenzen, bereitstellen.

Aufgrund der hohen Kosten (teure Geräte und Verbrauchsmaterialien) und der erforderlichen technischen und wissenschaftlichen Fachkenntnisse werden DNA-Microarrays bis heute allerdings nur in begrenztem Maße angewendet (CATTOLI & TERREGINO, 2008).

1.3.4. Pyrosequencing-Technologie

Die Pyrosequenzierung ermöglicht eine DNA-Sequenzierung in Echtzeit (Real-time). Sie nutzt wie die Sequenzierungsmethode nach Sanger eine DNA-Polymerase zur Synthese des DNA-Komplementärstranges. Nach Zugabe von Nukleosidtriphosphaten (NTPs) erfolgt ausgehend vom Primer eine DNA-Strangverlängerung. Bei Einbau eines komplementären Nukleotids durch die DNA-Polymerase wird Pyrophosphat freigesetzt. Dieses wird anschließend durch die ATP-Sulfurylase zu Adenosin-triphosphat (ATP) umgesetzt. Das ATP wiederum wird benötigt, um Luziferin in Oxyluziferin umzuwandeln und somit ein detektierbares Lichtsignal zu erhalten. Mit Hilfe dieser Methodik können z. B. Mutationen, die zu Veränderungen in der Rezeptorspezifität führen könnten, sehr schnell nachgewiesen werden (PASICK, 2008). Es wurde bereits ein diagnostischer Test für H5N1-Viren entwickelt, der durch Pyrosequenzierung schnelle Informationen über die H5N1-Clade, den Virusstamm, die Rezeptorspezifität und die HA-Spaltstelle ermöglicht (POURMAND et al., 2006).

1.4. Detektion wichtiger Virulenzfaktoren

Bei der Detektion von Virulenzfaktoren geht es um den Nachweis derjenigen Genombereiche, welche für die Virulenz (Grad der krank-

machenden Eigenschaft) von Influenza-A-Viren verantwortlich sind. Im veterinärmedizinischen Bereich ist in erster Linie die Pathotypisierung der Virusisolate durch die Sequenz der HA-Spaltstelle von Bedeutung. Darüber hinaus gibt es noch andere wichtige Genombereiche, die u. a. in der Neuraminidase lokalisiert sind, die Einfluss auf die Virulenz von Influenza-A-Viren haben.

1.4.1. Hämagglutinin (HA)

Das Hämagglutinin zählt neben der Neuraminidase zu den variabelsten Bereichen des Influenza-A-Genoms. Weniger als 30 % der Aminosäuren des HA der verschiedenen Subtypen sind konserviert (LEE & SAIF, 2009). Seit Auftreten der klassischen Geflügelpest spielen ihre Erreger als Viren der Subtypkomponenten H5 und H7 eine bedeutende Rolle. Die beiden Subtypkomponenten können, neben der hochvirulenten (HPAI) aber auch in einer niedrigvirulenten (LPAI) Form auftreten. Bei der Klassifizierung hoch- oder niedrigvirulent wird, alternativ zur Bestimmung des intravenösen Pathogenitätsindex (IVPI), mittlerweile die Sequenz der HA-Spaltstelle herangezogen. Das Vorliegen multipler basischer Aminosäuren (Arginin oder Lysin) an der HA-Spaltstelle ist ein wichtiger Indikator für hochvirulente Influenza-A-Viren (PERDUE & SUAREZ, 2000).

Subtypisierung und Pathotypisierung

Eine Möglichkeit zur Subtypisierung der HA-Komponente ist die von GALL et al. (2008) entwickelte RT-PCR, bei der die HA-Spaltstellen von Influenza-A-Viren aller 16 bekannten HA-Subtypen (pan HA-RT-PCR) amplifiziert und anschließend sequenziert werden. Es können aber auch RT-PCRs die konservierte Regionen, entweder nur des HA2-Gens oder in Kombination mit dem HA1-Gen amplifizieren, durchgeführt werden (PHIPPS et al., 2004; TSUKAMOTO et al., 2008). Bei diesen Methoden kann mittels nachfolgender Sequenzierung und BLAST-Analyse eine HA-Subtypisierung erfolgen. Die Methode nach GALL et al. (2008) ermöglicht zudem, anhand der HA-Spaltstellensequenz, eine Pathotypisierung der

Virusisolate. Darüber hinaus gibt es Ansätze, die eine Unterscheidung hoch- und niedrigvirulenter Virusisolate durch PCR-Restriktionsfragementlängenpolymorphismus (PCR-RFLP) ermöglichen (FEREIDOUNI et al., 2008; MICHAEL et al., 2009). Restriktionsenzyme spalten spezifisch Erkennungssequenzen an bestimmten Positionen des DNA-Doppelstranges, wobei Fragmente mit charakteristischer Länge entstehen. FEREIDOUNI et al. (2008) nutzten das Restriktionsenzym *MbolI*, das die Nukleotid-Sequenz (5'-GAAGA-3' und 3'-CTTCT-5') erkennt, die im Bereich der HA-Spaltstelle nur bei HPAIV vom Subtyp H5, nicht aber bei LPAI, vorkommt. HPAIV vom Subtyp H5 wurden im Anschluß an eine RT-PCR in der nachfolgenden *MbolI*-Reaktion typischerweise in zwei DNA-Fragmente mit 130 bzw. 180 bp-Länge gespalten, die durch Agarosegelelektrophorese detektiert werden konnten.

1.4.2. Neuraminidase (N)

Bis vor kurzem gab es nur wenige publizierte Studien, die sich mit der Neuraminidase-Subtypisierung befassten. Entwickelte Methoden zielten meistens auf den Nachweis der Subtypkomponenten N1 und N2 humaner Influenzaviren ab (TAKAO et al., 2002; KESSLER et al., 2004). Die einzige Möglichkeit alle Neuraminidase-Komponenten von N1 bis N9 auf molekularer Ebene zu detektieren bestand daher darin, die von HOFFMANN et al. (2001) beschriebene Two-Step-PCR mit nachfolgender Sequenzierung, anzuwenden, die eine relativ geringe Sensitivität besitzt und daher v. a. bei Vorliegen geringer Viruszahlen im Ausgangsmaterial nicht erfolgreich ist.

Allerdings wurden kürzlich, also nach Abschluss eines Großteils in der vorliegenden Arbeit dargestellten Laborarbeiten, PCR-Protokolle veröffentlicht, die den Nachweis aller N-Subtypkomponenten mit höherer Sensitivität ermöglichen (ALVAREZ et al., 2008; FEREIDOUNI et al., 2009). ALVAREZ et al. (2008) wählten für ihre RT-PCR ein Primerpaar, das ein 219 bp großes Fragment aller N-Subtypkomponenten amplifiziert. Eine Subtypisierung erfolgte mittels nachfolgender Sequenzierung und BLAST-Analyse. FEREIDOUNI et al. (2009) entwickelten unterschiedliche

Primerpaare für jede einzelne N-Subtypkomponente, da das Sequenz-Alignment aller N-Sequenzen (N1-N9) ausgeprägte Sequenzdiversitäten zwischen den einzelnen Komponenten, v. a. für N1 und N2, aufwies. Nach der PCR können mittels Agarosegelelektrophorese die PCR-Produkte, die subtypspezifisch, unterschiedliche Größen aufweisen, detektiert werden.

2. Epidemiologie

2.1. Vorkommen von Influenza-A-Virusinfektionen bei Wildvögeln

Infektionen mit aviären Influenza-A-Viren (AIV), und dabei im wesentlichen mit niedrigvirulenten Influenzaviren (LPAIV), konnten bisher bei mindestens 105 Wildvogelspezies aus 26 unterschiedlichen Familien detektiert werden (OLSEN et al., 2006). Wildvögel spielen eine wichtige Rolle bei der Verbreitung AIV, da deren Infektionen, sowohl mit LPAIV, als auch mit HPAIV, meistens symptomlos verlaufen (WEBSTER et al., 1992). Eine große Ausnahme stellte bisher HPAIV vom Subtyp H5N1 dar, das seit 2002 zu zahlreichen Todesfällen auch bei Wildvögeln geführt hat (STURM-RAMIREZ et al., 2004; GLOBIG et al., 2009).

Hoch- und niedrigvirulente AIV unterscheiden sich durch ihre primären Infektionsrouten. Einfluss auf die Infektionsrate nehmen Saisonalität, Wirtsspezies, Wirtsalter und Beprobungsort (OLSEN et al., 2006; MUNSTER et al., 2007). Diese Aspekte werden im Folgenden näher erläutert:

2.1.1. Infektionsrouten

Der Übertragungsweg aviärer Influenza-A-Viren unterscheidet sich, je nachdem, ob hoch- oder niedrigvirulente AIV (HPAIV bzw. LPAIV) vorliegen: Bei Infektionen mit HPAIV H5N1 fanden sich in Rachentupfern stets höhere Virustiter als in Kloakaltupfern. Dies wurde als Anzeichen für eine primäre Übertragung über den Respirationstrakt gewertet (STURM-RAMIREZ et al., 2004; BROWN et al., 2006).

LPAIV replizieren voranging im Intestinaltrakt, daher erfolgt die Virusausscheidung primär und in hohen Konzentrationen über die Fäzes. So konnten im Dünndarminhalt, experimentell mit 10^4 EID₅₀ peroral und intratracheal infizierter Stockenten (*Anas platyrhynchos*) bis zu $10^{8,7}$ EID₅₀/ml, nachgewiesen werden (WEBSTER et al., 1978). LPAIV werden daher v. a. fäkal-oral, meist über kontaminiertes Oberflächenwasser übertragen. Vor allem durch Ansammlung vieler Vögel auf engem Raum, z. B. in Ufernähe, kommt es zu einem Anstieg der Kot- und somit der Viruskonzentration, wodurch die Übertragung begünstigt wird. AIV sammeln sich in Gewässern auch am Grund an. LANG et al. (2008) untersuchten Sedimentproben aus Teichen und konnten mittels RT-PCR in mehr als 50 % ihrer Proben AIV-Genome nachweisen. Gründelenten wiesen, im Vergleich zu Tauchenten, stets höhere Prävalenzen für Infektionen mit LPAIV auf. Ihre Art der Nahrungsaufnahme in flachen Gewässern und v. a. am Gewässerboden, das sog. Gründeln (www.vogelarten.de/arten/Stockente), könnte dafür eine Erklärung liefern (OLSEN et al., 2006; IP et al., 2008). Aviäre Inflenzaviren können in Wasser, insbesondere bei kühlen Temperaturen, lange Zeit ihre Infektiosität behalten. In der Vergangenheit durchgeführte Versuche zeigten, dass sie in Flusswasser bei 0 °C über 30 und bei 22 °C bis zu vier Tage lang infektiös blieben (WEBSTER et al., 1978). STALLKNECHT et al. (1990) belegten mit destilliertem Wasser, dass AIV mindestens 60 Tage bei 17 °C und sogar 91 Tage bei 4 °C keine Verluste ihrer Infektiosität zeigten.

LATORRE-MARGALEF et al. (2009) fanden heraus, dass die mittlere Dauer der Virusausscheidung bei Stockenten mit LPAIV 3,1 bis 8,3 Tage betrug, wobei die Ausscheidungsdauer je nach Jahreszeit variierte und z. B. im November länger war als im August. Diese Tatsache steht vermutlich im Zusammenhang mit der Entwicklung einer transienten Immunität und dem Vorliegen von wahrscheinlich subtypspezifischen Antikörpern aus vorangegangenen Infektionen (KALTHOFF et al., 2008; LATORRE-MARGALEF et al., 2009).

2.1.2. Saisonalität

Die Nachweishäufigkeit LPAIV bei Wildvögeln steigt jährlich in den Herbst- und Wintermonaten deutlich an. Dieser Zeitraum entspricht dem des Vogelzuges, zu dem sich jedes Jahr große Vogelansammlungen bilden und an dem viele juvenile, immunologisch naive Tiere erstmals teilnehmen (WEBSTER et al., 1992; KRAUSS et al., 2004; GLOBIG et al., 2006; MUNSTER et al., 2007; WALLENSTEN et al., 2007; IP et al., 2008). Dieser Zeitraum bedeutet aber auch das Ende der Brutsaison, in dem sich relativ stationäre Arten wie die Stockente in größeren Gruppen zusammenschließen (www.vogelarten.de/arten/Stockente), was zu einem Anstieg des Infektionsrisikos führt.

2.1.3. Wirtsspezifität, Wirtsalter und Infektionsverlauf

In Monitoringstudien zum Vorkommen AIV unter Wildvögeln konnten Influenza-A-positive Tiere bisher überwiegend in den Ordnungen Anseriformes und Charadriiformes vorgefunden werden (Tab. II. 1) (OLSEN et al., 2006; MUNSTER et al., 2007; WALLENSTEN et al., 2007). Die höchsten Prävalenzen wurden in der Ordnung Anseriformes, und innerhalb derer, bei den Gründelenten und v. a. der Stockente mit Werten von etwa 7 % bis zu 44 % gefunden (OLSEN et al., 2006; MUNSTER et al., 2007; WALLENSTEN et al., 2007; PARMLEY et al., 2008). Zudem verlaufen Infektionen mit AIV bei adulten Wildenten meist ohne klinische Symptome (WEBSTER et al., 1992). Untersuchungen ziehender Stockenten, die mit LPAIV (u. a. H6N2, H6N8, H7N7) infiziert waren, ergaben daher auch keine direkte Beeinflussung des Migrationsverhalten hinsichtlich der zurückgelegten Distanz und Geschwindigkeit (LATORRE-MARGALEF et al., 2009). Möglicherweise gilt dies aber nicht generell. So wurde bei Zwergschwänen (*Cygnus columbianus bewickii* Yarrell), die mit LPAIV H6N2 und H6N8 infiziert waren, ein deutlich verändertes Zugverhalten beobachtet, dass sich in kürzeren Migrationsdistanzen, einem verspäteten Loszug und reduzierter Futteraufnahme zeigte (VAN GILS et al., 2007).

Neben der Wirtsspezies, spielt auch das Alter des Wirtes bei Infektionshäufigkeit und –verlauf eine bedeutende Rolle: Die Wahrscheinlichkeit mit AIV infiziert zu sein war bei juvenilen Enten, also bei Tieren im ersten Lebensjahr, stets höher als bei Adulten (MUNSTER et al., 2007; WALLENSTEN et al., 2007; IP et al., 2008; PARMLEY et al., 2008). Dies ist auch insofern von Bedeutung, da ungefähr ein Drittel der aktuellen Stockentenpopulation aus juvenilen, also immunologisch naiven Tieren besteht, weil die jährliche Mortalität bei Stockenten im ersten Lebensjahr 56 % erreicht und bei adulten Tieren immer noch 40 % beträgt (MUNSTER et al., 2007). Zudem variierte nicht nur die Infektionshäufigkeit, sondern bei HPAI H5N1 auch der Infektionsverlauf und die Mortalität bei experimentell infizierten Enten in Abhängigkeit vom Alter (PANTIN-JACKWOOD et al., 2007). So wurden bei zwei Wochen alten Enten nach Infektion mit drei von vier H5N1-Virusstämmen eine sehr hohe Letalität und schwere neurologische Symptome beobachtet. Im Gegensatz hierzu, wiesen fünf Wochen alte Tiere eine geringere Mortalität und schwächere Krankheitssymptomatik auf. Dabei wurden als Ursachen Unterschiede des sich entwickelnden Immunsystems und der noch reifenden Wirtszellen im Hinblick auf die Kapazität der Virusreplikation vermutet (PANTIN-JACKWOOD et al., 2007). Dass der Immunstatus und vor allem Kreuzreaktionen subtypspezifischer Antikörper auch bei Wildvögeln von enormer Bedeutung sind, zeigten KALTHOFF et al. (2008). Versuche mit Schwänen ergaben, dass Tiere mit neutralisierenden Antikörpern gegen H5 eine Infektion mit dem HPAIV H5N1 überlebten.

Tabelle II. 1: Wildvogelspezies mit epidemiologischer Bedeutung als AIV-Reservoir (OLSEN et al., 2006; MUNSTER et al., 2007; WALLENSTEN et al., 2007)

Ordnung	Familie	Betroffene Wildvogelspezies
Anseriformes	Anatidae	<i>Anas platyrhynchos, Anas penelope, Anas crecca, Anas acuta, Anas strepera, Anas clypeata, Anas discors, Anas rubripes, Anas poecilorhyncha, Aythya fuligula, Aix sponsa, Tadorna tadorna, Somateria mollissima</i>
		<i>Anser albifrons, Branta canadensis, Branta leucopsis, Anser anser, Branta bernicla, Anser fabalis, Anser brachyrhynchus</i>
		<i>Cygnus columbianus, Cygnus bewickii, Cygnus olor, Cygnus cygnus</i>
Charadriiformes	Laridae	<i>Larus ridibundus, Larus canus, Larus argentatus, Larus delawarensis, Larus crassirostris</i>
	Sternidae	<i>Sterna hirundo</i>
	Scolopacidae	<i>Calidris canutus, Calidris ruficollis</i>
	Alcidae	<i>Uria aalge</i>
Gruiformes	Rallidae	<i>Fulica atra</i>

2.1.4. Geographische Verbreitung/Monitoringstudien

Erst seit Mitte der 70er Jahre gibt es systematische Untersuchungen von Wildvögeln auf das Vorkommen von aviären Influenza-A-Viren (ALEXANDER, 2000). Die ersten offiziellen Wildvogelmonitoring-Programme der EU basierten auf der Entscheidung der EU-Kommission 2002/649/EC und wurden in den Mitgliedsstaaten auf freiwilliger Basis durchgeführt (EC, 2002; HESTERBERG et al., 2009). Zwischen 2003 und 2004 waren die Probenzahlen relativ gering. Seit 2005 stiegen sie aber stark an, da seitdem alle EU-Mitgliedsstaaten das Wildvogelmonitoring ausführen (EC, 2005; HESTERBERG et al., 2009).

Die bis heute umfangreichsten Wildvogelmonitoringstudien bezüglich des Vorkommens von aviären Influenzaviren fanden in Deutschland, Nordamerika, den Niederlanden und in Schweden statt (SÜSS et al., 1994; FOUCHIER et al., 2003; KRAUSS et al., 2004; GLOBIG, 2007; MUNSTER et al., 2007) und werden im Folgenden detaillierter dargestellt. Für die anderen Länder liegen vorrangig Untersuchungen zu Prävalenzen für die H5- und H7-Subtypkomponenten vor (EC, 2009; O.I.E., 2009a). In den Monitoringstudien bis etwa Anfang 2000 wurden zur Ermittlung des Vorkommens von AIV vorwiegend Methoden der klassischen Virologie, und hier vor allem Virusanzucht im embryonierten Hühnerei mit anschließender Differenzierung mittels Hämagglutinationstest (HA) und Hämagglutinations-Hemmungstest (HAH) verwendet, während in aktuellen Studien der Nachweis von AIV primär auf der Anwendung von RT-PCR Methoden beruht. Da die Sensitivität sehr unterschiedlich ist, sind die ermittelten Prävalenzen nur sehr eingeschränkt vergleichbar.

Ein Überblick über die in den einzelnen Studien am häufigsten nachgewiesenen Subtypkombinationen findet sich in Tabelle II. 2. Der Subtyp H4N6 wurde flächenübergreifend am häufigsten detektiert.

Deutschland

Die umfangreichste Wildvogelmonitoringstudie in Deutschland fand von 1977 bis 1989 in der damaligen DDR statt (SÜSS et al., 1994). SÜSS et

al. (1994) beprobten Hausenten, Sentinelen, Wildenten und andere Wildvögel mittels Tracheal- und Kloakaltupfern und wiesen Infektionen mit AIV mittels Virusanzucht im embryonierten Hühnerei nach. Allerdings war die Anzahl der Beprobungsorte sehr gering. So wurden nur ein Betrieb mit Hausenten, drei Stationen mit Sentineltieren, also domestizierten Enten, die Kontakt zu Wildvögeln hatten, und lediglich an 14 verschiedenen Standorten Wildvögel beprobt. Die höchste Virusisoliationsrate wurde mit 38 % bei Hausenten und mit 37 % bei den Sentinelen gefunden. Bei Wildenten und anderen Wildvögeln wurden AIV mit 8,7 % und 0,9 % weniger häufig isoliert. In einer 4 jährigen (1977 bis 1980) Studie von OTTIS & BACHMANN (1983) wurden u. a. in Bayern, Baden Württemberg, den Niederlanden und Kenia knapp 3.400 Wildvögel auf AIV untersucht, wobei etwa 90 % der beprobten Vögel aus Deutschland stammten. Die höchste Nachweisrate von AIV durch VI im embryonierten Hühnerei mit nachfolgendem HA und HAH wurde bei Wildenten festgestellt, und betrug 3,7 % (OTTIS & BACHMANN, 1983). In den Jahren 2001 und 2002 untersuchten HLINAK et al. (2006) an einem Beprobungsstandort, dem Gülper See in Brandenburg, schwerpunktmäßig Watvögel, aber auch andere Wildvögel auf das Vorkommen AIV. Bei nur 0,6 % der beprobten Wildvögel und lediglich bei Knäk- und Krickente konnten AIV mittels HA und HAH detektiert werden (HLINAK et al., 2006).

Von 2003 bis 2005 wurden in Deutschland, und zwar vorrangig in Mecklenburg-Vorpommern, Brandenburg, Sachsen und Sachsen-Anhalt, Wildvögel (n=3672) aus 11 unterschiedlichen Ordnungen beprobt (GLOBIG et al., 2006; GLOBIG, 2007). Nur wenige Daten aus Bayern wurden einbezogen, hier wurden nur Kanadagänse (n=50) und eine Graugans beprobt. Tupfer- und Organproben wurden einer Virusanzucht im embryonierten Hühnerei unterzogen und erhaltene Isolate mittels HA, HAH und NAH subtypisiert. GLOBIG (2007) detektierte AIV in den Ordnungen Anseriformes, Charadriiformes, Gruiformes und Passeriformes mit der höchsten Nachweisrate von 2,2 % bei den Anseriformes und einer durchschnittlichen Prävalenz über alle Ordnungen von 1,4 %. Zudem wurden AIV nur in den Herbst- und Wintermonaten und an nur wenigen Beprobungsorten festgestellt.

Nordamerika

In Kanada beprobten KRAUSS et al. (2004) 26 Jahre lang und zwar von 1976 bis 2001, Wildenten und über 16 Jahre, von 1985 bis 2000, Möwen und Watvögel. Die höchste Prävalenz AIV konnte mittels VI im embryonierten Hühnerei stets bei Wildenten beim Wegzug im Herbst (22,2 %) und bei Möwen- und Watvögeln beim Heimzug im Frühling (14,2 %) festgestellt werden. Von 2001 bis 2006 wurde das Wildvogelmonitoring fortgeführt, wobei in diesem Zeitraum die Prävalenz, ebenfalls mit Hilfe der VI ermittelt, für Wildenten bzw. Möwen- und Watvögel 16,6 % bzw. 5,8 % betrug. Es zeigten sich somit auch in Kanada deutliche Unterschiede in den Prävalenzen je nach Jahreszeit und beprobten Vogelordnungen. Dass die AIV-Prävalenz auch in Abhängigkeit vom Beprobungsort variiert, wurde für Kanada ebenfalls festgestellt. Die Nachweisrate AIV-positiver Vögel in der RT-rPCR reichte von 63 % im südlichen Quebec bis 9 % im südlichen Alberta (PARMLEY et al., 2008). Diese Unterschiede könnten aber auch zusätzlich saisonal oder speziesbedingt sein, hierzu fehlen allerdings analysierbare Angaben.

Nordeuropa: Niederlande/Schweden

Von 1998 bis 2006 wurden knapp 37.000 Vögel, die zu 90 % aus den Niederlanden und Schweden und zu 10 % aus anderen Ländern weltweit stammten, untersucht (FOUCHIER et al., 2003; MUNSTER et al., 2007; WALLENSTEN et al., 2007). Es wurden über 300 Vogelarten aus 18 Ordnungen einbezogen. Nur 25 Vogelspezies aus drei Ordnungen erwiesen sich in der RT-PCR Influenza-A-positiv (Tab. II. 1). In diesen Studien wurde die höchste Prävalenz von 12,5 % in der Ordnung Anseriformes festgestellt (WALLENSTEN et al., 2007), gefolgt von den Ordnungen Charadriiformes und Gruiformes mit 0,7 % bzw. 0,4 % Influenza-A-positiven Tieren (MUNSTER et al., 2007). Unter den beprobten Wildenten wiesen die Gründelenten (6,1 %) im Vergleich mit den Tauchenten (1,3 %) die höheren Nachweisraten auf (MUNSTER et al., 2007).

Tabelle II. 2: Bei Wildvögeln der Ordnung Anseriformes in Langzeitstudien in Europa und Nordamerika am häufigsten nachgewiesene Subtypen und AIV-Prävalenzen (modifiziert nach WALLENSTEN et al. (2007))

Ort	Zeitraum	Häufigste Subtypen (Anseriformes)	AIV-Prävalenz (%)	Quelle
Kanada	1976-2001	H3N8, H6N2, H4N6	22,2	(KRAUSS et al., 2004)
	2001-2006	H4N6, H1N4, H10N7	16,6	(KRAUSS et al., 2007)
Deutschland	1977-1980	H3N8, H4N6, H11N3	3,7	(OTTIS & BACHMANN, 1983)
	1977-1989	H2N3, H4N6, H1N1	8,7	(SÜSS et al., 1994)
	2003-2005	H2N3, H10N7, H4N6	2,2	(GLOBIG, 2007)
Schweden	1998-2006	H6N8, H6N2, H6N1	4,6	(MUNSTER et al., 2007)
	2002-2005	H4N6, H7N7, H6N2	12,5	(WALLENSTEN et al., 2007)

2.2. Subtypverteilung

2.2.1. Subtypverteilung LPAIV unter Wildvögeln

Bis heute konnten bei Wildvögeln alle HA- und N-Subtypkomponenten und die meisten der 144 möglichen Subtypkombinationen nachgewiesen werden (ALEXANDER, 2007). Niedrigvirulente aviäre Influenza-A-Viren wurden bei mindestens 105 Wildvogelspezies aus 26 unterschiedlichen

Familien detektiert (OLSEN et al., 2006). Für die meisten HA- und N-Subtypkomponenten zeigten phylogenetische Analysen das Vorliegen getrennter amerikanischer und eurasischer Genpools (WALLENSTEN et al., 2005; OLSEN et al., 2006).

Vögel der Ordnungen Anseriformes und Charadriiformes gelten als Hauptreservoir für aviäre Influenzaviren. Die Hämagglutinininkomponenten H1 bis H12 wurden bei Arten aus beiden Ordnungen häufig nachgewiesen (KRAUSS et al., 2004; MUNSTER et al., 2007; WALLENSTEN et al., 2007). Für die Hämagglutintypen H13 und H16 wurden gewisse Wirtsspeziespräferenzen vorgefunden: Beide Subtypkomponenten wurden bisher zwar nur gelegentlich, dann aber vorrangig in der Ordnung Charadriiformes vorgefunden, wobei die Subtypkomponente H16 erstmalig bei Lachmöwen in Schweden beschrieben wurde (FOUCHIER et al., 2005). Dies spricht für das Vorliegen eines eigenen, separierten genetischen Reservoirs (KAWAOKA et al., 1988; FOUCHIER et al., 2005). GLOBIG et al. (2006) konnten den Hämagglutintyp H13 bei einer Dohle aus der Ordnung Passeriformes nachweisen. Die Subtypen H14 und H15 wurden bislang nur sehr selten detektiert, und zwar H14 lediglich in Russland, ohne Angaben der Wirtsspezies (KAWAOKA et al., 1990; LVOV et al., 2001) und H15 bei einer Wildente und einem Sturmtaucher in Australien (ROHM et al., 1996).

Hinsichtlich der N-Subtypkomponenten scheint keine Wirtsspezifität vorzuliegen. So konnten KRAUSS et al. (2004) in Nordamerika bei Anseriformes (13.466 untersuchte Vögel) und Charadriiformes (4.266 untersuchte Vögel) alle N-Subtypkomponenten nachweisen. In Nordeuropa wurden bei Stockenten (8.938 untersuchte Tiere) ebenfalls alle N-Subtypkomponenten festgestellt, bei Möwen und Watvögeln (3.653 untersuchte Vögel) wurde allerdings nur N3, N6 und N8 detektiert (MUNSTER et al., 2007).

Vögel der Ordnung Gruiformes waren bisher eher selten Influenza-A-positiv und es wurde nur eine begrenzte Anzahl von Subtypen nachgewiesen. In Italien konnten bei Blässhühnern Antikörper gegen H3 und H10 festgestellt und in Deutschland der Subtyp H10N4 nachgewiesen

werden (DE MARCO et al., 2004; GLOBIG et al., 2006). Bei Wildenten in Kanada isolierten KRAUSS et al. (2004) die Subtypkomponenten H3, H4 und H6 am häufigsten, wobei ein zyklisches Muster (Jahre mit hoher Prävalenz, darauf folgend kein Nachweis) im Auftreten der einzelnen Subtypkomponenten erkennbar war. Als Subtypkombinationen wurden v. a. H4N6 und H6N2 nachgewiesen (Tab. II. 2) (KRAUSS et al., 2004; MUNSTER et al., 2007; WALLENSTEN et al., 2007).

2.2.2. Subtypen mit Gefährdungspotential für Nutzgeflügel

Die Frage, ob für die Einschleppung von AIV in Wirtschaftsgeflügelbestände Wildvögel oder eher der Handel mit Wirtschaftsgeflügel selbst oder ihren Produkten größere epidemiologische Bedeutung besitzen, wird derzeit immer noch kontrovers diskutiert. Die Auffassung, dass Wildvögel für die Einschleppung von AIV in Nutzgeflügelbeständen zumindest eine gewisse Bedeutung besitzen, wird durch folgende Hinweise gestützt: Zum einen konnten höhere AIV-Prävalenzen in Betrieben entlang der Migrationsrouten festgestellt werden. Zum anderen gab es stets eine höhere AIV-Prävalenz für Nutzgeflügel in Freilandhaltung und somit potentiell Wildvogelkontakt. Zudem zeigten Geflügelpestausbüche oftmals saisonale Peaks, die mit dem Beginn des Vogelzuges in Verbindung gebracht werden konnten (ALEXANDER, 2007).

Infolge der Ausbreitung HPAIV vom Subtyp H5N1 dehnte die Weltorganisation für Tiergesundheit (O.I.E.) bei Nutzgeflügel die Definition für anzeigepflichtige AIV (notifiable (N) AIV) aus (O.I.E., 2005). Ähnlich wurden die zu treffenden Kontrollmaßnahmen in den EU-Richtlinien angepasst (EC, 2005). Diese bezogen sich vorher nur auf HPAIV der Subtypkomponenten H5 und H7 und wurden jetzt auch auf deren LPAIV ausgedehnt, also auf H5 und H7, die weder molekular noch in vivo die Kriterien HPAIV erfüllen (EC, 2005; O.I.E., 2005; ALEXANDER, 2008).

Die nachfolgend dargestellten Subtypen H5N1, H5N2, H5N3, H7N3, H7N7 und H9N2 haben bezüglich ihres Gefährdungspotentials für Wirtschaftsgeflügel enorme Bedeutung erlangt:

H5N1

Die derzeit zirkulierenden hochvirulenten (HPAIV) H5N1 asiatischer Herkunft traten erstmalig 1996 bei domestizierten Gänsen (A/goose/Guangdong/1/96) in Südchina in Erscheinung (SHORTRIDGE et al., 1998). In den darauffolgenden Jahren kam es in Südostasien zu hohen Mortalitätsraten und zahlreichen Todesfällen unter Wildvögeln, wie beispielsweise 2002 in Hong Kong (STURM-RAMIREZ et al., 2004) und 2005 am chinesischen Qinghai-See (CHEN et al., 2005). Nachfolgend breitete sich das Virus nach Westen aus und erreichte Europa Ende 2005 und Deutschland Anfang 2006. Allein in Deutschland wurden von 2006 bis heute Hunderttausende Tiere (v. a. Hühner, Enten und Puten) gekeult, was zu enormen wirtschaftlichen Verlusten führte.

Im Jahr 2009 gab es bei Wirtschaftsgeflügel in Deutschland keine Fälle von HPAIV H5N1. In vielen asiatischen Ländern, zum Beispiel in China oder Indonesien, stellt H5N1 aber immer noch ein großes Problem für die Wirtschaftsgeflügelhaltung dar und Ägypten gilt auch 2009 immer noch als für diesen Erreger endemisches Gebiet (O.I.E., 2009b).

Darüber hinaus besitzt HPAIV H5N1 ein sehr breites Wirtsspektrum, das auch den Menschen einschließt und spielt hier insbesondere wegen sehr hohen Mortalitätsraten eine wichtige Rolle als Zoonoseerreger. So erkrankten bisher 442 Menschen und es kam zu 262 Todesfällen (WHO, 2009).

Bei Wildvögeln wurden in Deutschland von 2006 bis 2007 in sieben verschiedenen Bundesländern hochvirulente Influenza-A-Viren vom Subtyp H5N1 bei 30 unterschiedlichen Wildvogelspezies nachgewiesen (GLOBIG et al., 2009): 46 % aller an HPAIV H5N1 verendeten Wildvögel wurden auf der Insel Rügen gefunden, davon waren 90 % Singschwäne. Am Bodensee fand man v. a. Tafelenten, die an der H5N1-Infektion verendet waren. Bei toten Stockenten und Blässhühnern konnte jeweils kein HPAIV H5N1 festgestellt werden. Die Isolate aus Rügen sind der Subclade 2.2.2 (EMA-2) die vom Bodensee der Subclade 2.2.1 (EMA-1) zugehörig (STARICK et al., 2008). Die HPAIV H5N1, die in diesem Zeitraum aus toten Wildvögeln in Bayern isoliert wurden (2006: n=74;

2007: n=19), waren auf Nukleotid-Sequenzebene der HA- und N-Subtypkomponente mit Viren unterschiedlicher geographischer Herkunft verwandt. Phylogenetische Analysen des Hämagglutinins ergaben für das Jahr 2006 zwei getrennte Cluster, die der Subclade 2.2.1 (EMA-1) zuzurechnen sind, im Jahr 2007 konnten ebenfalls zwei differente genotypische Gruppen (Subclade 2.2.3; EMA-3) festgestellt werden. Die Tatsache, dass es sich nach Sequenzanalysen um deutlich abgrenzbare Isolate handelte, die mit Viren anderer geographischer Herkunft näher verwandt waren als die aus Bayern stammenden Genotypen untereinander, wies auf mehrere, voneinander unabhängige Einschleppungen von H5N1 nach Bayern hin (RINDER et al., 2007; LANG et al., zur Publikation eingereicht). Das Krankheitsgeschehen bei Wildvögeln war bis zum Jahr 2004 stets durch hohe Mortalitätsraten gekennzeichnet (STURM-RAMIREZ et al., 2004). Nachfolgend konnten allerdings auch Infektionen mit HPAIV H5N1 detektiert werden, die ohne klinische Symptome verliefen: 2004 wurden bei Untersuchungen von Feldsperlingen (*Passer montanus*) in China vier hochvirulente AIV vom Subtyp H5N1 isoliert. Die beprobten Vögel zeigten aber keinerlei Krankheitssymptome (KOU et al., 2005). Im Januar und März 2005 wurden am Poyang-See, einem bedeutenden Überwinterungsareal für migrierende Wasservögel in China, sechs Isolate von H5N1 (HPAI) aus symptomfreien Wildenten, u. a. aus der Sichelente (*Anas falcata*), der Stockente (*Anas platyrhynchos*) und der Fleckschnabelente (*Anas poecilorhyncha*), gewonnen (CHEN et al., 2006). Es wurde spekuliert, dass Zugvögel aus dieser Gegend das Virus auf Wildvögel am chinesischen Qinghai-See übertragen und somit das dort aufgetretene Massensterben von über 5000 Streifengänsen (*Anser indicus*) verursacht haben könnten (CHEN et al., 2005). In Europa erfolgte im Februar 2008 am Sempacher See in der Schweiz, ein singulärer Nachweis des HPAIV H5N1-Subtyps bei einer gesunden Tafelente (*Aythya ferina*) (O.I.E., 2008). Da es sich hier um einen Einzelfall handelte und andere Vögel aus diesem Gebiet, die im Rahmen eines Monitoringprogrammes untersucht wurden, negativ waren, kann allerdings eine Laborkontamination nicht sicher ausgeschlossen werden.

Experimentelle Infektionen mit HPAI H5N1 bestätigten die Variabilität in der Pathogenität, die bei natürlichen Infektionen in Wildvögeln beobachtet worden war. So variierte bei experimentell mit H5N1 infizierten Stockenten das klinische Bild von fehlender Symptomatik bis hin zu schweren ZNS-Störungen und Tod (STURM-RAMIREZ et al., 2005). Im Gegensatz zu infizierten Gründelenten entwickelten Tauchenten (Tafel- und Reiherenten) stets eine klinische Symptomatik oder starben (KEAWCHAROEN et al., 2008). Symptomlose Wildvögel könnten somit als sog. „Trojanische Pferde“ fungieren und zu einer Verbreitung von HPAI H5N1 Typ Asia beitragen (WEBSTER et al., 2007).

H5N2

Hochpathogene AIV vom Subtyp H5N2 besitzen große Bedeutung für Wirtschaftsgeflügel, wie die Geflügelpestausbüche in Pennsylvania (1983) (BEAN et al., 1985), Mexiko (1994) (GARCIA et al., 1996) und Norditalien (1997 bis 1998) (DONATELLI et al., 2001) zeigten. Bei Wildvögeln scheinen HPAI H5N2 allerdings bisher als Krankheitserreger keine Rolle zu spielen. So gelang in Nigeria im Februar 2007 bei klinisch unauffälligen Wildvögeln, und zwar einer Witwenente (*Dendrocygna viduata*) und mehreren Sporngänsen (*Plectropterus gambensis*), der Nachweis hochvirulenter H5N2-Subtypen. Satelliten-Telemetrie bewies sogar für eine der infizierten Enten ein Überleben von mindestens 47 Tagen. Erstaunlicherweise ergaben molekular-phylogenetische Analysen des HA-Gens die höchste Sequenzverwandtschaft zu einem als schwach virulent beurteilten (LPAI) H5N2 Isolat aus Bayern, A/mallard/Bavaria/1/2005 (GAIDET et al., 2008). Dies zeigt, dass LPAI- und HPAI-Viruspopulationen ein und desselben Subtyps mit hoher Nukleinsäuresequenz-Verwandtschaft in geographisch sehr weit entfernten Regionen auftreten und möglicherweise auch über weite Entfernungen transportiert werden können.

H5N3

1961 wurde erstmals unter Wildvögeln, nämlich Fluss-Seeschwalben (*Sterna hirundo*) in Südafrika, ein Massensterben durch AIV beobachtet und dabei der hochvirulente Subtyp H5N3 nachgewiesen (BECKER, 1966). Dieses Virusisolat zeigte große Ähnlichkeit zu dem Isolat A/Chicken/Scotland/1959 (H5N1), das die Klassische Geflügelpest in Schottland verursachte (BECKER, 1967).

In Deutschland wurde von Dezember 2008 bis Januar 2009 LPAIV vom Subtyp H5N3 in Putenbeständen und einem Gemischtbetrieb (Enten, Hühner und Gänse) im Landkreis Cloppenburg in Niedersachsen nachgewiesen. Die Infektionen äußerten sich mit nur geringgradiger oder fehlender klinischer Symptomatik. Trotzdem wurden insgesamt etwa 570.000 Tiere im Rahmen der Tierseuchenbekämpfung getötet. Wie die Einschleppung des Virus erfolgte ist bisher unbekannt. Das in dieser Region durchgeführte Wildvogelmonitoring ergab jedenfalls keinen Nachweis AIV (FLI, 2009).

H7N3

Im Jahr 2006 konnten KRAUSS et al. (2007) aus Möwen- und Watvögeln in Delaware Bay (New Jersey) auffällig häufig den Subtyp H7N3 isolieren: Es handelte sich zwar um LPAIV, allerdings kam es in virusbeimpften Hühnereiern nach 48 h zu einem Absterben der Embryonen. Ein Gefährdungspotential für Nutzgeflügel wurde für dieses Virusisolat daher gefolgert. Ein ähnliches H7N3-Virus wurde 2004 in Nutzgeflügel in British Columbia isoliert (HIRST et al., 2004).

H7N7

Die Geflügelpest in den Niederlanden im Jahr 2003 wurde durch ein HPAIV vom Subtyp H7N7 ausgelöst. In diesem Zusammenhang infizierten sich auch 89 Menschen mit diesem Subtyp, wobei ein Tierarzt an den Folgen einer Pneumonie in Kombination mit einem akuten respirato-

rischem Distresssyndrom verstarb (FOUCHIER et al., 2004). Als Bekämpfungsmaßnahme wurde ein Drittel der niederländischen Nutzgeflügelbestände gekeult.

Das aus den Nutzgeflügelbeständen gewonnene Virusisolat zeigte in seiner Genomsequenz enge Verwandtschaft zu LPAIV vom Subtyp H7N3 und H10N7, die während des Wildvogelmonitorings in den Niederlanden bei Stockenten nachgewiesen wurden. Es wurde daher spekuliert, dass eine Einschleppung dieser Viren in die Wirtschaftsgeflügelbestände den Ausbruch verursacht haben könnte (FOUCHIER et al., 2004; MUNSTER et al., 2005).

H9N2

Dem Subtyp H9N2 wird, genauso wie H5N1, großes Infektionspotential für Nutzgeflügel unterstellt, da er ebenfalls Krankheitserscheinungen bei Wirtschaftsgeflügel verursachen kann. In Asien wurden Viren dieses Subtyps bereits aus der Wildvogelpopulation in Nutzgeflügelbestände eingetragen und breiteten sich dort stark aus (ALEXANDER, 2007; DUCATEZ et al., 2008). Die klinische Symptomatik bei Infektionen mit H9N2 variierte von milden respiratorischen Erscheinungen bis hin zu Todesfällen, wobei hier auch Sekundärinfektionen beteiligt waren. Bei Wildvögeln in Nordamerika isolierte H9-Subtypkomponenten zeigten große Homologie zu eurasischen H9-Isolaten der Y439-Gruppe, also mit Viren die auch häufig in Nutzgeflügelhaltungen in Hong Kong und Korea gefunden wurden (JACKWOOD & STALLKNECHT, 2007). Die bei anderen HA-Subtypkomponenten festzustellende Trennung von eurasischen und amerikanischen Genpools wurde hier also nicht beobachtet. Es wurde daher vermutet, dass eine Durchmischung der Genpools in der Vergangenheit vielleicht durch Einfuhr von Geflügel, insbesondere Puten, aus Nordamerika nach Europa verursacht wurde (BANKS et al., 2000).

Wie experimentell nachgewiesen wurde, besitzen viele H9N2-Subtypen eine Rezeptorpräferenz für α 2,6-gebundene N-Acetyl-Neuraminsäuren,

also für Influenza-Zellrezeptoren, die häufig beim Menschen vorkommen (MATROSOVICH et al., 2001; WAN & PEREZ, 2007). Diesen Viren wird daher ein zoonotisches Potential zugeschrieben. Eine Infektiosität für den Menschen wurde bereits mehrfach durch Erkrankungsfälle bestätigt (MALIK PEIRIS, 2009).

2.3. Mischinfektionen

Die Relevanz von Mischinfektionen mit unterschiedlichen AIV gründet in der Tatsache, dass sie die Voraussetzung für ein genetisches Reassortment bilden (HINSHAW et al., 1980; SHARP et al., 1997). Einer der ersten Nachweise von Mischinfektionen mit aviären Influenzaviren gelang 1978 bei Wildenten in Alberta, Kanada (HINSHAW et al., 1978; SHARP et al., 1997). Dort wurden im Zeitraum von 1976 bis 1990 bei 54 Vögeln Infektionen mit mehr als einem Subtyp AIV festgestellt. Bei 47 Vögeln wurden Infektionen mit zwei unterschiedlichen Subtypen, und bei sieben Tieren mit drei verschiedenen Subtypen nachgewiesen (SHARP et al., 1997). Am häufigsten konnten bei den mit zwei Subtypen infizierten Vögeln die Subtypkombinationen H3N8 und H6N2, bei Dreifachinfektionen zusätzlich noch H4N6 nachgewiesen werden, also die bei Enten generell am häufigsten vorkommenden (Tab. II. 2) und wohl auch an die beprobten Entenspezies am besten adaptierten Subtypen (SHARP et al., 1997). Das Risiko für Mischinfektionen bei juvenilen Enten im Vergleich zu Adulten war zwar 1,6-fach höher, allerdings nicht statistisch signifikant (SHARP et al., 1997). Bei einer Studie in Alaska fanden WANG et al. (2008) in 16 % der AIV-positiven Kloakal-Tupferproben Mischinfektionen mit zwei bis fünf unterschiedlichen HA-Subtypkomponenten. In einer Studie von DUGAN et al. (2008) wurden AIV im Hühnerei vermehrt und anschließend durch Sequenzierung charakterisiert. Dabei beinhalteten 26 % der Virusisolate Mischungen aus unterschiedlichen Influenza-A-Viren.

Grundsätzlich kann genetisches Reassortment zwischen allen AIV-Viren auftreten, die sich in einzelnen Segmenten unterscheiden, ein Risiko besteht unter Umständen also auch bei Viren desselben Subtyps. So konnten bei fünf untersuchten Stockenten, die am gleichen Ort zur

gleichen Zeit beprobt wurden und denselben Subtyp H4N6 aufwiesen, vier unterschiedliche Genomkonstellationen (PB1, PB2, PA, NP, M, NS) festgestellt werden (DUGAN et al., 2008).

Aviäre Paramyxoviren (APMV), die eine ähnliche klinische Symptomatik wie AIV verursachen und ebenfalls hämagglutinierende Eigenschaften besitzen, müssen diagnostisch von AIV unterschieden werden. So konnte in Deutschland APMV-4 häufig bei Wildenten gefunden werden (HLINAK et al., 2006; GLOBIG, 2007). Allerdings kommen auch Mischinfektionen mit APMV und AIV vor. DORMITORIO et al. (2009) wiesen beispielsweise den Subtyp H1N1 in Kombination mit APMV-1 (Erreger der Newcastle Disease) nach.

3. Zielsetzung

Ziel dieser Studie war es, Daten über die aktuelle Verbreitung aviärer Influenza-A-Viren in der Wildvogelpopulation in Bayern zu gewinnen. Zur Bestimmung der AIV-Prävalenzen mit Bezug auf Wirtsspezifität, Saisonalität und geographischer Verbreitung sollten Wildvögel aus verschiedenen Regionen Bayerns in die Untersuchungen einbezogen werden. Im Mittelpunkt stand dabei die Frage nach der Existenz eines H5N1-Reservoirs. Zudem sollten Informationen über vorkommende Subtypen, insbesondere mit Gefährdungspotential für Wirtschaftsgeflügel, gesammelt werden.

Die hier dargestellte Untersuchung von Wildvögeln auf aviäre Influenza in Bayern, die den Zeitraum von Juli 2007 bis März 2009 umfasste, wurde vom Bayerischen Staatsministerium für Umwelt, Gesundheit und Verbraucherschutz in Auftrag gegeben und finanziert (Projekt 07-04). Die Laboruntersuchungen wurden im Bayerischen Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit in Oberschleißheim durchgeführt.

III. MATERIAL UND METHODEN

1. Probenmaterial

In die vorliegende Untersuchung wurden 6.114 Vögel einbezogen, die über einen Zeitraum von Juli 2007 bis März 2009 auf Influenza-A-Virusinfektionen untersucht wurden. Der Großteil der untersuchten Vögel (n=2943) wurde sowohl mittels Rachentupfer als auch mittels Kloakaltupfer (Virocult Medical Wire & Equipment, UK) beprobt, während bei 135 und 91 Tieren aus organisatorischen Gründen nur Rachen- bzw. nur Kloakal-Tupferproben entnommen werden konnten. Dabei wurden die meisten Tupferproben in der Jagdsaison und von den Jagdausübungsberechtigten selbst genommen. Außerdem wurden Organproben (Luftröhre, Enddarm, Lunge, Gehirn) einbezogen, die ausschließlich (n=180) oder zusätzlich zu Tupferproben (n=383) entnommen wurden. Frisch abgesetzte Kotproben (n=2765) wurden ebenfalls untersucht.

1.1. Beprobte Wildvogelspezies

Bei den Beprobungen wurden überwiegend Vogelarten berücksichtigt, die zu den Risikoarten für AIV zählen und im Anhang II der Entscheidung der EU-Kommission 2007/268/EG gelistet sind (EC, 2007). Schwerpunktmäßig fand die Probenentnahme bei Wasservögeln (Enten, Schwäne, Gänse, Rallen) statt (Tab. III. 1). Darüber hinaus wurden auch Vogelarten mit möglichem Nutzgeflügelkontakt (z. B. Fasane, Lachmöwen) und andere Risikoarten, wie Greifvögel und Aasfresser (z. B. Krähen) untersucht. Es handelte sich bei den beprobten Tieren überwiegend um in Bayern heimische Wildvögel, zudem wurden im Zoo Augsburg auch einzelne exotische Vögel (u. a. Austernfischer, Kuhreiher) mit potentielltem Kontakt zu Wildvögeln beprobt. Die Proben von Greifvögeln und Eulen stammten größtenteils aus der Klinik für Vögel (LMU München) und der Auffang- und Pflegestation in Regenstauf (LBV, 2009).

Tabelle III. 1: Probenanzahl der im Studienzeitraum am häufigsten beprobten Wildvogelspezies (n>35)

Ordnung	Vogelart	Wissenschaftliche Bezeichnung	n
Anseriformes	Stockente	<i>Anas platyrhynchos</i>	3474
	Reiherente	<i>Aythya fuligula</i>	40
	Graugans	<i>Anser anser</i>	678
	Kanadagans	<i>Branta canadensis</i>	239
	Höckerschwan	<i>Cygnus olor</i>	261
Gruiformes	Blässhuhn	<i>Fulica atra</i>	678
Galliformes	Fasan	<i>Phasianus colchicus</i>	118
Accipitriformes	Mäusebussard	<i>Buteo buteo</i>	44
	Turmfalke	<i>Falco tinnunculus</i>	45
Charadriiformes	Lachmöwe	<i>Larus ridibundus</i>	127
Passeriformes	Aaskrähe	<i>Corvus corone</i>	63

1.2. Beprobungszeitraum

Im Zeitraum von Juli 2007 bis März 2009 konnten in jedem Monat Wildvögel beprobt werden, allerdings in unterschiedlichen Größenordnungen (Abb. III. 1). Die meisten Proben wurden während der Jagdsaison in den Herbst- und Wintermonaten genommen (n=2777). So liegt die Jagdzeit der Stockente, der am häufigsten besammelten Vogelart, zwischen dem 1. September und dem 15. Januar (Landesjagdverband Bayern e. V.). Im Frühjahr wurden wegen der Brut- und Schonzeit verstärkt Kotproben (n=2765) gesammelt. Im Sommer wurden Wildvögel mittels eines Kanonennetzes oder per Hand zur Entnahme von Rachen- und Kloakentupferproben eingefangen und beprobt (n=170). Darüber hinaus konnten ganzjährig Proben von Wildvögeln aus Auffangstationen und Zoos (auch exotische Vögel mit potentiell Wildvogelkontakt) (n=87) und von verletzt aufgefundenen Tieren aus der Klinik für Vögel (n=315) entnommen werden.

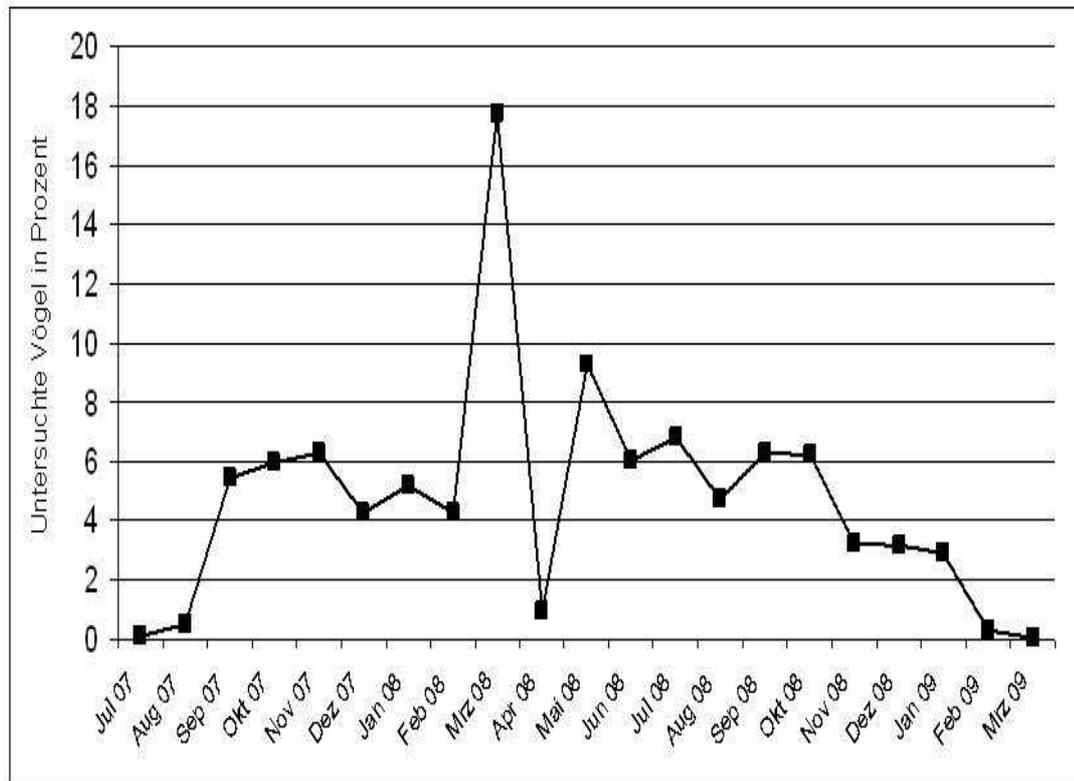


Abbildung III. 1: Monatliche Verteilung der untersuchten Proben (als prozentualer Anteil an der Gesamtprobenanzahl).

1.3. Beprobungsgebiet

Die Beprobungen fanden bayernweit statt, wobei sich zwischen den Regierungsbezirken die relativen Anteile am Probengesamtaufkommen unterschieden. In die Untersuchungen wurden Proben aus 69 von 71 Landkreisen in Bayern einbezogen. Wassergeflügel wurde überwiegend im Rahmen von Großjagden beprobt, die v. a. in Schwaben (Landkreis Donau-Ries) und Oberbayern (Landkreise Pfaffenhofen an der Ilm und Freising) stattfanden. Beim Lebendfang wurden Standorte an Seen (u. a. Bodensee, Wöhrder See, Starnberger See, Altmühlsee), Teiche, Bäche und Flüsse Bayerns, die von futterzahmen Wasservögeln genutzt werden, bevorzugt.

2. Labormaterial

2.1. Zellen

MDCK – Zellen	ATCC® Nr. CCL-34
1%ige Hühnererythrozytenlösung	Klinik für Vögel, LMU München

2.2. Chemikalien, Reagenzien und Nährmedien

DEPC-H ₂ O	Invitrogen
Ethanol 100 %	Merck
Isopropanol	Merck
Methanol 100 %	Merck
Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTP)	Invitrogen
Phosphate buffered saline (PBS)	PAA
Tween-20	Roth
0,1 M DTT	Invitrogen
RNase-Out	Invitrogen
IC2-RNA (Kontroll-RNA für die pan AIV RT-rPCR)	Friedrich-Loeffler-Institut (FLI)

Antikörper und Konjugate

Anti-AIV Kaninchenserum	Dr. Voigt, FLI Tübingen
Anti-Kaninchen Peroxidase-Konjugat	Promega

Agarosegel 1 bzw. 2%ig

1 bzw. 2 g Agarose	Gibco
100 ml TAE-Puffer	Gibco
3 µl (0,01 µg/µl) Ethidiumbromidlösung	Roth

Zellkulturmedium

Minimal Essential Medium (MEM)
(Earle´s Salze) Gibco

Zusätze für Zellkultur

7,5 % Bikarbonat (Bic) PAA
FBS (fötales bovines Serum) PAA
Gentamycin PAA
Nicht-essentielle Aminosäuren (NEA) PAA
Penicillin G Grünenthal
Streptomycin Hefa Pharma

Medium für Tupfer- und Organproben

MEM mit Glutaminzusatz Gibco
10 % fötales bovines Serum (FBS) PAA
1 % Antibiotika-Antimykotica: Gibco
10.000 U/ml Penicillin,
10.000 µg/ml Streptomycin,
25 µg/ml Amphotericin B
2 % Fungizone: Gibco
250 µg/ml Amphotericin B
0,3 % Gentamycin Gibco

Medium für Kotproben

MEM mit Glutaminzusatz Gibco
10 % fötales bovines Serum (FBS) PAA
10 % Antibiotika-Antimykotica: Gibco
10.000 U/ml Penicillin,
10.000 µg/ml Streptomycin,
25 µg/ml Amphotericin B
0,3 % Gentamycin Gibco

2.3. Puffer und LösungenPhysiologische Kochsalzlösung

Applichem

8,0 g NaCl ad 1000 ml Aqua bidest

Lösungen für die Immunfluoreszenz:Fixierlösung

3 Teile Ethanol (100%ig) und

Merck

1 Teil Methanol (100%ig)

Merck

Waschlösung I

2 Teile Aqua bidest und

1 Teil Waschlösung II

Waschlösung II

PBS mit

PAA

0,1 % Tween 20

Roth

Substratlösung

Vector VID

Vector Laboratories

50x TAE-Puffer bzw. 1x TAE-Puffer

Gibco

TE-Puffer

Applichem

6x DNA-Ladepuffer

Sigma

100 bp-Größenmarker

Invitrogen

2.4. Enzyme

HotStar Taq DNA Polymerase

QIAGEN

SuperScript II Reverse Transkriptase

Invitrogen

SuperScript III Platinum Taq DNA
Polymerase

Invitrogen

Für Reaktionen mit diesen Enzymen wurden die vom jeweiligen Enzymhersteller mitgelieferten Puffer und weiteren Reagenzien verwendet.

2.5. Kits

QIAamp Viral RNA Mini Kit	QIAGEN
QIAamp Virus BioRobot 9604 Kit	QIAGEN
QIAquick Gel Extraction Kit	QIAGEN

Bei der Anwendung dieser Kits wurden die vom jeweiligen Hersteller mitgelieferten Puffer und weiteren Reagenzien verwendet.

2.6. Primer

Für die Reverse Transkription wurden Random-Primer der Firma Invitrogen verwendet. Alle anderen genutzten Primer wurden von der Fa. MWG-Biotech AG (Ebersberg) synthetisiert.

2.6.1. Primer für die Real-time PCR

Primernamen for/rev	Sequenz (5'-3')	Zielgen	Quelle
IVA-1 for	AGA TGA GTC TTC TAA CCG AGG TCG	Matrix- protein	(SPACKMAN et al., 2002)
IVA-1 rev	TGC AAA AAC ATC TTC AAG TYT CTG		
IVA-2 for	TCG AGG GCG ACA CCC TG	IC2 (interne heterologe Kontroll- RNA)	(HOFFMANN et al., 2006)
IVA-2 rev	CTT GTA CAG CTC GTC CAT GC		
H5LH1 for	ACA TAT GAC TAC CCA CAR TAT TCA G	H5	(SPACKMAN et al., 2002) mod. EU-RL Weybridge
H5RH1 rev	AGA CCA GCT AYC ATG ATT GC		
Sequenzen auf Anfrage beim FLI erhältlich		H7	FLI
Sequenzen auf Anfrage beim FLI erhältlich		N1	FLI
H1-F1 for	GCG ATC TAY TCM ACW RTC	H1	(RINDER et al., in Vor- bereitung)
HR-YY rev	AGT AGA AAC AAG GGT GTT TTT YY		

Primername for/rev	Sequenz (5'-3')	Zielgen	Quelle
H2-F1 for	CAA ATC CTT GCY ATH TAY GC	H2	(RINDER et al., in Vorbereitung)
HR-AA rev	AGT AGA AAC AAG GGT GTT TTT AA		
H3-F1 for	ATA TCA TGC TTY TTG YTK TGT G	H3	
HR-AA rev	AGT AGA AAC AAG GGT GTT TTT AA		
H4-F1 for	ATT TCM TTY TCC ATA TCA TGY	H4	
HR-YY rev	AGT AGA AAC AAG GGT GTT TTT YY		
H6-F1 for	TGT GTA TCA AAT YCT YGC YAT HTA TAG	H6	
HR-YY rev	AGT AGA AAC AAG GGT GTT TTT YY		
H8-F1 for	GGC GGC CAG TCT YTG C	H8	
HR-YY rev	AGT AGA AAC AAG GGT GTT TTT YY		
H9-F1 for	TTA TTC GAC TGY CGC CTC	H9	
HR-RC rev	AGT AGA AAC AAG GGT GTT TTT RC		
H10-F2 for	ATG CTT TGT ACT TYT RGC YG	H10	
HR-AA rev	AGT AGA AAC AAG GGT GTT TTT AA		
H11-F1 for	CAG CAA TCA TYA TGG GKT TC	H11	
HR-RC rev	AGT AGA AAC AAG GGT GTT TTT RC		
H12-F1 for	CAG CAG TGT TGC CTC AAG	H12	
HR-AA rev	AGT AGA AAC AAG GGT GTT TTT AA		
H13-F2 for	AGA CGA YAR YGT TTA YAA AGC A	H13	
HR-YY rev	AGT AGA AAC AAG GGT GTT TTT YY		

2.6.2. Primer und Fragmentgrößen für die konventionelle PCR

Primername for/rev	Sequenz (5'-3')	Zielgen und Fragment- größe	Quelle
INF-9 for	AGC AAA AGC AGG AGT GAA	N2/1	(FUCHS, in Vorbereitung)
INF-10 rev	ATG AAA TGG AAC ACC CAA	523 bp	
INF-11 for	TGA CAC ART ACA TGA TAG	N2/2	
INF-12 rev	TGG AAW CAA TGC TAT AAT	505 bp	
INF-13 for	CTG CAG AGA CAA CTG GAA	N2/3	
INF-14 rev	TTC TAA AAT TGC GAA AGC	558 bp	
N3-F for	AGA TCR GGC TTT GAA RTC ATC AAA GT	N3	(FEREIDOUNI et al., 2009)
N3-R rev	CAT TGT CTA RTC CAC AGA AAG TAA CTA TAC	247 bp	
H3-F1 for	ATA TCA TGC TTY TTG YTK TGT G	H3	(RINDER et al., in Vor- bereitung)
HR-AA rev	AGT AGA AAC AAG GGT GTT TTT AA	125 bp	
H9-F1 for	TTA TTC GAC TGY CGC CTC	H9	
HR-RC rev	AGT AGA AAC AAG GGT GTT TTT RC	125 bp	

2.7. Sonden für die Real-time PCR

Sonden-name	Sequenz (5'-3')	Zielgen	Quelle
IVA-1 Sonde	FAM-TCA GGC CCC CTC AAA GCC GA-BHQ1	Matrix-protein	(SPACKMAN et al., 2002)
IVA-2 Sonde	HEX-AGC ACC CAG TCC GCC CTG AGC A-BHQ1	IC2 (interne heterologe Kontroll-RNA)	(HOFFMANN et al., 2006)
AIV-H5-1_HEX	HEX-TCA ACA GTG GCG AGT TCC CTA GCA-BHQ1	H5	(SPACKMAN et al., 2002)
Sequenzen auf Anfrage beim FLI erhältlich		H7	FLI
Sequenzen auf Anfrage beim FLI erhältlich		N1	FLI
H1-S1	ROX-CGC GAT CTG GGG GCA VTC AGY TTC TGG ATG TGA TCG CG-Dabcyl	H1	(RINDER et al., in Vorbereitung)
H2-S1	FAM-CGC GAT CTG GGC AAT CAT GAT RGC TGG GAT YTC GAT CGC G-Dabcyl	H2	
H3-S1	FAM-CGC GAT GAR AGG CAA YAT TAG RTG CAA CAA TCG CG-Dabcyl	H3	
H4-S1	TEX-CGC GAG AAA CAT CCG GTG YCA GAT TCG CG-Dabcyl	H4	
H6-S5	HEX-CGC GAT TGG GTC TTT GGA TGT GTT CAA ATG ATC GCG-Dabcyl	H6	
H8-S1	HEX-CGC GAT CTT GCT GGA GGT TTA ATC CTG GGC GAT CGC G-Dabcyl	H8	
H9-S1	FAM-CGC GAT TGG GGT TTG CTG CCT TYY TKT TAT CGC G-Dabcyl	H9	

Sondenname	Sequenz (5'-3')	Zielgen	Quelle
H10-S1	HEX-CGC GAT CAR AAT GGR AAC ATG CGA TGC ACA GAT CGC G-Dabcyl	H10	(RINDER et al., in Vorbereitung)
H11-S1	ROX-CGC GAT CTA GYA ATG GRT CAT GTA GAT GTA CCG ATC GCG-Dabcyl	H11	
H12-S1	TEX-CGC GAT CTG TCA AAA TGG AAA TGT TCG TTG TAC GAT CGC GCGC-Dabcyl	H12	
H13-S2	FAM-CGC GAT CTG CAT TGC AAG YAG TRT TGT RYT RGT GAT CGC G-Dabcyl	H13	

2.8. Geräte und Laborhilfsmittel

Begasungsbrutschrank	Heraeus
Eierbrutschrank	Ehret-Grumbach
Elektrophoresekammer Agagel Midi-Wide	Whatman-Biometra
Lichtmikroskop, Axiovert 40 C	Zeiss
Geldokumentationssystem	Biometra
Laborwaage CP622-OCE	Sartorius
Mikrowellengerät	Bartscher
Pipetten	Eppendorf, Abimed
Real-time PCR-Gerät Mx3000P™ und Mx3005P®	Stratagene
Schierlampe	Blohm
Sterilbank Lamin Air	Heraeus
Sterilfilter 45 nm	Sartorius Stedim Biotech
Tissue Lyser	QIAGEN
Thermocycler Trio	Whatman-Biometra
Vortex Genie 2	Scientific Industries
Zentrifugen	Eppendorf, Hettich

2.9. Software

Die Analyse und der Vergleich der Nukleotid- und Aminosäuresequenzen wurden mit Hilfe der DNAMAN Software von Lynnon BioSoft Version 5.2.9. durchgeführt.

Die Analyse der Agarosegelelektrophorese erfolgte mit der zur Geldokumentation gehörenden Software BioDocAnalyze (BDA) liveH Version 2.46.8.1 von Biometra.

Die Real-Time PCR-Ergebnisse wurden mit der MxPro™ QPCR Software (Stratagene) ausgewertet.

3. Methoden der Probenentnahme bei Wildvögeln

3.1. Organisation

Zur Probenbeschaffung konnte eine enge Kooperation des Bayerischen Landesamtes für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit mit dem Bayerischen Landesamt für Umwelt in Garmisch-Partenkirchen, dem Bayerischen Jagdverband und der Klinik für Vögel der LMU München initiiert werden. Bevor jedoch mit dem Lebendfang begonnen werden konnte, wurden tierschutz- und naturschutzrechtliche Genehmigungen bei den zuständigen Behörden und den Regierungen von Bayern eingeholt. Nachfolgend wurden Kontakte zu Zoos, Tierparks und Auffang- und Pflegestationen aufgenommen und Pläne für mögliche Beprobungsorte beim Lebendfang ausgearbeitet. Darüber hinaus musste für jede einzelne Fangaktion zuerst die Erlaubnis des zuständigen Jagdausübungsberechtigten eingeholt werden.

3.2. Lebendmonitoring

Die Proben des Lebendmonitorings stammten von eingefangenen Wasservögeln (n=170), von Tieren aus Auffangstationen und Zoos (auch exotische Vögel mit potentiell Wildvogelkontakt) (n=87) und von ver-

letzt aufgefundenen Wildvögeln aus der Klinik für Vögel (n=315). Zusätzlich wurden noch 2765 Kotproben von freilebenden Vögeln gesammelt.

Der Lebendfang erfolgte entweder mit Hilfe eines Kanonennetzes (Abb. III. 2) oder per Hand (BUB, 1995). Beim Lebendfang mit dem Kanonennetz wurde ein druckluftgefülltes Rohr unter Verwendung von 10 bar mit einem Messingzylinder, an dem das dreieckige Fangnetz befestigt ist, bestückt und mit Hilfe eines Stativs in die richtige Schusshöhe gebracht. Im nächsten Schritt wurden das Fangnetz aufgerollt und die futterzahmen Enten möglichst nah an die Netzrolle gelockt. Nachfolgend wurde das Druckluftgeschoss mit Hilfe einer Batterie ausgelöst und somit der Messingzylinder inklusive Netz über die Wasservögel geschossen.

Darüber hinaus wurden im Rahmen des trinationalen Influenza-Gemeinschaftsprojektes „Constanze“, an dem Arbeitsgruppen aus Deutschland, der Schweiz und Österreich beteiligt sind, einmal jährlich am Bodensee-ufer auf bayerischer Seite, Höckerschwäne per Hand eingefangen und auf Vorkommen von AIV untersucht (Abb. III. 3). Alle Tiere, die lebend gefangen werden konnten, wurden beringt und Daten zu Vogelart, Geschlecht, Alter und Gesundheitszustand erhoben.

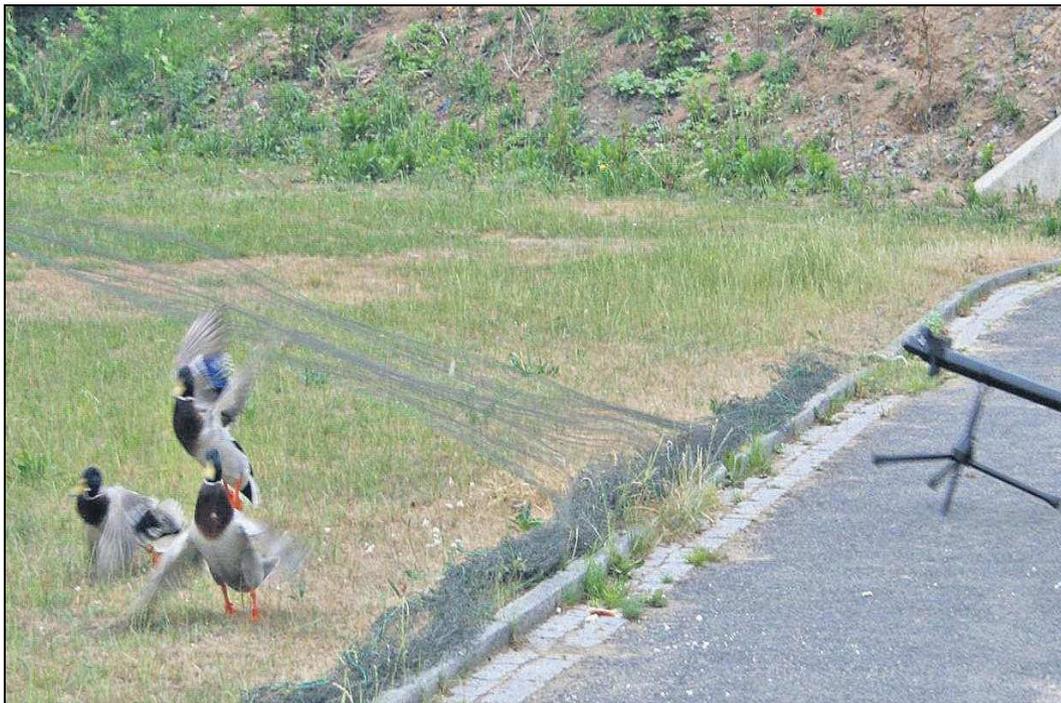


Abbildung III. 2: Zum Lebendfang verwendetes Kanonennetz, benötigte Utensilien und Fangbeispiel.



Abbildung III. 3: Handfang von Schwänen am Bodensee im Rahmen des Influenza-Gemeinschafts-Projektes „Constanze“.

3.3. Jagdmonitoring

Das Probenmaterial stammte von 2.777 in der Jagd erlegten Wasservögeln. Da die Tiere größtenteils im Flug erlegt wurden, kann davon ausgegangen werden, dass es sich überwiegend um gesunde, klinisch unauffällige Vögel handelte. Wenn trotzdem Auffälligkeiten vorlagen, wurden diese von den Jagdausübungsberechtigten in das Beprobungsprotokoll eingetragen.

3.4. Probenmanagement und –aufbereitung

Die Entnahme der Tupferproben erfolgte durch kreisförmige Bewegungen des Tupfers entlang der Schleimhäute der Kloake und des Rachens. Durch diese Vorgehensweise sollte gewährleistet werden, dass das Tupfermaterial möglichst viele Zellen enthält.

Die selbst entnommenen Kot-, Tupfer- und Organproben wurden auf Trockeneis tiefgefroren in das Bayerische Landesamt für Gesundheit und

Lebensmittelsicherheit in Oberschleißheim verbracht. Aus der Jagd stammende Tupferproben wurden überwiegend von Jagdausübungsberechtigten entnommen und entweder durch die Jäger selbst oder die zuständigen Veterinärämter gekühlt per Post eingesandt.

Im nächsten Schritt wurden die Tupferproben mit 2 ml des Antibiotika- und Antimykotika-haltigen Mediums für Tupfer- und Organproben versetzt, 30 min bei 4 °C inkubiert und schließlich gut durchmischt in ein 2 ml Reaktionsgefäß abgefüllt.

Bei den Kotproben wurde zunächst mit dem Medium für Kotproben eine 10%ige Aufschwemmung hergestellt. Die Lösung wurde nachfolgend bei 4 °C für 30 min inkubiert. Nach Zentrifugation für zehn Minuten bei 2000 U/min wurde der Überstand unter Verwendung von Filtern mit einer Porenweite von 0,45 µm sterilfiltriert und in ein 2 ml Reaktionsgefäß abgefüllt.

Bei vorhandenen Organproben wurden erbsengroße Stücke von Luft- röhre, Enddarm, Lunge und Gehirn eines Tieres in einem 2 ml Reaktions- gefäß mit einem Stahlkügelchen (5 mm Ø, QIAGEN) und 1 ml des Tupfer- mediums versetzt und in einem Tissue Lyser bei 25 Hz drei Minuten ge- schreddert.

Die Probenmaterialien wurden entweder, bei sofortiger Aufbereitung und Untersuchung, kurzfristig (bis 24 h) im Kühlschrank gelagert, oder bis zur weiteren Untersuchung bei -80 °C eingefroren. Je nach Probenumfang wurde nach dem Auftauen Material von bis zu fünf Einzeltupfer- oder Kot- proben für die Genomnachweise gepoolt. Im Falle einer positiven PCR- Reaktion wurde dann auf die Einzelproben zurückgegriffen und erneut untersucht.

3.5. Statistik

Um Rückschlüsse auf die Verbreitung aviärer Influenzaviren ziehen zu können, wurden Prävalenzen berechnet und genauer analysiert. Die Prävalenz (P) bezeichnet die Anzahl vorkommender Krankheitsfälle in einer bestimmten Risikopopulation während einer bestimmten Zeitperiode

oder zu einem bestimmten Zeitpunkt (www.vetgeb.uzh.ch/PDF/EpiVorlesung.pdf). Die Berechnung erfolgte mit folgender Formel:

$$P = a \times 100/n$$

P = Prävalenz in %

a = Anzahl AIV-positiver Tiere

n = Anzahl der untersuchten Tiere

Die statistische Auswertung mittels Chi²-Test erfolgte mit Hilfe des Programmes Epi Info Version 6. Für die Berechnung der Konfidenzintervalle wurde die Software SPSS verwendet.

4. Molekularbiologische Methoden

4.1. Nukleinsäureisolierung

Mit Hilfe des QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) wurde nach Herstellerangaben RNA aus Tupfer- und Allantoisflüssigkeiten sowie aus Organ- und Kotproben extrahiert. Dabei wird nach dem Prinzip einer Festphasenextraktion die RNA an die Silikagelmembran eines Säulchens gebunden. Zunächst wurden 560 µl AVL-Puffer vorgelegt und mit 5,6 µl Carrier RNA (cRNA) und 5 µl interner heterologer Kontroll-RNA (IC2) versetzt. Im zweiten Schritt wurden jeweils 140 µl Probenmaterial oder DEPC-H₂O für die Extraktionskontrollen (EK) (für 1 bis 14 Proben mindestens eine EK) zugegeben, 10 s kräftig geschüttelt und bei Raumtemperatur für 10 min inkubiert. Anschließend wurden 560 µl 100%iger Ethanol zugegeben und die Gefäße sanft geschwenkt. Nachfolgend wurden die Proben in zwei Schritten (jeweils 630 µl) auf Säulchen aufgetragen. Es folgten jeweils einminütige Zentrifugationsschritte bei 8000 U/min, die Säulchen wurden jeweils in ein neues Auffanggefäß übertragen. Im nächsten Schritt erfolgten zwei Waschschrte mit jeweils 500 µl Waschpuffer 1 (AW1), gefolgt von 1 min Zentrifugation bei 8000 U/min und dann Waschpuffer 2 (AW 2) und Zentrifugation für 3 min bei 14000 U/min. Nach nochmaliger einminütiger Zentrifugation bei

8000 U/min, wurde das Säulchen in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß übertragen. Im letzten Schritt wurde die RNA mit 60 µl des Elutionspuffers, nach einminütiger Inkubationszeit und Zentrifugation bei 8000 U/min, eluiert. Die gewonnene RNA wurde entweder bei -80 °C gelagert oder in die Reverse Transkription eingesetzt.

Wenn sehr große Probenzahlen (z. B. Kotproben) vorlagen, wurde der Pipettierroboter Hamilton Microlab Starlet genutzt. In diesem Vollautomaten für die RNA-Extraktion wurden in einem Lauf bis zu 96 Proben extrahiert. Hierzu wurde das QIAamp Virus BioRobot 9604 Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) verwendet, das ebenfalls nach dem Prinzip einer Festphasenextraktion funktioniert, in der RNA an die Silikagelmembran eines Säulchens gebunden wird.

4.2. Reverse Transkription (RT)

Für die konventionellen Reverse Transkriptions (RT)-PCRs und die Multiplex RT-Real-time PCRs (RT-rPCRs) wurde DNA als Ausgangsmaterial benötigt, deshalb musste die gewonnene RNA in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben werden. Für ein Ansatzvolumen von 20 µl wurden 10,5 µl RNA zusammen mit 1 µl Random-Primer (0,03 µg/µl) und 0,5 µl dNTP (je 25 mM) in ein 0,2 ml PCR-Gefäß pipettiert. Der Ansatz wurde für 5 min bei 65 °C erhitzt und anschließend sofort für mindestens eine Minute auf Eis gestellt. In der Zwischenzeit wurde der Reaktionsmix angesetzt: pro Ansatz 4 µl 5x-First-Strand-Puffer, 2 µl DTT (0,1 M), 1 µl RNase-Out (40 U/µl) und 1 µl Superskript II Reverse Transkriptase (200 U/µl). Nachfolgend wurde der Reaktionsmix dem Proben-Primer-Mix zugesetzt und das gesamte Volumen 10 min bei 25 °C und 1 h bei 42 °C erhitzt. In den anschließenden 15 min bei 70 °C wurde die Transkriptase deaktiviert. Die erhaltene cDNA wurde bis zur Verwendung als Template für die PCRs bei -20 °C gelagert.

4.3. Real-time PCR

4.3.1. Pan AIV RT-Real-time PCR (RT-rPCR)

Der Nachweis von Influenza-A-Genom erfolgte zunächst in einer One step RT-rPCR nach SPACKMAN et al. (2002), in der ein bei allen Subtypen hoch konserviertes 100 bp-Fragment aus dem Matrixprotein-Gen detektiert wird (sog. pan AIV RT-rPCR oder M-PCR). Das Protokoll nach SPACKMAN et al. (2002) wurde durch ein heterologes internes Kontrollsystem (IC2) ergänzt, bei dem Nicht-AIV-Kontroll-RNA, die bereits bei der Extraktion zugegeben wurde, in cDNA umgeschrieben und in der PCR amplifiziert wird (HOFFMANN et al., 2006). Zur Kontrolle der RNA-Extraktion und zum Ausschluß einer Inhibition der PCR wurden neben dem heterologen internen Kontrollsystem (IC2), RNA-Extraktions-Kontrollen (EK), No Template-Kontrollen (NTC) und mindestens eine Positivkontrolle (PK) mitgeführt. Nach Herstellung des Mastermixes (Tab. III. 2) wurden je 20 µl vorgelegt und anschließend 5 µl RNA-Template zugefügt. Die RT-PCR erfolgte nach dem in Tabelle III. 3 dargestellten Thermalprofil.

Tabelle III. 2: Reaktionsvolumina und -konzentrationen der Mastermix-Komponenten für die pan AIV RT-rPCR

Mastermix-Komponente	Volumen	Konzentration
DEPC-H ₂ O	2,5 µl	
2x Reaction Mix	12,5 µl	
SuperScript III Platinum Taq DNA Polymerase	1,0 µl	
<u>IVA-1Primer-Sonden-Mix:</u>	2,0 µl	
20 µl Primer IVA-1 for		100 pm/µl
30 µl Primer IVA-1 rev		100 pm/µl
2,5 µl Sonde IVA-1 (FAM)		100 pm/µl
<u>IVA-2 Primer-Sonden-Mix:</u>	2,0 µl	
5 µl Primer IVA-2 for		100 pm/µl
5 µl Primer IVA-2 rev		100 pm/µl
2,5 µl Sonde IVA-2 (HEX)		100 pm/µl
Gesamtvolumen Mastermix	20 µl	
Zugabe des RNA-Templates	5 µl	
Gesamtvolumen Reaktionsansatz	25 µl	

Tabelle III. 3: Thermalprofil für die pan AIV RT-rPCR und die H5-, H7- und N1-Subtypisierungs-RT-rPCR

Reverse Transkription (RT)	50 °C	30 min	
Inaktivierung RT/ Initiale Denaturierung	94 °C	2 min	
Denaturierung	94 °C	30 s	50 Zyklen
Annealing	57 °C (pan AIV) bzw. 56 °C	30 s	
Elongation	68 °C	30 s	

Alle Real-time PCR-Ergebnisse der pan AIV RT-rPCR wurden anhand der „threshold cycle“ (ct)-Werte beurteilt, wobei nur Proben mit einem signifikanten Anstieg der Fluoreszenz über das Basislevel bis Zyklus 38 als positiv, alle anderen ct-Werte (größer als 38) negativ bewertet wurden. Um von einer erfolgreichen Extraktion und PCR sprechen zu können, sollte die IC2-RNA jeweils mit ct-Werten zwischen 26 und 34 nachweisbar sein.

Von allen in der pan AIV RT-rPCR positiv reagierenden Proben wurden 500 µl Tupferflüssigkeit zur Bestätigung und weiteren Abklärung an das Friedrich-Loeffler-Institut, Insel Riems versandt.

4.3.2. RT-rPCR zur H5-, H7- und N1-Subtypisierung

Die weitere Analyse der in der pan AIV RT-rPCR positiven Proben auf die Subtypkomponenten H5, H7 und N1 erfolgte mittels einer spezifischen RT-rPCR (SPACKMAN et al., 2002), entsprechend der Angaben des Nationalen Referenzlabors für Aviäre Influenza (Friedrich-Loeffler-Institut, Insel Riems) (Tab. III. 3 und Tab. III. 4). Es wurden ebenfalls RNA-Extraktionskontrollen (EK), No Template-Kontrollen (NTC) und pro Subtypkomponente mindestens eine Positivkontrolle mitgeführt. Nachfolgend wurden die gleichen Mengen Mastermix und RNA-Template, wie bei der pan AIV RT-rPCR, vorgelegt und die PCR mit dem Temperaturprogramm aus Tabelle III. 3 durchgeführt. Analog zur pan AIV RT-rPCR wurden alle Real-time PCR-Ergebnisse der H5-, H7-, N1-Subtypisierungs-PCR anhand der ct-Werte beurteilt, wobei nur Proben mit einem signifikanten Anstieg der Fluoreszenz über das Basislevel bis Zyklus 38 als positiv und alle anderen ct-Werte (größer als 38) als negativ bewertet wurden.

Tabelle III. 4: Reaktionsvolumina und -konzentrationen der Mastermix-Komponenten für die H5-, H7- und N1-Subtypisierungs-RT-rPCR

Mastermix-Komponente	Volumen	Konzentration
DEPC-H ₂ O	0,5 µl	
2x Reaction Mix	12,5 µl	
SuperScript III Platinum Taq DNA Polymerase	1,0 µl	
<u>AIV-H5.1 Primer-Sonden-Mix:</u>	2,0 µl	
20 µl Primer H5LH1		100 pm/µl
20 µl Primer H5RH1		100 pm/µl
2,5 µl Sonde AIV-H5 (HEX)		100 pm/µl
<u>AIV-H7-2 Primer-Sonden-Mix:</u>	2,0 µl	
20 µl Primer AIV-HA7_1593-F		100 pm/µl
20 µl Primer AIV-HA7_1740-R		100 pm/µl
2,5 µl Sonde AIV-HA7_1649 (TEX)		100 pm/µl
<u>AIV-N1-3 Primer-Sonden-Mix:</u>	2,0 µl	
25 µl Primer N1-3-F		100 pm/µl
25 µl Primer N1-3-R		100 pm/µl
3,0 µl Sonde AIV-N1-3 (FAM)		100 pm/µl
Gesamtvolumen Mastermix	20 µl	
Zugabe des RNA-Templates	5 µl	
Gesamtvolumen Reaktionsansatz	25 µl	

4.3.3. Multiplex RT-rPCR zur Typisierung der Hämagglutinine H1-H4, H6 und H8-H13

Für die Hämagglutinintypen von H1 bis H13 wurden zur direkten Subtypisierung aus Probenmaterial Real-time PCRs, in Form von Multiplex-PCR-Tests, entwickelt (RINDER et al., in Vorbereitung). Die Multiplex-PCR-Tests wurden als drei Triplex-PCRs für H1/H6/H13, H3/H11/H12 und H4/H8/H9 und zwei Duplex-PCRs für H2/H10 und H5/H7 konzipiert. Zudem wurden zur Bestätigung für jede einzelne Subtypkomponente

Singleplex-PCR-Protokolle verwendet. Allerdings wurde die H5/H7-Duplex in der vorliegenden Studie nicht angewendet, da durch die vom FLI empfohlene RT-rPCR zur H5-, H7- und N1-Subtypisierung bereits Ergebnisse vorlagen.

Die Multiplex RT-rPCR wurde zunächst unter den empfohlenen Bedingungen für alle Influenza-A-positiven, H5- und H7-negativen Proben mit einem ct-Wert kleiner oder gleich 35 (n=131) durchgeführt. Hier kam es aber, v. a. bei Anwendung der H1/H6/H13-Triplex-PCR bei H6 (HEX-Kanal) zu vielen unspezifischen nicht sigmoiden Reaktionsverläufen. Nachfolgend wurden daher der H1- und H13-Nachweis in Form einer Duplex- und der H6-Nachweis in Form einer Singleplex-PCR fortgeführt. In der neuen H6-Singleplex-PCR wurde die Konzentration an H6-spezifischem Forward-Primer von 50 μ M auf 30 μ M erniedrigt, womit die unspezifischen Reaktionen deutlich reduziert werden konnten. Darüber hinaus wurde die Annealingtemperatur bei allen Multiplex-PCRs zunächst um 5 °C und in einem zweiten Versuch um 10 °C angehoben. Beide Annealingtemperaturen mit höherer Hybridisierstringenz führten zu einer zusätzlichen Minimierung der unspezifischen Reaktionsverläufe. Jedoch konnte bei einer Annealingtemperatur von 60 °C die H13-Positivkontrolle nicht mehr detektiert werden. Schließlich wurden alle PCRs mit einer Annealingtemperatur von 55 °C durchgeführt. Die Pipettierschemata für die verwendeten Tests sind in Tabelle III. 5 dargestellt.

Tabelle III. 5: Pipettierschemata für die HA-Multiplex-PCR

<p>H3/H11/H12</p> <p>2,5 µl 10x-Puffer 5,5 µl 25 mM MgCl₂ 7,5 µl H₂O 0,5 µl 50 µM H3-F1 0,5 µl 50 µM H11-F1 0,5 µl 50 µM H12-F1 1 µl 50 µM HR-AA 1 µl 50 µM HR-RC 1 µl 10 µM H3-S1 1 µl 10 µM H11-S1 1 µl 10 µM H12-S1 0,25 µl dNTP 0,25 µl HotStar Taq 2,5 µl cDNA ----- 25 µl</p>	<p>H4/H8/H9</p> <p>2,5 µl 10x-Puffer 7,5 µl 25 mM MgCl₂ 6,5 µl H₂O 0,5 µl 50 µM H4-F1 1 µl 50 µM H8-F1 0,5 µl 50 µM H9-F1 0,5 µl 50 µM HR-RC 1 µl 50 µM HR-YY 1 µl 10 µM H4-S1 0,5 µl 10 µM H8-S1 0,5 µl 10 µM H9-S1 0,25 µl dNTP 0,25 µl HotStar Taq 2,5 µl cDNA ----- 25 µl</p>	<p>H2/H10</p> <p>2,5 µl 10x-Puffer 4,5 µl 25 mM MgCl₂ 12,65 µl H₂O 0,5 µl 50 µM H2-F1 0,25 µl 50 µM H10-F2 1 µl 50 µM HR-AA 0,3 µl 10 µM H2-S1 0,3 µl 10 µM H10-S1 0,25 µl dNTP 0,25 µl HotStar Taq 2,5 µl cDNA ----- 25 µl</p>
<p>H1/H13</p> <p>2,5 µl 10x-Puffer 6,5 µl 25 mM MgCl₂ 9,75 µl H₂O 1 µl 50 µM H1-F1 0,5 µl 50 µM H13-F2 1 µl 50 µM HR-YY 0,25 µl 10 µM H1-S1 0,5 µl 10 µM H13-S2 0,25 µl dNTP 0,25 µl HotStar Taq 2,5 µl cDNA ----- 25 µl</p>	<p>H6</p> <p>2,5 µl 10x-Puffer 6,5 µl 25 mM MgCl₂ 11,35 µl H₂O 0,15 µl 50 µM H6-F1 1 µl 50 µM HR-YY 0,5 µl 10 µM H6-S5 0,25 µl dNTP 0,25 µl HotStar Taq 2,5 µl cDNA ----- 25 µl</p>	

Die PCRs wurden entweder in 0,2 µl Reaktionsgefäßen oder 96-Loch Microplatten in einem Real-time PCR-Thermocycler (Mx3000P™ oder Mx3005P®) nach folgendem Thermalprofil durchgeführt:

Initiale Denaturierung	95 °C	14 min 30 s	
Denaturierung	95 °C	30 s	50 Zyklen
Annealing	55 °C	60 s	
Elongation	72 °C	30 s	

Bei der Ergebnisauswertung wurden alle Proben als positiv gewertet, die einen signifikanten Anstieg der Fluoreszenz über das Basislevel bis Zyklus 45 und einen sigmoiden Reaktionsverlauf aufwiesen. Alle ct-Werte größer als 45 wurden negativ bewertet. Bei fraglichen und nicht-sigmoiden Reaktionsverläufen wurden die jeweiligen Proben in der entsprechenden Singleplex-PCR wiederholt.

4.4. Konventionelle PCR

4.4.1. Bestätigung der HA-Mischinfektionen

Zur Bestätigung der Mischinfektionen mit H3 und H9 bzw. H6 und H13 wurden die jeweiligen konventionellen Singleplex-PCR-Protokolle angewandt. Die PCR-Reaktionen wurden in 50 µl-Ansätzen mit 2,5 µl 25 mM MgCl₂, 5 µl 10x PCR-Puffer, 0,5 µl dNTP (jeweils 25 mM), 1 µl (50 µM) jedes Primers, 0,5 µl (5 U/µl) Hotstar Taq DNA Polymerase, 1 µl Template und DEPC-H₂O ad 50 µl durchgeführt. Die PCR erfolgte nach folgendem Thermalprofil:

Initiale Denaturierung	95 °C	15 min	
Denaturierung	95 °C	60 s	50 Zyklen
Annealing	50 °C	60 s	
Elongation	72 °C	60 s	
Finale Elongation	72 °C	7 min	

4.4.2. Anwendung N2-Gen-spezifischer Primer

Zum Nachweis von N2-Neuraminidase-Komponenten wurde bei allen noch nicht endgültig subtypisierten H5-positiven Proben und Virusisolaten eine konventionelle RT-PCR mit einem N2-spezifischen Primerpaar, INF-11 und INF-12, mit dem das mittlere Drittel des Neuraminidase-Gens amplifiziert wird, durchgeführt. Bei einer Probe wurde die vollständige Sequenz der N2-Komponente ermittelt. Hierzu wurden zusätzlich die fehlenden 5'- und 3'-Fragmente des Gens in zwei konventionellen RT-PCRs mit den Primerpaaren INF-9 und 10 bzw. INF-13 und 14 amplifiziert. Nach einer Reversen Transkription mit Random-Primern wurden die PCR-Reaktionen in 50 µl-Ansätzen mit 2 µl 25 mM MgCl₂, 5 µl 10x PCR-Puffer, 0,5 µl dNTP (jeweils 25 mM), 1 µl (50 µM) jedes Primers, 0,5 µl (5 U/µl) Hotstar Taq DNA Polymerase, 1 µl Template und DEPC-H₂O ad 50 µl durchgeführt. Die Reaktionsbedingungen für die PCR-Amplifikation waren folgende:

Initiale Denaturierung	95 °C	15 min	
Denaturierung	95 °C	60 s	50 Zyklen
Annealing	45 °C	60 s	
Elongation	72 °C	60 s	
Finale Elongation	72 °C	5 min	

4.4.3. Anwendung N3-Gen-spezifischer Primer

In einer konventionellen N3-spezifischen RT-PCR (FEREIDOUNI et al., 2009) wurden alle H5-positiven, N1- und N2-negativen Proben, sowie die nach wie vor untypisierten Virusisolate untersucht. Das N3-spezifische Fragment wurde wie bei FEREIDOUNI et al. (2009) angegeben amplifiziert.

4.5. Agarosegelelektrophorese

Die gelelektrophoretische Auftrennung der in der PCR generierten Nukleinsäurefragmente erfolgte je nach Fragmentgröße über 1 und 2%ige Agarosegele (1 bzw. 2 g Agarose pro 100 ml 1x TAE-Puffer). Zur späteren

Visualisierung der DNA-Banden wurde 3 μl (0,01 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) Ethidiumbromidlösung pro 100 ml Gel zugesetzt. Nach der Polymerisation des Gels wurden die DNA-Proben, mit Gel-Ladepuffer vermischt, in die Geltaschen aufgetragen. Um die Produktgrößen bestimmen zu können, wurde zudem ein 100 bp-Größenmarker aufgetragen.

Die Auftrennung der DNA erfolgte für 1%ige Gele bei 90 Volt und für 2%ige Gele bei 120 Volt für 45 bzw. 50 min in TAE-Puffer.

Der Nachweis der DNA-Fragmente erfolgte mit Hilfe eines digitalen Geldokumentationssystems (Biometra), womit die Doppelstrang-DNA in den Gelen bei kurzzeitigem UV-Licht ($\lambda=254\text{nm}$) analysiert wurde.

4.6. Gelaufreinigung der DNA

Falls PCR-Produkte für Sequenzierungen benötigt wurden, wurden die DNA-Fragmente auf einer Leuchtplatte mit langwelligem UV-Licht ($\lambda=360\text{nm}$) dargestellt und aus dem Agarosegel ausgeschnitten. Anschließend wurden sie mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) nach Angaben des Herstellers extrahiert: Zunächst wurden die ausgeschnittenen Banden in einem 1,5 μl Reaktionsgefäß mit 800 μl QG-Puffer versetzt und bis zur Auflösung des Gels (ca. 15 min) bei 50 °C inkubiert. Im zweiten Schritt wurden 200 μl Isopropanol hinzugefügt und gut durchgemischt. Nachfolgend wurden die Proben in zwei Schritten (jeweils 500 μl) auf Säulchen aufgetragen. Es folgten jeweils einminütige Zentrifugationsschritte bei 13000 U/min, die Säulchen wurden jeweils in ein neues Auffanggefäß übertragen. Anschließend erfolgten zwei Waschschritte: zuerst mit 500 μl QG-Puffer, gefolgt von 1 min Zentrifugation bei 8000 U/min und dann mit 750 μl Waschpuffer PE und Zentrifugation für 1 min und 13000 U/min. Nach nochmaliger 1minütiger Zentrifugation bei 13000 U/min, wurde das Säulchen in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben und die DNA mit 30 μl 5 mM Tris-HCl (pH 8,5), nach einminütiger Inkubationzeit und Zentrifugation bei 13000 U/min, eluiert. Die so gewonnene DNA konnte nun zur Sequenzierung genutzt werden.

4.7. DNA-Sequenzierung und Sequenzanalyse

Die Sequenzierung der HA-Komponenten der Mischinfektionen und der N3-Subtypkomponenten wurde bei der Firma Eurofins MWG (Martinsried) in Auftrag gegeben. Für die Sequenzierreaktionen wurden jeweils die gleichen Primer wie für die PCR verwendet. Die nachfolgende Analyse der erhaltenen Sequenzen erfolgte mit Hilfe der DNAMAN Software von Lynnon BioSoft Version 5.2.9. Dabei wurden kurze, sich überlappende Amplifikat-Sequenzen aneinander gelegt und somit die komplette Sequenz gebildet. Zur Identifizierung ähnlicher Sequenzen wurden BLAST-Analysen durchgeführt (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

5. Virologische Methoden

5.1. Virusisolierung im embryonierten Hühnerei

Die Beimpfung der Allantoishöhle erfolgte bei zehn bis elf Tage alten embryonierten spezifisch pathogenfreien (SPF) Hühnereiern mit 0,2 ml Tupferflüssigkeit pro Ei und zwei Eiern pro Probe. Die Eier wurden dann weitere fünf Tage bei 37 °C bebrütet und jeden Tag mit der Schierlampe auf abgestorbene Embryonen untersucht. Die Allantoisflüssigkeit wurde entweder nach Abtöten der Embryonen nach fünf Tagen oder bei Feststellen des Embryonaltods geerntet und in der pan AIV RT-rPCR auf Vorliegen von Influenzavirus-A-Genomkopien getestet. Dabei wurde 8,3 % der Gesamt-RNA aus 140 µl Allantoisflüssigkeit eingesetzt.

Hämagglutinationstest (HA)

Bei einem Teil der geernteten Allantoisflüssigkeiten wurde auch der Hämagglutinationstiter bestimmt. Beim Hämagglutinationstest (HA) wurden in einer 96 Well-Mikrotiterplatte in die ersten Vertiefungen der obersten Reihe je 50 µl der Allantoisflüssigkeit im Doppelansatz vorgelegt, zudem wurde eine Erythrozytenkontrolle mitgeführt. Die Verdünnung der Probe erfolgte in 2er Verdünnungsschritten, als Verdünnungsvorlage wurden ab der 1:2 Verdünnungsreihe je 25 µl physiologische NaCl-Lösung

vorgelegt. Anschließend wurden in alle Vertiefungen 50 µl einer 1%igen Hühnererythrozytensuspension hinzupipettiert und nach gründlicher Mischung für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das Ergebnis konnte durch Schräghaltung der Platte abgelesen werden. Im negativen Fall sedimentieren die Erythrozyten und sammeln sich zu einem Knopf am Boden der Vertiefung. Im positiven Fall agglutinieren die Erythrozyten mit dem Virusantigen und können daher nicht sedimentieren. Als HA-Titer wurde die letzte Verdünnung, bei der noch eine Agglutination stattfand, bezeichnet.

5.2. Zellkultur

5.2.1. Virustitration in Madin Darby Canine Kidney (MDCK) -Zellen

Nach erfolgreicher Vermehrung im Hühnerrei und Charakterisierung der Hämagglutininkomponente oder des AIV-Subtyps wurde die AIV-haltige Allantoisflüssigkeit von sechs selektierten Wildvogelproben in log₁₀ Verdünnungen simultan mit der Zelleinsaat von MDCK Zellen inokuliert (0,1 ml/Vertiefung von 24-Lochplatten, vier Vertiefungen pro Verdünnungsstufe). Die beimpften Zellen wurden anschließend in einem Zellkulturbrutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit für mindestens vier Tage inkubiert. Die Bildung eines zytopathogenen Effekt (cpE) wurde täglich lichtmikroskopisch beurteilt.

Zur genauen Bestimmung einer Viruspräsenz in den Endverdünnungen wurde noch eine Immunfluoreszenz durchgeführt. Hierzu wurde zunächst der Zellüberstand in den 24-Lochplatten abgekippt und die Vertiefungen dreimal mit der Waschlösung I gewaschen. Im nächsten Schritt wurden die Zellen mit einem Ethanol-Methanol-Gemisch (Fixierlösung) 20 min bei 4 °C fixiert. Anschließend wurde die Platte ausgeklopft, getrocknet, einmal mit Waschlösung I gewaschen und nochmals ausgeklopft. Im weiteren Vorgehen wurden die Zellen mit einem AIV Nukleoprotein (NP)-spezifisch reaktiven Serum (Anti-AIV Kaninchenserum) in der Verdünnung 1:500, 1 h bei 37 °C in einer feuchten Kammer inkubiert. Darauf folgten drei Waschschrte mit Waschlösung II. Anschließend erfolgte eine Inkubation

mit einem Anti-Kaninchen Peroxidase-Konjugat, wie oben beschrieben und drei Waschschrte mit Waschlösung II. Um eine NP-spezifische Antikörperreaktion sichtbar und mikroskopisch auswertbar zu machen, wurden die Zellen sodann mit einer Substratlösung ca. 10-15 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einmaligem Waschen mit Waschlösung I, wurde die Waschlösung I als Stopplösung auf die Platte gegeben und dort belassen.

Wenn eine Braunfärbung der Zellen erkennbar war, wurde die Reaktion als positiv beurteilt. Die abschließende Berechnung der Zellkultur-Infektionstiter erfolgte nach Spaerman und Kaerber (MAYR et al., 1974).

$$\log_{10} \text{ KID}_{50} - \text{ Endpunktverd\u00fcnnung} = X_0 - \frac{d}{2} + d \sum \left(\frac{r}{n} \right)$$

X_0 : \log_{10} des reziproken Wertes der Verd\u00fcnnung, bei der alle Reagenten positiv sind;

d : \log_{10} des Verd\u00fcnnungsfaktors ($d=0,3$ bei einem Verd\u00fcnnungsfaktor von 1:2; $d=0,7$ bei 1:5; $d=1,0$ bei 1:10);

n : Zahl der Reagenten, die f\u00fcr jede Verd\u00fcnnung eingesetzt wurden;

r : Anzahl der positiven Reagenten pro Gruppe.

Beginnend mit der Verd\u00fcnnungsstufe X_0 und endend mit der h\u00f6chsten Verd\u00fcnnungsstufe, in der noch positive Reagenten vorhanden sind, werden alle positiven Reagenten addiert und durch die Anzahl der pro Verd\u00fcnnungsstufe eingesetzten Reagenten geteilt.

IV. ERGEBNISSE

1. Prävalenzen des AIV-Genomnachweises bei Wildvögeln in Bayern

Im Untersuchungszeitraum von Juli 2007 bis März 2009 wurden insgesamt 78 Vogelarten aus 14 Ordnungen beprobt. Zudem konnten in allen Kalendermonaten und in allen Regierungsbezirken Bayerns Proben entnommen werden, allerdings in unterschiedlichen Größenordnungen.

Eine detaillierte Übersicht zu den beprobten Vogelarten, der jahreszeitlichen bzw. saisonalen Gesamtbetrachtung und den Beprobungsorten ist in den Tab. IX. 1 bis IX. 3 im Anhang gelistet.

1.1. Speziesspezifische Prävalenzen

Der Großteil, und zwar 5.131 der 6.114 untersuchten Proben, stammt von Vögeln aus fünf Arten: So wurden 3.474 Stockenten (*Anas platyrhynchos*), 40 Reiherenten (*Aythya fuligula*), 678 Graugänse (*Anser anser*) und 261 Höckerschwäne (*Cygnus olor*) aus der Ordnung Anseriformes und 678 Blässhühner (*Fulica atra*) aus der Ordnung Gruiformes untersucht. Bei insgesamt 223 Wildvögeln, die zu den genannten Spezies zählen, konnten mittels RT-rPCR nach SPACKMAN et al. (2002) Influenza-A-Virusinfektionen nachgewiesen werden.

Im Studienzeitraum wurden am häufigsten bei Stockenten (*Anas platyrhynchos*), die zu den Gründelenten zählen, Influenza-A-Virusgenome nachgewiesen (Prävalenz 6,2 %). In der Nachweisfrequenz folgte eine Tauchentenart, und zwar die Reiherente (*Aythya fuligula*), mit einer Nachweisrate von 5,0 %. Wesentlich geringere Prävalenzen konnten bei Höckerschwänen (*Cygnus olor*), Blässhühnern (*Fulica atra*) und Graugänsen (*Anser anser*) festgestellt werden (Tab. IV. 1). Der Prävalenzunterschied von AIV-Genom aus diesen drei Vogelspezies im Vergleich zur Stockente und zur Reiherente war statistisch signifikant ($\text{Chi}^2=85,6$; $p<0,001$).

Tabelle IV. 1: AIV-Genomnachweis und Zahl der H5- und N1-Nachweise aus Wildvogelproben von Juli 2007 bis März 2009 unterteilt nach Vogelarten, 95 %-Konfidenzintervalle (95 %-KI) siehe Tab. IX. 1 im Anhang (n. n. = nicht nachgewiesen)

Vogelart	Probenanzahl		AIV positiv		H5		N1	
	n	%	n	% ^a	n	% ^b	n	% ^b
Stockente <i>Anas platyrhynchos</i>	3474	56,8	214	6,2	52 ^c	24,3 ^c	15 ^c	7,0 ^c
Graugans <i>Anser anser</i>	678	11,1	1	0,1	n. n.		n. n.	
Blässhuhn <i>Fulica atra</i>	678	11,1	2	0,3	n. n.		1	50,0
Höckerschwan <i>Cygnus olor</i>	261	4,3	4	1,5	1	25,0	n. n.	
Reiherente <i>Aythya fuligula</i>	40	0,7	2	5,0	n. n.		n. n.	
Restliche Arten	983	16,1	n. n.		n. n.		n. n.	
Gesamt	6114	100,0	223	3,6	53 ^c	23,8 ^c	16 ^c	7,2 ^c

^abezogen auf die Gesamtprobenanzahl jeweiliger Vogelspezies.

^bbezogen auf Influenza-A-positive Proben jeweiliger Vogelspezies.

^cdavon einmal HPAIV H5N1, Typ Asia.

1.2. Saisonale Prävalenzen

Die höchste monatliche Prävalenz der Infektionen mit AIV bei Wildvögeln wurde jeweils im September festgestellt, und zwar 19,5 % (75 von 384 untersuchten Proben) im September 2008 und 9,3 % (31 von 334) im September 2007. In den Monaten Juli und August 2007, April bis Juli 2008 sowie Februar und März 2009 konnten jeweils keine Influenzavirusinfektionen nachgewiesen werden (Abb. IV. 1).

Die jahreszeitliche Gesamtbetrachtung des Studienzeitraumes zeigt, dass im Herbst (Sept – Nov ´07-´08) (9,1 %; 95 %-KI: 8,71-11,50) und Winter

(Dez '07 und '08, Jan – Feb '08-'09) (2,6 %; 95 %-KI: 1,83-3,74), im Gegensatz zu Frühjahr (Mrz – Mai '08, März '09) (0,1 %; 95 %-KI:0,01-0,42) und Sommer (Juli - Aug '07, Juni - Aug '08) (0,2 %; 95 %-KI:0,02-0,65) signifikant höhere Prävalenzen nachweisbar waren ($\text{Chi}^2=182,8$; $p<0,001$) (Tab. IX. 2). Somit war das relative Risiko für die Wildvögel mit AIV infiziert zu sein in den Herbst- und Wintermonaten 51,1 bzw. 14,5-mal so hoch wie in den Sommermonaten (Abb. IV. 1).

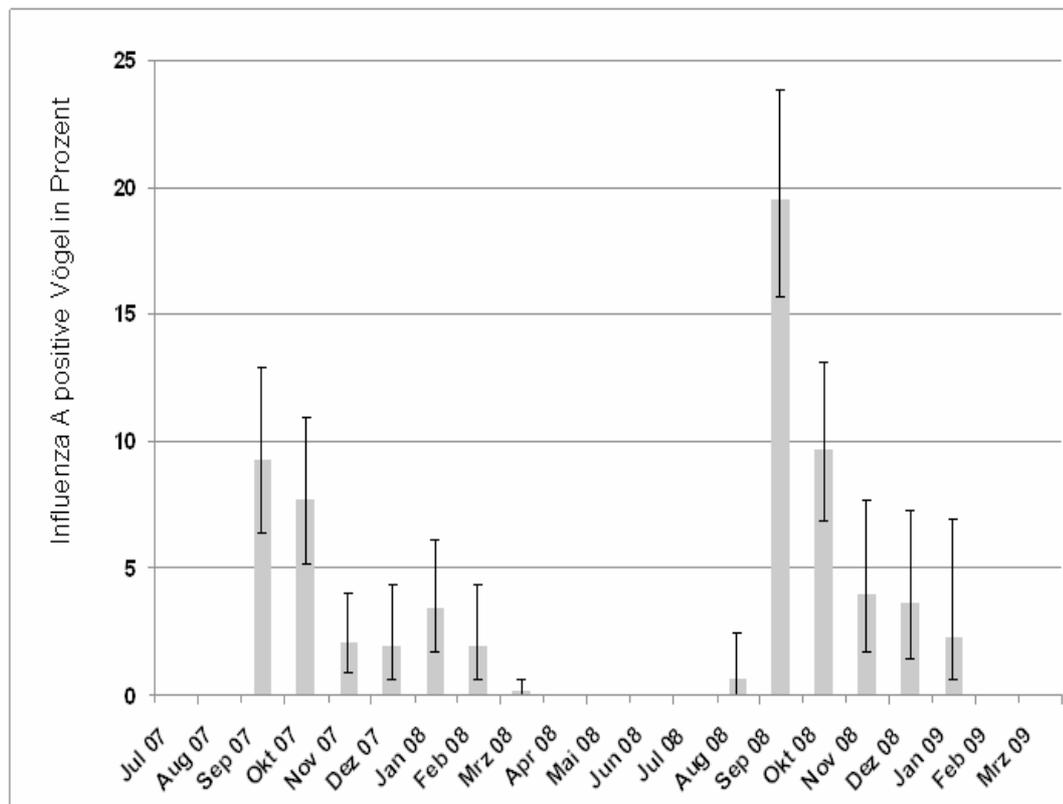


Abbildung IV. 1: Monatliche Verteilung der prozentualen Nachweisrate von Influenza-A-Genom im Studienzeitraum mit Angabe der 95 %-Konfidenzintervalle.

1.3. Regionale Prävalenzen

Die Beprobungen fanden bayernweit statt. Allerdings variierte das Probengesamtaufkommen in den einzelnen Regierungsbezirken und war in Oberbayern mit 2.737 untersuchten Vögeln am höchsten, in Unterfranken mit 255 Tieren am niedrigsten (Tab. IV. 2). Auf Ebene der

Landkreise lagen Proben aus 69 von insgesamt 71 Landkreisen Bayerns vor. Die meisten der 6.114 Proben stammten aus dem oberbayerischen Landkreis München (n=562) und hier mit einem Anteil von 39,5 % aus der Klinik für Vögel der LMU München.

Genome aviärer Influenzaviren wurden in allen sieben Regierungsbezirken nachgewiesen, allerdings mit signifikanten Unterschieden in der Nachweishäufigkeit (Abb. IV. 2). So reichte die AIV-Prävalenz von 9,6 % für Schwaben (109/1133; 95 %-KI: 7,97-11,49) bis 0,5 % für Mittelfranken (3/549; 95 %-KI: 0,11-1,59) ($\chi^2=47,5$; $p<0,001$) (Tab. IV. 2).

Auf Landkreisebene bestanden ebenfalls signifikante Unterschiede in der AIV-Prävalenz. So wurden nur in 33 von 71 Landkreisen aviäre Influenzaviren bei Vögeln nachgewiesen. In den Landkreisen Würzburg, Donau-Ries, Unterallgäu und Bad Tölz war die Nachweisrate besonders hoch (Abb. IV. 2). Die für die einzelnen Landkreise ermittelten AIV-Prävalenzen sind in der Tabelle IX. 3 im Anhang dargestellt.

Tabelle IV. 2: AIV-Genomnachweis und Zahl der H5- und N1-Nachweise aus Wildvogelproben von Juli 2007 bis März 2009 unterteilt nach bayerischen Regierungsbezirken, 95 %-KI siehe Tab. IX. 3 im Anhang, (n. n. = nicht nachgewiesen)

Regierungs- bezirk	Proben- anzahl		AIV positiv		H5		N1	
	n	%	n	% ^a	n	% ^b	n	% ^b
Oberfranken	289	4,7	12	4,2	1	8,3	1	8,3
Unterfranken	255	4,2	4	1,6	n. n.		2	50,0
Mittelfranken	549	9,0	3	0,5	n. n.		n. n.	
Oberpfalz	512	8,4	16	3,1	2	12,5	n. n.	
Niederbayern	639	10,5	17	2,7	n. n.		1	5,9
Oberbayern	2737	44,8	62	2,3	5 ^c	8,1 ^c	6 ^c	9,7 ^c
Schwaben	1133	18,5	109	9,6	45	41,3	6	5,5
Gesamt	6114	100,0	223	3,6	53 ^c	23,8 ^c	16 ^c	7,2 ^c

^a bezogen auf die Probenanzahl aus jeweiligem Regierungsbezirk.

^b bezogen auf Influenza-A-positive Proben aus jeweiligem Regierungsbezirk.

^c davon einmal HPAIV H5N1, Typ Asia.

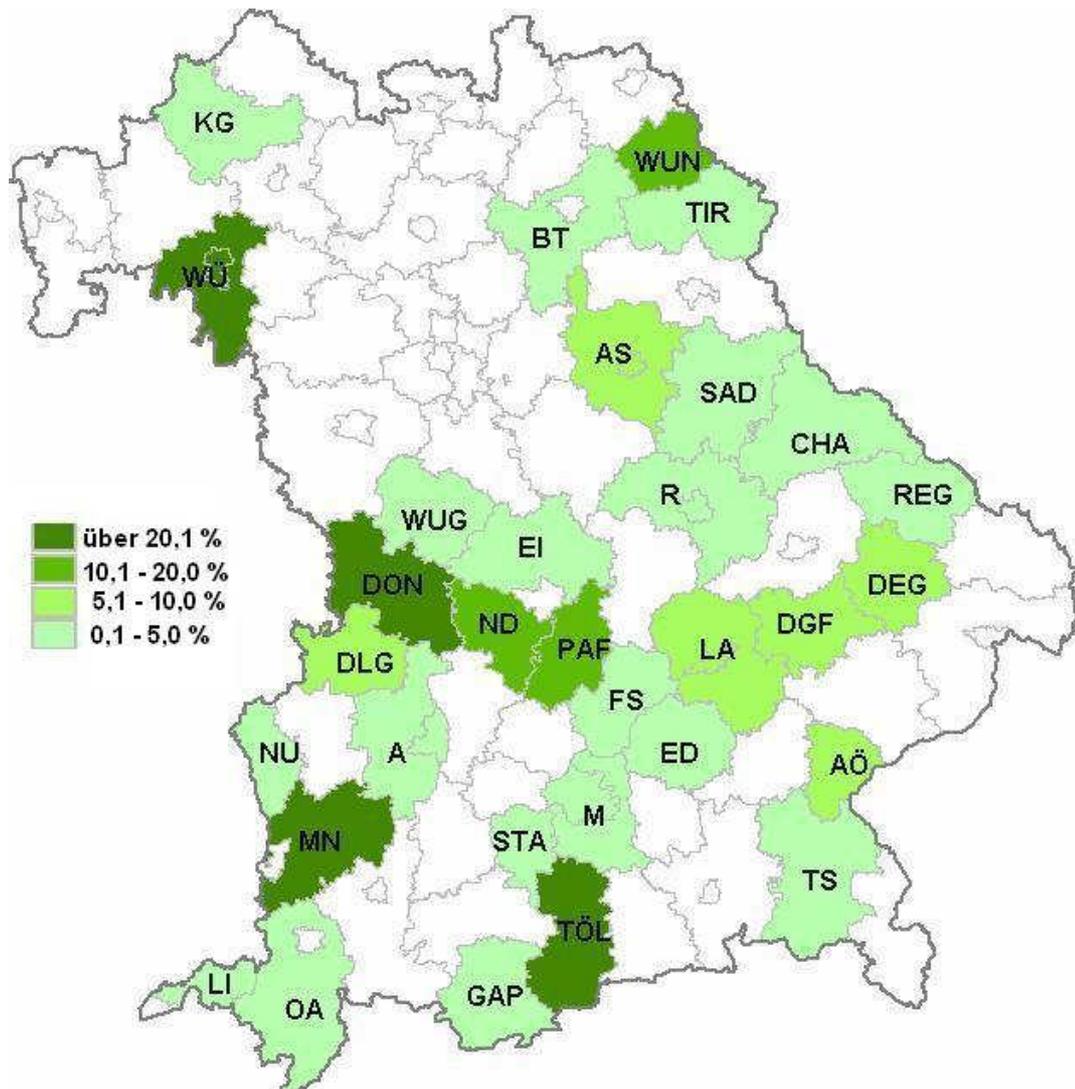


Abbildung IV. 2: Regionale Verteilung der prozentualen Nachweisrate von Influenza-A-Genom im Studienzeitraum.

2. AIV-Nachweise bei unterschiedlichen Probenmaterialien

Aviäre Influenzaviren wurden am häufigsten in Kloakal (K)-Tupfern (6,4 %) nachgewiesen, im Gegensatz zu sehr viel geringeren Prävalenzen in Rachen (R)-Tupfern (0,9 %), Organproben (0,7 %) und Kotproben (0,5 %) ($\text{Chi}^2=311,7$; $p<0,001$).

Während der ct-Mittelwert (M) der pan AIV RT-rPCR bei den K-Tupfern 16,9 (SD: 3,5) betrug, waren die ct-Mittelwerte für die anderen Proben-

materialien stets größer als 30 (R-Tupfer: M: 35,2; SD: 2,4; Organproben: M: 35,5, SD: 2,8; Kotproben: M: 33,4, SD: 2,9). Bei einer semi-quantitativen Auswertung der ct-Werte zeigt dies eine höhere AIV-Genom-Kopienzahl in K-Tupfern im Vergleich zu den anderen Probenarten (Abb. IV. 3).

Darüber hinaus wurde nur bei 16 Tieren sowohl im K-, als auch im R-Tupfer AIV-Genom detektiert, obwohl für insgesamt 2.943 Wildvögel jeweils beide Tupferarten vorhanden waren. Bei 15 der 16 Tupferpaare wiesen die K-Tupfer (M: 28,7, SD: 3,8) niedrigere ct-Werte als die R-Tupfer (M: 34,3, SD: 2,5) auf. Zum größten Teil konnte Influenza-A-Genom aber nur in der Kloake (178 von 2943) und nur gelegentlich nur im Rachen (12 von 2943) detektiert werden.

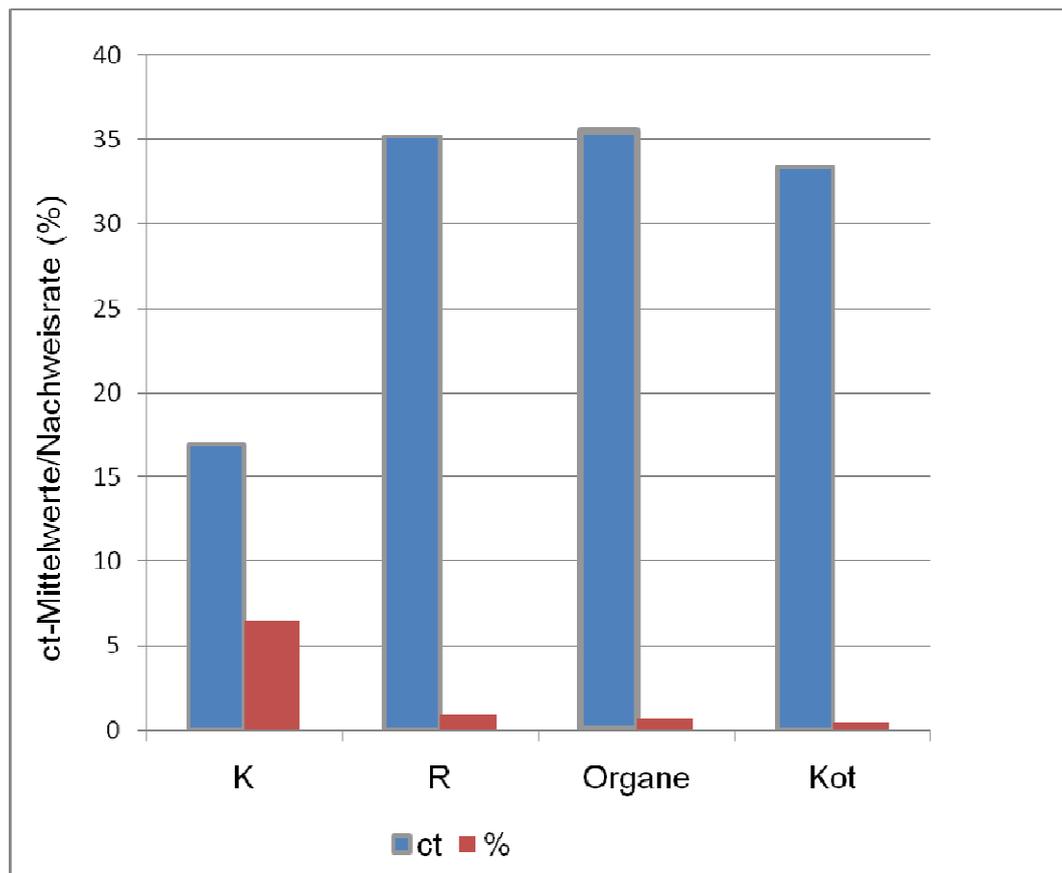


Abbildung IV. 3: Ct-Mittelwerte und prozentuale Nachweisrate von aviärem Influenzavirusgenom in Kloakal- (K), Rachentupfern (R), Organen und Kot.

3. Charakterisierung und Subtypisierung von AIV

Alle AIV-Genom-positiven Wildvögel wurden zunächst auf Vorliegen von H5, H7 und N1 und nachfolgend auf die restlichen HA-Typen von H1 bis H13 untersucht. So konnten bei 58,3 % (n=130) der insgesamt 223 Influenza-A-positiven Proben die Hämagglutinin-Komponente und bei 26,0 % (n=58) der Neuraminidase-Subtyp bestimmt werden. Ein Nachweis der vollständigen Subtypkombination gelang bei 50 Proben (22,4 %). Hiervon wurden zwölf Subtypkombinationen vom Nationalen Referenzlabor bestimmt, jeweils einmal H1N1, H1N9, H3N1, H3N2, H5N1, H5N3, H9N2, H10N9, H11N2 und H11N9 sowie zweimal H4N6.

Eine Gesamtübersicht der in den einzelnen Landkreisen nachgewiesenen HA- und N-Subtypkomponenten befindet sich im Anhang in Tab. IX. 4 und IX. 5.

3.1. Subtypisierung der Hämagglutinkomponente

Die Multiplex RT-rPCRs für H1-H4, H6 und H8-H13 wurden für alle Influenza-A-positiven Proben mit einem ct-Wert kleiner oder gleich 35, die in der H5/H7-PCR negativ getestet wurden, angewendet. Damit wurden 131 von 170 bis dahin noch nicht typisierten AIV-positiven Proben weiter untersucht.

Bei 58,8 % (77 von 131) dieser Proben konnte der Hämagglutintyp bestimmt werden. Davon handelte es sich bei drei Kloakentupfern von Stockenten um eine Mischinfektion mit jeweils zwei unterschiedlichen Hämagglutinin-Subtypkomponenten (H3/H9, H6/H13 und H9/H10).

Der hochvirulente Subtyp H5N1/Typ Asia wurde im Untersuchungszeitraum in Bayern einmal nachgewiesen, und zwar durch das FLI im Januar 2009 bei einer erlegten Stockente. Das beprobte Tier stammte aus einer Jagdstrecke im Landkreis Starnberg, bei der noch weitere 34 Stockenten und vier Kanadagänse erlegt wurden, die allerdings alle im Influenza-A-Genom-PCR-Nachweis negativ waren.

Bei 52 Vögeln, und zwar ausschließlich aus den Herbstmonaten 2007 und 2008, sowie vom Winter 2008, wurden H5-Subtypkomponenten ohne N1-Komponente detektiert. Die positiven Proben stammten, mit einer Ausnahme, von Stockenten (n=51), lediglich ein Höckerschwan war ebenfalls H5-positiv (Tab. IV. 1). Die Prävalenzunterschiede zwischen den einzelnen Regierungsbezirken waren statistisch signifikant: Während von September bis Oktober 2008 zum Beispiel in Oberbayern nur 0,6 % der untersuchten Proben (n=321) H5-positiv waren, waren es im gleichen Zeitraum in Schwaben 12,7 % (n=251) ($\text{Chi}^2=34,9$; $p<0,001$). Alle H5-Subtypkomponenten wurden vom Nationalen Referenzlabor (NRL) für Aviäre Influenza (Friedrich-Loeffler-Institut (FLI), Insel Riems) nach Bestimmung einer monobasischen Hämagglutinin-Spaltstellensequenz als niedrig pathogen (LPAI) bewertet.

Bei einer Stockente (J1/137), die in der Jagdsaison 2007 im Landkreis Donau-Ries erlegt wurde, wurde der AIV-Subtyp mittels Sequenzierung der Hämagglutinin- und Neuraminidasekomponente als H5N2 bestätigt (A/mallard/Bavaria/1/2007 (H5N2)). Die Sequenzen für das Hämagglutinin und die Neuraminidase von A/mallard/Bavaria/1/2007 (H5N2) sind in der Genbank hinterlegt und unter den Zugangs Codes (accession numbers) FJ648285 und FJ648284 zu finden.

Die Subtypkomponente H7 konnte im gesamten Studienzeitraum nicht nachgewiesen werden.

Neben H5 wurden in der vorliegenden Studie die HA-Typen H1, H2, H3, H4, H6, H9, H10, H11 und H13 detektiert. Bei der Stockente, der am häufigsten beprobten Art, wurden mit Ausnahme von H7, H8 und H12 alle HA-Subtypkomponenten von H1 bis H13 nachgewiesen. Diese Art bestätigt also das breiteste Spektrum an AIV-HA-Subtypkomponenten. Bei zwei Blässhühnern wurden die HA-Komponenten H10 und H13, bei der Graugans H9, bei den Höckerschwänen H5 und H6 und bei den Reiherenten H11 detektiert. Die Subtypkomponente H5 wurde mit 23,8 % am häufigsten nachgewiesen, gefolgt von H11 (12,1 %) und H9 (5,8 %). Bei den 50 vollständig subtypisierten AIV dominierten H5N3 mit einem Anteil von 56,0 %, gefolgt von H1N1 mit 12,0 %.

Bei Betrachtung der regionalen und saisonalen Subtypverteilung fiel auf, dass im September 2008 bei zwei Jagden im gleichen Jagdrevier Oettingen-Spielberg im Landkreis Donau-Ries der HA-Typ H5, und dabei der Subtyp H5N3 mit Abstand am häufigsten vorkam. Hier wurde H5 bei 31 Vögeln nachgewiesen, das entsprach 16,1 % der untersuchten Tiere (n=192) und 55,4 % der AIV-positiven Vögel (n=56). Darüber hinaus waren von den H5-positiven Tieren 80,6 % H5N3-positiv (n=25). Im Landkreis Pfaffenhofen an der Ilm konnte, bei einer Jagd im Oktober 2008, die Subtypkomponente H11 (n=14) bei 6,8 % der untersuchten (n=205) und 48,3 % der Influenza-A-Virusgenom positiven (n=29) Wasservögel festgestellt werden (Abb. IV. 4).

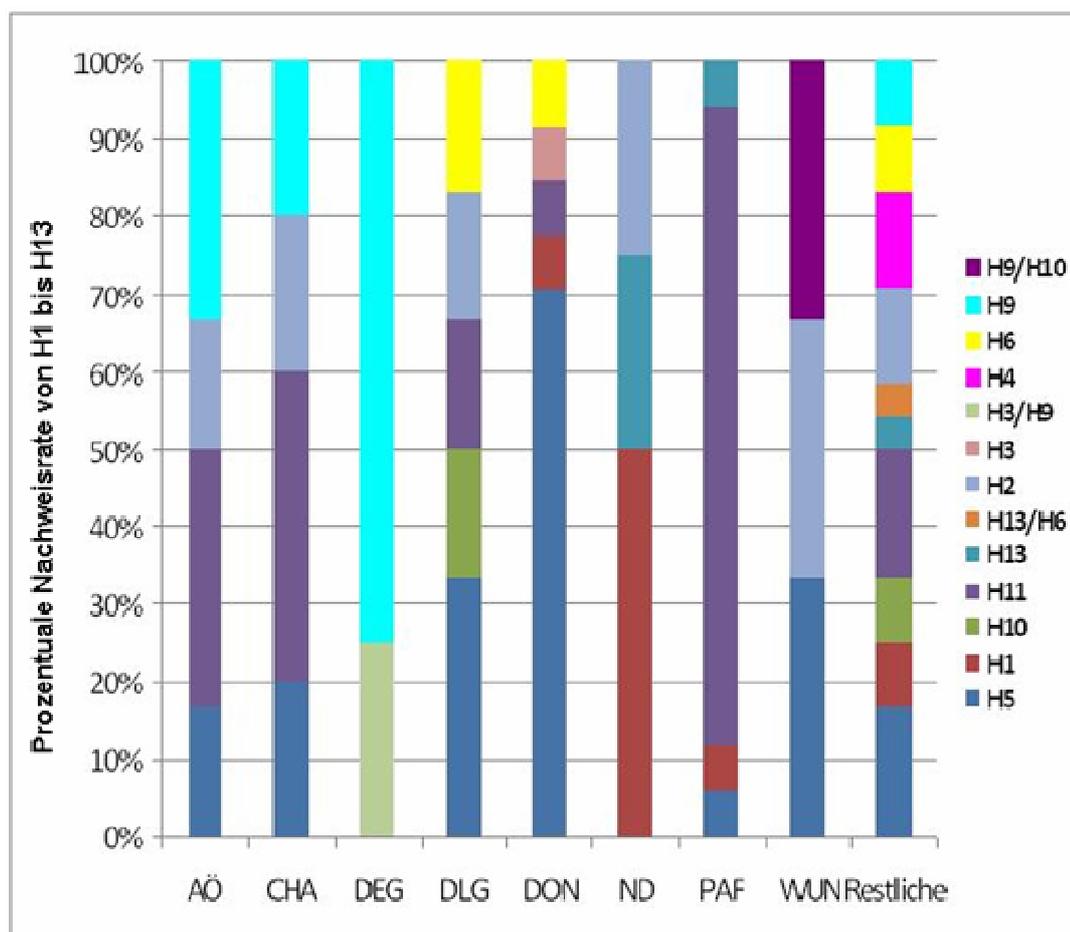


Abbildung IV. 4: Prozentuale Nachweisrate der Subtypkomponenten H1 bis H13 in den bayerischen Landkreisen (H5-/H7-Subtypisierung nach SPACKMAN et al. (2002), restliche HA-Typen nach RINDER et al. (in Vorbereitung));

AÖ=Altötting; CHA=Cham; DEG=Deggendorf; DLG=Dillingen an der Donau; DON=Donau-Ries; ND=Neuburg-Schrobenhausen; PAF=Pfaffenhofen an der Ilm; WUN=Wunsiedel).

3.1.1. Bestätigung der Mischinfektionen

Bei drei Stockenten wurden mittels Multiplex RT-rPCR Mischinfektionen mit unterschiedlichen HA-Subtypkomponenten nachgewiesen, und zwar je einmal H3+H9, H6+H13 und H9+H10. Bei diesen Vögeln wurden die HA-Typen in den entsprechenden Singleplex RT-rPCR-Tests bestätigt (Abb. IV. 5). Bei einem Vogel, Probennummer 112, wurde zusätzlich das Vorliegen von H3 und H9 mittels Durchführung von konventionellen Singleplex-PCRs verifiziert. Dabei wurden die Sequenzen durch

Agarosegelelektrophorese (Abb. IV. 6) der PCR-Produkte, nachfolgender Sequenzierung und BLAST-Analyse eindeutig als H3 und H9 identifiziert.

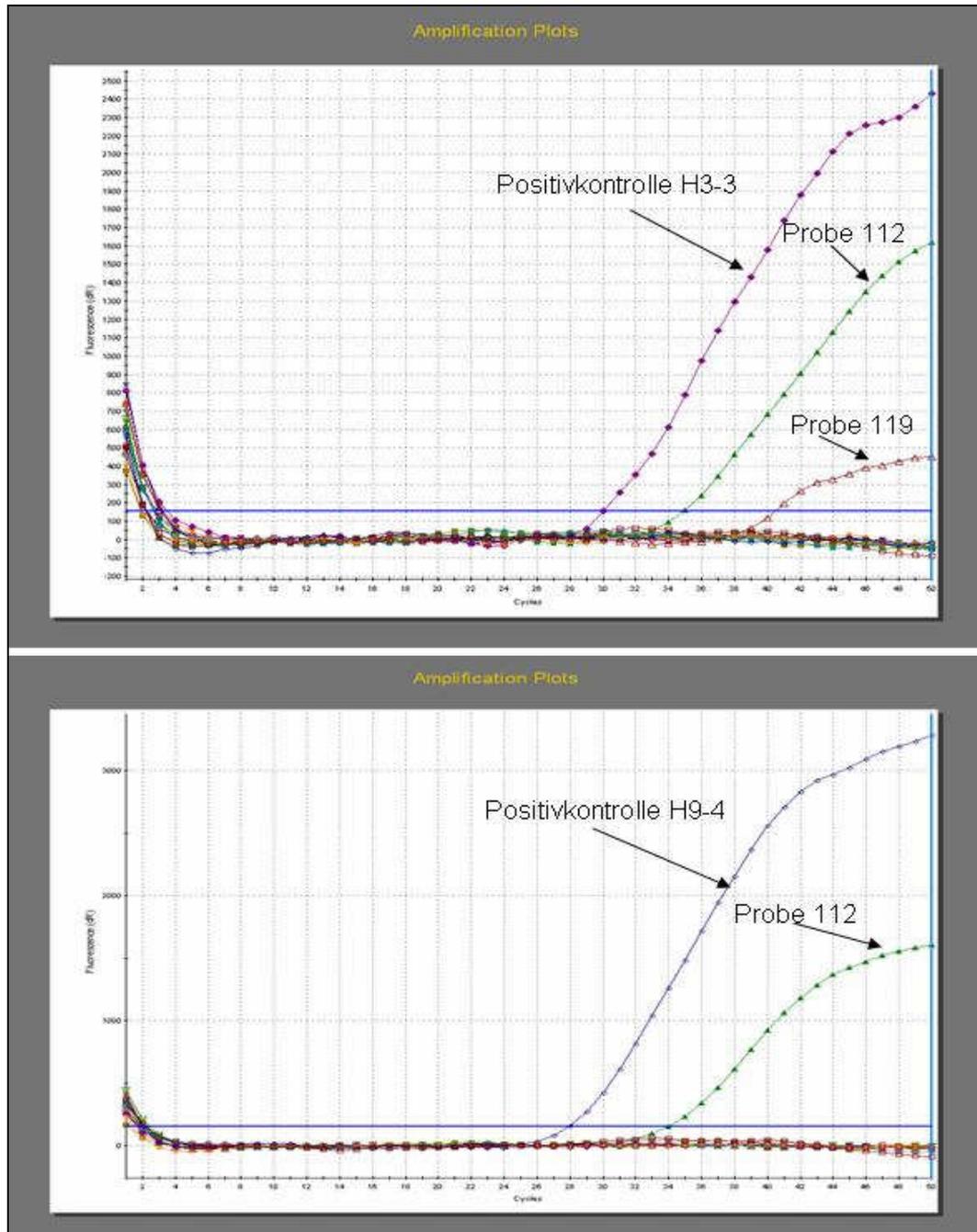


Abbildung IV. 5: Darstellung der Reaktionsverläufe der Probe 112 in der H3- und H9-spezifischen Real-time Singleplex-PCR.

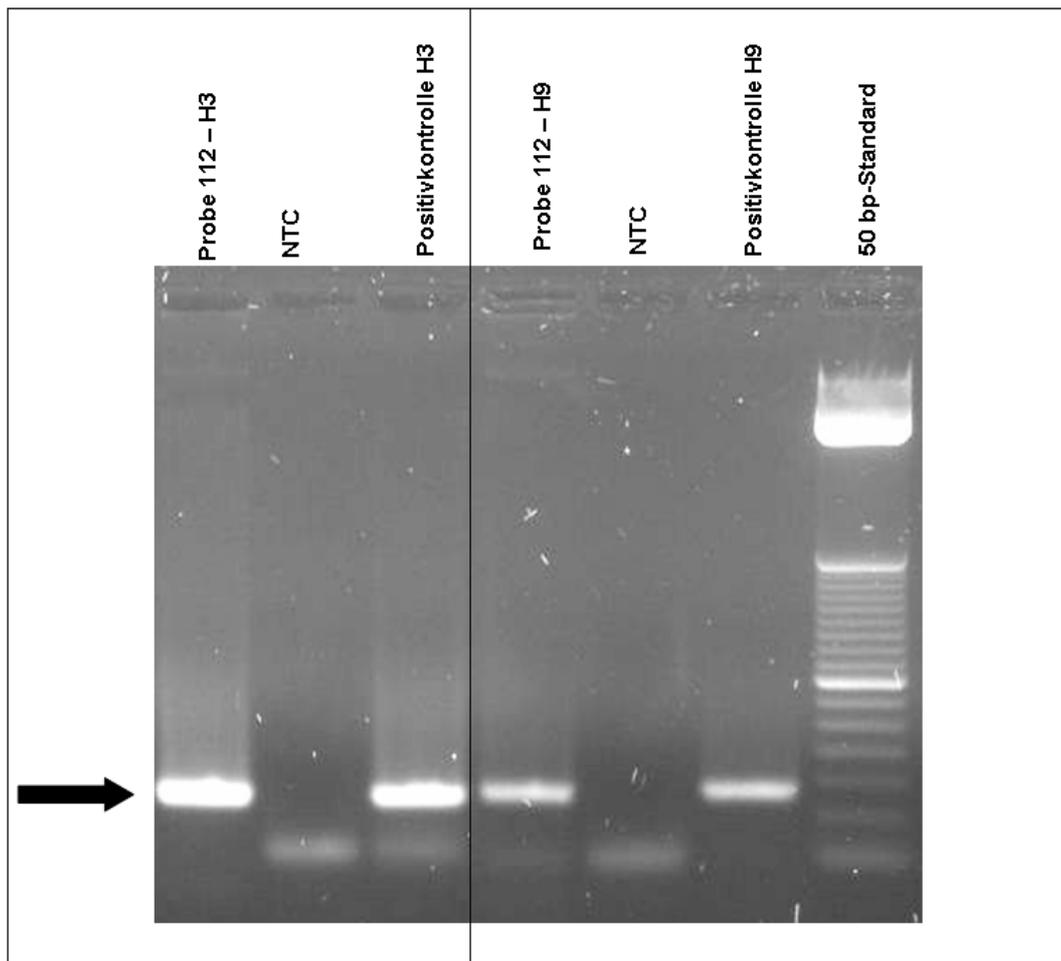


Abbildung IV. 6: Agarosegelanalyse (2%iges Gel) der nach H3- und H9-Singleplex-PCR erhaltenen DNA-Produkte: In der Probe 112 wurden Produkte in der erwarteten Größe nachgewiesen (Produktgröße je 125 bp, Pfeil). Zur Größenbestimmung wurde ein 50 bp-Standard verwendet.

3.2. Subtypisierung der Neuraminidasekomponente

Die Neuraminidase-Komponente konnte bei insgesamt 26,0 % der Influenza-A-positiven Tiere bestimmt werden:

Zunächst wurden alle Influenza-A-Genom-positiven Proben auf Vorliegen der Neuraminidase-Komponente N1 untersucht. Wenn entweder die Hämagglutinin-Komponente H5 nachweisbar war oder Virusisolate gewonnen werden konnten, wurden diese Proben zusätzlich auf N2 und N3 untersucht.

Die Neuraminidase-Komponente N1 wurde 16-mal nachgewiesen, und zwar in Proben aus den Herbst- und Wintermonaten des Studienzeitraumes (Tab. IX. 2 im Anhang). Sie kam am häufigsten in Kombination mit der H1-Subtypkomponente vor (n=6), gefolgt von zweimal H3 und jeweils einmal mit H5, H6, H10 und H11.

Mittels konventioneller N2-spezifischer RT-PCR wurde bei vier Proben der Subtyp H5N2 und bei einer Probe H3N2 festgestellt. Weitere drei Subtypkombinationen wurden vom FLI detektiert, und zwar H3N2, H9N2 und H11N2.

Der Nachweis von N3-Subtypkomponenten erfolgte in einer konventionellen N3-spezifischen RT-PCR nach FERREIDOUNI et al. (2009). In dieser PCR wurden alle H5-positiven, N1- und N2-negativen klinischen Proben (n=32), sowie die nach wie vor untypisierten Virusisolate (n=2) untersucht. Bei 85,3 % (n=29) der untersuchten Proben konnte die N3-Subtypkomponente bestimmt werden (Abb. IV. 7; Tab. IV. 3). Auffällig war, dass es sich beim Großteil (n=26) der N3-subtypisierten AIV-Genom positiven Proben, um Material von erlegten Stockenten aus zwei Jagden im selben Jagdrevier (Oettingen-Spielberg) im Landkreis Donau-Ries handelte (Tab. IV. 3). Die bei diesen Jagden im September 2008 erlegten Wildvögel erwiesen sich zu 29,2 % (56/192) als Influenza-A-Virusgenomträger und davon zu 44,6 % (25/56) als Träger des Subtyps H5N3. Die PCR-Produkte von AIV aus zwei Vögeln (J182/31K und J182/38K) wurden mittels Sequenzierung und BLAST-Analyse als N3 bestätigt.

Zudem konnte das Nationale Referenzlabor zwei N6-Subtypkomponenten in Kombination mit H4 und eine N9-Komponente in Kombination mit H11 bestimmen.

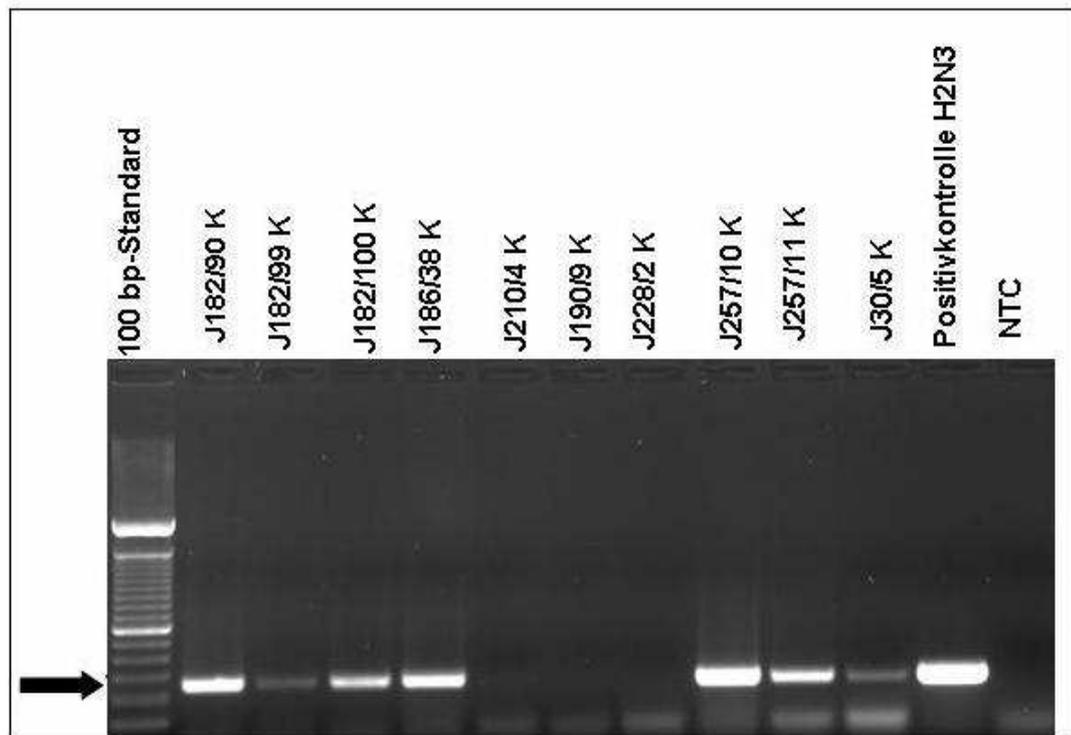


Abbildung IV. 7: Agarosegelanalyse (1%iges Gel) der nach konventioneller N3-PCR erhaltenen DNA-Produkte: Beispielhafte Darstellung für zehn H5-positive Proben (erwartete Produktgröße 247 bp, Pfeil; NTC = no template control). Zur Größenbestimmung wurde ein 100 bp-Standard verwendet.

Tabelle IV. 3: Ergebnisse der pan AIV RT-rPCR und der N2- und N3-Subtypisierung von Wildvogelproben von Juli 2007 bis März 2009 unterteilt nach bayerischen Landkreisen, Abkürzungen für die Landkreise wie in Abb. IV. 4 (n. n. = nicht nachgewiesen)

Landkreis (LK)	AIV positiv		N2		N3	
	n	% ^a	n	% ^b	n	% ^b
AÖ	8	3,6	n. n.		n. n.	
CHA	7	3,1	2	28,6	n. n.	
DEG	13	5,8	n. n.		n. n.	
DLG	6	2,7	n. n.		2	33,3
DON	89	39,9	4	4,5	26	29,2
ND	9	4,0	n. n.		n. n.	
PAF	31	13,9	n. n.		n. n.	
WUN	10	4,5	1	10,0	n. n.	
Restliche LK ^c	50	22,4	1	2,0	1	2,0
Gesamt	223	100,0	8	3,6	29	13,0

^abezogen auf die Gesamtanzahl Influenza-A-positiver Proben.

^bbezogen auf Influenza-A-positive Proben aus jeweiligem Landkreis.

^cÜbersicht über alle beprobten Landkreise im Anhang Tabelle IX. 3.

4. Virusisolierung

4.1. Virusisolierung im embryonierten Hühnerei

Mit Material aus 75 Tupferproben (70 K- und 5 R-Tupfer) und sechs Kotproben, in denen 42 H5-, 13 N1- und 26 andere HA-Typen (H1-H4, H6, H9-H11, H13) vorlagen, wurde eine Virusvermehrung im embryonierten Hühnerei versucht. Bei 12,3 % (n=10) der verimpften Proben wurde eine Virusvermehrung durch positive Reaktionen entweder in der pan AIV RT-rPCR mit ct-Werten zwischen 12,7 und 22,6, der am Tag des Absterbens des 1. Embryos geernteten Allantoisflüssigkeiten, festgestellt. Darüber hinaus bestätigten auch HA-Titer > 1:8 und das Absterben der Embryonen die produktive Virusvermehrung in der Allantoisflüssigkeit (Tab. IV. 4).

Bei einem Virusisolat wurde eine Mischinfektion mit aviären Paramyxoviren festgestellt, die vom FLI als APMV-4 diagnostiziert wurden.

4.2. Zellkulturinfektion und Virustiter

Durch Verimpfen von log₁₀ Verdünnungen der Allantoisflüssigkeiten, die aus der Virusisolierung von K-Tupfern von sechs AIV-positiven Stockenten stammten in MDCK-Zellen konnten Virustiter im Bereich zwischen 10^{3,5} und 10^{4,5} pro ml berechnet werden (Tab. IV. 4). Ein zytopathogener Effekt (cpE) wurde nach simultaner Inokulation der Zellen mit allen Proben bis zu einer Verdünnungsstufe von 10⁻³ beobachtet.

Die Infektion der Zellen mit AIV wurde mittels Immunhistochemie mit Hilfe von Nukleoprotein-spezifischen Antikörpern bestätigt (Abb. IV. 8).

Tabelle IV. 4: Virusisolierung von Influenza-A-Viren aus Kloakaltupfern von Stockenten (*Anas platyrhynchos*). Ergebnisse des Virusgenomnachweises in der pan AIV RT-rPCR sind als ct-Werte und Ergebnisse des Hämagglutinationstestes sind als Endpunktverdünnung der noch hämagglutinierenden Allantoisflüssigkeit (HA) angegeben

(p. i. = post inokulationem; n. d. = nicht durchgeführt)

Proben-Nr.	Subtyp	Virusnachweis			Absterben des Embryos ^a (Tage p. i.)	MDCK Zellkulturtiter (log10)
		Tupfer	Allantoisflüssigkeit			
		ct	HA	ct		
J31/5K	H4N6	28,0	n. d.	17,8	1/1	10 ^{3,5} /ml
J182/2K	H3Nx	23,7	1:32	13,3	2/2	10 ^{4,5} /ml
J182/32K	H5N3	26,3	1:32	16,6	2/2	10 ^{4,5} /ml
J182/41K	H5N3	20,7	1:8	13,9	2/4	10 ^{3,5} /ml
J182/66K	H3N2	33,4	1:32	12,7	2/2	10 ^{4,5} /ml
J182/79K	H3N3	25,7	1:32	14,1	2/2	10 ^{4,5} /ml

^a zwei beimpfte Eier, Zeitangaben für 1. Ei/2. Ei.

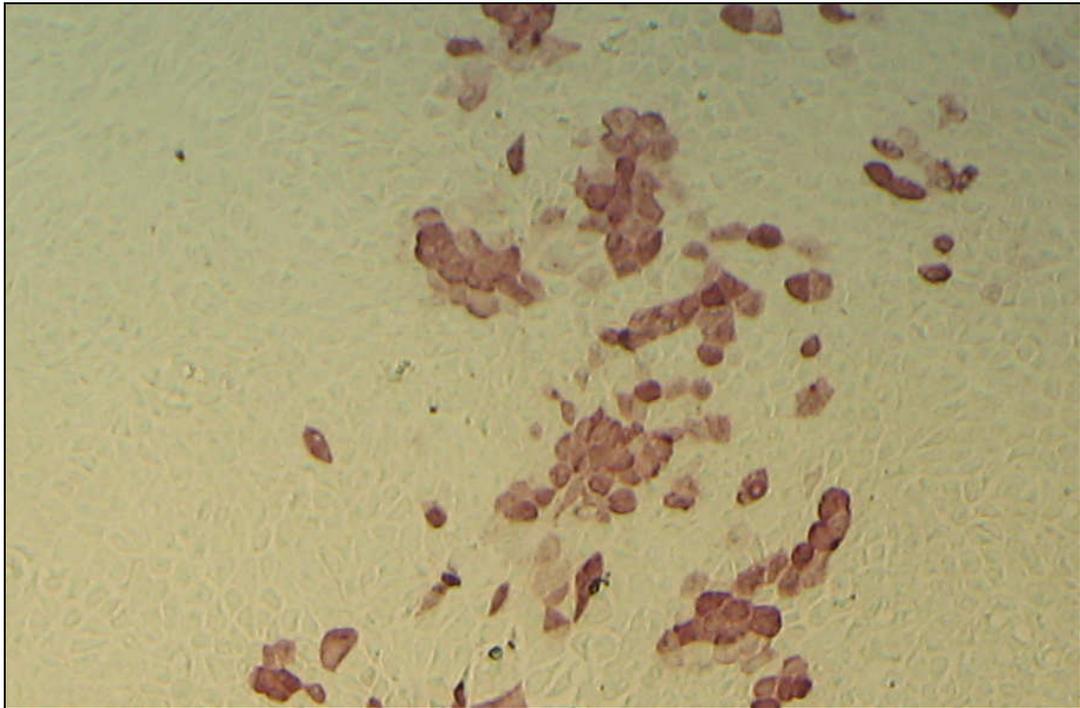


Abbildung IV. 8: Immunhistochemischer Nachweis (Braunfärbung) der AIV-Infektion von MDCK-Zellen mit Nukleoprotein-spezifischen Antikörpern.

V. DISKUSSION

Das Ziel dieser Studie war es, Daten über die aktuelle Verbreitung aviärer Influenza-A-Viren in der Wildvogelpopulation in Bayern zu gewinnen. Im Mittelpunkt stand dabei die Frage nach der Existenz eines H5N1-Reservoirs und der Rolle niedrigvirulenter H5- und H7-Subtyp-komponenten bei Wildvögeln. Zudem sollten die AIV-Prävalenzen mit Bezug auf Saisonalität, Wirtsspezifität, geographische Lokalisation und Subtypverteilung festgestellt werden. Weiterhin wurden grundlegende Daten zur AIV-Verteilung ermittelt, um eine Aussage über das Eintragsrisiko für AIV aus Wildvögeln in Nutzgeflügelbestände treffen zu können. Bisher konnte weltweit noch nicht eindeutig geklärt werden, welche Aspekte hierbei die bedeutendere epidemiologische Rolle spielen. Derzeit wird hauptsächlich das Infektionsrisiko, dass von Wildvögeln, Nutzgeflügel, dem Handel mit Geflügelprodukten oder von mechanischen Vektoren (u. a. Personen- und Fahrzeugverkehr) ausgehen kann, diskutiert.

Im Zusammenhang mit dem Vorkommen hochvirulenter H5N1-Subtypen in den letzten Jahren bei Wildvögeln in Bayern, stellten sich diese Fragen wieder verstärkt. Da für Bayern bisher nur unzureichende Daten und Erkenntnisse vorlagen, wurden von 2007 bis 2009 Wildvögel aus verschiedenen Regionen und nahezu allen Landkreisen Bayerns untersucht.

1. Angewandte Methoden

1.1. Pan AIV RT-Real-time PCR (RT-rPCR)

Die pan AIV RT-rPCR nach SPACKMAN et al. (2002), bei der ein für alle aviäre Influenzaviren hoch konservierter Abschnitt des Matrixproteingens amplifiziert wird, stellt mittlerweile eine weltweit angewandte Standard-Methodik zur Detektion von AIV-Genom dar (O.I.E., 2009c). Sie wird auch vom Nationalen Referenzlabor für Aviäre Influenza für die amtliche Diagnostik empfohlen. Ihre Anwendbarkeit als One-Step RT-rPCR, bei der Reverse Transkription und PCR unmittelbar aufeinander folgend im selben

Gefäß durchgeführt werden und bei der das Vorliegen eines spezifischen Produktes über fluoreszierende Sonden in Echtzeit angezeigt wird, verringert das Kontaminationsrisiko und ermöglicht ein schnelles Testergebnis. Zudem ist die Sensitivität dieses Tests sehr hoch, so wurde die Nachweisgrenze mit 1000 Genomkopien pro Ansatz angegeben (SPACKMAN et al., 2002). Als Ausgangsmaterial für den Virusnachweis wurde unter anderem Kot verwendet, der wegen seines hohen Gehalts an Substanzen, die die PCR hemmen können, als problematisch gilt. Diese PCR-Inhibitoren werden häufig bei der RNA-Extraktion aus dem klinischen Material nicht wirkungsvoll genug abgetrennt. Zur Kontrolle des Vorkommens von inhibitorischen Substanzen, also von möglicherweise falsch negativen Proben wurde daher, wie vom Nationalen Referenzlabor empfohlen und zur Verfügung gestellt, bereits bei der RNA-Extraktion eine interne heterologe Nicht-AIV-Kontroll-RNA (IC2) zugegeben, die mit entsprechenden Primern und Sonden in der RT-rPCR stets nachzuweisen war (HOFFMANN et al., 2006).

1.2. RT-rPCR zur H5-, H7- und N1-Subtypisierung

Die H5-Subtypisierung basierte auf einer RT-rPCR nach SPACKMAN et al. (2002). Da die in der ursprünglichen Publikation verwendeten Primer und Sonden für die H5-Detektion primär auf die Erkennung nord-amerikanischer Virusgenotypen ausgerichtet waren, wurden sie entsprechend modifiziert. Dabei wurden die Primer durch das Europäische Referenzlabor in Weybridge modifiziert und die Sonde zunächst wie in SPACKMAN et al. (2002) angegeben verwendet. Im Laufe der vorliegenden Untersuchungen gab es erste Hinweise auf die Existenz von H5-Virusstämmen mit Mutationen in der Sondenregion, die durch die vorliegende PCR nicht erkannt werden. Die Häufigkeit von H5 wird in der vorliegenden Studie daher möglicherweise unterschätzt. Zur Detektion von H7 und N1 wurden vom Friedrich-Löffler-Institut (FLI) entwickelte Primer und Sonden genutzt, deren Sequenzen auf Anforderung vom FLI zur Verfügung gestellt werden. Zur Sensitivität und Spezifität liegen derzeit noch keine Informationen vor. Aufgrund der hohen Mutationsneigung AIV,

die sich insbesondere auf wenig konservierte Gene wie das Hämagglutinin- und das Neuraminidasegen auswirkt, ist zu erwarten, dass Mutationen auch in der Primer- und Sondenregion auftreten. Es ist daher wichtig, bei ersten Hinweisen auf Mutationen in der Primer- oder Sondenregion die Oligonukleotide entsprechend zu verändern.

1.3. Multiplex RT-rPCR zur Typisierung der Hämagglutinine H1-H4, H6 und H8-H13

In den letzten Jahren wurden bereits einige Influenza-Multiplex-PCRs entwickelt, aber überwiegend für Subtypkomponenten, die potentiell hochvirulent sein können oder häufig beim Menschen vorkommen, wie H1, H3, H5, H7 und H9 (CHOI et al., 2002; XIE et al., 2006; ONG et al., 2007). Darüber hinaus entwickelten CHANG et al. (2008) eine Multiplex RT-PCR, die H1 bis H12 und alle N-Subtypkomponenten detektiert. Die erwähnten Methoden basieren jedoch größtenteils auf einer konventionellen PCR mit nachfolgender Produktauftrennung in Agarosegelen. Eine Multiplex-PCR für die am häufigsten vorkommenden aviären Influenzaviren (von H1 bis H13), die auf Real-time Verfahren beruht, ist in der Literatur bisher noch nicht beschrieben worden.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Hämagglutininkomponenten von H1-H4, H6 und H8-H13 subtypisiert. Dies fand mit Hilfe von Multiplex RT-PCR-Protokollen statt, die, für H1-H13 entwickelt, auf Real-time Basis und mit Sonden vom Typ Molecular Beacon durchgeführt wurden (RINDER et al., in Vorbereitung). Die Subtypkomponenten H14 bis H16 werden in diesem Testsystem nicht erfasst. Sie wurden bisher selten nachgewiesen, besitzen daher geringere Bedeutung als die anderen Subtypkomponenten. Ausschlaggebend war allerdings, dass für diese Hämagglutinintypen Sequenzinformationen nur für einzelne Virusstämme in der Genbank vorliegen. Es ist anzunehmen, dass auch für diese HA-Subtypkomponenten eine Variabilität des Hämagglutinins in ähnlichem Ausmaß wie bei H1 bis H13 vorliegt. Daher wäre es nicht möglich gewesen, basierend auf diesen wenigen Sequenzen Bereiche zu identifizieren, die zur Konstruktion von Primern und Sonden ausreichend

konserviert und gleichzeitig spezifisch sind. Somit beschränkte man die Real-time PCR-Protokolle auf H1 bis H13. Durch die gleichzeitige Abklärung von bis zu drei HA-Subtypkomponenten in einem Reaktionsansatz unter Verwendung von Single- bis Triplex-rPCRs mit vorangehender RT-Reaktion wurde eine effiziente Subtypisierung direkt aus Probenmaterial gewährleistet. Bisher fand die HA-Subtypisierung im veterinärmedizinischen Bereich, vielleicht mit der Ausnahme von H5 und H7, entweder mittels klassischer virologischer Methoden, in diesem Fall mit dem HAH statt oder erfolgte molekularbiologisch durch HA-spezifische konventionelle PCRs mit nachfolgender Sequenzierung und BLAST-Analyse (PHIPPS et al., 2004; GALL et al., 2008). Da für diese Methoden mehr Virus-Ausgangsmaterial benötigt wird, war meist eine vorausgehende Virusisolierung im embryonierten Hühnerei notwendig. Damit verbunden war der Nachteil, dass sich bei Mischinfektionen eventuell ein "dominanter" Virusstamm im Ei vermehrt und ursprünglich vorhandene, andere Subtypen folglich nicht mehr detektiert werden konnten (SHARP et al., 1997; WANG et al., 2008). Daher kam es in der Vergangenheit vermutlich auch häufig zu einer Unterschätzung der Anzahl von Koinfektionen mit unterschiedlichen AIV-Subtypen.

Die neue Multiplex RT-rPCR ermöglicht den direkten Nachweis von Doppel- oder Mischinfektionen. Vorher war es nur möglich, auf methodisch sehr aufwendige Art und Weise die Allantoisflüssigkeit mit spezifischem Antiserum gegen bereits nachgewiesene Subtypen zu inkubieren und nochmals auf embryonierte Hühnereier zu verimpfen. Hierdurch sollten Viren des bereits bekannten Subtyps inaktiviert werden und sich andere evtl. vorhandene Subtypkomponenten vermehren und detektieren lassen (SHARP et al., 1997).

Die Multiplex-PCR-Protokolle zeigten bei Validierungstests eine sehr hohe Spezifität. Es gab lediglich bei der Sensitivität geringe Einschränkungen, also falsch negative Ergebnisse, die bei zu geringer Ausgangsmenge viraler Genomkopien im Probenmaterial auftraten (RINDER et al., in Vorbereitung; Ergebnisse hier nicht dargestellt). Die unerwünschten, nicht sigmoiden Reaktionsverläufe, die bei Anwendung der H1/H6/H13-Triplex, bei einer Annealingtemperatur von 50 °C und v. a. bei H6 (HEX-Kanal)

beobachtet wurden, können auf verschiedene Ursachen zurückzuführen sein: Kreuzreaktivitäten mit anderen Subtypgenomen durch zu geringe Spezifität der ausgewählten Primer- und SONDENSEQUENZEN wurden als mögliche Ursache weitgehend ausgeschlossen (RINDER et al., in Vorbereitung; Ergebnisse hier nicht dargestellt). Zur Verringerung möglicher unspezifischer Effekte durch Bindung von Primern und Sonden untereinander wurden die für diesen Fall naheliegendsten Modifikationsmöglichkeiten, wie eine Erhöhung der Annealingtemperatur und eine Erniedrigung der Primerkonzentration ausgetestet (HENEGARIU et al., 1997). Zudem fand der H6-Nachweis, um Kreuzreaktionen zu minimieren, nur noch in der entsprechenden Singleplex-PCR statt. Die unspezifischen Reaktionen konnten durch diese Maßnahmen wesentlich verringert werden.

1.4. Neuraminidase-Subtypisierung von N1-N3

Bis vor kurzem war es nur möglich alle N-Subtypkomponenten zu detektieren, indem man die von HOFFMANN et al. (2001) beschriebene Two-Step-PCR mit nachfolgender Sequenzierung anwendete. Allerdings verfügt diese Methodik über eine relativ geringe Sensitivität, was v. a. bei geringen Mengen viraler RNA im Ausgangsmaterial, typisch für klinische Proben mit LPAIV, problematisch ist und in der vorliegenden Studie bei ausgewählten Virusstämmen nicht erfolgreich war (Ergebnisse nicht dargestellt). In der vorliegenden Studie beschränkte man sich auf die Subtypkomponenten N1 bis N3. Man wählte diese drei N-Typen, weil sie in der Vergangenheit, v. a. in Kombination mit H5, bereits für Wildvögel und Nutzgeflügelbestände gleichermaßen von Bedeutung waren. Darüber hinaus waren PCR-Protokolle, die den Nachweis aller N-Subtypkomponenten mit höherer Sensitivität ermöglichen erst kürzlich, also nach Abschluss des Großteils der in der vorliegenden Arbeit dargestellten Laborarbeiten, verfügbar (ALVAREZ et al., 2008; FERREIDOUNI et al., 2009).

1.5. Virusisolierung im embryonierten Hühnerei und Zellkulturinfektion

Die Virusisolierung im embryonierten Hühnerei gelang im Studienzeitraum nur in zehn Fällen. Über die Ursachen kann lediglich spekuliert werden: Zum einen könnte dies auf eine zu geringe Menge vermehrungsfähiger Viren im Probenmaterial, überwiegend Kloakal-Tupferproben, zurückzuführen sein. Zum anderen wurden zur Virusisolierung Hühnereier verwendet, die möglicherweise kein optimales Medium für die Isolierung von Entenviren darstellen. Des Weiteren war zumindest ein gewisser Anteil (n=20) der verimpften Proben schlechten Lager- und Transportbedingungen (lange, teilweise ungekühlte Versandwege per Post) ausgesetzt, wobei vor allem ungünstige Temperaturbedingungen zum Verlust der Vermehrungsfähigkeit der Viren führen können. Möglicherweise haben ähnliche Schwierigkeiten auch bei der Studie von OTTIS & BACHMANN (1983) zu sehr geringen Influenza-Nachweisraten geführt. Hier basierte der Virusnachweis bei allen einbezogenen Tupferproben auf Virusisolation im embryonierten Hühnerei. Dabei waren nur 2,0 % der 3.392 untersuchten Wildvögel Influenza-A-positiv (OTTIS & BACHMANN, 1983). Aber auch in einigen aktuellen Studien waren die Virus-Isolierungsraten sehr gering (FOUCHIER et al., 2003; GAIDET et al., 2007). So konnten beispielsweise GAIDET et al. (2007) lediglich fünf der 159 in der RT-rPCR AIV-positiven Tupferproben im Hühnerei vermehren. Die heute angewandte PCR-Methodik erhöht aufgrund ihrer verbesserten Sensitivität die Aussagekraft epidemiologischer Studien im Vergleich zur Ära der alleinigen VI im embryonierten Hühnerei enorm.

Die Virusvermehrung von LPAIV in Hühnereiern ist also häufig nicht stark ausgeprägt. Bei einem Virusisolat, das ursprünglich als LPAIV H5N2 (A/mallard/Bavaria/1/2007) subtypisiert worden war, zeigte die Allantoisflüssigkeit nach dreimaliger Eipassage einen sehr hohen HA-Titer von 1:256. Dieser HA-Titer lies sich allerdings nicht auf Influenza-A-Viren, sondern auf aviäre Paramyxoviren (APMV-4) zurückführen. Vermutlich konnte sich APMV-4 gegenüber H5N2 durchsetzen und im embryonierten Hühnerei dominant vermehren. APMV-4 stellt übrigens den bedeutendsten Paramyxovirus-Serotyp bei Wildenten dar. So wurde in einer

anderen Untersuchung in Deutschland bei Wildenten (Krick-, Pfeif- und Stockenten) APMV-4 am häufigsten gefunden (GLOBIG, 2007). Erst kürzlich wurden ähnliche Mischinfektionen von AIV und APMV beschrieben: DORMITORIO et al. (2009) stellten bei der Probe eines Wildvogels eine Mischinfektion von H1N1 und APMV-1 fest.

Die Ergebnisse der Zellkulturinfektion mit MDCK-Zellen und der Immunhistochemie (Abb. IV. 8) bestätigten, dass es sich bei den sich im Ei vermehrten Viren tatsächlich um aviäre Inflenzaviren handelte und sprechen für die Eignung dieser weitverbreiteten permanenten Zelllinie für die Anzucht von AIV. Untersuchungen von LI et al. (2008) zeigten bereits, dass sich LPAIV in MDCK-Zellen effizient vermehren können. Dabei wurden aviäre, humane und Säugetier-Zelllinien mit dem Isolat H11N9 (A/duck/WA/663/97) infiziert. Ein Vergleich der Virustiter ergab für aviäre Zelllinien bis zu 50-fach und für humane Zelllinien bis zu 5000-fach niedrigere Virustiter als für MDCK-Zellen.

1.6. AIV-Nachweise bei unterschiedlichen Probenmaterialien

Im Studienzeitraum ergab sich die höchste Nachweisrate von AIV-Genomen aus Kloakentupfern (6,4 %), das stützt die Auffassung einer hauptsächlichlichen Replikation der Viren im Digestionstrakt und somit einen primären fäkal-oralen Übertragungsweg niedrigvirulenter aviärer Inflenzaviren (WEBSTER et al., 1992). Die, im Vergleich zu Rachentupfern (35,2), Organ- (35,5) und Kotproben (33,4) sehr viel niedrigeren ct-Mittelwerte von 16,9 sprechen für eine höhere Genomlast LPAIV in Kloakal-Tupferproben. Ähnliche Beobachtungen machten ELLSTRÖM et al. (2008), was die hohe Nachweiseffizienz LPAIV aus Kloakal-Tupferproben und auch die Eignung von Kloakentupfern als Ausgangsmaterial für epidemiologische Untersuchungen unterstreicht.

Das in der vorliegenden Arbeit lediglich einmal nachgewiesene hochvirulente Influenza-A-Virus vom Subtyp H5N1/Typ Asia konnte interessanterweise nur in der Kloakal- und nicht in der Tracheal-Tupferprobe detektiert werden. Im Gegensatz hierzu wurde bei

experimentell mit hochvirulentem H5N1 infizierten Enten nur eine geringe Virusvermehrung im Intestinaltrakt und der Kloake festgestellt, jedoch eine hohe Virusreplikation in der Trachea, die mit hohen Virustitern in Trachealtupfern verbunden war (STURM-RAMIREZ et al., 2005; BROWN et al., 2006).

Die niedrigste Influenza-A-Nachweisrate ergab sich für die Kotproben. Dies lässt sich zum einen auf die Empfindlichkeit AIV gegenüber Umwelteinflüssen (z. B. Virusinaktivierung durch UV-Strahlung) zurückführen. Zum anderen wurden die Kotproben größtenteils in Pools von bis zu fünf Proben zusammengefasst, was durch einen Verdünnungseffekt zu Einbußen in der Sensitivität führen kann. Zudem enthält Kot auch viele Bestandteile, die in der PCR inhibitorisch wirken können. In der RT-rPCR wurden zudem generell sehr hohe ct-Mittelwerte festgestellt, die auf eine insgesamt niedrige AIV-Genom-Kopienanzahl des Ausgangsmaterials schließen lassen. Eine Beeinträchtigung des Ausgangsmaterials durch ungünstige Umweltbedingungen oder nicht vollständige Eliminierung von PCR-Inhibitoren führt daher bei Kotproben wahrscheinlich häufig zu einem (falsch) negativen Ergebnis. Des Weiteren besteht die Gefahr durch eine Konzentrierung des Wildvogelmonitorings auf Kotproben, bestimmte Subtypen wie z. B. HPAIV H5N1, die bevorzugt im Respirationstrakt replizieren, zu übersehen (PANNWITZ et al., 2009). Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung zeigen daher, dass für Monitoringstudien bezüglich LPAIV die Verwendung von Kloakentupfern zu empfehlen ist. Bei Verdacht auf HPAIV mit bevorzugter Ausscheidung über den Respirationstrakt sollten zusätzlich Rachentupfer mit einbezogen werden.

2. Vorkommen Aviärer Influenzaviren (AIV) bei Wildvögeln

2.1. Speziesspezifische Prävalenzen

In der vorliegenden Untersuchung wurden 78 Vogelarten aus 14 Ordnungen beprobt. Die einzelnen Arten waren dabei im Probenaufkommen nicht gleichstark vertreten, sondern es wurde Gewicht auf

Spezies gelegt, die zu den Risikoarten für AIV zählen und im Anhang II der Entscheidung der EU-Kommission 2007/268/EG gelistet sind (EC, 2007). Vögel der Ordnungen Anseriformes und Charadriiformes gelten allgemein als Hauptreservoir für aviäre Influenzaviren (WEBSTER et al., 1992; ALEXANDER 2000). Schwerpunktartig fand die Probenentnahme daher bei Wasservögeln aus der Ordnung Anseriformes statt, aus der 4.769 der untersuchten 6.114 Vögel stammten. Die Stockente war mit 3.474 Tieren mit Abstand die zahlenmäßig am häufigsten untersuchte Art. Aus der Ordnung Charadriiformes war hingegen nur eine Spezies, die Lachmöwe vertreten, von der 127 Proben einbezogen wurden. Als Gründe für die geringe Zahl von untersuchten Vögeln aus dieser Ordnung sind die schwierige Lebendbeprobung und fehlender Zugang zu bei der Jagd erlegten Vögeln zu nennen. Die Gruiformes war mit 678 Blässhühnern die am zweitstärksten vertretene Ordnung.

Wie die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigten, lag der Schwerpunkt des Vorkommens von Influenza-A-Viren auch in Bayern bei Vögeln der Ordnung Anseriformes (Enten, Gänse, Schwäne). So wurden nur bei fünf der insgesamt 78 einbezogenen Arten Infektionen mit aviären Influenzaviren festgestellt, die bis auf eine Ausnahme, den Blässhühnern, alle zur Ordnung Anseriformes und hier zu den Arten Stockente, Reiherente, Höckerschwan und Graugans zuzurechnen waren. Daraus kann gefolgert werden, dass bei Monitoringstudien zum Vorkommen von aviären Influenzaviren eine Fokussierung auf diese Arten sinnvoll ist. Abweichungen hiervon sind natürlich notwendig, wenn ein Focus auf Viren mit Besonderheiten im Wirtsspektrum gelegt werden soll, wie zum Beispiel die HPAI H5N1 asiatischer Herkunft, die sich durch ein ungewöhnlich breites Wirtsspektrum auszeichnen und auch Greifvögel und Eulen befallen (FLI, 2006).

Bei Stockenten, die zu den Gründelenten zählen, wurde mit 6,2 % die höchste Prävalenz an AIV-Genomen nachgewiesen. In der Vergangenheit wurden auch in anderen Ländern höchste Nachweisraten von LPAIV für Gründelenten und v. a. Stockenten gefunden (KRAUSS et al., 2004; GLOBIG et al., 2006; OLSEN et al., 2006; IP et al., 2008; PARMLEY et al., 2008). Die Rolle einer Vogelart hinsichtlich der AIV-Epidemiologie wird

durch individuelle und speziesspezifische Unterschiede in der Empfänglichkeit, den Verhaltensweisen, der saisonalen und regionalen Verbreitung, dem Zugverhalten und der Altersstruktur der Population beeinflusst (STALLKNECHT & BROWN, 2007). Die saisonalen und regionalen Aspekte werden weiter unten näher erläutert. An bayerischen Gewässern ist die Stockente mit einer Populationsgröße von ca. 65.000 Tieren (geschätzter bayernweiter Maximalbestand, basierend auf den mittleren Wintersummen der Wasservogelzählungen von 2000 bis 2005) (KLUTH, persönliche Mitteilung) die häufigste Wasservogelart. Da Stockenten außerhalb der Brutsaison sehr gesellig sind und in großen Ansammlungen auftreten, ermöglichen sie den Viren optimale Replikations- und Transmissionsbedingungen. Bei Reiherenten, die zu den Tauchenten gehören, konnten ebenfalls Influenza-A-positive Tiere gefunden werden. Die Prävalenz betrug hier 5,0 %. Allerdings stand nur eine geringe Probenanzahl zur Verfügung, so dass die Prävalenzschätzung relativ ungenau ist (95 %-KI: 0,61-16,92).

Die hier dargestellten Ergebnisse unterstreichen die bedeutende Rolle der Stockente im Influenzageschehen in der Wildvogelpopulation. So wurden hier die höchsten AIV-Prävalenzen festgestellt, damit eignet sich diese Vogelart als AIV-Indikator im Wildvogelmonitoring. Zudem ist ein Lebendbeprobieren bei dieser Art wegen des ausgeprägten Kontaktes zum Menschen (z. B. futterzahme Enten in Stadtparks), am einfachsten realisierbar, während sich bei den meisten anderen Vogelarten der Fang mittels Kanonennetz und per Hand als sehr schwierig herausstellte.

2.2. Saisonale Prävalenzen

Das - bei ganzjährig stattfindender Beprobung zeitlich gehäufte Auftreten von AIV in den Herbst- und Wintermonaten bestätigte Ergebnisse früherer Studien in Europa (FOUCHIER et al., 2003; GLOBIG et al., 2006; OLSEN et al., 2006; MUNSTER et al., 2007; WALLENSTEN et al., 2007). Zum einen lässt sich diese Beobachtung auf die längere Infektiosität der Viren in kälteren Gewässern (STALLKNECHT et al., 1990; BROWN et al., 2009) und in Gewässersedimenten (LANG et al., 2008) zurückführen. Zum

anderen gibt es auch einen Zusammenhang mit dem Beginn des Vogelzuges, wobei das Zusammentreffen großer Vogelzahlen, teilweise immunologisch naiver Jungtiere und unterschiedlicher Vogelarten an Rast- und Überwinterungsplätzen bedeutsam ist (GARAMSZEGI & MOLLER, 2007).

Die hohen AIV-Prävalenzen bei Stockenten gründen u. a. auf der hohen Turnover-Rate der Populationen dieser Art in Europa. So wurde nachgewiesen, dass die Mortalität bei Stockenten im ersten Lebensjahr 56 % und bei adulten Tieren immer noch 40 % pro Jahr beträgt. Das bedeutet, dass die aktuellen Stockentenpopulationen in Europa jeweils zu einem Drittel aus empfänglichen, juvenilen Tieren bestehen, die insbesondere im Herbst hochempfänglich für Infektionen mit AIV sind (MUNSTER et al., 2007).

Lediglich spekuliert werden kann über die Bedeutung von Stockenten aus kommerziellen Zuchten für das Influenzageschehen bei Wildvögeln. In Europa (v. a. in Frankreich und Irland) werden immer wieder Stockenten aus kommerziellen Zuchten als Lockenten (decoy ducks) für die Jagd oder zur Aufstockung des jagdbaren Bestandes genutzt (DEFRA, 2009b; RALEIGH et al., 2009). Erst kürzlich, im März 2009, wurden LPAIV H5N1 in einem Bestand mit Lockenten in Frankreich nachgewiesen (DEFRA, 2009b). Folglich könnten auch auf diesem Wege AIV in die Wildvogelpopulation, und hier insbesondere in die Populationen der bejagten Vögel eingetragen werden. Ein Großteil der hier untersuchten Stockenten stammte aus der Jagd. Daten zur Bedeutung des Einsatzes von Lockenten in Bayern liegen allerdings nicht vor.

2.3. Regionale Prävalenzen

In allen sieben Regierungsbezirken Bayerns wurden Influenza-A-positive Vögel diagnostiziert, die Nachweisrate wies jedoch signifikante regionale Unterschiede auf. Sie war mit 9,6 % in Schwaben am höchsten, während in Mittelfranken nur 0,5 % Influenza-A-positive Wildvögel gefunden werden konnten (Tab. IV. 2 und IX. 3). Die Ergebnisse stützen die These, dass die

AIV-Prävalenz, neben der Wirtspezies und dem Beprobungszeitraum auch vom Beprobungsort abhängt. So konnten z. B. PARMLEY et al. (2008) bei einer Beprobung von Wildvögeln in Kanada (2005) ebenfalls regionale Unterschiede feststellen. Erklärungsansätze für diese statistisch signifikanten Unterschiede in der Nachweisrate AIV in der vorliegenden Untersuchung finden sich in der Tatsache, dass die Region des Schwäbischen Donautals einschließlich der Neben- und Zuflüsse der Donau (z. B. Wörnitz), also die Region mit der höchsten AIV-Prävalenz bei Stockenten, reich an Oberflächengewässern ist und im zentralen Bereich der mitteleuropäischen Südwestroute des Vogelzuges liegt (LIFE-NATUR, 2009). Demnach wird dieses Gebiet, vor allem zur Zeit des Vogelzuges, als Nahrungs-, Rast- und Überwinterungshabitat von zahlreichen Zugvögeln genutzt (Abb. V. 1). Eine hohe Vogeldichte begünstigt dann die intra- oder interspezifische Übertragung von AIV und somit das Auftreten hoher Replikations- und Transmissionsraten (WEBSTER et al., 1992; GARAMSZEGI & MOLLER, 2007; GLOBIG et al., 2009). Darüber hinaus stellt die monatelange Persistenz LPAIV insbesondere in Wasser einen wichtigen indirekten Übertragungsmodus dar, wie ROHANI et al. (2009) anhand statistischer Modelle und u. a. LANG et al. (2008), an Untersuchungen von Gewässersedimenten bewiesen.

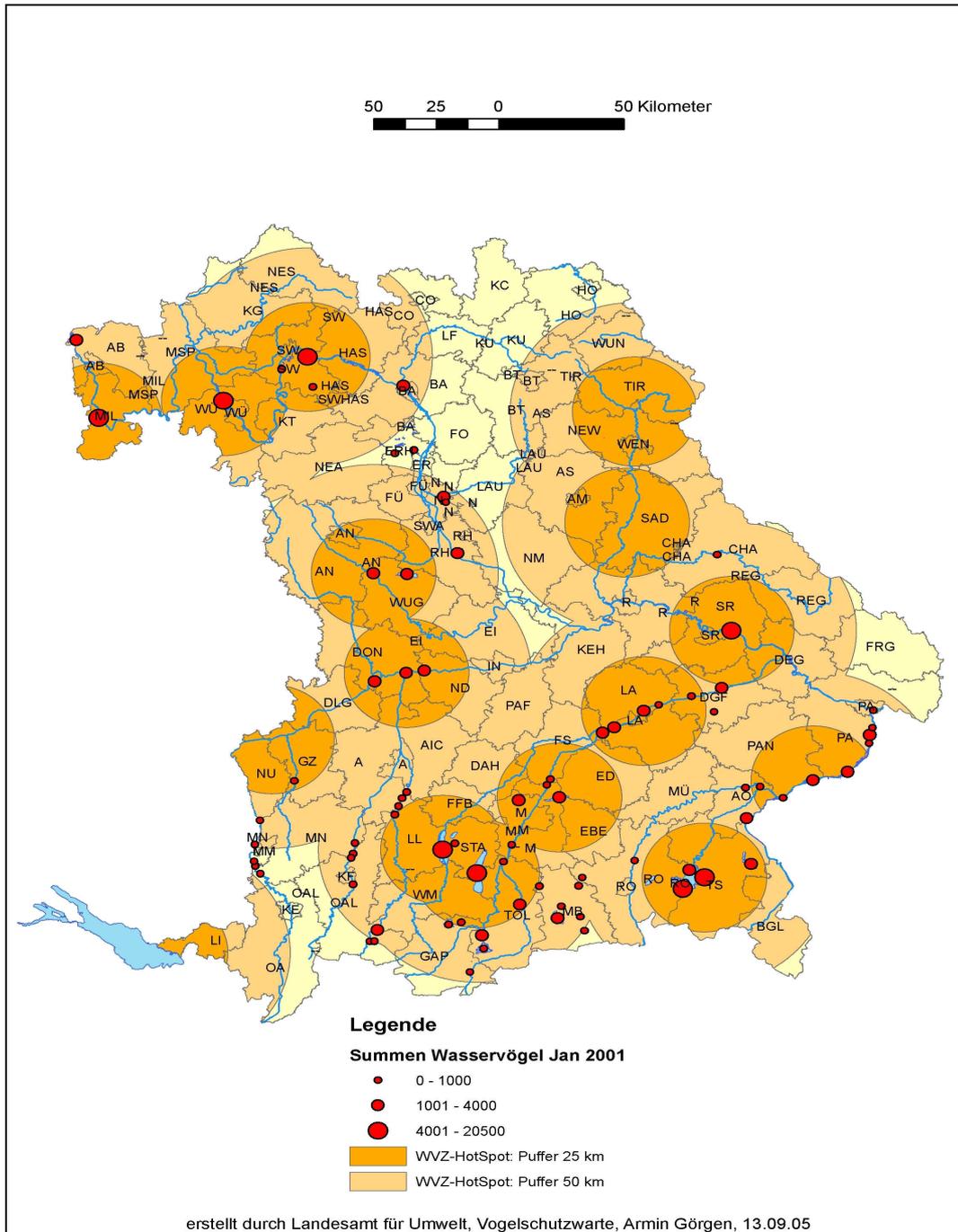


Abbildung V. 1: Geographische Verteilung der Standorte mit dem größten Wasservogelaufkommen in Bayern (Quelle: LfU Bayern, 2005).

3. Vorkommen definierter Subtypkomponenten bei Wildvögeln

3.1. Vorkommen der Hämagglutininkomponenten H1 bis H13

Eine zentrale Fragestellung des AIV-Monitorings in Bayern war, ob es ein Reservoir für die HPAIV asiatischer Herkunft bei gesunden Wildvögeln gibt. In den Jahren 2006 und 2007 wurde H5N1 in Bayern nur bei verendet aufgefundenen Wildvögeln nachgewiesen, zuletzt 2007 bei 19 Tieren aus zwei getrennten Regionen, in Nürnberg und München (RINDER et al., 2007; LANG et al., zur Publikation eingereicht). Bei gesunden Vögeln wurden bis Dezember 2008 nur solitäre H5- und N1-Subtypkomponenten detektiert, die dazugehörigen H5-Viren wurden stets als LPAIV charakterisiert. Überraschenderweise wurde dann im Rahmen des bayerischen Monitoring-Programmes im Januar 2009 bei einer bei einer Jagd erlegten Stockente aus dem LKR Starnberg hochvirulentes H5N1/Typ Asia festgestellt. Der Nachweis erfolgte dabei beim Nationalen Referenzlabor für Aviäre Influenza (FLI). Es ist davon auszugehen, dass es sich bei dem betroffenen Vogel um eine klinisch gesunde Wildente handelte, da sie im Flug erlegt wurde und auch keine Besonderheiten im Beprobungsprotokoll vermerkt wurden. Alle anderen bei derselben Jagd erlegten und beprobten Stockenten und Kanadagänse waren Influenza-A-negativ. Unter der Annahme, dass es sich bei diesem H5N1-Nachweis nicht um eine Laborkontamination handelt, kann nur spekuliert werden, dass sich die restlichen Tiere der Gruppe entweder nicht infiziert haben, oder dass die Virusausscheidung, die sehr kurz sein kann und unter Umständen nur 3,1 Tage dauert (LATORRE-MARGALEF et al., 2009) bereits vorüber war. In der Vergangenheit gab es bereits Berichte über mehrere Wildenten, die ohne klinische Symptomatik zu zeigen, natürlich mit hochvirulentem H5N1 infiziert waren, unter anderem ein Einzelnachweis bei einer Tafelente aus der Schweiz (CHEN et al., 2006; O.I.E., 2008). Infektionsversuche mit hochvirulentem H5N1 von KEAWCHAROEN et al. (2008) stützen die Hypothese, dass subklinische Infektionen mit H5N1 bei Stockenten vorkommen können: Hier entwickelten Tauchenten am ehesten klinische Symptome bzw. starben.

Dagegen zeigten infizierte Stockenten keine klinischen Symptome bzw. pathologische Befunde, aber signifikante Virusexkretion über den gesamten Untersuchungszeitraum. Die Stockente könnte daher als subklinisch infizierter Carrier und somit als sogenannter Langzeitvektor in Frage kommen, über den H5N1 AIV über weite Distanzen verbreitet wird (KEAWCHAROEN et al., 2008). Ob aus dem Einzelnachweis von HPAIV H5N1 bei der Stockente in Bayern die Existenz eines H5N1-Wildvogelreservoirs gefolgert werden kann, ist allerdings fraglich. Epidemiologische Bedeutung, also nachweisbare Folgen für das HPAIV-H5N1-Vorkommen in der Wildvogelpopulation oder beim Wirtschaftsgeflügel, kann diesem Nachweis auf jeden Fall nicht zugesprochen werden.

Die H5-Subtypkomponente wurde 52-mal ohne N1-Komponente detektiert. Interessanterweise ergab sich dabei eine räumliche Häufung der Nachweise in Schwaben, wo 41,3 % der H5-positiven Vögel lokalisiert waren. In den restlichen Regierungsbezirken waren die Nachweisraten wesentlich geringer oder die H5-Komponente konnte gar nicht nachgewiesen werden (Tab. IV. 2 und IX. 2). In Schwaben konnte die höchste Zahl an H5-Subtypkomponenten und insbesondere von H5N3-Subtypen (28,1 %) im schwäbischen Landkreis Donau-Ries festgestellt werden (Tab. IV. 3). Die untersuchten Proben stammten aus zwei, örtlich begrenzten Jagden im September 2008 im Jagdrevier Oettingen-Spielberg. Ein ähnliches Phänomen einer starken räumlichen Fokussierung der Nachweise einer bestimmten HA-Subtypkomponente ergab sich für H11. Dabei waren überwiegend erlegte Wasservögel im Landkreis Pfaffenhofen an der Ilm, H11-positiv (Abb. IV. 4). Vergleichbar konnten auch KRAUSS et al. (2007) im Jahr 2006 bei Möwen- und Watvögeln in Delaware Bay (USA) gehäuft den Subtyp H7N3 isolieren. Diese Ergebnisse könnten mit dem Vorliegen eines aktuellen, regional oder zeitlich begrenzten Infektionsgeschehens erklärbar sein. Es könnte sich also um lokal vorherrschende Subtypen handeln, die bei den jeweils heimischen standorttreuen Wasservögeln weit verbreitet sind. Diese Ergebnisse könnten aber auch einen zeitlich begrenzten Focus als Folge von Einschleppungen von Viren aus anderen Regionen widerspiegeln, bei der die Enten der lokalen Population eine Infektion durchlitten, wie für 2006

und die HPAI H5N1-Subtypen in Bayern nachgewiesen wurde (RINDER et al., 2007). Um dies abzuklären, wären wiederholte Untersuchungen im selben Gebiet notwendig.

Bei der Analyse von Infektketten ist neben der Möglichkeit des AIV-Eintrages durch migrierende Wasservögel in Wirtschaftsgeflügel hinein auch der umgekehrte Weg zu bedenken, also eine Übertragung von Influenzaviren von Nutzgeflügel auf Wildvögel. SEDLMAIER et al. (2009) bewiesen, dass aviäre Influenzaviren in Feinstäuben, die aus infizierten Stallungen emittiert werden, bei entsprechender Witterung über mehrere Tage infektiös bleiben und somit eine Infektionsgefahr für die im Umkreis heimischen Wildvögel darstellen. Dass es auch bei H5N1-Ausbrüchen zu einer Umweltkontamination kommt, wiesen VONG et al. (2008) bei einem H5N1-Ausbruch bei Nutzgeflügel in Kambodscha nach. Hier wurde innerhalb eines 1 km-Radius um den betroffenen Bestand virale RNA in 35 % der Umweltproben (Schlamm, Teichwasser, Wasserpflanzen, Erdreich) detektiert. Eine Isolation vermehrungsfähiger Viren gelang aus den Proben allerdings nicht (VONG et al., 2008). Ob im Landkreis Donau-Ries bzw. Pfaffenhofen an der Ilm ein lokales H5- bzw. H11-Reservoir existiert oder ob es sich um Einschleppungen von Viren aus anderen Regionen bzw. aus Nutzgeflügelbeständen handelt, kann aber anhand der vorliegenden Daten nicht abschließend geklärt werden.

Die H7-Subtypkomponente besitzt wie H5 große tiermedizinische Bedeutung, da Influenzaviren mit H7 in der hochvirulenten Form als Erreger der Geflügelpest gelten, aber auch als LPAI-Viren bei Vorkommen in Geflügelbeständen Bekämpfungsmaßnahmen nach sich ziehen (EC, 2006). H7 konnte im Studienzeitraum bei Wildvögeln nicht nachgewiesen werden. Daraus kann allerdings nicht gefolgert werden, dass diese Subtypkomponente in Bayern grundsätzlich keine Rolle spielt. Es kann vielmehr spekuliert werden, dass H7 in den nächsten Jahren wieder an Bedeutung gewinnen wird. Dass das Auftreten AIV-Subtypen von Jahr zu Jahr variieren kann, wurde in der Literatur schon mehrfach beschrieben (KRAUSS et al., 2004; OLSEN et al., 2006). Beispielsweise konnten SÜSS et al. (1994) in der damaligen DDR zwischen 1977 bis 1989 bei Wildenten zwar die Subtypkomponente H7, aber nicht H5 detektieren.

Zukünftige Monitoringstudien in Bayern sollten daher auch das Vorkommen von H7 nicht außer Acht lassen.

Neben H5 konnten außer H7, H8 und H12 alle anderen HA-Subtypkomponenten von H1 bis H13 bei Stockenten nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse bestätigen Beobachtungen anderer Studien, die ebenfalls das breiteste Spektrum von HA-Subtypkomponenten bei Wildenten finden konnten (KRAUSS et al., 2004; MUNSTER et al., 2007; WALLENSTEN et al., 2007). Die in der vorliegenden Studie am häufigsten detektierten HA-Subtypkomponenten waren H5 (23,8 % der AIV-positiven Vögel), gefolgt von H11 (12,1 %) und H9 (5,8 %). In bedeutenden Langzeit-Wildvogelmonitoringstudien in Deutschland, Nordamerika und Schweden wurden die Subtypkomponenten H1, H2, H3, H4, H6 und H7 am häufigsten nachgewiesen (SÜSS et al., 1994; KRAUSS et al., 2004; WALLENSTEN et al., 2007). Bei einer aktuellen, in Deutschland von 2003 bis 2005 durchgeführten Wildvogelmonitoringstudie wurden die Subtypkomponenten H2, H3, H4 und H10, am häufigsten detektiert (GLOBIG, 2007). Die Unterschiede in den Ergebnissen sind nicht überraschend und sind Anzeichen für jahreszyklische Muster, wie sie in der Vergangenheit häufig bei der Isolierung AIV festgestellt werden konnten (KRAUSS et al., 2004). So wurden in einem Zeitraum von ein bzw. zwei Jahren sehr hohe Prävalenzen einzelner Subtypen nachgewiesen, gefolgt von Perioden mit reduziertem bzw. fehlendem Nachweis. Gelegentlich wird allerdings auch das Vorkommen bestimmter Subtypen über Jahre hinweg in bestimmten Gebieten festgestellt. Es ist jedoch immer noch unklar, ob diese Beobachtung auf ihre lokale Persistenz zurückzuführen ist oder ob jedes Jahr neue Einträge stattfinden (CHEN & HOLMES, 2009).

In der vorliegenden Untersuchung unerwartet war der Nachweis eines aviären Influenzavirus mit H13-Subtypkomponente aus der Kotprobe eines Blässhuhns, die im Gegensatz zur aktuellen Literatur steht. Bisher wurde H13, neben H16, überwiegend bei Möwen- und Watvögeln, gelegentlich bei Stockenten (MUNSTER et al., 2007) und noch nie bei Vögeln der Ordnung Gruiformes beschrieben (KAWAOKA et al., 1988; FOUCHIER et al., 2005; KRAUSS et al., 2007). Es erscheint daher am wahrscheinlichsten, dass sich das mit H13 infizierte Blässhuhn durch Kontakte

mit Möwen oder Stockenten, z. B. an gemeinsamen Rast- und Futterplätzen, angesteckt haben könnte.

Darüber hinaus stellt sich die Frage, um welche HA-Subtypkomponenten es sich bei den in der Multiplex RT-rPCR untypisierten Proben (n=54) handelt. Hier kann natürlich nur spekuliert werden. Dass es sich hierbei um H14 bis H16 handelt, kann als ziemlich unwahrscheinlich angesehen werden, da H14 bisher nur in Russland, H15 nur in Australien und H16 überwiegend bei Charadriiformes detektiert wurden (KAWAOKA et al., 1988; KAWAOKA et al., 1990; ROHM et al., 1996; LVOV et al., 2001; FOUCHIER et al., 2005). Es ist daher mit höherer Wahrscheinlichkeit davon auszugehen, dass es sich um die HA-Subtypkomponenten H1 bis H13 handelt, die mit den angewendeten PCR-Assays nicht nachgewiesen wurden. Zum einen handelt es sich vielleicht um Subtypkomponenten, deren Sequenzen sich aufgrund von Mutationen verändert haben und somit anhand der vorhandenen Primer oder Sonden nicht detektiert werden konnten. Zum anderen ist es aber wahrscheinlicher, dass die Ausgangsmenge viraler RNA-Kopien im Untersuchungsmaterial unter der Nachweisgrenze lag.

In der vorliegenden Untersuchung wurden lediglich bei drei Vögeln Koinfektionen mit Viren unterschiedlicher HA-Subtypkomponenten nachgewiesen (3,9 %, n= 77 AIV-positive Vögel). Die geringe absolute Zahl lässt sich mit der Tatsache erklären, dass nicht alle Proben in der HA-Multiplex untersucht worden sind. Hier wurde nur H5-negatives Ausgangsmaterial einbezogen, das einen ct-Wert in der pan AIV RT-rPCR kleiner oder gleich 35 besaß (n=131). Dies liegt daran, dass die festgelegten Schwerpunkte der Studie nicht primär auf die Detektion von Mischinfektionen abzielten. Diese wurden eher als Nebenbefund festgestellt.

SHARP et al. (1997) konzentrierten sich in ihrer Studie in erster Linie auf die Häufigkeit von Koinfektionen bei nordamerikanischen Wildenten und konnten bei 2.937 Virusisolaten 54 Mischinfektionen (1,8 %) nachweisen. Im Vergleich hierzu wiesen WANG et al. (2008), bei 16 % der untersuchten RT-PCR-positiven Vögel und DUGAN et al. (2008) sogar bei 26 % der Virusisolate Koinfektionen nach. Der höhere Anteil an Misch-

infektionen könnte unter Umständen durch einen höheren Anteil immunologisch naiver Tiere am Probenaufkommen bedingt sein, da für sie die Wahrscheinlichkeit für Einfach- und auch für Mischinfektionen erwiesenermaßen höher ist (SHARP et al., 1997). Die Doppel- und Mischinfektionen sind deshalb so bedeutend, da sie die Voraussetzung für ein genetisches Reassortment darstellen, in deren Folge „neue“, also stark veränderte Viren entstehen können (KRAUSS et al., 2007; DUGAN et al., 2008; KOEHLER et al., 2008). Genetische Reassortments werden durch hohe Wasservogeldichten an vielen Teichen und Seen, die die Übertragungsrate von AIV und damit die Infektionsrate erhöhen, begünstigt. Die in der vorliegenden Studie nachgewiesenen Doppelinfektionen mit H3/H9, H6/H13 und H9/H10 stehen im Gegensatz zu den in der Literatur am häufigsten beschriebenen Subtypkombinationen (H3N8, H6N2 und H4N6) (SHARP et al., 1997).

3.2. Vorkommen der Neuraminidasekomponenten N1 bis N3

In der vorliegenden Studie wurden nur N1-, N2- und N3-Subtypkomponenten in die Analyse einbezogen. Die N1-Subtypkomponente trat am häufigsten in Kombination mit H1 und in drei unterschiedlichen Landkreisen auf. Der Subtyp H1N1 kam auch in der Vergangenheit relativ häufig vor. So konnten KRAUSS et al. (2004), WALLENSTEN et al. (2007) und MUNSTER et al. (2007) H1N1 mit Prävalenzen zwischen 2,1 bis 6,0 % nachweisen. Möglicherweise handelt es sich, wie bei den gehäuft aufgetretenen HA-Subtypkomponenten, um aktuelle, zeitlich und regional begrenzte Infektionsherde.

Die N2- und N3-Subtypkomponenten wurden am häufigsten in Kombination mit H5 und immer bei LPAIV nachgewiesen. Diese Viren sind hinsichtlich der Beurteilung eines Risikos für Wirtschaftsgeflügel bedeutungsvoll, da nach allgemeiner Auffassung LPAI H5- und H7-Viren nach Einschleppung in Wirtschaftsgeflügelbestände zu hochvirulenten Subtypen mutieren können, die hohe wirtschaftliche Schäden verursachen. In der Literatur wurden bereits einige Fälle beschrieben, bei denen dieser Mechanismus für H5N2-Virusisolate angenommen wurde.

Beispielsweise wurde 1983 in Pennsylvania ein zunächst niedrigvirulentes H5N2-Isolat hochvirulent und verursachte sodann hohe Mortalitätsraten in Nutzgeflügelbeständen. Die Virusisolate waren u. a. eng mit Viren von Wildenten aus Nordamerika verwandt. Eine experimentelle Infektion mit dem hoch- und mit dem niedrigvirulenten Virusisolat verursachte jedoch keine klinischen Symptome bei Enten (BEAN et al., 1985).

4. Schlussbetrachtung und Ausblick

Wie die Diskussion der angewandten Methoden gezeigt hat, fand in den letzten Jahren eine enorme Entwicklung und Verbesserung des Methodenspektrums statt. Heutzutage durchgeführte AI-Monitoringstudien haben den großen Vorteil, dass sie auf der Grundlage molekularer Tests mit höherer Sensitivität und Spezifität durchgeführt werden können. Die hier angewendete Multiplex RT-rPCR für die Subtypen H1 bis H13 könnte auch in der Routinediagnostik Eingang finden, da sie, direkt aus Probenmaterial, einen effizienten Überblick über die wichtigsten HA-Subtypkomponenten und eventuell vorhandene Mischinfektionen bieten kann. Die Methode stellt eine interessante Alternative zur Anwendung des HAH oder einer HA-PCR mit nachfolgender Sequenzierung und BLAST-Analyse dar. Ein Problem aller molekularen Tests besteht lediglich in der hohen Mutationsneigung AIV, die eine ständige Anpassung der Primer- und Sondensequenzen erfordern kann.

Im Hinblick auf die epidemiologischen Eigenschaften AIV konnten deutliche Verteilungsschwerpunkte der AIV-Infektionen auf einige wenige Wildvogelspezies beobachtet werden. Darüber hinaus bestand ein charakteristisches saisonales und regionales Muster der Prävalenzen von Influenzavirusinfektionen bei Wildvögeln. Die Bedeutung migrierender Vogelspezies hinsichtlich der Verbreitung AIV konnte verdeutlicht werden (siehe Punkt V.2.3). Im Zusammenhang mit der Häufung von H5N3-Subtypen im Landkreis Donau-Ries wäre es interessant, die Genome der gewonnenen Virusisolate (J182/32K, J182/41K) nach Möglichkeit komplett zu sequenzieren, um mit Hilfe einer BLAST-Analyse und weitergehender

phylogenetischer Untersuchungen Hinweise auf die Herkunft der Viren zu bekommen.

Mit Hilfe der neu erworbenen Daten zur Verbreitung AIV in Bayern ist es möglich, das Wildvogelmonitoring in Zukunft noch risikobasierter und zielgerichteter zu gestalten. Wie der Vergleich der AIV-Nachweisraten unterschiedlicher Probenmaterialien zeigte, gewährleiten die Kloakal-Tupferproben das effizienteste Screeninginstrument für Wildvögel. Allerdings sollten auch weiterhin Tracheal-Tupferproben entnommen werden, da die Virusausscheidung über den Respirationstrakt, v. a. für HPAIV H5N1, von enormer Bedeutung ist (STURM-RAMIREZ et al., 2004; BROWN et al., 2006). Weiterhin sollten zur Optimierung des Monitorings v. a. zu "Risikozeiten" (in den Herbstmonaten) und somit bei kühleren Wassertemperaturen (BROWN et al., 2009), überwiegend juvenile Individuen und, neben den relativ stationären Vogelarten, nach Möglichkeit auch migrierende Wasservogelspezies beprobt werden (WARD et al., 2009).

Im Zeitraum der vorliegenden Studie wurde vom FLI ein hochvirulenter Subtyp H5N1/Asia nachgewiesen. Darüber hinaus wurden insbesondere viele solitäre H5-Subtypkomponenten detektiert, von denen ein Risiko für Wirtschaftsgeflügelbestände ausgeht. Diese Erkenntnisse, aber auch die jüngsten H5N1-Ausbrüche unter Wildvögeln in Russland und der Mongolei (DEFRA, 2009a) und die erst kürzlich aufgetretenen Fälle LPAIV H7 in Nutzgeflügelbeständen in Italien (Regionen Piemont und Emilia Romagna) (ANON., 2009), unterstreichen die Notwendigkeit eines flächendeckenden Wildvogelmonitorings auch in Zukunft. Neben der Untersuchung von Wildvögeln als potentielle AIV-Infektionsquelle für Wirtschaftsgeflügel wäre es aber auch sinnvoll, andere mögliche AI-Übertragungswege, wie z. B. den illegalen Tierhandel und Tiertransporte sowie die bei der Geflügelhaltung anfallenden Abfallprodukte und Futtermittel noch besser zu kontrollieren und zu überwachen, da auch hieraus eine Verbreitung hochvirulenter Subtypen resultieren kann (VAN BORM et al., 2005; HARDER et al., 2009).

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Aviäre Inflenzaviren (AIV) und v. a. H5- und H7-Subtypkomponenten sind weltweit von Bedeutung, da sie in hochvirulenter Form enorme wirtschaftliche Schäden für die Nutzgeflügelhaltung verursachen können. Als primäres Reservoir für alle HA- und N-Subtypkomponenten gelten Wasservögel, und hier v. a. Anseriformes (Gänse- und Entenvögel) und Charadriiformes (Möwen- und Watvögel). Vorkommen und die Subtypverteilung aviärer Inflenzaviren bei Wildvögeln in Bayern sind aber noch weitgehend unbekannt.

Das Ziel der vorliegenden Studie war es daher, Daten über die aktuelle Verbreitung aviärer Influenza-A-Viren in der Wildvogelpopulation in Bayern zu erheben. Neben Informationen über die Existenz eines H5N1-Reservoirs, sollten Erkenntnisse über das speziesspezifische, regionale und saisonale Vorkommen von AIV bei Wildvögeln gewonnen werden.

Zwischen Juli 2007 und März 2009 wurden bayernweit 6.114 Wildvögel aus insgesamt 14 zoologischen Ordnungen beprobt. Dabei wurden Kloakal- und Tracheal-Tupferproben, Kotproben und Organe untersucht. Der AIV-Nachweis sowie die Differenzierung der HA- und N-Subtypkomponenten H1 bis H13 und N1 bis N3 erfolgten mittels molekularbiologischer Methoden direkt aus klinischem Material. Bei einzelnen Proben wurde zudem eine Virusisolierung mittels Anzucht im embryonierten Hühnerei durchgeführt.

Bei 3,6 % der 6.114 Wildvögel wurden mittels RT-Real-time PCR (RT-rPCR) Influenza-A-Virusgenome nachgewiesen, allerdings nur bei fünf der insgesamt 78 untersuchten Vogelarten. Die höchste AIV-Prävalenz wurde bei der am häufigsten beprobten Stockente (*Anas platyrhynchos*) (6,2 %) festgestellt, gefolgt von der Reiherente (*Aythya fuligula*) (5,0 %), dem Höckerschwan (*Cygnus olor*) (1,5 %), dem Blässhuhn (*Fulica atra*) (0,3 %) und der Graugans (*Anser anser*) (0,1 %). Influenza-A-Virusgenome wurden am häufigsten in Schwaben (9,6 %) detektiert. Diese Region liegt im zentralen Bereich der Südwest-Route des Vogelzuges und weist beliebte Rastplätze für Zugvögel auf. Eine charakteristische saisonal

erhöhte Nachweisrate wurde bei Wildvögeln jeweils im Herbst/Winter gefunden. Mit Ausnahme von H7, H8 und H12 wurden alle HA-Subtypkomponenten von H1 bis H13 und drei Doppelinfektionen (H3/H9, H6/H13, H9/H10) bei Stockenten nachgewiesen. Darüber hinaus wurden die HA-Typen H5 (23,8 % der AIV-positiven Vögel), H11 (12,1 %), H9 (5,8 %) bzw. die Subtypen H5N3 (12,6 %) und H1N1 (2,7 %) am häufigsten detektiert. Bei einer im Landkreis Starnberg erlegten Stockente wurde HPAIV H5N1/Typ Asia nachgewiesen. Solitäre H5- und N1-Subtypkomponenten wurden außerdem bei 0,9 % bzw. 0,3 % der untersuchten Vögel festgestellt. Viren mit der für Nutzgeflügel besonders relevanten Subtypkomponente H7 wurden im dargestellten Untersuchungszeitraum nicht nachgewiesen. Die Virusanzucht im bebrüteten Hühnerei war in zehn Fällen erfolgreich.

Zusammenfassend ergaben sich in diesen Untersuchungen keine Hinweise auf ein epidemiologisch bedeutendes HPAI H5N1-Reservoir bei Wildvögeln in Bayern. Die Ergebnisse belegen jedoch ein Vorkommen von AIV mit deutlichen speziesspezifischen, regionalen und saisonalen Verteilungsschwerpunkten. Stockenten erwiesen sich als bedeutendes AIV-Reservoir und eignen sich ganz besonders als Indikatoren zur Abschätzung des Vorkommens und der Subtypverteilung von AIV in einer bestimmten Region.

VII. SUMMARY

Wild bird monitoring in Bavaria: Occurrence and distribution of avian influenza viruses from 2007 to 2009

Avian influenza A viruses (AIV) and particularly subtype components H5 and H7 are important worldwide, because they can cause tremendous economical losses for poultry farming especially when occurring as high pathogenic AIV (HPAIV). Waterfowl species, especially of the orders Anseriformes (geese and ducks) and Charadriiformes (gulls and shorebirds), are the primary reservoir for all AIV subtypes. However the occurrence and distribution of avian influenza virus subtypes in wild birds in Bavaria is still unknown.

The aim of the present study was to collect data on the current distribution of AIV within the wild bird population in Bavaria. Information on the existence of a H5N1-reservoir and additional data on the species-specific, regional and seasonal distribution of AIV should be obtained.

Between July 2007 and March 2009 cloacal and tracheal swabs, droppings and organs from 6114 wild birds of 14 different zoological orders were collected and analysed. We used molecular biological methods to detect AIV and to differentiate the hemagglutinin and neuraminidase types H1 to H13 and N1 to N3 directly from field specimens. In some samples we tried to isolate virus by inoculation in embryonated chicken eggs.

AIV genomes were detected in 3.6 % of 6114 wild birds examined by RT-real-time PCR (RT-rPCR), but only in five of the 78 sampled bird species. Mallards (*Anas platyrhynchos*) were the most frequently sampled bird species and had the highest AIV infection rate of 6.2 %, followed by Tufted ducks (*Aythya fuligula*) (AIV prevalence of 5.0 %), Mute Swans (*Cygnus olor*) (1.5 %), Coots (*Fulica atra*) (0.3 %) and Greylag Goose (*Anser anser*) (0.1 %). Most of the positive AIV genome results originated from samples in the district Swabia (9.6 %), which is situated in the central area of the south-west bird migration route across southern Germany and harbours

favourable resting areas for migrating birds. The detection rate of AIV in Bavarian wild birds showed a seasonal peak in autumn/winter. With the exception of H7, H8 and H12 all hemagglutinin types from H1 to H13 and three coinfections (H3/H9, H6/H13, H9/H10) had been detected in mallards. Furthermore the HA-types H5 (23.8 % of AIV positive birds), H11 (12.1 %) and H9 (5.8 %) and the subtypes H5N3 (12.6 %) and H1N1 (2.7 %) were most frequently detected. One hunted down mallard of the administrative district Starnberg was found to be infected with HPAIV H5N1/type Asia. Additionally solitary H5 and N1 subtype components were detected in 0.9 and 0.3 %, respectively, of the sampled birds. The hemagglutinin subtype component H7, which is also very important for poultry, could not be detected. The virus isolation in embryonated chicken eggs was successful in ten cases.

Summarizing the study results shown above, no indications for a considerable HPAI H5N1 reservoir in wild birds in Bavaria were given. However the results revealed the occurrence of AIV with obvious species-specific, regional and seasonal emphases. Mallards represent an important AIV-reservoir and are suitable indicators to estimate the AIV occurrence and subtype distribution in a particular region.

VIII. LITERATURVERZEICHNIS

- Aguero M, Sanchez A, San Miguel E, Gomez-Tejedor C, Jimenez-Clavero MA. A real-time TaqMan RT-PCR method for neuraminidase type 1 (N1) gene detection of H5N1 Eurasian strains of avian influenza virus. *Avian Dis* 2007a; 51: 378-81.
- Aguero M, San Miguel E, Sanchez A, Gomez-Tejedor C, Jimenez-Clavero MA. A fully automated procedure for the high-throughput detection of avian influenza virus by real-time reverse transcription-polymerase chain reaction. *Avian Dis* 2007b; 51: 235-41.
- Alexander DJ. A review of avian influenza in different bird species. *Vet Microbiol* 2000; 74: 3-13.
- Alexander DJ. An overview of the epidemiology of avian influenza. *Vaccine* 2007; 25: 5637-44.
- Alexander DJ. Avian influenza - diagnosis. *Zoonoses Public Health* 2008; 55: 16-23.
- Alvarez AC, Brunck ME, Boyd V, Lai R, Virtue E, Chen W, Bletchly C, Heine HG, Barnard R. A broad spectrum, one-step reverse-transcription PCR amplification of the neuraminidase gene from multiple subtypes of influenza A virus. *Virology* 2008; 5: 77.
- Anon. Italien: Neue Fälle von niedrig pathogener Aviärer Influenza aufgetreten. DGS Das Magazin für die Geflügelwirtschaft und Schweineproduktion 2009: <http://www.dgs-magazin.de/QUIEPTEnNjM3ODYmTUIEPTQ2MTkmVEIYPTA.html>.
- Atmar R, Baxter B, Dominguez E, Taber L. Comparison of reverse transcription-PCR with tissue culture and other rapid diagnostic assays for detection of type A influenza virus. *J. Clin. Microbiol.* 1996; 34: 2604-6.
- Auewarakul P, Sangsiriwut K, Chaichoune K, Thitithanyanont A, Wiriyarat W, Songserm T, Ponak-nguen R, Prasertsopon J, Pooruk P, Sawanpanyalert P, Ratanakorn P, Puthavathana P. Surveillance for reassortant virus by multiplex reverse transcription-PCR specific for eight genomic segments of avian influenza A H5N1 viruses. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 1637-9.
- Banks J, Speidel EC, Harris PA, Alexander DJ. Phylogenetic analysis of influenza A viruses of H9 haemagglutinin subtype. *Avian Pathol* 2000; 29: 353-9.

- Bean WJ, Kawaoka Y, Wood JM, Pearson JE, Webster RG. Characterization of virulent and avirulent A/chicken/Pennsylvania/83 influenza A viruses: potential role of defective interfering RNAs in nature. *J Virol* 1985; 54: 151-60.
- Becker WB. The isolation and classification of tern virus: Influenza virus A/Tern/South Africa/1961. *J Hyg Cambridge* 1966; 64: 309-20.
- Becker WB. Experimental infection of common terns with tern virus: Influenza Virus A/Tern/South Africa/1961. *J Hyg Cambridge* 1967; 65: 61-5.
- Brown JD, Stallknecht DE, Beck JR, Suarez DL, Swayne DE. Susceptibility of north american ducks and gulls to H5N1 highly pathogenic avian influenza viruses. *Emerg Infect Dis* 2006; 12: 1663-70.
- Brown JD, Goekjian G, Poulson R, Valeika S, Stallknecht DE. Avian influenza virus in water: Infectivity is dependent on pH, salinity and temperature. *Vet Microbiol* 2009; 136: 20-6.
- Brown JD, Stallknecht DE, Berghaus RD, Luttrell MP, Velek K, Kistler W, Costa T, Yabsley MJ, Swayne D. Evaluation of a commercial blocking ELISA as a serologic assay for detecting avian influenza virus infection in multiple experimentally infected avian species. *Clin. Vaccine Immunol.* 2009: CVI.00084-09.
- Bub H (1995) *Vogelfang und Vogelberingung*. Westarp Wissenschaften-verlagsgesellschaft.
- Büttner M, Neubauer-Juric A. Problematik der Serologie aviärer Influenza. 3. Riemser Diagnostiktage des Friedrich-Loeffler-Instituts in Greifswald, 22./23. November 2007: http://www.dvg.net/fileadmin/Bilder/PDF_AVID_Alt/3._Riemser_Diagnostiktage_2007/Buettner_AIV.pdf.
- Cattoli G, Terregino C. New perspectives in avian influenza diagnosis. *Zoonoses Public Health* 2008; 55: 24-8.
- Chang HK, Park JH, Song MS, Oh TK, Kim SY, Kim CJ, Kim H, Sung MH, Han HS, Hahn YS, Choi YK. Development of multiplex rt-PCR assays for rapid detection and subtyping of influenza type A viruses from clinical specimens. *J Microbiol Biotechnol* 2008; 18: 1164-9.

- 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 HT, Zhang J, Sun DH, Zhang JL, Cai XP, Liu XT, Ding YZ, Ma LN, Yang SH, Jin L, Liu Y. Rapid discrimination of H5 and H9 subtypes of avian influenza viruses and Newcastle disease virus by multiplex RT-PCR. *Vet Res Commun* 2008; 32: 491-8.
- Chen R, Holmes EC. Frequent inter-species transmission and geographic subdivision in avian influenza viruses from wild birds. *Virology* 2009; 383: 156-61.
- Choi YK, Goyal SM, Kang SW, Farnham MW, Joo HS. Detection and subtyping of swine influenza H1N1, H1N2 and H3N2 viruses in clinical samples using two multiplex RT-PCR assays. *J Virol Methods* 2002; 102: 53-9.
- De Marco MA, Campitelli L, Foni E, Raffini E, Barigazzi G, Delogu M, Guberti V, Di Trani L, Tollis M, Donatelli I. Influenza surveillance in birds in Italian wetlands (1992-1998): is there a host restricted circulation of influenza viruses in sympatric ducks and coots? *Vet Microbiol* 2004; 98: 197-208.
- Defra. HPAI H5N1 in wild birds in Russia. 2009a: <http://www.defra.gov.uk/foodfarm/farmanimal/diseases/monitoring/documents/h5n1-russia-090626.pdf>.
- Defra. Low pathogenic avian influenza H5N1 in France. 2009b: <http://www.defra.gov.uk/foodfarm/farmanimal/diseases/monitoring/documents/hpa-france.pdf>.
- Donatelli I, Campitelli L, Di Trani L, Puzelli S, Selli L, Fioretti A, Alexander DJ, Tollis M, Krauss S, Webster RG. Characterization of H5N2 influenza viruses from Italian poultry. *J Gen Virol* 2001; 82: 623-30.

- Dormitorio TV, Giambrone JJ, Guo K, Hepp GR. Detection and characterization of avian influenza and other avian paramyxoviruses from wild waterfowl in parts of the southeastern United States. *Poult Sci* 2009; 88: 851-5.
- Ducatez MF, Webster RG, Webby RJ. Animal influenza epidemiology. *Vaccine* 2008; 26 Suppl 4: D67-9.
- Dugan VG, Chen R, Spiro DJ, Sengamalay N, Zaborsky J, Ghedin E, Nolting J, Swayne DE, Runstadler JA, Happ GM, Senne DA, Wang R, Slemons RD, Holmes EC, Taubenberger JK. The evolutionary genetics and emergence of avian influenza viruses in wild birds. *PLoS Pathog* 2008; 4: e1000076.
- EC. Commission Decision of 5 August 2002 on the implementation of surveys for avian influenza in poultry and wild birds in the Member States. *Off J E U* 2002; L213: 38-42.
- EC. Council Directive 2005/94/EC of 20 December 2005 on community measures for the control of avian influenza and repealing 92/40/EEC. *Off J E U* 2005; L10: 16-65.
- EC. Commission Decision of 4 August 2006 approving a Diagnostic Manual for avian influenza as provided for in Council Directive 2005/94/EC. *Off J E U* 2006; L237: 1-27.
- EC. Entscheidung der Kommission vom 13. April 2007 über die Durchführung von Programmen zur Überwachung der Aviären Influenza bei Hausgeflügel und Wildvögeln in den Mitgliedstaaten und zur Änderung der Entscheidung 2004/450/EG. *Off J E U* 2007; L115: 3-16.
- EC. Results of AI surveillance in wild birds. EC, ed. 2009: http://ec.europa.eu/food/animal/diseases/controlmeasures/avian/eu_resp_surveillance_en.htm.
- Ellstrom P, Latorre-Margalef N, Griekspoor P, Waldenstrom J, Olofsson J, Wahlgren J, Olsen B. Sampling for low-pathogenic avian influenza A virus in wild Mallard ducks: oropharyngeal versus cloacal swabbing. *Vaccine* 2008; 26: 4414-6.
- Fereidouni SR, Harder TC, Starick E. Rapid pathotyping of recent H5N1 highly pathogenic avian influenza viruses and of H5 viruses with low pathogenicity by RT-PCR and restriction enzyme cleavage pattern (RECP). *J Virol Methods* 2008; 154: 14-9.

- Fereidouni SR, Starick E, Grund C, Globig A, Mettenleiter TC, Beer M, Harder T. Rapid molecular subtyping by reverse transcription polymerase chain reaction of the neuraminidase gene of avian influenza A viruses. *Vet Microbiol* 2009; 135: 253-60.
- FLI. Epidemiologisches Bulletin Nr. 22/2006. 2006.
- FLI. Bewertung des Risikos zur neuerlichen Einschleppung sowie zum Auftreten von hochpathogenem aviären Influenzavirus (HPAIV H5N1) in Hausgeflügelbestände in der Bundesrepublik Deutschland. 2009: 1-21.
- Fouchier RA, Bestebroer TM, Herfst S, Van Der Kemp L, Rimmelzwaan GF, Osterhaus AD. Detection of influenza A viruses from different species by PCR amplification of conserved sequences in the matrix gene. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 4096-101.
- Fouchier RA, Olsen B, Bestebroer TM, Herfst S, van der Kemp L, Rimmelzwaan GF, Osterhaus AD. Influenza A virus surveillance in wild birds in Northern Europe in 1999 and 2000. *Avian Dis* 2003; 47: 857-60.
- 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.
- Fouchier RAM, Schneeberger PM, Rozendaal FW, Broekman JM, Kemink SAG, Munster V, Kuiken T, Rimmelzwaan GF, Schutten M, van Doornum GJJ, Koch G, Bosman A, Koopmans M, Osterhaus ADME. Avian influenza A virus (H7N7) associated with human conjunctivitis and a fatal case of acute respiratory distress syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2004; 101: 1356-61.
- Fuchs C (in Vorbereitung) Biologische, immunologische und molekulare Eigenschaften neuer Isolate des aviären Influenza A Virus (AIV) in Bayern. Fakultät für Biologie der Eberhard-Karls-Universität Tübingen.
- Gaidet N, Dodman T, Caron A, Balanca G, Desvaux S, Goutard F, Cattoli G, Martin V, Tripodi A, Lamarque F, Hagemeijer W, Monicat F. Influenza Surveillance in Wild Birds in Eastern Europe, the Middle East, and Africa: Preliminary Results from an Ongoing FAO-led Survey. *J Wildl Dis* 2007; 43: S22-8.

- Gaidet N, Cattoli G, Hammoumi S, Newman SH, Hagemeyer W, Takekawa JY, Cappelle J, Dodman T, Joannis T, Gil P, Monne I, Fusaro A, Capua I, Manu S, Micheloni P, Ottosson U, Mshelbwala JH, Lubroth J, Domenech J, Monicat F. Evidence of infection by H5N2 highly pathogenic avian influenza viruses in healthy wild waterfowl. *PLoS Pathog* 2008; 4: e1000127.
- Gall A, Hoffmann B, Harder T, Grund C, Beer M. Universal Primer Set for Amplification and Sequencing of HA0 Cleavage Sites of All Influenza A Viruses. *J. Clin. Microbiol.* 2008; 46: 2561-7.
- Gall A, Hoffmann B, Harder T, Grund C, Hoper D, Beer M. Design and validation of a microarray for detection, hemagglutinin subtyping, and pathotyping of avian influenza viruses. *J Clin Microbiol* 2009; 47: 327-34.
- Garamszegi LZ, Moller AP. Prevalence of avian influenza and host ecology. *Proc Biol Sci* 2007; 274: 2003-12.
- Garcia M, Crawford JM, Latimer JW, Rivera-Cruz E, Perdue ML. Heterogeneity in the haemagglutinin gene and emergence of the highly pathogenic phenotype among recent H5N2 avian influenza viruses from Mexico. *J Gen Virol* 1996; 77 (Pt 7): 1493-504.
- Globig A, Starick E, Werner O. Influenza virus infections in migrating waterfowl: results of a two year study in Germany. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 2006; 119: 132-9.
- Globig A (2007) Untersuchungen zum Vorkommen von aviären Influenza- und aviären Paramyxoviren bei Wildvögeln in Deutschland. Tierärztliche Hochschule, Hannover.
- Globig A, Staubach C, Beer M, Koppen U, Fiedler W, Nieburg M, Wilking H, Starick E, Teifke JP, Werner O, Unger F, Grund C, Wolf C, Roost H, Feldhusen F, Conraths FJ, Mettenleiter TC, Harder TC. Epidemiological and ornithological aspects of outbreaks of highly pathogenic avian influenza virus H5N1 of Asian lineage in wild birds in Germany, 2006 and 2007. *Transbound Emerg Dis* 2009; 56: 57-72.
- Häuslaigner R, Harder T, Globig A, Beer M, Grund C. Serologische Untersuchungen beim Höckerschwan am Beispiel des H5N1-Ausbruchsgeschehens in Kelbra 2007. Wissenschaftliche Schlusstagung des Projektes Constanze in Arbon, 8./9. Juni 2009: http://www.bvet.admin.ch/gesundheit_tiere/00276/00280/02814/02817/index.html?lang=de.

- Harder TC, Teuffert J, Starick E, Gethmann J, Grund C, Fereidouni S, Durban M, Bogner KH, Neubauer-Juric A, Repper R, Hlinak A, Engelhardt A, Nockler A, Smietanka K, Minta Z, Kramer M, Globig A, Mettenleiter TC, Conraths FJ, Beer M. Highly pathogenic avian influenza virus (H5N1) in frozen duck carcasses, Germany, 2007. *Emerg Infect Dis* 2009; 15: 272-9.
- He Q, Velumani S, Du Q, Lim CW, Ng FK, Donis R, Kwang J. Detection of H5 Avian Influenza Viruses by Antigen-Capture Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Using H5-Specific Monoclonal Antibody. *Clin. Vaccine Immunol.* 2007; 14: 617-23.
- Heine HG, Trinidad L, Selleck P, Lowther S. Rapid detection of highly pathogenic avian influenza H5N1 virus by TaqMan reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Avian Dis* 2007; 51: 370-2.
- Henegariu O, Heerema NA, Dlouhy SR, Vance GH, Vogt PH. Multiplex PCR: critical parameters and step-by-step protocol. *Biotechniques* 1997; 23: 504-11.
- Hesterberg U, Harris K, Stroud D, Guberti V, Busani L, Pittman M, Piazza V, Cook A, Brown I. Avian influenza surveillance in wild birds in the European Union in 2006. *Influenza Other Respi Viruses* 2009; 3: 1-14.
- Higgins DA. Precipitating antibodies of the duck (*Anas platyrhynchos*). *Comp Biochem Physiol B* 1989; 93: 135-44.
- Hinshaw VS, Webster RG, Turner B. Novel influenza A viruses isolated from Canadian feral ducks: including strains antigenically related to swine influenza (Hsw1N1) viruses. *J Gen Virol* 1978; 41: 115-27.
- Hinshaw VS, Bean WJ, Webster RG, Sriram G. Genetic reassortment of influenza A viruses in the intestinal tract of ducks. *Virology* 1980; 102: 412-9.
- Hirst M, Astell CR, Griffith M, Coughlin SM, Moksa M, Zeng T, Smailus DE, Holt RA, Jones S, Marra MA, Petric M, Krajden M, Lawrence D, Mak A, Chow R, Skowronski DM, Tweed SA, Goh S, Brunham RC, Robinson J, Bowes V, Sojonky K, Byrne SK, Li Y, Kobasa D, Booth T, Paetzel M. Novel avian influenza H7N3 strain outbreak, British Columbia. *Emerg Infect Dis* 2004; 10: 2192-5.

- Hlinak A, Muhle RU, Werner O, Globig A, Starick E, Schirrmeier H, Hoffmann B, Engelhardt A, Hubner D, Conraths FJ, Wallschlager D, Kruckenberg H, Muller T. A virological survey in migrating waders and other waterfowl in one of the most important resting sites of Germany. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 2006; 53: 105-10.
- Hoffmann B, Depner K, Schirrmeier H, Beer M. A universal heterologous internal control system for duplex real-time RT-PCR assays used in a detection system for pestiviruses. *J Virol Methods* 2006; 136: 200-9.
- Hoffmann B, Harder T, Starick E, Depner K, Werner O, Beer M. Rapid and highly sensitive pathotyping of avian influenza A H5N1 virus by using real-time reverse transcription-PCR. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 600-3.
- Hoffmann E, Stech J, Guan Y, Webster RG, Perez DR. Universal primer set for the full-length amplification of all influenza A viruses. *Arch Virol* 2001; 146: 2275-89.
- Imai M, Ninomiya A, Minekawa H, Notomi T, Ishizaki T, Tashiro M, Odagiri T. Development of H5-RT-LAMP (loop-mediated isothermal amplification) system for rapid diagnosis of H5 avian influenza virus infection. *Vaccine* 2006; 24: 6679-82.
- Ip HS, Flint PL, Franson JC, Dusek RJ, Derksen DV, Gill RE, Jr., Ely CR, Pearce JM, Lanctot RB, Matsuoka SM, Irons DB, Fischer JB, Oates RM, Petersen MR, Fondell TF, Rocque DA, Pedersen JC, Rothe TC. Prevalence of Influenza A viruses in wild migratory birds in Alaska: patterns of variation in detection at a crossroads of intercontinental flyways. *Virol J* 2008; 5: 71.
- Jackwood MW, Stallknecht DE. Molecular epidemiologic studies on North American H9 avian influenza virus isolates from waterfowl and shorebirds. *Avian Dis* 2007; 51: 448-50.
- Jayawardena S, Cheung CY, Barr I, Chan KH, Chen H, Guan Y, Peiris JS, Poon LL. Loop-mediated isothermal amplification for influenza A (H5N1) virus. *Emerg Infect Dis* 2007; 13: 899-901.
- Kalthoff D, Breithaupt A, Teifke JP, Globig A, Harder T, Mettenleiter TC, Beer M. Highly pathogenic avian influenza virus (H5N1) in experimentally infected adult mute swans. *Emerg Infect Dis* 2008; 14: 1267-70.

- 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, Yamnikova S, Chambers TM, Lvov DK, Webster RG. Molecular characterization of a new hemagglutinin, subtype H14, of influenza A virus. *Virology* 1990; 179: 759-67.
- Keawcharoen J, van Riel D, van Amerongen G, Bestebroer T, Beyer WE, van Lavieren R, Osterhaus AD, Fouchier RA, Kuiken T. Wild ducks as long-distance vectors of highly pathogenic avian influenza virus (H5N1). *Emerg Infect Dis* 2008; 14: 600-7.
- Keller I, Korner-Nievergelt F, Jenni L. Within-winter movements: a common phenomenon in the common pochard *Aythya ferina*. *J Ornithol* 2009; 150: 483-94.
- Kessler N, Ferraris O, Palmer K, Marsh W, Steel A. Use of the DNA flow-thru chip, a three-dimensional biochip, for typing and subtyping of influenza viruses. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 2173-85.
- Kluth S (persönliche Mitteilung) Geschätzter bayernweiter Maximalbestand der Stockente, basierend auf den mittleren Wintersummen der Wasservogelzählungen von 2000 bis 2005. Landesamt für Umwelt, Vogelwarte Garmisch-Partenkirchen.
- Kodihalli S, Sivanandan V, Nagaraja KV, Goyal SM, Halvorson DA. Antigen-capture enzyme immunoassay for detection of avian influenza virus in turkeys. *Am J Vet Res* 1993; 54: 1385-90.
- Koehler AV, Pearce JM, Flint PL, Franson JC, Ip HS. Genetic evidence of intercontinental movement of avian influenza in a migratory bird: the northern pintail (*Anas acuta*). *Mol Ecol* 2008; 17: 4754-62.
- Kou Z, Lei FM, Yu J, Fan ZJ, Yin ZH, Jia CX, Xiong KJ, Sun YH, Zhang XW, Wu XM, Gao XB, Li TX. New genotype of avian influenza H5N1 viruses isolated from tree sparrows in China. *J Virol* 2005; 79: 15460-6.
- Krauss S, Walker D, Pryor SP, Niles L, Chenghong L, Hinshaw VS, Webster RG. Influenza A Viruses of Migrating Wild Aquatic Birds in North America. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 2004; 4: 177-89.

- Krauss S, Obert CA, Franks J, Walker D, Jones K, Seiler P, Niles L, Pryor SP, Obenauer JC, Naeve CW, Widjaja L, Webby RJ, Webster RG. Influenza in migratory birds and evidence of limited intercontinental virus exchange. *PLoS Pathog* 2007; 3: e167.
- Lang AS, Kelly A, Runstadler JA. Prevalence and diversity of avian influenza viruses in environmental reservoirs. *J Gen Virol* 2008; 89: 509-19.
- Lang V, Rinder M, Hafner-Marx A, Rabl S, Bogner KH, Neubauer-Juric A, Büttner M (zur Publikation eingereicht) Avian influenza A virus monitoring in wild birds in Bavaria: occurrence and heterogeneity of H5 and N1 encoding genes.
- Latorre-Margalef N, Gunnarsson G, Munster VJ, Fouchier RA, Osterhaus AD, Elmerberg J, Olsen B, Wallensten A, Haemig PD, Fransson T, Brudin L, Waldenstrom J. Effects of influenza A virus infection on migrating mallard ducks. *Proc Biol Sci* 2009; 276: 1029-36.
- Lau LT, Banks J, Aherne R, Brown IH, Dillon N, Collins RA, Chan KY, Fung YW, Xing J, Yu AC. Nucleic acid sequence-based amplification methods to detect avian influenza virus. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 313: 336-42.
- LBV. Greifvogelpflege- und auffangstation Regenstauf. Regenstauf: 2009: <http://www.lbv.de/lbv-regional/umweltstationen/umweltstation-regenstauf.html>.
- Lee CW, Saif YM. Avian influenza virus. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2009; 32: 301-10.
- Li J, Chen S, Evans DH. Typing and subtyping influenza virus using DNA microarrays and multiplex reverse transcriptase PCR. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 696-704.
- Li J, Cardona CJ, Xing Z, Woolcock PR. Genetic and phenotypic characterization of a low-pathogenicity avian influenza H11N9 virus. *Arch Virol* 2008; 153: 1899-908.
- LIFE-Natur. Schwäbisches Donautal. <http://www.donautal-life-natur.de/images/Infomaterial/steckbrief.pdf>.
- Lin B, Malanoski AP, Wang Z, Blaney KM, Long NC, Meador CE, Metzgar D, Myers CA, Yingst SL, Monteville MR, Saad MD, Schnur JM, Tibbetts C, Stenger DA. Universal detection and identification of avian influenza virus by use of resequencing microarrays. *J Clin Microbiol* 2009; 47: 988-93.

- Luo Q, Huang H, Zou W, Dan H, Guo X, Zhang A, Yu Z, Chen H, Jin M. An indirect sandwich ELISA for the detection of avian influenza H5 subtype viruses using anti-hemagglutinin protein monoclonal antibody. *Vet Microbiol* 2009; 137: 24-30.
- Lvov DK, Yamnikova SS, Gambaryan AS, Fedyakina IT, Matrosovich MN. Isolation of influenza viruses from wild birds in the volga river basin and in the north caspian region. *Internat Congress Series* 2001; 1219: 251-8.
- Malik Peiris JS. Avian influenza viruses in humans. *Rev sci tech Off int Epiz* 2009; 28: 161-74.
- Matrosovich MN, Krauss S, Webster RG. H9N2 influenza A viruses from poultry in Asia have human virus-like receptor specificity. *Virology* 2001; 281: 156-62.
- Mayr A, Bachmann PA, Bibrack B, Wittmann G (1974) Quantitative Bestimmung der Virusinfektiosität (Virustitration). In: *Virologische Arbeitsmethoden Band I*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart. 35-9
- Michael K, Harder TC, Mettenleiter TC, Karger A. Diagnosis and strain differentiation of avian influenza viruses by restriction fragment mass analysis. *J Virol Methods* 2009; 158: 63-9.
- Mori Y, Nagamine K, Tomita N, Notomi T. Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 289: 150-4.
- Munch M, Nielsen LP, Handberg KJ, Jorgensen PH. Detection and subtyping (H5 and H7) of avian type A influenza virus by reverse transcription-PCR and PCR-ELISA. *Arch Virol* 2001; 146: 87-97.
- Munster VJ, Wallensten A, Baas C, Rimmelzwaan GF, Schutten M, Olsen B, Osterhaus AD, Fouchier RA. Mallards and highly pathogenic avian influenza ancestral viruses, northern Europe. *Emerg Infect Dis* 2005; 11: 1545-51.
- Munster VJ, Baas C, Lexmond P, Waldenstrom J, Wallensten A, Fransson T, Rimmelzwaan GF, Beyer WE, Schutten M, Olsen B, Osterhaus AD, Fouchier RA. Spatial, temporal, and species variation in prevalence of influenza A viruses in wild migratory birds. *PLoS Pathog* 2007; 3: e61.

- O.I.E. Terrestrial animal health code. chapter 2.7.12.1 on Avian influenza 2005: http://www.oie.int/download/SC/2005/avian_influenza_2005.pdf.
- O.I.E. Update on highly pathogenic avian influenza in animals (type H5 and H7). 2008: http://www.oie.int/download/AVIAN%20INFLUENZA/A2008_AI.php.
- O.I.E. Update on highly pathogenic avian influenza in animals (Type H5 and H7), 2009a: http://www.oie.int/download/AVIAN%20INFLUENZA/A_AI-Asia.htm.
- O.I.E. Avian influenza: Facts & Figures. 2009b: http://www.oie.int/Eng/info_ev/en_AI_factoids_3.htm.
- O.I.E. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial Animals 2009. Chapter 2.3.4 on Avian influenza 2009c: http://www.oie.int/Eng/Normes/Mmanual/2008/pdf/2.03.04_AI.pdf.
- Olsen B, Munster VJ, Wallensten A, Waldenstrom J, Osterhaus ADME, Fouchier RAM. Global Patterns of Influenza A Virus in Wild Birds. *Science* 2006; 312: 384-8.
- Ong WT, Omar AR, Ideris A, Hassan SS. Development of a multiplex real-time PCR assay using SYBR Green 1 chemistry for simultaneous detection and subtyping of H9N2 influenza virus type A. *J Virol Methods* 2007; 144: 57-64.
- Ottis K, Bachmann PA. Isolation and characterization of ortho- and paramyxoviruses from feral birds in Europe. *Zentralbl Veterinarmed B* 1983; 30: 22-35.
- Pannwitz G, Wolf C, Harder T. Active Surveillance for Avian Influenza Virus Infection in Wild Birds by Analysis of Avian Fecal Samples from the Environment. *J Wildl Dis* 2009; 45: 512-8.
- Pantin-Jackwood MJ, Suarez DL, Spackman E, Swayne DE. Age at infection affects the pathogenicity of Asian highly pathogenic avian influenza H5N1 viruses in ducks. *Virus Res* 2007; 130: 151-61.
- Parmley EJ, Bastien N, Booth TF, Bowes V, Buck PA, Breault A, Caswell D, Daoust PY, Davies JC, Elahi SM, Fortin M, Kibenge F, King R, Li Y, North N, Ojkic D, Pasick J, Pryor SP, Robinson J, Rodrigue J, Whitney H, Zimmer P, Leighton FA. Wild bird influenza survey, Canada, 2005. *Emerg Infect Dis* 2008; 14: 84-7.

- Pasick J. Advances in the molecular based techniques for the diagnosis and characterization of avian influenza virus infections. *Transbound Emerg Dis* 2008; 55: 329-38.
- Perdue ML, Suarez DL. Structural features of the avian influenza virus hemagglutinin that influence virulence. *Vet Microbiol* 2000; 74: 77-86.
- Phipps LP, Essen SC, Brown IH. Genetic subtyping of influenza A viruses using RT-PCR with a single set of primers based on conserved sequences within the HA2 coding region. *J Virol Methods* 2004; 122: 119-22.
- Pourmand N, Diamond L, Garten R, Erickson JP, Kumm J, Donis RO, Davis RW. Rapid and highly informative diagnostic assay for H5N1 influenza viruses. *PLoS ONE* 2006; 1: e95.
- Raleigh PJ, Flynn O, O'Connor M, O'Donovan T, Purcell B, De Burca M, Regazzoli V, Minihan D, Connell J, Markey BK, Sammin DJ. Avian influenza viruses detected by surveillance of waterfowl in Ireland during 2003-2007. *Epidemiol Infect* 2009; 137: 464-72.
- Rinder M, Lang V, Fuchs C, Hafner-Marx A, Bogner KH, Neubauer A, Buttner M, Rinder H. Genetic evidence for multi-event imports of avian influenza virus A (H5N1) into Bavaria, Germany. *J Vet Diagn Invest* 2007; 19: 279-82.
- Rinder M, Rabl S, Büttner M, Korb R (in Vorbereitung) Development of a multiplex RT-Real-time-PCR assay for detection of avian influenza virus subtypes H1-H13.
- Rohani P, Breban R, Stallknecht DE, Drake JM. Environmental transmission of low pathogenicity avian influenza viruses and its implications for pathogen invasion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106: 10365-9.
- Rohm C, Zhou N, Suss J, Mackenzie J, Webster RG. Characterization of a novel influenza hemagglutinin, H15: criteria for determination of influenza A subtypes. *Virology* 1996; 217: 508-16.
- Schrimpf G (2002a) Real-time-PCR und -RT-PCR. In: *Gentechnische Methoden*. Spektrum Akademischer Verlag GmbH. 163-4.
- Schrimpf G (2002b) DNA-Microarrays. In: *Gentechnische Methoden*. Eds List H-J, Wellesen K, Huch R, Schüßler P. 411-3.

- Schweiger B, Zadow I, Heckler R, Timm H, Pauli G. Application of a fluorogenic PCR assay for typing and subtyping of influenza viruses in respiratory samples. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 1552-8.
- Sedlmaier N, Hoppenheidt K, Krist H, Lehmann S, Lang H, Buttner M. Generation of avian influenza virus (AIV) contaminated fecal fine particulate matter (PM(2.5)): Genome and infectivity detection and calculation of immission. *Vet Microbiol* 2009; 139: 156-64.
- Seigner L, Knabel S. PCR-ELISA: Eine Methode zur Pathogendiagnose und zur Ermittlung der Befallsstärke. Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft 2009: http://www.lfl.bayern.de/ips/forschung/12209/linkurl_0_3.pdf.
- Sharp G, Kawaoka Y, Jones D, Bean W, Pryor S, Hinshaw V, Webster R. Coinfection of wild ducks by influenza A viruses: distribution patterns and biological significance. *J. Virol.* 1997; 71: 6128-35.
- 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.
- Spackman E, Senne DA, Myers TJ, Bulaga LL, Garber LP, Perdue ML, Lohman K, Daum LT, Suarez DL. 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* 2002; 40: 3256-60.
- Stallknecht DE, Shane SM, Kearney MT, Zwank PJ. Persistence of avian influenza virus in water. *Avian Dis* 1990; 34: 406-11.
- Stallknecht DE, Brown JD. Wild birds and the epidemiology of avian influenza. *J Wildl Dis* 2007; 43: S15-S20.
- Starick E, Romer-Oberdorfer A, Werner O. Type- and subtype-specific RT-PCR assays for avian influenza A viruses (AIV). *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 2000; 47: 295-301.
- Starick E, Werner O, Schirrmeier H, Kollner B, Riebe R, Mundt E. Establishment of a competitive ELISA (cELISA) system for the detection of influenza A virus nucleoprotein antibodies and its application to field sera from different species. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 2006; 53: 370-5.

- Starick E, Beer M, Hoffmann B, Staubach C, Werner O, Globig A, Strebelow G, Grund C, Durban M, Conraths FJ, Mettenleiter T, Harder T. Phylogenetic analyses of highly pathogenic avian influenza virus isolates from Germany in 2006 and 2007 suggest at least three separate introductions of H5N1 virus. *Vet Microbiol* 2008; 128: 243-52.
- Sturm-Ramirez KM, Ellis T, Bousfield B, Bissett L, Dyrting K, Rehg JE, Poon L, Guan Y, Peiris M, Webster RG. Reemerging H5N1 influenza viruses in Hong Kong in 2002 are highly pathogenic to ducks. *J Virol* 2004; 78: 4892-901.
- Sturm-Ramirez KM, Hulse-Post DJ, Govorkova EA, Humberd J, Seiler P, Puthavathana P, Buranathai C, Nguyen TD, Chaisingh A, Long HT, Naipospos TS, Chen H, Ellis TM, Guan Y, Peiris JS, Webster RG. Are ducks contributing to the endemicity of highly pathogenic H5N1 influenza virus in Asia? *J Virol* 2005; 79: 11269-79.
- Suarez DL, Das A, Ellis E. Review of rapid molecular diagnostic tools for avian influenza virus. *Avian Dis* 2007; 51: 201-8.
- Süss J, Schafer J, Sinnecker H, Webster RG. Influenza virus subtypes in aquatic birds of eastern Germany. *Arch Virol* 1994; 135: 101-14.
- Takao S, Shimazu Y, Fukuda S, Kuwayama M, Miyazaki K. Neuraminidase subtyping of human influenza A viruses by RT-PCR and its application to clinical isolates. *Jpn J Infect Dis* 2002; 55: 204-5.
- 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.
- Tsukamoto K, Ashizawa H, Nakanishi K, Kaji N, Suzuki K, Okamatsu M, Yamaguchi S, Mase M. Subtyping of avian influenza viruses H1 to H15 on the basis of hemagglutinin genes by PCR assay and molecular determination of pathogenic potential. *J Clin Microbiol* 2008; 46: 3048-55.
- Van Borm S, Thomas I, Hanquet G, Lambrecht B, Boschmans M, Dupont G, Decaestecker M, Snacken R, van den Berg T. Highly pathogenic H5N1 influenza virus in smuggled Thai eagles, Belgium. *Emerg Infect Dis* 2005; 11: 702-5.
- Van Deusen RA, Hinshaw VS, Senne DA, Pellacani D. Micro neuraminidase-inhibition assay for classification of influenza A virus neuraminidases. *Avian Dis* 1983; 27: 745-50.

- van Gils JA, Munster VJ, Radersma R, Liefhebber D, Fouchier RA, Klaassen M. Hampered foraging and migratory performance in swans infected with low-pathogenic avian influenza A virus. *PLoS ONE* 2007; 2: e184.
- Vong S, Ly S, Mardy S, Holl D, Buchy P. Environmental contamination during influenza A virus (H5N1) outbreaks, Cambodia, 2006. *Emerg Infect Dis* 2008; 14: 1303-5.
- Wallensten A, Munster VJ, Elmberg J, Osterhaus AD, Fouchier RA, Olsen B. Multiple gene segment reassortment between Eurasian and American lineages of influenza A virus (H6N2) in Guillemot (*Uria aalge*). *Arch Virol* 2005; 150: 1685-92.
- Wallensten A, Munster VJ, Latorre-Margalef N, Brytting M, Elmberg J, Fouchier RA, Fransson T, Haemig PD, Karlsson M, Lundkvist A, Osterhaus AD, Stervander M, Waldenstrom J, Bjorn O. Surveillance of influenza A virus in migratory waterfowl in northern Europe. *Emerg Infect Dis* 2007; 13: 404-11.
- Wan H, Perez DR. Amino acid 226 in the hemagglutinin of H9N2 influenza viruses determines cell tropism and replication in human airway epithelial cells. *J Virol* 2007; 81: 5181-91.
- Wang R, Soll L, Dugan V, Runstadler J, Happ G, Slemons RD, Taubenberger JK. Examining the hemagglutinin subtype diversity among wild duck-origin influenza A viruses using ethanol-fixed cloacal swabs and a novel RT-PCR method. *Virology* 2008; 375: 182-9.
- Ward MP, Maftei DN, Apostu CL, Suru AR. Association between outbreaks of highly pathogenic avian influenza subtype H5N1 and migratory waterfowl (family Anatidae) populations. *Zoonoses Public Health* 2009; 56: 1-9.
- 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, Bean WJ, Gorman OT, Chambers TM, Kawaoka Y. Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 1992; 56: 152-79.

- Webster RG, Hulse-Post DJ, Sturm-Ramirez KM, Guan Y, Peiris M, Smith G, Chen H. Changing epidemiology and ecology of highly pathogenic avian H5N1 influenza viruses. *Avian Dis* 2007; 51: 269-72.
- WHO. Cumulative number of confirmed human cases of avian influenza A/(H5N1) reported to WHO. 2009: http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/country/cases_table_2009_09_24/en/index.html.
- Woolcock PR, Cardona CJ. Commercial immunoassay kits for the detection of influenza virus type A: evaluation of their use with poultry. *Avian Dis* 2005; 49: 477-81.
- Xie Z, Pang YS, Liu J, Deng X, Tang X, Sun J, Khan MI. A multiplex RT-PCR for detection of type A influenza virus and differentiation of avian H5, H7, and H9 hemagglutinin subtypes. *Mol Cell Probes* 2006; 20: 245-9.
- Yacoub A, Kiss I, Zohari S, Hakhverdyan M, Czifra G, Mohamed N, Gyarmati P, Blomberg J, Belak S. The rapid molecular subtyping and pathotyping of avian influenza viruses. *J Virol Methods* 2009; 156: 157-61.

IX. ANHANG

1. Tabellenverzeichnis

Tabelle II. 1: Wildvogelspezies mit epidemiologischer Bedeutung als AIV-Reservoir (OLSEN et al., 2006; MUNSTER et al., 2007; WALLENSTEN et al., 2007).....	22
Tabelle II. 2: Bei Wildvögeln der Ordnung Anseriformes in Langzeitstudien in Europa und Nordamerika am häufigsten nachgewiesene Subtypen und AIV-Prävalenzen (modifiziert nach WALLENSTEN et al. (2007).....	26
Tabelle III. 1: Probenanzahl der im Studienzeitraum am häufigsten beprobten Wildvogelspezies (n>35)	37
Tabelle III. 2: Reaktionsvolumina und -konzentrationen der Mastermix-Komponenten für die pan AIV RT-rPCR	55
Tabelle III. 3: Thermalprofil für die pan AIV RT-rPCR und die H5-, H7- und N1-Subtypisierungs-RT-rPCR	55
Tabelle III. 4: Reaktionsvolumina und -konzentrationen der Mastermix-Komponenten für die H5-, H7- und N1-Subtypisierungs-RT-rPCR	57
Tabelle III. 5: Pipettierschemata für die HA-Multiplex-PCR.....	59
Tabelle IV. 1: AIV-Genomnachweis und Zahl der H5- und N1-Nachweise aus Wildvogelproben von Juli 2007 bis März 2009 unterteilt nach Vogelarten, 95 %-Konfidenzintervalle (95 %-KI) siehe Tab. IX.1 im Anhang (n. n. = nicht nachgewiesen).....	67
Tabelle IV. 2: AIV-Genomnachweis und Zahl der H5- und N1-Nachweise aus Wildvogelproben von Juli 2007 bis März 2009 unterteilt nach bayerischen Regierungsbezirken, 95 %-KI siehe Tab. IX.3 im Anhang, (n. n. = nicht nachgewiesen)	70

Tabelle IV. 3: Ergebnisse der pan AIV RT-rPCR und der N2- und N3-Subtypisierung von Wildvogelproben von Juli 2007 bis März 2009 unterteilt nach bayerischen Landkreisen, Abkürzungen für die Landkreise wie in Abb. IV. 4 (n. n. = nicht nachgewiesen)	81
Tabelle IV. 4: Virusisolierung von Influenza-A-Viren aus Kloakaltupfern von Stockenten (<i>Anas platyrhynchos</i>). Ergebnisse des Virusgenomnachweises in der pan AIV RT-rPCR sind als ct-Werte und Ergebnisse des Hämagglutinationstestes sind als Endpunktverdünnung der noch hämagglutinierenden Allantoisflüssigkeit (HA) angegeben (p. i. = post inokulationem; n. d. = nicht durchgeführt).....	83
Tabelle IX. 1: Taxonomische Einordnung der von Juli 2007 bis März 2009 beprobten Vögel und speziesbezogene AIV-Prävalenz (KI = Konfidenzintervall; n. n. = nicht nachgewiesen).....	131
Tabelle IX. 2: Jahreszeitliche Unterschiede im Nachweis Influenza-A-, H5, N1-, N2- und N3-positiver Tiere über den gesamten Studienzeitraum, unterteilt nach bayerischen Regierungsbezirken (n. n. = nicht nachgewiesen).....	135
Tabelle IX. 3: Verteilung der untersuchten Proben und der nachgewiesenen Influenza-A-Virusinfektionen auf die bayerischen Landkreise von Juli 2007 bis März 2009	137
Tabelle IX. 4: Gesamtübersicht über den Nachweis der Subtypkomponenten H1-H13 in den bayerischen Landkreisen (H5-/H7-Subtypisierung nach SPACKMAN et al. (2002), restliche HA-Typen nach RINDER et al. (in Vorbereitung). Bei grau hinterlegten Feldern wurde keine Subtypkomponente nachgewiesen. H7, H8 und H12 wurden im Untersuchungszeitraum nicht nachgewiesen	142
Tabelle IX. 5: Gesamtübersicht über den Nachweis der Subtypkomponenten N1-N3, N6 und N9 in den bayerischen Landkreisen. In Mittel-franken und bei grau hinterlegten Feldern wurde keine der angegebenen Subtypkomponenten nachgewiesen	144

2. **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung II. 1: Diagnostik aviärer Influenzaviren: Ablauf klassischer und molekularbiologischer Methoden (EC, 2006).....	3
Abbildung III. 1: Monatliche Verteilung der untersuchten Proben (als prozentualer Anteil an der Gesamtprobenanzahl).....	38
Abbildung III. 2: Zum Lebendfang verwendetes Kanonennetz, benötigte Utensilien und Fangbeispiel.....	49
Abbildung III. 3: Handfang von Schwänen am Bodensee im Rahmen des Influenza-Gemeinschafts-Projektes „Constanze“.....	50
Abbildung IV. 1: Monatliche Verteilung der prozentualen Nachweisrate von Influenza-A-Genom im Studienzeitraum mit Angabe der 95 %-Konfidenzintervalle.....	68
Abbildung IV. 2: Regionale Verteilung der prozentualen Nachweisrate von Influenza-A-Genom im Studienzeitraum.....	71
Abbildung IV. 3: Ct-Mittelwerte und prozentuale Nachweisrate von aviärem Influenzavirusgenom in Kloakal- (K), Rachentupfern (R), Organen und Kot.....	72
Abbildung IV. 4: Prozentuale Nachweisrate der Subtypkomponenten H1 bis H13 in den bayerischen Landkreisen (H5-/H7-Subtypisierung nach Spackman et al. (2002), restliche HA-Typen nach RINDER et al. (in Vorbereitung); AÖ=Altötting; CHA=Cham; DEG=Deggendorf; DLG=Dillingen an der Donau; DON=Donau-Ries; ND=Neuburg-Schrobenhausen; PAF=Pfaffenhofen an der Ilm; WUN=Wunsiedel).....	76
Abbildung IV. 5: Darstellung der Reaktionsverläufe der Probe 112 in der H3- und H9-spezifischen Real-time Singleplex-PCR.....	77
Abbildung IV. 6: Agarosegelanalyse (2%iges Gel) der nach H3- und H9-Singleplex-PCR erhaltenen DNA-Produkte: In der Probe 112 wurden Produkte in der erwarteten Größe nachgewiesen (Produktgröße je 125 bp, Pfeil). Zur Größenbestimmung wurde ein 50 bp-Standard verwendet.....	78

Abbildung IV. 7: Agarosegelanalyse (1%iges Gel) der nach konventioneller N3-PCR erhaltenen DNA-Produkte: Beispielhafte Darstellung für zehn H5-positive Proben (erwartete Produktgröße 247 bp, Pfeil; NTC = no template control). Zur Größenbestimmung wurde ein 100 bp-Standard verwendet.....80

Abbildung IV. 8: Immunhistochemischer Nachweis (Braunfärbung) der AIV-Infektion von MDCK-Zellen mit Nukleoprotein-spezifischen Antikörpern...84

Abbildung V. 1: Geographische Verteilung der Standorte mit dem größten Wasservogelaufkommen in Bayern (Quelle: LfU Bayern, 2005).....97

3. Detaillierte Daten zu beprobten Wildvogelspezies, saisonaler, regionaler Verteilung AIV und Subtypverteilung

Tabelle IX. 1: Taxonomische Einordnung der von Juli 2007 bis März 2009 beprobten Vögel und speziesbezogene AIV-Prävalenz (KI = Konfidenzintervall; n. n. = nicht nachgewiesen)

Ordnung	Familie	Vogelart	Wissenschaftliche Bezeichnung	Probenanzahl		AIV positiv		95 %-KI
				n	% ^a	n	% ^b	
Anseriformes	Anatidae	Stockente	<i>Anas platyrhynchos</i>	3474	56,82	214	6,16	5,88-7,01
		Reiherente	<i>Aythya fuligula</i>	40	0,65	2	5,00	0,61-16,92
		Schnatterente	<i>Anas strepera</i>	4	0,07	n. n.		0,00-60,24
		Tafelente	<i>Aythya ferina</i>	3	0,05	n. n.		0,00-70,76
		Nordamerikan. Pfeifente	<i>Anas americana</i>	2	0,03	n. n.		0,00-84,19
		Kolbenente	<i>Netta rufina</i>	1	0,02	n. n.		0,00-97,50
		Rotschulterente	<i>Callonetta leucophrys</i>	1	0,02	n. n.		0,00-97,50
		Löffelente	<i>Anas clypeata</i>	1	0,02	n. n.		0,00-97,50
		Fleckschnabelente	<i>Anas poecilorhyncha</i>	1	0,02	n. n.		0,00-97,50
		Eiderente	<i>Somateria mollissima</i>	2	0,03	n. n.		0,00-84,19
		Mandarinente	<i>Aix galericulata</i>	1	0,02	n. n.		0,00-97,50
		Krickente	<i>Anas crecca</i>	23	0,38	n. n.		0,00-14,82
		Knäkente	<i>Anas querquedula</i>	2	0,03	n. n.		0,00-84,19
		Ente	Art nicht bestimmt	17	0,28	n. n.		0,00-19,51
		Graugans	<i>Anser anser</i>	678	11,09	1	0,15	0,01-0,82
		Brandgans	<i>Tadorna tadorna</i>	1	0,02	n. n.		0,00-97,50
Weißwangengans	<i>Branta leucopsis</i>	3	0,05	n. n.		0,00-70,76		

Tabelle IX. 1, Fortsetzung

Ordnung	Familie	Vogelart	Wissenschaftliche Bezeichnung	Proben- anzahl		AIV positiv		95 %-KI
				n	% ^a	n	% ^b	
Anseriformes	Anatidae	Ringelgans	<i>Branta bernicla</i>	1	0,02	n. n.		0,00-97,50
		Rothalsgans	<i>Branta ruficollis</i>	5	0,08	n. n.		0,00-52,18
		Streifengans	<i>Anser indicus</i>	2	0,03	n. n.		0,00-84,19
		Nilgans	<i>Alopochen aegyptiacus</i>	1	0,02	n. n.		0,00-97,50
		Kanadagans	<i>Branta canadensis</i>	239	3,91	n. n.		0,00-1,53
		Kaisergans	<i>Chen canagica</i>	2	0,03	n. n.		0,00-84,19
		Zwergsäger	<i>Mergellus albellus</i>	1	0,02	n. n.		0,00-97,50
		Gänsesäger	<i>Mergus merganser</i>	2	0,03	n. n.		0,00-84,19
		Höckerschwan	<i>Cygnus olor</i>	261	4,27	4	1,53	0,42-3,88
		Schwarzhalsschwan	<i>Cygnus melancoryphus</i>	1	0,02	n. n.		0,00-97,50
Gruiformes	Rallidae	Bläbhuhn	<i>Fulica atra</i>	678	11,09	2	0,29	0,04-1,06
		Teichhuhn	<i>Gallinula chloropus</i>	22	0,36	n. n.		0,00-15,44
	Gruidae	Kranich	<i>Grus grus</i>	2	0,03	n. n.		0,00-84,19
Podicipediformes	Podicipedidae	Haubentaucher	<i>Podiceps cristatus</i>	2	0,03	n. n.		0,00-84,19
		Schwarzhalstaucher	<i>Podiceps nigricollis</i>	1	0,02	n. n.		0,00-97,50
		Zwergtaucher	<i>Tachybaptus ruficollis</i>	1	0,02	n. n.		0,00-97,50
Charadriiformes	Laridae	Lachmöwe	<i>Larus ridibundus</i>	127	2,08	n. n.		0,00-2,86
	Sternidae	Inkaseeschwalbe	<i>Larosterna inca</i>	1	0,02	n. n.		0,00-97,50
	Scolopacidae	Waldschnepfe	<i>Scolopax rusticola</i>	8	0,13	n. n.		0,00-36,94
	Haematopodidae	Austernfischer	<i>Haematopus ostralegus</i>	4	0,07	n. n.		0,00-60,24
Ciconiiformes	Ciconiidae	Weißstorch	<i>Ciconia ciconia</i>	13	0,21	n. n.		0,00-24,71
		Schwarzstorch	<i>Ciconia nigra</i>	3	0,05	n. n.		0,00-70,76

Tabelle IX. 1, Fortsetzung

Ordnung	Familie	Vogelart	Wissenschaftliche Bezeichnung	Proben- anzahl		AIV positiv		95 %-KI
				n	% ^a	n	% ^b	
Ciconiiformes	Ardeidae	Graureiher	<i>Ardea cinerea</i>	9	0,15	n. n.		0,00-33,63
		Kuhreiher	<i>Bubulcus ibis</i>	3	0,05	n. n.		0,00-70,76
	Threskiornithidae	Weißer Löffler	<i>Platalea leucorodia</i>	2	0,03	n. n.		0,00-84,19
		Strohhalbsibis	<i>Carpodacus spinicollis</i>	1	0,02	n. n.		0,00-97,50
		Waldrapp	<i>Geronticus eremita</i>	1	0,02	n. n.		0,00-97,50
Pelecaniformes	Phalacrocoracidae	Kormoran	<i>Phalacrocorax carbo</i>	15	0,25	n. n.		0,00-21,80
Accipitriformes	Accipitridae	Mäusebussard	<i>Buteo buteo</i>	44	0,72	n. n.		0,00-8,04
		Wespenbussard	<i>Pernis apivorus</i>	2	0,03	n. n.		0,00-84,19
		Sperber	<i>Accipiter nisus</i>	19	0,31	n. n.		0,00-17,65
		Habicht	<i>Accipiter gentilis</i>	9	0,15	n. n.		0,00-33,63
		Turmfalke	<i>Falco tinnunculus</i>	45	0,74	n. n.		0,00-7,87
		Wanderfalke	<i>Falco peregrinus</i>	4	0,07	n. n.		0,00-60,24
		Baumfalke	<i>Falco subbuteo</i>	1	0,02	n. n.		0,00-60,24
		Rotmilan	<i>Milvus milvus</i>	1	0,02	n. n.		0,00-97,50
		Seeadler	<i>Haliaeetus albicilla</i>	1	0,02	n. n.		0,00-97,50
		Gerfalke	<i>Falco rusticolus</i>	1	0,02	n. n.		0,00-97,50
Strigiformes	Strigidae	Waldkauz	<i>Strix aluco</i>	24	0,39	n. n.		0,00-14,25
		Uhu	<i>Bubo bubo</i>	7	0,11	n. n.		0,00-40,96
		Waldohreule	<i>Asio otus</i>	18	0,29	n. n.		0,00-18,53
		Schnee-Eule	<i>Nyctea scandiaca</i>	3	0,05	n. n.		0,00-70,76
		Sumpfohreule	<i>Asio flammeus</i>	1	0,02	n. n.		0,00-97,50
	Tytonidae	Schleiereule	<i>Tyto alba</i>	7	0,11	n. n.		0,00-40,96
		Eule	Art nicht bestimmt	4	0,07	n. n.		0,00-60,24

Tabelle IX. 1, Fortsetzung

Ordnung	Familie	Vogelart	Wissenschaftliche Bezeichnung	Proben- anzahl		AIV positiv		95 %- KI
				n	% ^a	n	% ^b	
Passeriformes	Corvidae	Saatkrähe	<i>Corvus frugilegus</i>	4	0,07	n. n.		0,00-60,24
		Aaskrähe	<i>Corvus corone</i>	63	1,03	n. n.		0,00-5,69
		Dohle	<i>Corvus monedula</i>	2	0,03	n. n.		0,00-84,19
		Kolkrabe	<i>Corvus corax</i>	1	0,02	n. n.		0,00-97,50
		Eichelhäher	<i>Garrulus glandarius</i>	10	0,16	n. n.		0,00-30,85
		Elster	<i>Pica pica</i>	4	0,07	n. n.		0,00-60,24
		Tannenhäher	<i>Nucifraga caryocatactes</i>	1	0,02	n. n.		0,00-97,50
	Fringillidae	Gimpel	<i>Pyrrhula pyrrhula</i>	1	0,02	n. n.		0,00-97,50
		Fink	Art nicht bestimmt	1	0,02	n. n.		0,00-97,50
	Oriolidae	Pirol	<i>Oriolus oriolus</i>	1	0,02	n. n.		0,00-97,50
	Turdidae	Amsel	<i>Turdus merula</i>	1	0,02	n. n.		0,00-97,50
Motacillidae	Bachstelze	<i>Motacilla alba</i>	23	0,38	n. n.		0,00-14,82	
Columbiformes	Columbidae	Ringeltaube	<i>Columba palumbus</i>	19	0,31	n. n.		0,00-17,65
		Straßentaube	<i>Columba livia f. domestica</i>	8	0,13	n. n.		0,00-36,94
Galliformes	Phasianidae	Fasan	<i>Phasianus colchicus</i>	118	1,93	n. n.		0,00-3,08
		Rebhuhn	<i>Perdix perdix</i>	1	0,02	n. n.		0,00-97,50
		Rothuhn	<i>Alectoris rufa</i>	1	0,02	n. n.		0,00-97,50
Upupiformes	Upupidae	Wiedehopf	<i>Upupa epops</i>	1	0,02	n. n.		0,00-97,50
Piciformes	Picidae	Buntspecht	<i>Dendrocopos major</i>	1	0,02	n. n.		0,00-97,50
Gesamt				6114	100	223	3,65	3,19-4,15

^abezogen auf Gesamtprobenanzahl 6114.

^abezogen auf die Gesamtprobenanzahl jeweiliger Vogelspezies.

Tabelle IX. 2: Jahreszeitliche Unterschiede im Nachweis Influenza-A-, H5-, N1-, N2- und N3-positiver Tiere über den gesamten Studienzeitraum, unterteilt nach bayerischen Regierungsbezirken (n. n. = nicht nachgewiesen)

Regierungsbezirk	Jahreszeit	Probenanzahl		AIV positiv		H5-positiv		N1-positiv		N2-positiv		N3-positiv	
		n	% ^a	n	% ^b	n	% ^c						
Oberfranken	Frühjahr (Mrz-Mai)	59	1,0	n. n.		n. n.		n. n.		n. n.		n. n.	
	Sommer (Juni-Aug)	71	1,2	n. n.		n. n.		n. n.		n. n.		n. n.	
	Herbst (Sep-Nov)	77	1,3	11	14,3	1	9,1	n. n.		1	9,1	n. n.	
	Winter (Dez-Feb)	82	1,3	1	1,2	n. n.		1	100,0	n. n.		n. n.	
Oberfranken Gesamt		289	4,7	12	4,2	1	8,3	1	8,3	1	8,3	n. n.	
Unterfranken	Frühjahr (Mrz-Mai)	0	0,0	n. n.		n. n.		n. n.		n. n.		n. n.	
	Sommer (Juni-Aug)	105	1,7	n. n.		n. n.		n. n.		n. n.		n. n.	
	Herbst (Sep-Nov)	61	1,0	2	3,3	n. n.		2	100,0	n. n.		n. n.	
	Winter (Dez-Feb)	89	1,5	2	2,2	n. n.		n. n.		n. n.		n. n.	
Unterfranken Gesamt		255	4,2	4	1,6	n. n.		2	50,0	n. n.		n. n.	
Mittelfranken	Frühjahr (Mrz-Mai)	315	5,2	n. n.		n. n.		n. n.		n. n.		n. n.	
	Sommer (Juni-Aug)	102	1,7	n. n.		n. n.		n. n.		n. n.		n. n.	
	Herbst (Sep-Nov)	61	1,0	3	4,9	n. n.		n. n.		n. n.		n. n.	
	Winter (Dez-Feb)	71	1,2	n. n.		n. n.		n. n.		n. n.		n. n.	
Mittelfranken Gesamt		549	9,0	3	0,5	n. n.		n. n.		n. n.		n. n.	
Oberpfalz	Frühjahr (Mrz-Mai)	60	1,0	n. n.		n. n.		n. n.		n. n.		n. n.	
	Sommer (Juni-Aug)	173	2,8	2	1,2	n. n.		n. n.		1	50	n. n.	
	Herbst (Sep-Nov)	232	3,8	12	5,2	2	16,7	n. n.		1	8,3	1	8,3
	Winter (Dez-Feb)	47	0,8	2	4,3	n. n.		n. n.		n. n.		n. n.	
Oberpfalz Gesamt		512	8,4	16	3,1	2	12,5	n. n.		2	12,5	1	6,3

Tabelle IX. 2, Fortsetzung

Regierungsbezirk	Jahreszeit	Probenanzahl		AIV positiv		H5-positiv		N1-positiv		N2-positiv		N3-positiv	
		n	% ^a	n	% ^b	n	% ^c						
Niederbayern	Frühjahr (Mrz-Mai)	43	0,7	n. n.		n. n.		n. n.		n. n.		n. n.	
	Sommer (Juni-Aug)	205	3,4	n. n.		n. n.		n. n.		n. n.		n. n.	
	Herbst (Sep-Nov)	266	4,4	9	3,4	n. n.		n. n.		n. n.		n. n.	
	Winter (Dez-Feb)	125	2,0	8	6,4	n. n.		1	12,5	n. n.		n. n.	
Niederbayern Gesamt		639	10,5	17	2,7	n. n.		1	5,9	n. n.		n. n.	
Oberbayern	Frühjahr (Mrz-Mai)	1110	18,2	2	0,2	n. n.		n. n.		n. n.		n. n.	
	Sommer (Juni-Aug)	387	6,3	n. n.		n. n.		n. n.		n. n.		n. n.	
	Herbst (Sep-Nov)	751	12,3	53	7,1	4	7,5	5	9,4	1	1,9	n. n.	
	Winter (Dez-Feb)	489	8,0	7	1,4	1	14,3	1	14,3	n. n.		n. n.	
Oberbayern Gesamt		2737	44,8	62	2,3	5	8,1	6	9,7	1	1,6	n. n.	
Schwaben	Frühjahr (Mrz-Mai)	127	2,1	n. n.		n. n.		n. n.		n. n.		n. n.	
	Sommer (Juni-Aug)	76	1,2	n. n.		n. n.		n. n.		n. n.		n. n.	
	Herbst (Sep-Nov)	601	9,8	97	16,1	43	44,3	3	3,1	4	4,1	28	28,9
	Winter (Dez-Feb)	329	5,4	12	3,6	2	16,7	3	25,0	n. n.		n. n.	
Schwaben Gesamt		1133	18,5	109	9,6	45	41,3	6	5,5	4	3,7	28	25,7
Gesamt		6114	100,0	223	3,6	53	23,8	16	7,2	8	3,6	29	13,0

^a bezogen auf Gesamtprobenanzahl 6114.

^b bezogen auf Probenanzahl aus jeweiligem Regierungsbezirk zur entsprechenden Jahreszeit.

^c bezogen auf Influenza-A-positive Proben aus jeweiligem Regierungsbezirk zur entsprechenden Jahreszeit.

Tabelle IX. 3: Verteilung der untersuchten Proben und der nachgewiesenen Influenza-A-Virusinfektionen auf die bayerischen Landkreise von Juli 2007 bis März 2009

Regierungsbezirk	Landkreis	Probenanzahl		AIV positiv		95 %-KI
		n	% ^a	n	% ^b	
Oberfranken	Bayreuth	82	1,34	2	2,44	0,30-8,53
	Wunsiedel	77	1,26	10	12,99	6,41-22,59
	Bamberg	77	1,26	n. n.		0,00-4,68
	Coburg	3	0,05	n. n.		0,00-70,76
	Forchheim	15	0,25	n. n.		0,00-21,80
	Kulmbach	13	0,21	n. n.		0,00-24,71
	Lichtenfels	22	0,36	n. n.		0,00-15,44
Oberfranken Gesamt		289	4,73	12	4,15	2,16-7,14
Unterfranken	Bad Kissingen	54	0,88	2	3,70	0,45-12,75
	Würzburg	4	0,07	2	50,00	6,76-93,24
	Haßberge	8	0,13	n. n.		0,00-36,94
	Aschaffenburg	55	0,9	n. n.		0,00-6,49
	Miltenberg	8	0,13	n. n.		0,00-36,94
	Main-Spessart	5	0,08	n. n.		0,00-52,18
	Rhön-Grabfeld	28	0,46	n. n.		0,00-12,34
	Schweinfurt	93	1,52	n. n.		0,00-3,89
Unterfranken Gesamt		255	4,17	4	1,57	0,43-3,97

Tabelle IX. 3, Fortsetzung

Regierungsbezirk	Landkreis	Probenanzahl		AIV positiv		95 %-KI
		n	% ^a	n	% ^b	
Mittelfranken	Weißenburg-Gunzenhausen	217	3,55	3	1,38	0,29-3,99
	Ansbach	8	0,13	n. n.		0,00-36,94
	Erlangen-Höchstadt	69	1,13	n. n.		0,00-5,21
	Fürth	106	1,73	n. n.		0,00-3,42
	Nürnberg	109	1,78	n. n.		0,00-3,33
	Neustadt an der Aisch	30	0,49	n. n.		0,00-11,57
	Roth	10	0,16	n. n.		0,00-30,85
Mittelfranken Gesamt		549	8,98	3	0,55	0,11-1,59
Oberpfalz	Amberg-Sulzbach	18	0,29	1	5,56	0,14-27,29
	Tirschenreuth	100	1,64	4	4,00	1,10-9,93
	Cham	181	2,96	7	3,87	1,57-7,81
	Regensburg	141	2,31	1	0,71	0,02-3,89
	Schwandorf	71	1,16	3	4,23	0,88-11,86
	Neumarkt	1	0,02	n. n.		0,00-97,50
Oberpfalz Gesamt		512	8,37	16	3,13	1,80-5,03
Niederbayern	Deggendorf	204	3,34	13	6,37	3,44-10,65
	Dingolfing-Landau	30	0,49	2	6,67	0,82-22,07
	Landshut	19	0,31	1	5,26	0,13-26,03

Tabelle IX. 3, Fortsetzung

Regierungsbezirk	Landkreis	Probenanzahl		AIV positiv		95 %-KI
		n	% ^a	n	% ^b	
Niederbayern	Regen	30	0,49	1	3,33	0,08-17,22
	Kelheim	85	1,39	n. n.		0,00-4,25
	Freyung-Grafenau	1	0,02	n. n.		0,0097,50
	Passau	167	2,73	n. n.		0,00-2,18
	Rottal-Inn	96	1,57	n. n.		0,00-3,77
	Straubing-Bogen	7	0,11	n. n.		0,00-40,96
Niederbayern Gesamt		639	10,45	17	2,66	1,56-4,23
Oberbayern	Altötting	133	2,18	8	6,02	2,63-11,51
	Erding	110	1,80	1	0,91	0,02-4,96
	Eichstätt	125	2,04	2	1,60	0,19-5,66
	Freising	135	2,21	4	2,96	0,81-7,41
	Garmisch-Partenkirchen	61	1,64	1	1,64	0,04-8,8
	München	562	9,19	1	0,18	<0,01-0,99
	Neuburg-Schrobenhausen	84	1,37	9	10,71	5,02-19,37
	Pfaffenhofen an der Ilm	220	3,60	31	14,09	9,78-19,4
	Starnberg	224	3,66	2	0,89	0,11-3,19
	Bad Tölz	6	0,10	2	33,33	4,33-77,7
	Traunstein	401	6,56	1	0,25	<0,01-1,38
	Fürstenfeldbruck	54	0,88	n. n.		0,00-6,60

Tabelle IX. 3, Fortsetzung

Regierungsbezirk	Landkreis	Probenanzahl		AIV positiv		95 %-KI
		n	% ^a	n	% ^b	
Oberbayern	Dachau	89	1,46	n. n.		0,00-4,06
	Miesbach	12	0,20	n. n.		0,00-26,46
	Mühldorf am Inn	9	0,15	n. n.		0,00-33,63
	Ebersberg	15	0,25	n. n.		0,00-21,80
	Ingolstadt	58	0,95	n. n.		0,00-6,16
	Rosenheim	278	4,55	n. n.		0,00-1,32
	Landsberg am Lech	142	2,32	n. n.		0,00-2,56
	Weilheim-Schongau	19	0,31	n. n.		0,00-17,65
Oberbayern Gesamt		2737	44,77	62	2,27	1,74-2,89
Schwaben	Augsburg	140	2,29	3	2,14	0,44-6,13
	Dillingen an der Donau	75	1,23	6	8,00	2,99-16,6
	Donau-Ries	409	6,69	89	21,76	17,86-26,08
	Lindau	268	4,38	6	2,24	0,83-4,81
	Unterallgäu	13	0,21	3	23,08	5,04-53,81
	Neu-Ulm	32	0,52	1	3,13	0,08-16,22
	Oberallgäu	30	0,49	1	3,33	0,08-17,22
	Kempton	4	0,07	n. n.		0,00-60,24
	Aichach-Friedberg	135	2,21	n. n.		0,00-2,70

Tabelle IX. 3, Fortsetzung

Regierungsbezirk	Landkreis	Probenanzahl		AIV positiv		95 %-KI
		n	% ^a	n	% ^b	
Schwaben	Memmingen	2	0,03	n. n.		0,00-84,19
	Günzburg	12	0,20	n. n.		0,00-26,46
	Ostallgäu	13	0,21	n. n.		0,00-24,71
Schwaben Gesamt		1133	18,53	109	9,62	7,97-11,49
Gesamt		6114	100	223	3,65	3,19-4,15

^a bezogen auf Gesamtprobenanzahl 6114.

^b bezogen auf Probenanzahl aus jeweiligem Landkreis.

Tabelle IX. 4: Gesamtübersicht über den Nachweis der Subtypkomponenten H1-H13 in den bayerischen Landkreisen (H5-/H7-Subtypisierung nach SPACKMAN et al. (2002), restliche HA-Typen nach RINDER et al. (in Vorbereitung). Bei grau hinterlegten Feldern wurde keine Subtypkomponente nachgewiesen. H7, H8 und H12 wurden im Untersuchungszeitraum nicht nachgewiesen.

Regierungsbezirk	Landkreis	H1	H2	H3	H3/H9	H4	H 5	H6	H9	H9/H10	H10	H11	H13	H13/H6	Gesamt
Oberfranken	WUN		1				1		3	1					6
Unterfranken	KG											1			1
	WÜ			2											2
Mittelfranken	WUG							1							1
Oberpfalz	AS						1								1
	CHA		1				1		1			2			5
	R		1												1
	TIR					1									1
Niederbayern	DEG				1				3						4
	DGF										1				1
	REG	1													1
Oberbayern	AÖ		1				1		2			2			6
	EI											1			1
	FS						1							1	2
	GAP		1												1
	M						1								1
	ND	2													2
	PAF	1					1					14	1		17

Tabelle IX. 4, Fortsetzung

Regierungs- bezirk	Landkreis	H1	H2	H3	H3/ H9	H4	H 5	H6	H9	H9/ H10	H10	H11	H13	H13/ H6	Gesamt
Oberbayern	STA						1								1
	TÖL					2									2
	TS											1			1
Schwaben	A						1								1
	DLG		1				2	1			1	1			6
	DON	4		4			41	5				4			58
	LI						1	1			1		1		4
	MN								2			1			3
Gesamt		8	6	6	1	3	53	8	11	1	3	27	2	1	130

Tabelle IX. 5: Gesamtübersicht über den Nachweis der Subtypkomponenten N1-N3, N6 und N9 in den bayerischen Landkreisen. In Mittelfranken und bei grau hinterlegten Feldern wurde keine der angegebenen Subtypkomponenten nachgewiesen.

Regierungsbezirk	Landkreis	N1	N2	N3	N6	N9	Gesamt
Oberfranken	BT	1					1
	WUN		1				1
Unterfranken	WÜ	2					2
Oberpfalz	AS			1			1
	CHA		2				2
Niederbayern	REG	1					1
Oberbayern	M		1				1
	ND	4					4
	PAF	1				3	4
	STA	1					1
	TÖL				2		2
Schwaben	A	1					1
	DLG	1		2			3
	DON	3	4	26			33
	LI	1					1
Gesamt		16	8	29	2	3	58

X. DANKSAGUNG

Zum Schluss möchte ich allen herzlich danken, die zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben:

Frau PD Dr. Monika Rinder danke ich ganz herzlich für die Hilfestellung während der Erstellung und Korrektur dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Dr. M. Büttner danke ich für die stetige und effektive Unterstützung bei der Umsetzung der Thematik und die Bereitstellung des Arbeitsplatzes.

Herrn Univ-Prof. Dr. R. Korbel danke ich für die Überlassung des Themas und die Unterstützung und Hilfestellung.

Vielen Dank an das Bayerische Staatsministerium für Umwelt, Gesundheit und Verbraucherschutz, das die Studie in Auftrag gegeben und finanziert (Projekt 07-04) hat.

In ganz besonderer Weise möchte ich mich beim gesamten Team der Veterinär-Virologie und vor allem bei Sandra Müller und Isabella Stöhr für die tatkräftige Hilfe und unerschöpfliche Geduld bei vielen Fragestellungen bedanken. Vielen Dank auch an Susanne Gellert und Heike Lang für die Hilfestellung und Unterstützung.

Frau Sauter-Louis von der Klinik für Wiederkäuer herzlichen Dank für die Unterstützung bei der statistischen Beurteilung meiner Daten.

Für sein Engagement vielen Dank an Herrn Egbert Urbach vom Landesjagdverband Bayern und den vielen fleißigen probensammelnden Jägern in Bayern.

Ein großer Dank geht auch an die Vogelwarte Garmisch-Partenkirchen für die Bereitstellung des Kanonennetzes und die jederzeit gewährte Hilfestellung.

Ein Dankeschön auch an Caroline, ohne die das Lebendmonitoring nicht umsetzbar gewesen wäre.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mir meinen Werdegang ermöglicht und mich stets unterstützt haben und meinem Freund Kurt für die moralische Unterstützung und unermüdliche Hilfe.