

Aus dem Institut für Geflügelkrankheiten
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

**Untersuchungen zum Vorkommen von aviären Influenzaviren bei
synanthropen Tauben, bei Beizvögeln, deren Beutewild sowie bei
Falknern**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Veterinärmedizin
an der
Freie Universität Berlin

vorgelegt von
Andrea Kohls
Tierärztin aus Henstedt-Ulzburg

Berlin 2010
Journal-Nr. 3378

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Prof. Dr. Leo Brunnberg
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Hafez Mohamed Hafez
Zweiter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Klaus Osterrieder
Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Karl-Hans Zessin

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

Pigeons, falconidae, birds of prey, wild birds, urban areas, avian influenza, avian influenza a viruses, human diseases, disease transmission, zoonoses, epidemiology, Germany

Tag der Promotion: 26.03.2010

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

ISBN: 978-3-86664-776-3

Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2010

Dissertation, Freie Universität Berlin

D 188

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

Coverbild © Frank Seifert

alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© mensch und buch verlag 2010

choriner str. 85 - 10119 berlin

verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

INHALT

1	EINLEITUNG UND ZIELE DER ARBEIT	1
2	LITERATURÜBERSICHT.....	3
2.1	Aviäre Influenza	3
2.1.1	Ätiologie	3
2.1.2	Allgemeines Wirtsspektrum.....	5
2.1.3	Übertragung	6
2.1.4	Klinik und Pathologie.....	6
2.1.5	Diagnostik	9
2.1.6	Bekämpfung und Prophylaxe	14
2.1.7	Seuchengeschehen durch hochpathogene AIV.....	15
2.2	Aviäre Influenzavirusinfektionen bei Tauben.....	22
2.2.1	Experimentelle Infektionsstudien.....	22
2.2.2	Natürliche Infektionen	35
2.2.3	Serologische Untersuchungen	38
2.3	Aviäre Influenzavirusinfektionen bei Greifvögeln	39
2.3.1	Experimentelle Infektionsstudien.....	39
2.3.2	Natürliche Infektionen	40
2.3.3	Serologische Untersuchungen	44
2.4	Aviäre Influenzavirusinfektionen beim Menschen.....	45
2.4.1	Experimentelle und natürliche Infektionen.....	45
2.4.2	Mechanismen der Wirtszellrestriktion.....	50
2.4.3	Risikofaktoren für humane AIV-Infektionen	53
3	MATERIAL UND METHODEN	55
3.1	Organisation der Probennahme.....	55
3.2	Art der Proben.....	55
3.3	Technik der Probennahme	56
3.4	Aufbereitung und Asservierung des Probenmaterials.....	58
3.5	Virologische Untersuchungen	58
3.5.1	Virusisolierung im SPF-Hühnerei	58
3.5.2	Hämagglutinationstest.....	59
3.5.3	Hämagglutinationshemmtest.....	59
3.6	Molekularbiologische Untersuchungen	60
3.6.1	Extraktion der RNA	60

3.6.1.1	Manuelle RNA-Präparation.....	61
3.6.1.2	Automatisierte RNA-Präparation.....	61
3.6.2	Untersuchungen mittels RT-qPCR	61
3.6.2.1	Nachweis von Influenza A Virus-RNA sowie AIV H5-subtypspezifischer RNA	61
3.6.2.2	Nachweis von AIV H6- und H9-subtypspezifischer RNA.....	65
3.6.2.3	Nachweis von APMV-1-spezifischer RNA.....	65
3.6.3	Untersuchungen mittels Nested-RT-PCR.....	66
3.6.3.1	Nachweis des AIV Subtyps H7	66
3.6.4	Sonstige Untersuchungen zur Subtypisierung.....	67
3.7	Serologische Untersuchungen	68
3.7.1	Agargelpräzipitationstest.....	68
3.7.2	Kompetitiver ELISA zum Nachweis von Antikörpern gegen Influenza A Virus ...	69
3.7.3	Hämagglutinationshemmtest.....	70
3.7.4	Mikroneutralisationstest.....	70
3.8	Verwendete Virusstämme, Kontrollseren und Zelllinien.....	73
3.9	Verwendete Software.....	74
3.10	Auswertung der nationalen Wildvogeldatenbank.....	74
4	ERGEBNISSE.....	77
4.1	Untersuchungen zur Etablierung von Methoden.....	77
4.2	Untersuchung der Stadt-und Wildtauben.....	80
4.2.1	Untersuchungsgut.....	80
4.2.1.1	Herkunft und Anzahl der Proben	80
4.2.1.2	Zeitliche Verteilung der Probennahme.....	82
4.2.2	Untersuchungsergebnisse.....	82
4.2.2.1	Virologische Untersuchungen.....	82
4.2.2.2	Molekularbiologische Untersuchungen	83
4.2.2.3	Serologische Untersuchungen.....	83
4.2.3	Auswertung der nationalen Wildvogeldatenbank.....	83
4.3	Untersuchung von Beizvögeln, deren Beutewild sowie Falknern	84
4.3.1	Untersuchungsgut.....	84
4.3.1.1	Anzahl der Proben.....	84
4.3.1.2	Zeitliche Verteilung der Probennahme.....	85
4.3.2	Auswertung der Fragebögen.....	86
4.3.2.1	Anzahl der Beizvogelarten.....	86
4.3.2.2	Altersverteilung der Beizvögel	87

4.3.2.3	Angaben zur Fütterung und zu Vorerkrankungen der Beizvögel.....	87
4.3.2.4	Herkunft der Beutetiere	88
4.3.2.5	Anzahl der Beutetierarten.....	89
4.3.2.6	Herkunft der Falknerproben.....	92
4.3.2.7	Geschlechter- und Altersverhältnis der Falkner	93
4.3.2.8	Grippeimpfungen der Falkner	94
4.3.2.9	Angaben über die Jagdtätigkeiten der Falkner	95
4.3.3	Untersuchungsergebnisse der Beizvögel	95
4.3.3.1	Virologische Untersuchungen.....	95
4.3.3.2	Molekularbiologische Untersuchungen	95
4.3.3.3	Serologische Untersuchungen.....	95
4.3.4	Untersuchungsergebnisse der Beutetiere	96
4.3.4.1	Virologische Untersuchungen.....	96
4.3.4.2	Molekularbiologische Untersuchungen	96
4.3.4.3	Auswertung der nationalen Wildvogel­datenbank	98
4.3.5	Untersuchungsergebnisse der Falkner.....	100
4.3.5.1	Serologische Untersuchungen.....	100
5	DISKUSSION.....	101
6	ZUSAMMENFASSUNG.....	119
7	SUMMARY	121
8	LITERATUR.....	123
	ANHANG 1	167
	ANHANG 2.....	173
	ANHANG 3.....	177
	ANHANG 4.....	179

Verwendete Abkürzungen

AF	Allantoisflüssigkeit
AG	Antigen
AGP	Agargelpräzipitationstest
AH	Allantoishöhle
AI	Aviäre Influenza
AIV	Aviäres Influenza A Virus
AK	Antikörper
APMV-1	Aviäres Paramyxovirus vom Serotyp 1
°C	Grad Celsius
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DIVA	Differentiating Infected from Vaccinated Animals (engl. "Methode zur Differenzierung von geimpften und infizierten Tieren")
Dpi	Days post infectionem (engl. "Tage nach der Infektion")
H	Hämagglutinin
HA	Hämagglutinationstest
HAE	Hämagglutinierende Einheit
HAH	Hämagglutinationshemmtest
HPAI	Hochpathogene Aviäre Influenza
HPAIV	Hochpathogenes Aviäres Influenza A Virus
IBDV	Infectious Bursal Disease Virus (engl. „Infektiöse Burstitis Virus“)
IBV	Infectious Bronchitis Virus (engl. „Infektiöses Bronchitis Virus“)
IC	Intrazerebral (lat. <i>Intra-</i> „hinein“, <i>cerebrum</i> „Gehirn“)
IM	Intramuskulär (lat. <i>Intra-</i> „hinein“, <i>musculus</i> „Muskel“)
IN	Intranasal (lat. <i>Intra-</i> „hinein“, <i>nasus</i> „Nase“)
IO	Intraokulär (lat. <i>Intra-</i> „hinein“, <i>occulus</i> „Auge“)
IV	Intravenös (lat. <i>Intra-</i> „hinein“, <i>vena</i> „Vene“)
IVPI	Intravenöser Pathogenitätsindex
K. A.	Keine Angabe
LGM	Lebendgeflügelmärkte
min	Minuten
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar

N	Neuraminidase
nm	Nanometer
NPAI	Niedrigpathogene Aviäre Influenza
NPAIV	Niedrigpathogenes Aviäres Influenza A Virus
o. A.	Ohne Altersangabe
o.b.B.	Ohne besonderen Befund
OIE	Office Internationale des Epizooties (franz. „Internationales Tierseuchenamt“)
PBS	Phosphate Buffered Saline (engl. „Phosphatgepufferte Kochsalzlösung“)
PCR	Polymerase Chain Reaction (engl. „Polymerase-Ketten-Reaktion“)
pH	Negativer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
ReoV	Reoviren
RNA	Ribonucleic acid (engl. „Ribonukleinsäure“)
RNP	Ribonukleoproteinkomplex
rpm	rounds per minute (engl. „Umdrehungen pro Minute“)
RT-qPCR	Realtime Reverse Transkriptase Polymerase-Ketten-Reaktion
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerase-Ketten-Reaktion
SC	Subkutan (lat. <i>sub-</i> „unter“, <i>cutis</i> „Haut“)
SPF	Spezifiziert pathogen frei
TBE	Tris-Borat-Elektrophoresepuffer
TRTV	Turkey Rhinotracheitis Virus (engl. „Rhinotracheitis-Virus der Puten“)
VI	Virusisolierung

1 EINLEITUNG UND ZIELE DER ARBEIT

Die Aviäre Influenza (AI) ist eine bei domestiziertem Geflügel und Wildvögeln vorkommende, hochkontagiöse Viruserkrankung mit zooanthroponotischem Potential. Je nach Pathogenität der aviären Influenza A Viren (AIV) für terrestrisches Geflügel, wird die „Niedrigpathogene Aviäre Influenza“ (NPAI) von der „Hochpathogenen Aviären Influenza“ (HPAI) abgegrenzt. Bei Letzterer handelt es sich um eine wichtige, in der Liste des „Internationalen Tierseuchenamtes“ (OIE) aufgeführte und in Deutschland anzeigepflichtige Tierseuche. Die HPAI führt weltweit zu drastischen ökonomischen Verlusten durch Tierverluste, Bekämpfungsmaßnahmen und Handelsbeschränkungen in der Geflügelindustrie. Insbesondere seit der globalen Verbreitung des Subtyps HPAIV H5N1 in Asien, Afrika und Europa ist die AI unter dem von den Medien geprägten Begriff „Vogelgrippe“ erstmalig auch in das öffentliche Interesse gelangt. Ausschlaggebend hierfür waren und sind über das bekannte Maß hinausgehende, in über der Hälfte der Fälle tödlich verlaufende Infektionen des Menschen mit aviären Influenzaviren. Als Infektionsquelle spielen der enge Kontakt zu HPAIV H5N1-erkranktem Geflügel und kontaminierten Geflügelprodukten sowie Wildvögeln, welche an HPAIV H5N1 verendeten, eine wesentliche Rolle. Nicht zuletzt geschürt durch die Medien machte sich unter der Bevölkerung die Befürchtung breit, dass es sich bei HPAIV H5N1 um einen Vorläufer eines neuen, gefährlichen Pandemievirus handeln könnte. Dieser würde unter Umständen, nach effizienter Übertragung von Mensch zu Mensch, eine neue weltweite Influenzawelle mit mehreren Millionen Toten unter der Bevölkerung verursachen können. Darüber hinaus lassen weitere Tatsachen diesen Erreger einzigartig unter den AIV erscheinen. HPAIV H5N1 verursachte eine bislang unbekannt hohe Anzahl von verendeten oder gekeulten Geflügels (bislang >150 Millionen Tiere). Außerdem führte er erstmals in der Geschichte auch zu einem massenhaften Wildvogelsterben. Schließlich zirkulierte weder ein AIV für eine so ungewöhnlich lange Zeit (seit 1996 anhaltend), noch wurde eine so großräumige Verbreitung wie der von HPAIV H5N1 über mehrere Kontinente bislang beschrieben. Die weltweite HPAIV H5N1-Pandemie blieb jedoch bislang aus. Dennoch führt, trotz abgerissenen Medieninteresses, HPAIV H5N1 in weiten Teilen Asiens und Afrikas nach wie vor zu Infektionen bei Vogel und Mensch. In dieser Arbeit sollten daher zwei epidemiologische Fragestellungen mit humanmedizinischem Bezug erörtert werden.

Tauben (*Columba livia*) bewegen sich als „Brückenspezies“ frei zwischen Wildvögeln und im Freiland gehaltenem Wirtschaftsgeflügel. Sie könnten daher womöglich einen Vektor zum AIV-Eintrag in Letztere darstellen. Darüber hinaus kommen vor allem Stadttauben (*C. livia f. urbana*) in Ballungsräumen auch mit Menschen, sowie jagdlich genutzte Wildtauben (in erster Linie Ringeltauben (*Columba palumbus*)) mit Jägern und Förstern in engen Kon-

takt. Aktuelle experimentelle Empfänglichkeitsstudien an Tauben gegenüber verschiedenen HPAIV H5N1-Isolaten ergaben widersprüchliche Angaben. Unter dem besonderen Aspekt der Humangesundheit sollen für den ersten Teil dieser Studie daher Stadttauben aus deutschen Städten gefangen sowie Proben von Wildtauben in Zusammenarbeit mit Jägern akquiriert werden. Aus diesen Proben ergibt sich für diese Arbeit folgendes Ziel:

- ❖ Erhebung des natürlichen Infektionsstatus von Stadttauben und geschossenen Wildtauben mit AIV, unter der besonderen Berücksichtigung von HPAIV H5N1, in Deutschland.

Bei Greifvögeln wurden AIV-Infektionen bislang selten beschrieben. Allerdings befanden sich im Zuge der weltweiten HPAIV H5N1-Ausbrüche in mehreren Ländern, hierunter auch in Deutschland, unter den positiv getesteten Vögeln auch mehrere Wildgreife. Während Wildgreife im Zuge des nationalen AI-Wildvogelmonitorings auf das Vorkommen von AIV untersucht worden sind, war dies bei falknerisch gehaltenen Greifvögeln („Beizvögeln“) bislang nicht der Fall. Allerdings wurden außerhalb Deutschlands in jüngster Zeit ebenso aus Beizvögeln mehrfach HPAIV H5N1-Stämme isoliert. Wildlebende als auch falknerisch gehaltene Greife haben durch die Jagd möglicherweise Kontakt zu AIV-tragenden Beutetieren und können sich an diesen infizieren. Dies insbesondere, da Greifvögel geschwächte Beutetiere bevorzugt fangen und somit ein vermutlich höheres Risiko tragen, mit AIV in Kontakt zu kommen. Infizierte Beizvögel sowie Beutetiere kommen wiederum in engen Kontakt zum Falkner. Dieser könnte sich dadurch anstecken. Da Falkner zudem Kontakt zu humanen Influenzaviren haben, ist denkbar, dass die Beizjagd (die Jagd mit Beizvögeln) eine besondere Rolle in der Epidemiologie der Aviären Influenza sowie in der Entstehung neuer Pandemieviren spielen könnte. Um dieses Risiko zu bewerten, sollte eine Feldstudie in Zusammenarbeit mit dem Robert Koch-Institut (RKI) und einem deutschen Falknerverband, dem Deutschen Falkenorden (DFO), auf den Weg gebracht werden. Folgende Ziele sind für diese Studie festzuhalten:

- ❖ Epidemiologische Untersuchungen zum Vorkommen von AIV bei Beizvögeln;
- ❖ Gleichzeitige Untersuchung von deren Beutetieren (ausschließlich Flugwild), um diese als mögliche Ansteckungsquelle der untersuchten Beizvögel zu erkennen;
- ❖ Untersuchung der Falkner, um das Risiko der Ansteckung durch die Falknerei einzuschätzen.

2 LITERATURÜBERSICHT

2.1 Aviäre Influenza

2.1.1 Ätiologie

Die Aviäre Influenza (AI) wird durch Influenza A Viren aus der Familie der *Orthomyxoviridae* verursacht. Diese behüllten Viren besitzen ein geteiltes Genom, bestehend aus acht Segmenten negativ-strängiger RNA. Anhand der antigenen Eigenschaften ihrer Nukleo- (NP) und Matrixproteine (M) werden Influenza A Viren innerhalb der *Orthomyxoviridae* von Influenza B, C, Thogoto- und Isaviren abgegrenzt. In die Virushülle sind die beiden transmembranalen Glykoproteine „Hämagglutinin“ (H) und „Neuraminidase“ (N) eingelagert. Diese werden zur weiteren Subtypisierung herangezogen. Bis zum heutigen Zeitpunkt sind 16 antigenetisch verschiedene H und neun unterschiedliche N bekannt (Fouchier et al., 2005). Anhand der Kombination dieser in der Virushülle (z.B. H1N1, H5N1, H7N3) können theoretisch 256 verschiedene Subtypen resultieren. Einige Stämme ursprünglich aviärer Influenza A Viren (AIV) haben sich im Laufe der Zeit an verschiedene Vogel- und Säugetierwirte adaptiert. Innerhalb dieser Spezies haben sie eigene Linien (Hauptlinien) ausgebildet, innerhalb welcher sie zirkulieren (Webster et al., 1992). Anhand von Nukleotidsequenzanalysen des NP werden derzeit acht Hauptlinien unterschieden: eurasische und nordamerikanische Vogellinie (beide diverse Subtypen), Möwenlinie (H13Nx), equine Linie Typ I und II (H7N7 und H3N8), klassische und vogelähnliche europäische Schweinelinie (H1N1, H3N2) sowie eine humane Linie (H1N1, H2N2, H3N2) (Gorman et al., 1991).

Gemäß ihrer Pathogenität im Geflügel werden AIV in Pathotypen eingeteilt. Solche AIV, welche im terrestrischen Geflügel schwere Krankheitsverläufe mit einer hohen Morbidität und Mortalität verursachen, werden als „Hochpathogene aviäre Influenzaviren“ (HPAIV) bezeichnet und von den ungleich häufiger vorkommenden „Niedrigpathogenen aviären Influenzaviren“ (NPAIV) abgegrenzt. Die „Hochpathogene Aviäre Influenza“ (HPAI, frühere Bezeichnung „Geflügelpest“) verursacht schwere ökonomische Verluste in der Geflügelindustrie. HPAI-Ausbrüche werden daher als anzeigepflichtige Erkrankung tierseuchenrechtlich geregelt. Bis zum heutigen Zeitpunkt wurden HPAI-Ausbrüche nur durch einzelne H5- und H7-Subtypen verursacht. Die Mehrzahl dieser Subtypen sind jedoch den NPAIV zuzuordnen (Swayne und Suarez, 2000). Nach der Definition der „Verordnung zum Schutz gegen die Geflügelpest“ vom 18.10.2007, liegt die anzeigepflichtige HPAI dann vor, wenn (1) eine Infektionskrankheit beim Geflügel oder bei Wildvögeln durch ein Influenza A Virus mit einem intravenösen Pathogenitätsindex (IVPI) in sechs Wochen alten Hühnern von $\geq 1,2$ verursacht

wird, bzw. (2) eine Infektion mit den AIV-Subtypen H5 und H7, bei der im Rahmen einer Nukleotid-Sequenzanalyse das Vorhandensein multipler basischer Aminosäuren im Spaltbereich des H nachgewiesen wurde, auftritt (Anonym 2007c).

Punkt zwei der obigen Definition erklärt sich dahingehend, dass eine Hauptdominante der Virulenz von AIV durch die Aminosäuresequenz im Spaltbereich des H determiniert wird (Horimoto und Kawaoka, 1994; Senne et al., 1996). Vor der Infektion einer Zelle muss das Hämagglutinin in zwei Untereinheiten gespalten werden. HPAIV besitzen eine multibasische Spaltstelle. Die Spaltung erfolgt durch ubiquitär im Körper vorhandene Proteasen (Webster et al., 1986; Perdue et al., 1996; Perdue et al., 1997). Dadurch können sich HPAIV grundsätzlich systemisch verbreiten. Die monobasischen Spaltstellen der NPAIV können dagegen nur durch Proteasen, welche sich im Respirations- (RT) und Gastrointestinaltrakt (GIT) befinden, gespalten werden. Daher bleiben NPAIV auf diese Organsysteme beschränkt.

Influenza A Viren zeichnen sich durch eine hohe genetische Variabilität aus. Austauschraten von bis zu einem Nukleotid pro Genom und Replikationszyklus wurde von Drake (1993) beschrieben. Punktmutationen im H und N können zu einer langsamen, stetigen Veränderung der antigenetischen Eigenschaften führen (sogenannter „Antigendrift“). Im Wassergeflügel scheinen AIV in einem evolutionären Gleichgewicht zu stehen, so dass Antigendrift bisher hauptsächlich bei terrestrischen Geflügelarten nachgewiesen wurde (Kida et al., 1987; Webster et al., 1992). Neben Mutationen innerhalb eines Genomsegments können Influenza A Viren, unter der Voraussetzung, dass zwei verschiedene Subtypen gleichzeitig eine Zelle infizieren, komplette Segmente austauschen (sogenanntes „Reassortment“). Werden H und/oder N zwischen humanen und nicht-humanen (z.B. aviären) Influenza A Viren ausgetauscht, können „problematische“ Subtypen resultieren, gegen welche in der menschlichen Bevölkerung keine Antikörper existieren (sogenannter „Antigenshift“) (Scholtissek, 2006). In solchen Fällen könnte es zum Ausbruch einer Influenzapandemie kommen.

AIV sind in der Umwelt recht instabil und werden durch Hitze (sofortiges Absterben bei 70°C), extreme pH-Werte (< pH 6 und > pH 8), hypertone Medien und Trockenheit inaktiviert, ebenso durch UV-Strahlen (Stettmund von Brodorotti und Mahnel, 1982). Organisches Material hat einen stabilisierenden Effekt. Ebenso können AIV im kühlen und wässrigen Milieu eine relativ hohe Überlebensfähigkeit behalten. Beispielsweise blieben aus Wildvögeln isolierte LPAIV bei einer Wassertemperatur von 17°C für 207 Tage, bei 28°C für 102 Tage infektiös. Erhöhte Salzwerte oder pH-Werte im Wasser verkürzten die Überlebenszeiten für AIV bei beiden Temperaturen (Stallknecht et al., 1990a, b; Brown et al., 2007). Im Eis können AIV über mehrere Jahre infektiös bleiben (Yilmaz und Kaleta, 2004).

2.1.2 Allgemeines Wirtsspektrum

Das natürliche Wirtsspektrum von AIV umfasst Hausgeflügel und Wildvögel aus mindestens zwölf taxonomischen Ordnungen, 26 Vogelfamilien und 105 Vogelspezies (Stallknecht und Shane 1988; Olsen et al., 2006). Die Mehrzahl der Isolate stammen hierbei aus Wasservögeln, insbesondere Vertretern der Ordnungen „Gänsevögel“ (*Anseriformes*) und „Wat- und Möwenvögel“ (*Charadriiformes*). Bei diesen kommen NPAIV aller bislang nachgewiesenen H- und N-Subtypen vor. Ohne selber zu erkranken, beherbergen und passagieren Spezies dieser Ordnungen somit eine Vielzahl verschiedener AIV und das Vorhandensein mehrerer Subtypen in einem Vogel fördert die Entstehung neuer Virusreassortanten (Sharp et al., 1997; Hatchette et al., 2004). Wasservögel stellen somit ein natürliches Influenza A Virus-Reservoir für Wirtschaftsgeflügel und Säugetiere dar (Webster et al., 1992; Alexander, 2000). Im hochempfindlichen Geflügel können NPAIV durch Tierpassagen eine Virulenzsteigerung erfahren und die HPAI hervorrufen (Banks et al., 2000; Cilloni et al., 2010). Die prinzipielle Vorstellung, dass bei Wildvögeln gemeinhin NPAIV vorkommen, wurde widerlegt, als während der bis heute anhaltenden HPAI H5N1-Ausbrüche auch massenhaft Wildvögel verstarben. Der Erreger konnte ferner in asymptomatisch infizierten Wildvögeln nachgewiesen werden (siehe Kapitel 2.1.7) (FLI, 2008a).

Obgleich gemeinhin eine Übertragung von AIV auf Säugetiere nicht stattfindet, konnten manche Subtypen auch schon in verschiedenen Säugetierspezies (Tabelle 2.1) sowie im Menschen (siehe Kapitel 2.4.) nachgewiesen werden.

Tabelle 2.1: Säugetierspezies mit natürlichen AIV-Infektionen

Säugetierart	AIV-Subtypen	Referenz
Schwein (<i>Sus scrofa</i>)	H1N1, H3N2, H9N2	Pensaert et al., 1981 Scholtissek et al., 1983 Xu et al., 2004
Katzenartige (<i>Felidae</i>)	H5N1	Keawcharoen et al., 2004 Leschnik et al., 2007 Marschall und Hartmann, 2008
Hund (<i>Canis lupus</i>)	H3N2, H3N8, H5N1	Harder und Vahlenkamp, 2009b Songserm et al., 2006b
Pferd (<i>Equus ferus caballus</i>)	H3N8, H7N7	Van Maanen und Cullinae, 2002
Nerz (<i>Neovison vison</i>)	H10N4	Klingeborn et al., 1985
Steinmarder (<i>Martes foina</i>)	H5N1	Globig et al., 2009
Seehund (<i>Pinnipedia</i>)	H3N3, H4N5, H7N7	Geraci et al., 1982, Callan et al., 1995 Webster et al., 1981
Wale (<i>Cetacea</i>)	H1N3, H13N2, H13N9	Hinshaw et al., 1986; Lvov et al., 1978

2.1.3 Übertragung

Die Ausscheidung von AIV erfolgt über Kot, Sekrete des Respirations- und Reproduktionstraktes, über Federfollikel sowie Tränenflüssigkeit (Swayne, 2008; Yamamoto et al., 2008). Der Erreger wird oral, nasal oder über kontaminierte Samenflüssigkeit aufgenommen. Die Übertragung erfolgt auf horizontalem Wege über direkte oder indirekte Vektoren (Insekten, Wasser, Futter, Personen, Geflügelprodukte). Eine vertikale Übertragung findet theoretisch statt. Es kommt allerdings meist nicht zum Schlupf der Küken, da die infizierten Embryonen zuvor absterben (Swayne, 2008).

In den Reservoirspezies wird der Erreger in großen Mengen repliziert und mit dem Kot ausgeschieden (Webster et al., 1978). Begünstigt durch hohe Populationsdichten an Brut-, Futter- sowie Vogelzug-Rastplätzen, der relativ hohen Tenazität von AIV im Wasser sowie des koprophagialen Verhaltens der meisten Entenspezies, findet eine rege Virusübertragung auf fäkal-oralem Wege statt (Hinshaw et al., 1979, Stallknecht et al., 1990b; Webster et al., 1992; Brown et al., 2007).

Für HPAIV H5N1 ist darüber hinaus eine Infektion von karnivoren Vögeln und Säugetieren durch den Verzehr infektiösen Fleisches nachgewiesen worden (Keawcharoen et al., 2004; Songserm et al., 2006a, Songserm et al., 2006b, Khan et al., 2009). Auch hat in einem Fall für die Entstehung humaner HPAIV H5N1-Fälle der Verzehr rohen Entenblutes eine Rolle gespielt (Apisarnthanarak et al., 2004).

2.1.4 Klinik und Pathologie

Die klinischen sowie pathologischen Bilder von AIV sind, abhängig vom Wirt (Art, Alter, Immunstatus), des Erregers (Virusstamm, Pathotyp, Infektionsdosis) sowie Umweltfaktoren (Haltungs-, Fütterungs-, Hygienebedingungen, Klima), sehr variabel und unspezifisch.

Bei wildlebenden Wasservögeln verlaufen Infektionen mit **NPAIV** in der Regel subklinisch (Webster et al., 1992). In domestizierten Enten und Gänsen verlaufen NPAIV-Infektionen oft asymptomatisch, gelegentlich können jedoch respiratorische Symptome auftreten. Bei den hochempfindlichen Hühnern (*Gallus gallus*) und Puten (*Meleagris gallopavo f. dom.*) verursachen diese dagegen eine hohe Morbidität (> 50 %) bei geringer Mortalität (< 5 %). Die Sterblichkeit kann in Verbindung mit Sekundärfaktoren allerdings weitaus höher liegen (Capua et al., 2000a). Während beim Wassergeflügel alle bekannten H-Subtypen regelmäßig vorkommen, wurde aus Hühnern und Puten bislang fast ausschließlich H5, H6, H7 und H9 isoliert (Alexander, 2003; Senne, 2003; Hafez et al., 2003; Kaleta et al., 2005). Respirations-, Digestions- und Urogenitaltrakt können betroffen sein. Neben einem schlechten Allgemeinbefinden umfassen die häufigsten klinischen Symptome einen milden bis mäßigen Schnupfen sowie Abfall der Legeleistung (Mutinelli et al., 2003). Zu den pathologisch-

anatomischen Veränderungen zählen Rhinitis, Sinusitis und Bronchopneumonien. Diese treten durch sekundäre bakterielle Infektionen häufig mukopurulent in Erscheinung. Die Eierstöcke können gerötet und rückgebildet sowie der Legedarm stark entzündet sein. Über einen respiratorischen Krankheitsverlauf in Laufvögeln (*Struthioniformes*) berichten Swayne et al. (1996).

Infolge einer Infektion mit **HPAIV** bei Hühnern und Puten können innerhalb weniger Stunden Morbiditäts- und Mortalitätsraten von bis zu 100 % erreicht werden. Die Tiere versterben vielfach ohne vorherige klinische Krankheitsanzeichen. Allerdings können zyanotische Verfärbungen sowie Schwellungen der Kopfanhänge, petechiale Blutungen an den Ständern und Durchfälle in Erscheinung treten. In weniger perakuten Fällen treten öfter zentralnervöse Symptome auf. Pathologisch-anatomische Befunde umfassen eine Hyperämie diverser Organe und petechiale Blutungen an den Serosen, Herzkranzfett und in der Drüsenmagenschleimhaut. Juvenile Laufvögel reagierten auf eine natürliche Infektion mit HPAIV H7 mit respiratorischen sowie zentralnervösen Symptomen (Capua et al., 2000b). Die Infektion kommerzieller Moschusenten (*Cairina moschata*) und Hausgänse (*Anser anser* var. *domestica*) mit einem HPAIV H7N1 in Italien induzierte zentralnervöse Symptome und Todesfälle (Capua und Mutinelli, 2001).

Bei Wildvögeln wurde neben dem Seuchengeschehen durch HPAIV H5N1 nur im Jahr 1961 eine AIV-Epidemie, hervorgerufen durch HPAIV H5N3, beobachtet. Hierbei verendeten circa 1300 Flusseeeschwalben (*Sterna hirundo*) unter den Symptomen einer Bewegungsunfähigkeit und Diarrhoe (Rowan, 1962; Becker, 1966).

Ausgelöst durch HPAIV H5N1 Asia entwickelten sowohl Wirtschaftsgeflügelpezies als auch verschiedene Wild- und Ziervogelarten nach natürlicher sowie experimenteller Infektion klinische Symptome mit nachfolgenden Todesfällen. Nach experimenteller Infektion verschiedener Vogelarten mit einem HPAIV H5N1 aus dem Jahr 1997 konnten diese, anhand der Virusreplikation, der pathologisch-anatomischen Veränderungen, der Morbidität sowie Mortalität, in vier Gruppen eingeteilt werden. Gruppe 1 bestand aus Hühnervögeln und Zebrafinken (*Taeniopygia guttata*). Tiere dieser Gruppe zeigten eine systemische Infektion mit HPAIV H5N1. Die Morbidität lag bei 100 %, die Mortalität bei 75 %. Die Vögel verstarben perakut und zeigten höchstens für eine kurze Zeit zentralnervöse Symptome. Virus konnte in allen parenchymatösen Organen nachgewiesen werden. Gänse (*Anser anser dom.*), Emus (*Dromaius novaehollandiae*), Finken (*Caprodacus mexicanus*) und Wellensittiche (*Melopsittacus undulatus*) bildeten die zweite Gruppe. In dieser verlief der Krankheitsverlauf protrahierter, mit einer geringeren Mortalität. Das Virus zeigte in diesen Spezies einen starken Tropismus für das Zentralnervensystem. Herz und Bauchspeicheldrüse waren öfter betroffen. In der dritten Gruppe, bestehend aus Pekingenten, Haussperlingen (*Passer dom.*) und

Aztekenmöwen (*Larus atricilla*), replizierte sich das Virus in nur geringen Titern, hauptsächlich im Respirationstrakt. In dieser Gruppe fielen keine Todesfälle an. Tauben und Stare (*Sturnus vulgaris*) zeigten überhaupt keine Anzeichen einer Infektion und bildeten die Gruppe 4 (Perkins und Swayne, 2001; 2002a; b; 2003a; b). Verschiedene andere Studien an domestizierte Enten sowie Wildenten, in erster Linie Jungtiere, zeigten, dass diese mit einigen HPAIV H5N1-Stämmen aus Asien unter Ausbildung zentralnervöser Störungen und Todesfällen experimentell infiziert werden konnten, wobei andere HPAIV H5N1-Virusisolate lediglich subklinische Infektionen auslösten (Perkins und Swayne, 2002a; Perkins und Swayne, 2003a; Sturm-Ramirez et al., 2004; Brown et al., 2006; Pantin-Jackwood und Swayne, 2007).

Bei den natürlichen HPAIV H5N1-Infektionen der Subklade 2.2 in Wildvögeln in Deutschland zeigten diese speziesabhängige pathogenetische Verlaufsformen. Schwäne, Gänse, Tauchenten und Möwen zeigten Läsionen, welche einer typischen HPAIV H5N1-Infektion des Geflügels entsprachen (Teifke et al., 2007; Globig et al., 2009). Bei verendeten Schwänen aus Deutschland konnten neben Blutungen in zahlreichen Organen auch Pankreasnekrosen, pulmonale Ödeme sowie subepikardiale Hämorrhagien festgestellt werden. Histologische Befunde umfassten akute Pankreasnekrosen, eine multifokale, nekrotisierende Hepatitis sowie eine Enzephalitis mit Nekrosen der Neuronen (Teifke et al., 2007). Liu et al. (2005) beschreiben bei Möwen und Gänsen Tremor, Opisthotonus und Diarrhoe. Einen moderateren, neurotrophen Verlauf zeigten vor allem Greifvögel. Insbesondere bei Bussarden (*Buteo spp.*) ließen sich über hochgradig immungefärbte Neuronen und Gliazellen im Gehirn hohe Viruslasten anzeigen (Globig et al., 2009). Eine Infektionsstudie mit HPAIV H5N1 von Lierz et al. (2007) bestätigte eine hohe Empfänglichkeit gegenüber HPAIV H5N1 auch in Falken (siehe Kapitel 2.3.1).

Krähen wurden nach natürlicher Infektion mit HPAIV H5N1 in Deutschland und Südkorea tot aufgefunden. Eine nekrotisierende Pankreatitis sowie Meningoenzephalitis waren pathologisch-anatomischen Veränderungen in HPAIV H5N1-positiven toten Elstern (*Pica pica*) (Kwon et al., 2005b). Eine experimentelle Infektionsstudie an Amerikanerkrähen (*Corvus brachyrhynchos*) führte zu einem gestörten Allgemeinbefinden mit Apathie. Die histopathologischen Befunde ähnelten denen der in Südkorea verendeten Elstern (Swayne, 2007).

Interessanterweise blieb der Erreger gegenüber Schwimmenten (*Anatini*) weitestgehend apathogen. Beispielsweise konnte bei diesen während der deutschen Ausbrüche nur eine geringe Sterblichkeit und Virusausscheidung nachgewiesen werden (Beer et al., 2006, Globig et al., 2009). In einer amerikanischen Studie, bei welcher Stockenten (*Anas platyrhynchos*), Spießenten (*Anas acuta*), Krickenten (*Anas crecca*), Rotkopften (*Aythya americana*) und Brautenten (*Aix sponsa*) mit zwei HPAIV H5N1, isoliert in den Jahren 2001 und

2005, inokuliert wurden, entwickelte sich lediglich in Letzteren eine Infektion mit nachfolgenden Todesfällen. Die restlichen Enten zeigten zwar eine Serokonversion, entwickelten aber weder klinische Symptome noch verstarb eines der Tiere (Brown et al., 2006).

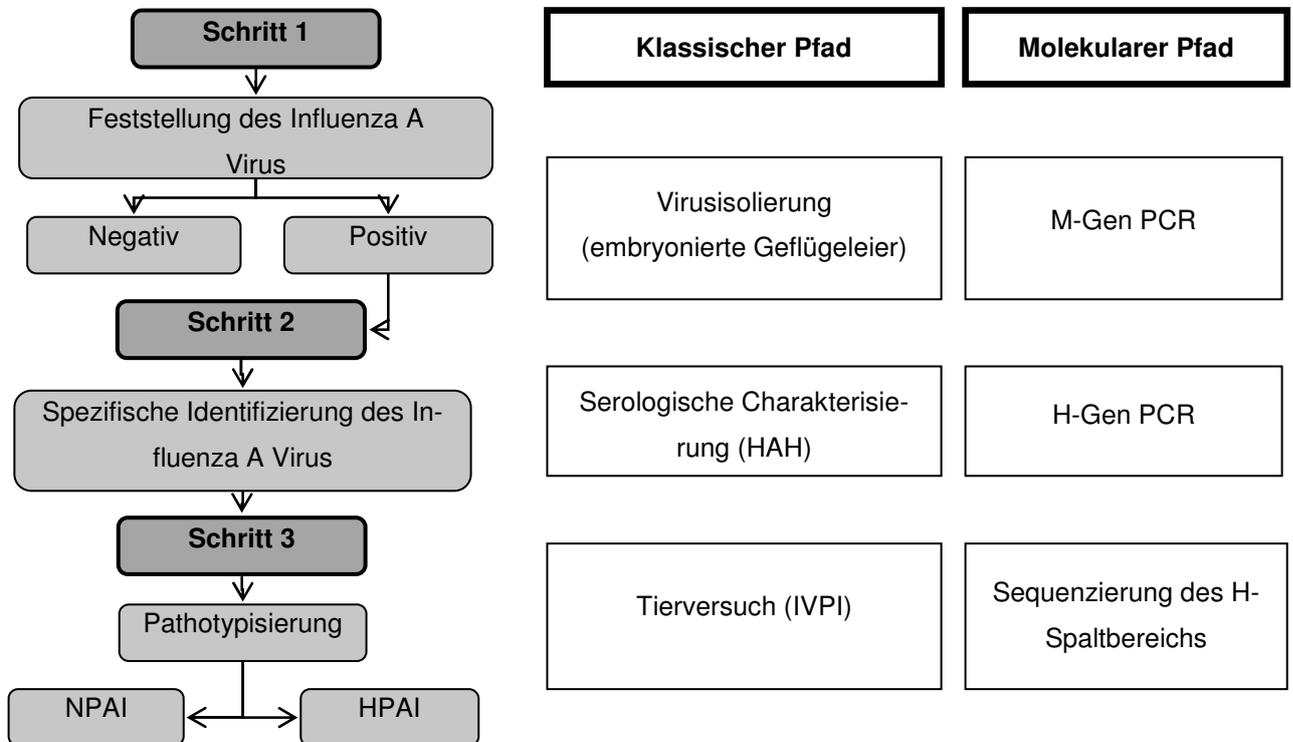
2.1.5 Diagnostik

Die Krankheitsbilder bei der Aviären Influenza sind nicht pathognomonisch, daher sind labordiagnostische Verfahren zur Erregerspezifizierung unabdingbar. Geeignete Methoden zur Erfassung einer AIV-Infektion sind (1) die klassische Virusisolierung (VI) im SPF-Hühnerei oder in Zellkultur mit nachfolgender Virusidentifizierung, (2) molekularbiologische Methoden zur Detektion von Influenza A -, bzw. subtypspezifischer RNA-Sequenzen, (3) der Nachweis von Influenza A-, bzw. subtypspezifischen Antigen (AG) sowie (4) der Antikörpernachweis. Die empfohlenen diagnostischen Methoden werden im OIE-Handbuch „OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2008“ (aktueller Stand: Mai 2009) beschrieben (OIE, 2009). Für Deutschland gilt zudem das „Handbuch zur Diagnose der Aviären Influenza“ gemäß der Richtlinie (RL) 2005/94/EG (EG 2005; EG, 2006).

Als Probenmaterial zur VI, der Detektion von AIV-Genomsequenzen sowie dem Antigennachweises dienen Kotproben, Kloaken- sowie Tracheal- oder Oropharyngealtupfer am lebenden Tier, ansonsten Organmaterial. Grundsätzlich sind Organproben den Tupferproben überlegen (Globig et al., 2009). Studien geben weiterhin Hinweise darauf, dass zum Nachweis von HPAIV H5N1 Tupfer aus der Trachea oder Oropharynx bei nicht-Wassergeflügelartespezies den Kloakentupfern und Kotproben überlegen seien (Suarez et al., 2007; Killian, 2008). Die mittels semi-quantitativer Realtime Reverse Transkriptase Kettenreaktion (RT-qPCR) nachgewiesenen Ct-Werte aus Organproben von Wildvögeln, welche während der deutschen HPAIV H5N1-Ausbrüche als positiv detektiert wurden, reichten beispielsweise von Werten zwischen 14 und 20, während Trachealproben Ct-Werten von 20 bis 24 erreichten. Kloakentupfer zeigten nochmals signifikant höhere Ct-Werte, welche von 26,7 bis 38,5 reichten (Globig et al., 2009). Hierbei ist zu beachten, dass je niedriger der Ct-Wert liegt, umso mehr Virus im Ausgangsmaterial vorhanden sein muss.

Das „Handbuch zur Diagnose der Aviären Influenza“ gibt zum AIV-Nachweis mehrere Schritte vor, wobei ein klassischer sowie ein molekularer Pfad existieren (Abbildung 2.1).

Abbildung 2.1: Schematischer Überblick über die Diagnoseschritte zur Bestätigung von Aviärer Influenza (entnommen aus dem „Handbuch zur Diagnose der Aviären Influenza gemäß der Richtlinie (RL) 2005/94/EWG (EG 2005; EG, 2006)



Die Virusisolierung (VI) im SPF-Hühnerei gilt infolge der hohen Sensitivität und Spezifität nach wie vor als Goldstandard in der AIV-Diagnostik. Zu untersuchendes Material wird in zehn bis elf Tage vorbebrütete SPF-Hühnereier inokuliert und die Allantoisflüssigkeit (AF) von Eiern mit abgestorbenen oder getöteten Embryonen auf das Vorhandensein eines hämagglutinierenden Agens mittels Hämagglutinationstest (HA) untersucht. Die zwei- bis dreifache Passage der Proben bei negativem Ergebnis erhöht die Sensitivität des Tests. Kann ein hämagglutinierendes Agens nachgewiesen werden, wird dieses, in der Regel durch einen Hämagglutinationshemmtest (HAH), von aviären Paramyxoviren (APMV) oder anderen hämagglutinierenden Viren abgegrenzt. Durch Verwendung der entsprechenden Antiseren gegen H1 bis H16 kann der H-Typ sodann im HAH subtypisiert werden. Der Neuraminidasetyp wird mittels Neuraminidase-Hemmtest bestimmt (Aymard-Henry et al., 1973). Weitere Möglichkeiten der Erregeridentifizierung aus AF bieten der Agargelpräzipitationstest (AGP), kommerzielle Tests zum AG-Nachweis, wie auch molekularbiologische Methoden. Wird ein H5 oder H7 nachgewiesen, erfolgt sodann die Bestimmung des Pathotyps über die Bestimmung des Intravenösen Pathogenitätsindex (IVPI) im Tierversuch an Hühnerküken oder

über molekularbiologische Methoden (siehe später). Große Nachteile der VI sind lange Untersuchungszeiten. Bei mehrmaliger Passage der Proben mit anschließendem Tierversuch können mehrere Wochen vergehen. Dies bedeutet einen gravierenden Verlust von wertvoller Zeit im Falle eines akuten Seuchengeschehens.

Um eine effektive Tierseuchenbekämpfung mit schnellstmöglicher Diagnosestellung zu gewährleisten, wurden vom Gemeinschaftlichen Referenzlabor (GRL) („Department of Environment, Food and Rural Affairs“, Weybridge, Vereinigtes Königreich) sowie dem Nationalen Referenzlabor (NRL) für Aviäre Influenza („Friedrich Loeffler-Institut“, Insel Riems) auf Basis der Protokolle von Spackman et al. (2002) validierte molekularbiologische Methoden für die Untersuchung auf Influenza A Virus-RNA sowie H5- und H7-subtypspezifische RNA innerhalb der Europäischen Union etabliert (Anonym, 2007a; Anonym, 2007b). Darüber hinaus existieren zahlreiche Protokolle zum typ- und subtypspezifischen Nachweis von AIV-RNA mittels Reverser Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR), Real-time RT-PCR (RT-qPCR), Nucleic Acid Sequence Based Amplification (NASBA) und Microarray (Tabelle 2.2). Allerdings zeigen Untersuchungen an experimentellen Proben und Feldproben, dass das Maß der Übereinstimmung von VI und molekularbiologischen Methoden nicht 100% beträgt. Es kommen bei der parallelen Verwendung beider Untersuchungsmethoden sowohl VI-negative/RT-PCR-positive, als auch VI-positive/RT-PCR-negative Proben vor (Spackman et al., 2002; Cattoli et al., 2004, Elvinger et al., 2007). Zur Vermeidung falsch-negativer Proben sollten daher möglichst beide Methoden parallel durchgeführt werden.

Inzwischen wurden Primersequenzen veröffentlicht, mit denen entweder alle acht kompletten Segmente von Influenza A Viren (Hoffmann et al., 2001), bzw. nur der Spaltstellenbereich des H sequenziert werden können (Phipps et al., 2004). Die Anwendung molekularer Verfahren, einschließlich der automatisierten Sequenzierung, erlaubt heutzutage die vollständige Sub- und Pathotypisierung sowie phylogenetische Analysen innerhalb von 24 Stunden.

Tabelle 2.2: Literatur über molekularbiologische Methoden zur Detektion von AIV-RNA, chronologisch geordnet (Nachgewiesener Subtyp in Klammern *)

RT-PCR	RT-qPCR	NASBA	Microarray
Fouchier et al., 2000 (A)	Spackman et al., 2002 (A, H5, H7)	Collins et al., 2002 (H5)	Li et al., 2001 (A, H1 - H16)
Starick et al., 2000 (A, H5, H7)	Spackman et al., 2003 (A)	Collins et al., 2003 (H7)	Sengupta et al., 2003 (A, H1 - H16)
Ellis und Zambon, 2001 (A)	Di Trani et al., 2006 (A)	Lau et al., 2004 (A)	Kessler et al., 2004 (A, H1 - H16)
Lee et al., 2001 (A, H1 – H16)	Kiss et al., 2006 (A)		Dawson et al., 2007 (H5)
Munch et al., 2001 (A, H5, H7)	Payungporn et al., 2006 (H5)		Gall et al., 2008 (A)
Starick und Werner, 2003 (H7)	Das und Suarez, 2007 (H6, H9, H11)		Jia et al., 2008a (A, H5, H9)
Starick et al., 2005 (H7)	Heine et al., 2007 (H5)		Gall et al., 2009a (H1 – H16)
Ng et al., 2006 (H5)	Rossi et al., 2007 (H5)		Gall et al., 2009b (N1 – N9)
Wei et al., 2006 (H5)	Van Borm et al., 2007 (A)		Lin et al., 2009 (A, H1 - H16)
Xie et al., 2006 (H5, H7, H9)			
Saberfar et al., 2007 (H5, H9)			
Chaharaein et al., 2009 (H5, H7, H9)			

*A = typspezifischer Nachweis von Influenza A Viren

Zur Detektion von Influenza A-spezifischen Virusantigenen sowie des spezifischen Nachweises von H5 wurden mehrere kommerzielle Assays entworfen, welche als sogenannte „Schnelltests“ innerhalb von 15 bis 30 Minuten die Anwesenheit von Influenza A Virusantigenen in einer Probe nachweisen sollen (Ryan-Poirier et al., 1992; Slemons und Brugh, 1998; Cui und Tong, 2008; Ho et al., 2009). Gleich von mehreren Autoren wurde jedoch festgestellt, dass der Vorteil der Schnelligkeit einhergeht mit einer Abnahme der Sensitivität (Cattoli et al., 2004; Woolcock und Cardona, 2005; Spackman et al., 2009). Dormitorio et al. (2009) untersuchten Kloakentupfer von Enten und kamen zu dem Ergebnis, dass sicher Influenza A-positives Tupfermaterial, welches direkt im Schnelltest untersucht wurde, falsch-negative Ergebnisse ergab. Allerdings gelang der AIV-Nachweis mittels VI im SPF-Hühnerei.

Marché und van den Berg (2010) evaluierten vier Schnelltest-Kits für den veterinärmedizinischen Gebrauch und zwei für den humanmedizinischen. Die Ergebnisse zeigten, dass die veterinärmedizinischen Kits zwar grundsätzlich besser abschnitten als die humanmedizinischen, allerdings auch bei diesen infolge einer geringen Sensitivität sowie einigen unspezifischen Reaktionen die Ergebnisse mit anderen Tests überprüft werden sollten.

Neben diesen Schnelltests wurden Antigen (AG)-ELISA's entwickelt, welche innerhalb weniger Stunden Influenza A- sowie H5- und H7-Antigen nachweisen und hierbei eine mit der RT-, RT-qPCR sowie VI vergleichbare Sensitivität und Spezifität aufweisen (Kodihalli et al., 1993; Zhang et al., 2006; He et al., 2007; Velumani et al., 2008; Ho et al., 2009).

Zum Antikörpernachweis gegen AIV gilt der Hämagglutinationshemmtest (HAH) aufgrund seiner hohen Sensitivität, ähnlich wie die VI, als das klassische Richtmaß. Wildvogelseren sollten vor der Untersuchung vorbehandelt werden, um unspezifische Reaktionen, die zu falsch positiven oder fragwürdigen Ergebnissen führen, zu verhindern (Swayne und Halvorson, 2008). Unspezifische Reaktionen entstehen über die Aktivierung des Komplementsystems durch Immunkomplexe (Reno und Hoffmann, 1972) oder über eventuell vorhandene Inhibitoren im Serum. Diese binden an Rezeptoren der Virusoberflächen und unterbinden so eine Agglutination mit den Erythrozyten (Mayr et al., 1977). Zur Elimination von unspezifischen Inhibitoren sind heute verschiedene Methoden anwendbar. Zum einen können die Seren für 30 Minuten bei 56°C erhitzt werden. Eine andere Methode ist die Behandlung der Seren mit Rezeptor-zerstörendem Enzym (Receptor-destroying Enzyme, RDE) (Tyrrell und Horsefall, 1952). Schließlich können die Proben mit Kaliumperjodat (KJO_4) versetzt werden (Mayr et al., 1977).

Standardgemäß werden für den HAH Hühnererythrozyten verwendet. Louisirirochanakul et al. (2007) wiesen bei ihren Untersuchungen verschiedener Erythrozyten von 5 Spezies zur Anwendung im HAH gegen H5N1-Stämme jedoch nach, dass Gänseerythrozyten hierfür besser geeignet seien. Bezüglich ihrer Sensitivität waren Meerschweinchen-, Pferde- und Menscherythrozyten dagegen schlechter geeignet als Hühnererythrozyten. Nach dem Auftreten mehrerer humaner Fälle von HPAIV H5N1 kam das Bestreben auf, auch humane Seren auf AIV im HAH zu testen, wie dies für die humanen Influenzaviren standardmäßig mit Erythrozyten von Hühnern, Puten, Meerschweinchen oder Menschen durchgeführt wird. Allerdings zeigten Testergebnisse, dass der HAH zum Nachweis von Antikörpern gegen aviäre Influenzaviren in humanen Seren weniger sensitiv sei, woraufhin der Mikroneutralisationstest (MNT) als Standardmethode eingeführt wurde (Profeta und Palladino, 1986; Rowe et al., 1999). Da mit dem MNT jedoch erst nach zwei Tagen Ergebnisse auszuwerten sind, wurden inzwischen HAH-Protokolle, basierend auf Pferdeerythrozyten, beschrieben, welche eine

dem MNT vergleichbare Sensitivität und Spezifität aufweisen und Ergebnisse innerhalb von zwei bis drei Stunden liefern (Gill et al., 2006; Kayali et al., 2008).

Grundsätzlich nachteilig am HAH oder MNT ist, dass mit diesen nur subtypspezifische Antikörper nachgewiesen werden können und somit zum Ausschluss von Antikörpern gegen alle Subtypen ein 16-facher Ansatz nötig wäre. Dagegen stellt der Agargelpräzipitationstest (AGP) einen einfachen und kostengünstigen Test zum typspezifischen Nachweis von Influenza A-Antikörpern dar (Beard, 1970). Er zeigte aber in experimentellen Vergleichsuntersuchungen mit dem HAH und dem ELISA eine niedrigere Sensitivität, indem Antikörper später und weniger lange nachgewiesen wurden (Meulemans et al., 1987; Wu et al., 2007; Spackman et al., 2009). Zu berücksichtigen ist weiterhin, dass nicht alle Vogelspezies, insbesondere Enten und Gänse, in ausreichenden Mengen präzipitierende Antikörper bilden, somit der Test für diese Spezies generell schwache Ergebnisse liefert (Slemons und Easterday, 1972; Spackman et al., 2009). Zum Monitoring wurden daher für das Wirtschaftsgeflügel speziesspezifische Antikörper-ELISA's, für andere Spezies kompetitive Multi-spezies ELISA's entwickelt, welche je nach Fragestellung Antikörper gegen Influenza A Virus (Shafer et al., 1998; Zhou et al., 1998; Zhou et al., 2003; Jin et al., 2004; Starick et al., 2006; Wu et al., 2007), gegen H5 (Chen et al., 2008) oder H7 (Sala et al., 2003; Shien et al., 2008) detektieren. Während in allen Assays die mit dem HAH vergleichbar hohe Sensitivität und Spezifität unterstrichen wurde, beschrieben Starick et al. (2006) das vermehrte Auftreten von fraglich positiven Proben, welche mit Vorsicht zu interpretieren seien.

2.1.6 Bekämpfung und Prophylaxe

Die anzeigepflichtige HPAI wird in nahezu allen Ländern nach tierseuchenrechtlichen Vorgaben bekämpft. In der Europäischen Union (EU) bildet die „Richtlinie 2005/94/EG des Rates vom 20. Dezember 2005 mit Gemeinschaftsmaßnahmen zur Bekämpfung der Aviären Influenza“ die Rahmenbedingungen, welche mit der „Verordnung zum Schutz gegen die Geflügelpest“ (Geflügelpest-Verordnung) vom 18. Oktober 2007 in nationales Recht umgesetzt wurde (EG, 2005; Anonym, 2007c). Diese Verordnung umfasst die Bekämpfungsmaßnahmen bei Verdacht oder amtlicher Feststellung von HPAIV oder NPAIV der Subtypen H5 und H7 bei in Gefangenschaft gehaltenen Vögeln sowie bei Wildvögeln. Die Bekämpfung richtet sich beim Wirtschaftsgeflügel nach dem Stamping-out Prinzip sowie der Einrichtung von Sperr- und Beobachtungsgebieten um eine betroffene Anlage. Generell sollte Geflügel in geschlossenen Räumen oder gegen Wildvogelkontakt geschützten Außenanlagen gehalten werden, um eine gegenseitige Übertragung zu unterbinden. Allerdings können bestimmte Gebiete benannt werden, in welchen Vögel grundsätzlich draußen gehalten werden können, solange diese nicht bestimmten HPAI-Überwachungsbezirken angehören. Zur Früherkennung einer HPAI bei Wildvögeln, in erster Linie Enten, wird ein Wildvogelmonitoring durchge-

führt. Hierfür entnehmen Ornithologen und Jäger auf Anordnung der Behörden Proben. Zudem muss eine besondere Häufung von Todesfällen bei diesen Tieren gemeldet werden. Auch hier werden bei Nachweis einer HPAI Sperr- und Beobachtungsgebiete eingerichtet.

Impfungen gegen die Subtypen H5 und H7 sind in der Europäischen Union in der Regel verboten. Im Falle akuter Seuchengeschehen können diese, als begleitende Biosecurity-Maßnahme, allerdings als „Notimpfungen“ zum Einsatz kommen. Desweiteren bestehen Ausnahmegenehmigungen für im Zoo oder anderen vergleichbaren Einrichtungen gehaltenen Tieren, insbesondere solchen, die einer seltenen Rasse angehören. Der Impfung geht hier ein Genehmigungsverfahren voraus.

In Deutschland sind derzeit keine Vakzine zugelassen, jedoch stehen für die oben genannten Ausnahmen eine inaktivierte H5N2-Vakzine sowie eine rekombinante H5-Vakzine auf Basis eines Geflügelpockenvektors zur Verfügung. Bei der Impfung muss berücksichtigt werden, dass alle verfügbaren Impfstoffe zu keiner sterilen Immunität führen. Es werden jedoch klinische Symptome einer Feldinfektion vermindert, der Titer der ausgeschiedenen Viren sowie die Ausscheidungszeit verringert und die nötige Infektionsdosis erhöht (Swayne, 2006). Inaktivierte H5N2-Vakzine bieten gegenüber den Vektorvakzinen den Nachteil, dass die Unterscheidung von infizierten und geimpften Tieren (sogenannte „DIVA-Strategie“) ohne den Einsatz von Sentineltieren (ungeimpfte Tiere) erschwert ist. Eine Möglichkeit wäre die serologische Untersuchung der geimpften Tiere auf Antikörper gegen das N der vermuteten Feldinfektion, was jedoch immer dann problematisch wird, wenn das Feldvirus den gleichen N-Subtyp besitzt wie der Vakzinestamm (Capua et al., 2002; Capua et al., 2003; Capua et al., 2004). Dagegen induzieren H5-Vektorvakzinen lediglich Antikörper gegen das entsprechende H und die Untersuchung auf AK gegen das NP würde eine einfache DIVA-Strategie bieten. Vektorvakzine sind daher in den USA zur Notimpfung zugelassen (Bublöt et al., 2006) und werden in Mexiko seit vielen Jahren eingesetzt (Villarreal-Chávez und Rivera-Cruz, 2003).

2.1.7 Seuchengeschehen durch hochpathogene AIV

Die Erstbeschreibung eines AIV-Ausbruches beim Geflügel erfolgte Ende des 19ten Jahrhunderts von Perroncito (1878) in Italien. Es wurde jedoch erst Jahre später durch Schäfer (1955) dieser Erreger den Influenza A Viren zugeordnet. Seit 1959 bis heute sind 26 HPAIV-Ausbrüche beim Wirtschaftsgeflügel aufgetreten. Diese wurden verursacht durch (1) die Subtypen H5N1 in Schottland (1959), England (1991) sowie dem von Asien ausgehenden und bis heute anhaltend zirkulierenden H5N1-Stamm (seit 1996), (2) H5N2 in den USA (1983-85 und 2004), Mexiko (1994-95), Italien (1997) sowie Südafrika (2004), (3) H5N8 in Irland (1983), (4) H5N9 in Kanada (1966), (5) H7N1 in Italien (1999-2000), (6) H7N3 in Eng-

land (1963), Australien (1992 und 1994), Pakistan (1994), Chile (2002) sowie Kanada (2007) und schließlich (7) H7N7 in Australien (1976 und 1985), Deutschland (1979 und 2003), England (1997), den Niederlanden und Belgien (beide 2003). Die meisten dieser Ausbrüche blieben lokal begrenzt.

Der anhaltend zirkulierende, erstmals 1996 von Gänsen in China isolierte HPAIV H5N1-Stamm (Xu, et al., 1999) führte dahingegen in Bezug auf die Anzahl der verendeten, bzw. gekeulten Tierzahlen (>150 Mio. Geflügel) sowie der Länge und der globalen Ausbreitung des Seuchenzuges zu einem AIV-Ausbruch bislang unbekanntem Ausmaßes. Darüber zeigt sich dieses Virus erstmals auch in Wildvögeln, einschließlich der Reservoirwirte, als pathogen. Nicht zuletzt weist es ein erweitertes Wirtsspektrum auf, welches Säugetiere und auch Menschen einschließt. Erstmals in den internationalen Medien erschien HPAIV H5N1 „Asia“, als dieser 1997 in Hong Kong zu tödlichen Infektionen sowohl beim Geflügel als auch beim Menschen führte (Sims et al., 2003). Humane Fälle traten auch in den folgenden Jahren immer wieder auf (Kapitel 2.4).

Inzwischen werden HPAIV H5N1-Stämme bezüglich ihrer Genotypen in zehn verschiedene Kladen (0 – 9) und Subkladen eingeteilt, welche in verschiedenen räumlichen Gebieten verteilt vorkommen (WHO, 2009). Bis zum heutigen Zeitpunkt wurde HPAIV H5N1 in insgesamt 62 Ländern auf drei Kontinenten nachgewiesen. 16 Länder verzeichneten hierbei lediglich Ausbrüche bei Wildvögeln (Stand: Februar 2010).

Dem westlichen Eintrag nach Europa und Afrika ging 2005 ein massives Wildvogelsterben am Qinghai-See (Zentralchina) voraus (Chen et al., 2005; Liu et al., 2005). Aus diesen Ausbrüchen wurde erstmalig ein Virus der Subklade 2.2 isoliert, in welche zukünftig alle aus Wildvögeln und Wirtschaftsgeflügel in Europa isolierten HPAIV H5N1 fielen (Salzberg et al., 2007). Galt früher insbesondere der Handel mit infizierten Geflügel oder Geflügelprodukten als einer der Hauptrisikofaktoren zur Verbreitung einer HPAI, kamen jetzt erstmals Wildvögel, und hier im Besonderen Zugvögel, in den Verdacht, eine wesentliche Rolle in der Verbreitung von HPAIV H5N1 zu spielen. Für Afrika und Asien erscheint nach wie vor der legale und illegale Handel mit infiziertem Geflügel in erster Linie relevant, doch gelten inzwischen Zugvögel als der bedeutsamste Vektor in der Verbreitung von HPAIV H5N1 innerhalb Europas (Kilpatrick et al., 2006; Lee et al., 2008; Schoene et al., 2009). Diese Wildvogeltheorie wird dadurch unterstützt, dass in 23 Ländern HPAIV H5N1-Infektionen bei diesen entdeckt wurden, bevor es zu Ausbrüchen in den intensiv überwachten Geflügelhaltungen kam. Darüber hinaus wurde in den meisten der betroffenen europäischen Ländern der Nachweis von HPAIV H5N1 ausschließlich bei Wildvögeln erbracht (Kilpatrick et al., 2006). Bei Nukleotidsequenzanalysen wurden im ersteren Fall große Übereinstimmungen der Isolate aus Geflügel und Wildvögeln festgestellt (Lee et al., 2008). Experimentelle Studien an Enten und

Schwänen zeigten außerdem, dass diese schon während der Inkubationszeit große Virusmengen ausscheiden können und somit als mögliche Überträger in Betracht gezogen werden müssen (Brown et al., 2006; Kalthoff et al., 2008; Keawcharoen et al., 2008). Für die Verbreitung von HPAIV H5N1 über weite Distanzen kommen infolge der Ergebnisse von Keawcharoen et al. (2008) speziell Stockenten (*Anas platyrhynchos*) in Frage, da diese in ihrer Studie an sechs Entenspezies keine klinischen oder pathologisch-anatomischen Befunde trotz ausreichender Virusausscheidung entwickelten. Auch während der natürlichen HPAIV H5N1-Ausbrüche in Europa im Jahr 2006 wurde eine vergleichsweise geringe Anzahl verendeter Stockenten mit HPAIV H5N1-Nachweisen detektiert. Um die mögliche Rolle der Stockente zur Verbreitung der AI abzuschätzen, analysierten Sauter und Jenni (2008) Ringfundanalysen und Tierbewegungen mittels Telemetrie. Sie fanden heraus, dass nur 7 % der Individuen großräumige Bewegungen von mehr als 50 km durchführen. Ringfunde wiesen allerdings auch auf Entfernungen von bis zu 200 km hin. Die Distanz der Bewegungen stieg mit zunehmender Winterhärte. Die telemetrierten Vögel, ohne Nachweise von AIV, legten Distanzen von bis zu 2100 m zurück. In einer Telemetriestudie des Max Planck-Instituts für Ornithologie konnten jedoch auch zwei Stockenten verfolgt werden, die außerhalb der Brutzeit vom Bodensee aus nach Russland und wieder zurück flogen (Fiedler, 2008). Ebenfalls telemetrisch verfolgten Gaidet et al. (2008) eine HPAIV H5N2-infizierte Ente. Sie wiesen somit nach, dass Migrationsverhalten auch bei vorliegender HPAI-Infektion grundsätzlich möglich ist. Diese Tatsache wurde zuvor für unwahrscheinlich gehalten. Die Annahme, dass Wildvögel stets nur NPAIV beherbergen wurde widerlegt, als in der Schweiz im März 2008 eine subklinisch HPAIV H5N1-infizierte Tafelente (*Aythya ferina*), sowie im Januar 2009 in Bayern solch eine Stockente aufgefunden wurde (FLI, 2008b).

Schwäne (*Cygnini*) waren die am häufigsten tot aufgefundenen und mit HPAIV H5N1-infizierten Vögel. Diese trugen vermutlich zur HPAIV H5N1-Verbreitung über kürzere Strecken bei, denn Schwäne scheiden zwar große Mengen an Viren aus, zeigen aber nur für wenige Tage eine noch milde klinische Verlaufsform, welche eine Migration zulassen würde (Kalthoff et al., 2008). Feare (2010) betont in ihrer Zusammenfassung über die Rolle der Wildvögel in der Verbreitung der HPAIV H5N1 jedoch, dass nicht das Migrationsverhalten an sich, sondern zusätzlich stressende Faktoren wie extrem ungünstige Witterungsverhältnisse in der Vergangenheit zu einer Manifestierung von HPAIV H5N1 beigetragen haben.

In Deutschland wurde HPAIV H5N1 erstmals Mitte Februar 2006 bestätigt. In diesem Jahr kam es zu Nachweisen bei insgesamt 343 Wildvögeln, einem Zoovogel (Trauerschwan, *Cygnus atratus*), einem Wirtschaftsgeflügelbestand sowie in drei Katzen (*Felis catus*) und einem Steinmarder (*Martes foina*) (Beer et al., 2006). Die Tabelle 2.3 gibt eine Übersicht

über die betroffenen Wildvogelarten im Jahr 2006. Die räumliche Verteilung dieser Ausbrüche ist in Abbildung 2.2 dargestellt.

Tabelle 2.3: H5N1-positive Wildvögel in Deutschland 2006 (Beer et al., 2006)

Wissenschaftlicher Name	Deutscher Name	Positive
Ordnung: Ciconiiformes	Störche, Reiher	
<i>Ardea cinerea</i>	Graureiher	1
<i>Ardea spec.</i>	Reiher	1
<i>Ciconia ciconia</i>	Weißstorch	2
Ordnung: Podicipediformes	Lappentaucher	
<i>Podiceps cristatus</i>	Haubentaucher	4
Ordnung: Anseriformes	Entenvögel	
<i>Anas spec</i>	Ente	21
<i>Anas platyrhynchos</i>	Stockente	4
<i>Aythya fuligula</i>	Reiherente	18
<i>Aythya marila</i>	Bergente	1
<i>Aythya ferina</i>	Tafelente	8
<i>Bucephala clangula</i>	Schellente	1
<i>Melanitta fusca</i>	Samtente	1
<i>Melanitta nigra</i>	Trauerente	1
<i>Mergus serrator</i>	Mittelsäger	1
<i>Mergus merganser</i>	Gänsesäger	5
<i>Anas streptera</i>	Schnatterente	1
<i>Anser spec.</i>	Gans	4
<i>Anser anser</i>	Graugans	7
<i>Branta canadensis</i>	Kanadagans	21
<i>Anser fabalis</i>	Saatgans	1
<i>Branta leucopsis</i>	Weißwangengans	2
<i>Cygnus spec</i>	Schwan	22
<i>Cygnus olor</i>	Höckerschwan	130
<i>Cygnus cygnus</i>	Singschwan	32
<i>Cygnus atratus</i> (zoo)	Trauerschwan	1
Ordnung: Charadriiformes	Möwen-, Watvögel	
<i>Larus spec.</i>	Möwe	4
<i>Larus marinus</i>	Mantelmöwe	2
<i>Larus argentatus</i>	Silbermöwe	3
<i>Larus canus</i>	Sturmmöwe	1
Ordnung: Accipitriformes	Greifvögel	
<i>Buteo spec.</i>	Bussard	8

<i>Buteo buteo</i>	Mäusebussard	20
<i>Circus cyaneus</i>	Kornweihe	1
<i>Accipiter gentilis</i>	Habicht	1
<i>Falco spec</i>	Falke	1
<i>Falco peregrinus</i>	Wanderfalke	2
<i>Falco tinnunculus</i>	Turmfalke	1
Ordnung: Strigiformes	Eulen	
<i>Bubo bubo</i>	Uhu	2
Ordnung: Gruiformes	Kranichvögel	
<i>Fulica atra</i>	Blessralle	2
Ordnung: Phalacrocoraciformes	Kormoranvögel	
<i>Phalacrocorax carbo</i>	Kormoran	3
Ordnung: Passeriformes	Sperlingsvögel	
<i>Corvus corone cornix</i>	Nebelkrähe	1
<i>Garrulus glandarius</i>	Eichelhäher	1
Aves	Vögel	
unbekannt	unbekannt	1
Insgesamt		343

Molekularepidemiologische Untersuchungen ordneten alle Isolate aus Deutschland in die Klade 2.2 ein (Salzberg et al., 2007, Starick et al., 2008). Innerhalb dieser bildeten sich im Jahr 2006 zwei Cluster heraus, welche sich grob in die Isolate aus dem Süden (Südcluster 2.2.1) sowie des Nordens (Nordcluster 2.2.2) spalteten (Starick et al., 2008; Globig et al., 2009). Dies führte zu der Annahme, dass HPAIV H5N1 durch Zugvögel über zwei verschiedenen Quellen, nämlich über Zentralrussland nach Norddeutschland (Ost – West – Zugroute) und über die Schwarzmeerregion in den Süden (Süd–Nord–Zugroute), eingetragen wurde. Eine weitere Studie, welche speziell die Isolate aus Bayern untersuchte, bestätigte diese Ergebnisse (Rinder et al., 2007). Neben Schwänen waren Enten (hauptsächlich Tauchenten) die am häufigsten betroffene Spezies. Im April 2006 wurde erstmals in einem Wirtschaftsgeflügelbetrieb mit teilweiser Freilandhaltung in Sachsen ein Ausbruch bestätigt (Siehe Abbildung 2.2) (Heiß, 2006). Interessanterweise konnten mehrere Virusisolate aus dem Ausbruchsgeschehen isoliert werden, welche sowohl in das Nord- als auch in das Südcluster fielen. Die exakte Eintragsquelle konnte nicht eruiert werden, doch gilt ein Eintrag über Wildvögel, trotz fehlender Fälle in dieser Region, als am wahrscheinlichsten (Starick et al., 2008).

Im Jahr 2007 wurde HPAIV H5N1 bei 326 Wildvögeln sowie bei vier Geflügel-Hobbybeständen und zwei Enten-Großmastbetrieben nachgewiesen (Abbildung 2.2). Bei den erneuten Ausbrüchen handelte es sich höchstwahrscheinlich um einen Neueintrag, da molekularepidemiologische Untersuchungen der 2007-Isolate zur Einordnung dieser in ein

neues Cluster (2.2.3) führten (Starick et al., 2008). Über 90 % der Wildvogelnachweise stammten von Schwarzhalstauchern (*Podiceps nigricollis*). Schwäne, obgleich anwesend, machten dagegen nur einen geringen Anteil aller Fälle aus (Tabelle 2.4). Bei den beiden betroffenen Enten-Großmastbetrieben handelte es sich um eine epidemiologische Einheit, indem beide Betriebe an den gleichen Schlachthof lieferten und das Personal teilweise in beiden Betrieben arbeitete. Nachdem in einem Betrieb die Mortalität der Enten auf 1,8 % anstieg und HPAIV H5N1-spezifische RNA in Trachealtupferproben nachgewiesen werden konnte, wurden bei der Untersuchung von Schlachtierkörpern auch positive Muskelproben vom zweiten Betrieb ausgemacht. Nachfolgende Untersuchungen in Letzterem wiesen daraufhin H5N1-Antikörper sowie schwach positive Trachealtupferproben nach, obgleich die Tiere geringe bis keine Symptome zeigten und die Mortalität niedrig war (Harder et al., 2009a).

Tabelle 2.4. H5N1-positive Wildvögel in Deutschland 2007
(Quelle: FLI 2007)

Wissenschaftlicher Name	Deutscher Name	Positive
Ordnung: Podicipediformes	Lappentaucher	
<i>Podiceps cristatus</i>	Haubentaucher	9
<i>Podiceps nigricollis</i>	Schwarzhalstaucher	285
Ordnung: Anseriformes	Entenvögel	
<i>Anas spec (Tribus Aythyini)</i>	Ente (Tribus Tauchente)	3
<i>Anas platyrhynchos</i>	Stockente	2
<i>Anser anser</i>	Graugans	1
<i>Branta canadensis</i>	Kanadagans	1
<i>Cygnus olor</i>	Höckerschwan	22
Ordnung: Charadriiformes	Möwen-, Watvögel	
<i>Larus spec.</i>	Möwe	2
Ordnung: Gruiformes	Kranichvögel	
<i>Fulica atra</i>	Blesshuhn	1
Insgesamt		326

Im Jahr 2008 blieben weitere HPAIV H5N1-Nachweise bei Wildvögeln aus. Auf dem Wirtschaftsgeflügelsektor kam es dagegen zur HPAIV H5N1-Bestätigung bei einer einzelnen Ente aus einem Geflügelmastbetrieb. Dieser Ausbruch stellt bis zum jetzigen Zeitpunkt den letzten HPAIV H5N1-Fall im Wirtschaftsgeflügel in Deutschland dar (Stand Februar 2010). Allerdings kam es zwischen dem 16.12.08 und dem 19.01.09 zu insgesamt 33 Ausbrüchen eines NPAIV H5N3 bei Hausgeflügel im Landkreis Cloppenburg (Niedersachsen). Hierbei

waren hauptsächlich Puten betroffen. Aufgrund der Gefahr einer Mutation zu hochpathogenen Viren wurden unverzüglich insgesamt 570 000 Tiere getötet. Ein verstärkt durchgeführtes Wildvogelmonitoring im Umkreis der Ausbrüche ergab keine weiteren Nachweise von AIV (FLI, 2009a).

Der einzige HPAIV H5N1-Nachweis aus dem Jahr 2009 stammt aus Bayern. Bei diesem handelte es sich um eine asymptomatisch-infizierte Stockente, welche während des Wildvogelmonitorings geschossen und beprobt wurde (FLI, 2009b).

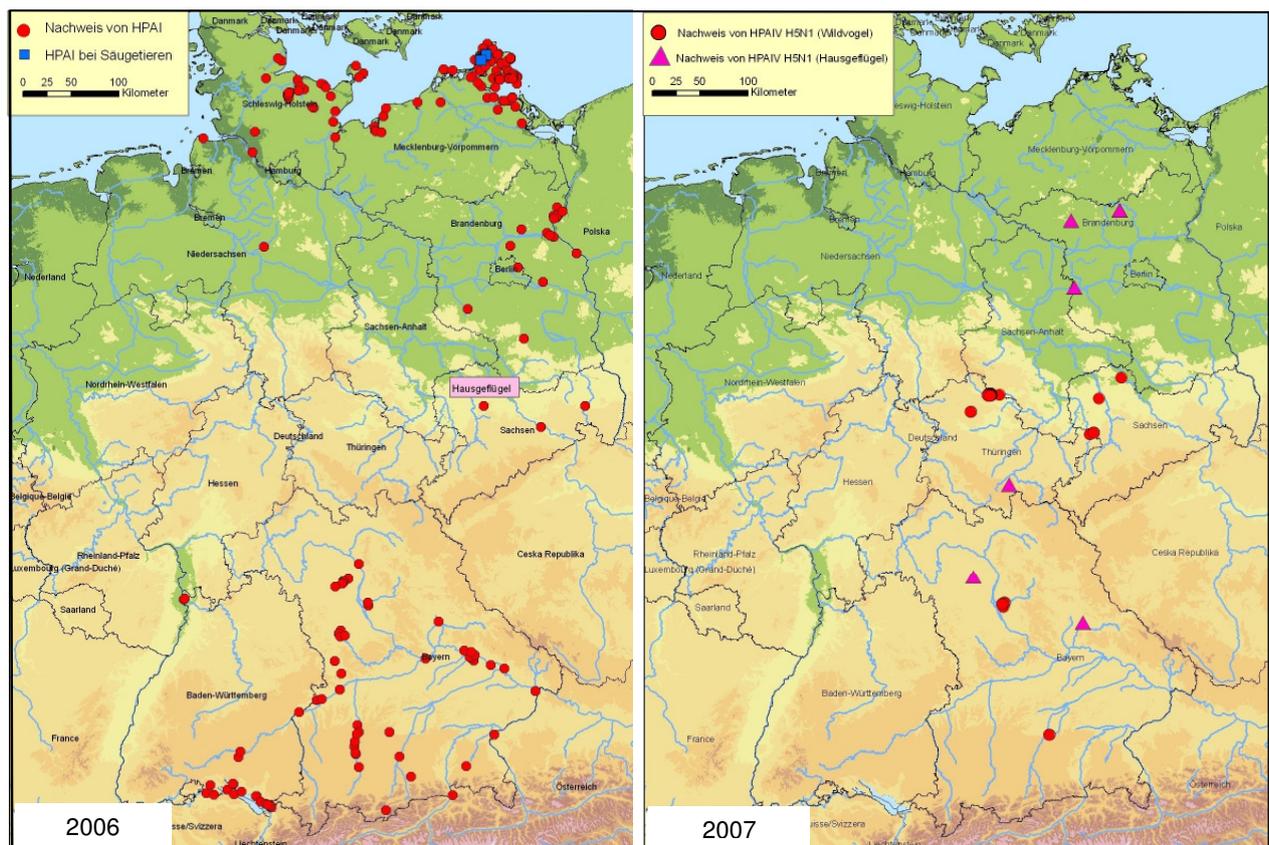


Abbildung 2.2: Lokalisation von Ausbruchs- und Verdachtsfällen von HPAIV H5N1 in Deutschland, 2006 und 2007. Quelle: mit freundlicher Genehmigung vom FLI Wusterhausen

2.2 Aviäre Influenzavirusinfektionen bei Tauben

2.2.1 Experimentelle Infektionsstudien

Schon Anfang des 20. Jahrhunderts wurde von Centanni (1902) ein filtrierbares Agens als Ursache der klassischen Geflügelpest postuliert. Dieses wurde circa fünfzig Jahre später als Influenza A Virus charakterisiert (Schäfer, 1955). Während dieser Zeitspanne erfolgten anfängliche Infektionsversuche an Tauben, indem diesen Organmaterial, Blut oder Fäzes von an Geflügelpest-erkrankten Hühnern inokuliert wurden (Tabelle 2.5). Die Ergebnisse dieser Studien müssen rückblickend mit großer Vorsicht beurteilt werden, da die eingesetzten Inokula weder genau charakterisiert noch quantifiziert wurden. Aus diesem Grunde kann nicht mit letzter Sicherheit davon ausgegangen werden, dass in allen Fällen eine klassische Geflügelpest, und nicht etwa Geflügelcholera oder eine Newcastle Krankheit vorgelegen hatte (Kaleta und Hönicke, 2004). Tauben wurden bis in die 30er Jahre als unempfindlich angesehen, nur in einigen Fällen wurden vorübergehende Symptome, vornehmlich bei Jungtauben, ausgelöst, woraufhin Centanni (1902) und Maggiori und Valenti (1903) eine unterschiedliche Empfänglichkeit der Tauben, abhängig von deren Alter, beschrieben.

Bei Versuchen ab den 40-er Jahren konnte die Identifizierung des verwendeten Materials im Nachhinein stattfinden (Tabelle 2.7). Bis zu diesem Zeitpunkt galt der Tierversuch an Mäusen und Tauben als eine adäquate Methode zur Abgrenzung von Newcastle Disease Viren und dem Erreger der Geflügelcholera von Influenzaviren: induzierte das Inokulum klinische Symptome nur in Mäusen und nicht in Tauben, galt es als Erreger der klassischen Geflügelpest, umgekehrt wurde es als Erreger der Newcastle Disease oder Geflügelcholera angesehen (Künnemann, 1902). Dinter (1944) induzierte durch einen Erreger, der sich später als ein H7 herausstellte, in zwei Tauben und nicht in Mäusen zentralnervöse Symptome. Weidenmüller (1950) injizierte juvenilen Tauben das „Virus N“, woraufhin zwar keine Taube klinische Symptome zeigte, jedoch eine wenige Tage anhaltende Serokonversion nachgewiesen werden konnte. Tatsächlich wurde das Virus N zehn Jahre später als NPAIV A/Chicken/Germany/49 (H10N7) bestimmt. In einem Folgeversuch infizierte Weidenmüller (1950) mit den gleichen Ergebnissen Tauben mit dem Influenza A Virusstamm „Brescia“ (HPAIV H7N7), welcher 1902 aus Hühnern isoliert wurde.

Tabelle 2.5: Infektionsversuche an Tauben mit verschiedenen Inokula (1900 bis 1940)*

Inokulum/ Applikationsart	Anzahl und Alter	Klinik und Pathologie	Referenz
Blut/ IM	2, o.A.	o.b.B.	Greve, 1901
Fäzes/ oral	2, o.A.	1 vorübergehend flüssiger Kot, dann Rekonvaleszenz	
Leber, Darm/ SK	6, o.A.	2 verstorben; 1 ZNS-Symptome; Keine Kontaktinfektion	Lode und Gruber, 1901
Peritonäalflüssigkeit, Darminhalt/ oral	Je 1, adult	o.b.B.	Scheuerlen und Buhl, 1901
Blut/ SK	4 juvenile, 3 adulte	Juvenile: ZNS-Störungen, hiervon 1 verstorben, adulte: o.b.B.	Centanni , 1902
Blut, Fäzes/ SK und oral	3 juvenile, 3 adulte	o.b.B.	Künnemann, 1902
Blut/ Injektion	K.A.	o.b.B.	Von Ostertag und Wolffhügel, 1902
Peritonäalflüssigkeit/ IM	2 juvenile, 2 adulte	Juvenile: 1 Parese, 1 Lethargie	Maggiori und Valenti, 1903
Blut/ IM	2 juvenile	ZNS-Symptome ab 10dpi	Kleine und Möllers, 1905
Gehirn/ SK	K.A., juvenil	o.b.B.	Freese, 1908
Gehirn/ IZ	10, o.A.	Reinfektion von Gehirnmateriale auf Hühner. Diese danach verstorben	Krauss und Doerr, 1908
Blut/ SK	K.A.	Verstorben	Krumwiede et al., 1925
Organe/ Injektion oder oral	K.A.	o.b.B.	Mohler, 1926
Blut, Gehirn/ IM	2, adult	2 Tremor, intestinale Hämorrhagien; hiervon 1 verstorben	Miessner und Berge, 1926
Blut, Leber/ IM und SK	4, adult	o.b.B.	Purchase, 1931

*k.A. = Keine Angabe; o.A. = Ohne Altersangabe; o.b.B. = Ohne besonderen Befund; SK = subkutan; IM = intramuskulär, IC = intrazerebral

Spätere Infektionsversuche erfolgten in erster Linie mit den tierseuchenrechtlich bedeutsamen Subtypen H5 und H7 (Tabelle 2.6 und 2.7). Bereits nach einem HPAIV H5N9-Ausbruch in Kanada in den sechziger Jahren wurden Tauben experimentell infiziert. Trotz einer hohen Dosis konnten hierbei sowohl in Jung- als auch Alttauben keine Symptome ausgelöst werden, wobei alle zeitgleich infizierten Puten sofort verendeten (Narayan et al., 1969). Slemons und Easterday (1972) verzeichneten jedoch den Tod einer Taube, obgleich

sie dasselbe Virus in einer geringeren Dosis verwendeten. Ein nah verwandtes HPAIV H5N9 nahm eine Mittelstellung ein, indem zwar keine Symptome hervorgerufen wurden, allerdings die Reisolierung bei einigen Tauben möglich war und in knapp über der Hälfte der Tauben neutralisierende Antikörper nachgewiesen wurden (Slemons und Easterday, 1972).

Einige Jahre später stufen Panigrahy et al. (1996) Tauben infolge ihrer Untersuchungen mit hoch- und niedrigpathogenen H5 als „nicht oder nur in sehr geringen Maße“ empfänglich gegenüber diesem Subtyp ein. Diese Ergebnisse werden unterstützt durch eine aktuellere Studie, in welcher nicht einmal in gesunden Tauben, welche experimentell durch die Verabreichung von Cyclophosphamid immunsupprimiert wurden, eine NPAIV H5N2-Infektion ausgelöst werden konnte (Fang et al., 2006).

Infektionsversuche mit **HPAIV H5N1** aus Hong Kong brachten ähnliche Ergebnisse (Perkins und Swayne, 2002a; b; 2003a; b). Dieser Stamm erzeugte bei Tauben keine Infektion, obgleich diese durch eine Circovirus-Infektion zusätzlich immunsupprimiert waren. Daher postulierten die Autoren eine angeborene Resistenz von Tauben auch gegenüber HPAIV H5N1. Boon et al. (2007) erreichten nur mit einem von vier Isolaten eine subklinische, kurze Infektion bei juvenilen Tauben (*Colomba spp.*), wohingegen Haussperlinge (*Passer domesticus*) zu nahezu 100% an der Infektion verstarben. In einer weiteren Studien mit verschiedenen, nah verwandten HPAIV H5N1 aus China konnten weder Brief-, Stadt- oder Fleischtauben infiziert werden (Liu et al., 2007). Diese Arbeitsgruppe ging daher der Frage nach, welcher Mechanismus hinter der scheinbaren Unempfindlichkeit von Tauben gegenüber HPAIV H5N1 liegen könnte (Liu et al., 2009). Sie suchten die Antwort primär in den AIV-Rezeptoren. Wie später noch ausführlich dargestellt wird (Kapitel 2.4.2), binden AIV vornehmlich an endständige Sialinsäuren, welche über eine alpha-2,3-glykosidische Bindung verankert vorliegen (SA α 2,3Gal-Rezeptoren). Humane Influenzaviren binden demgegenüber an einen zweiten Rezeptortyp, bei dem die Sialinsäuren alpha-2,6-glykosidisch gebunden werden (SA α 2,6Gal-Rezeptoren). Liu et al. (2009) untersuchten für ihre Fragestellung die Verteilung dieser beiden Rezeptortypen in Organteilen des Kehlkopfs, Luftröhre, Lunge, Zwölffingerdarms, Hüftdarms und des Mastdarms von sechs Brieftauben verschiedenen Alters und verglichen die Ergebnisse mit denen von Hühnern. Die Ergebnisse zeigten im Epithel von Kehlkopf, Luftröhre, Bronchien und Bronchiolen der Tauben reichlich vorhandene alpha-2,6-glykosidisch gebundene Sialinsäuren, dagegen nur in sehr geringem Maße solche, die alpha-2,3-glykosidisch gebunden vorkommen. Bei den Hühnern war die Rezeptorverteilung in den genannten Organen umgekehrt. Liu et al. (2009) fanden somit heraus, dass die AIV-Rezeptorverteilung in der Taube eher dem des menschlichen Atmungstrakts entspricht als dem der Hühner. Im Zwölffinger- bzw. Hüftdarm wurden weder bei den Tauben noch bei den Hühnern eine nennenswerte Anzahl von AIV-Rezeptoren ausgemacht, wobei wiederum im Mastdarm der Tauben, nicht aber dem der Hühner, eine hohe Anzahl von SA α 2,3Gal-

Rezeptoren vorhanden waren. Schließlich wurde in dieser Studie das Vorhandensein der zwei verschiedenen Sialinsäuretypen (N-Acetylneuraminsäure (*N-Ac*) oder N-Glykolyneuraminsäure (*N-Gc*)) untersucht. Die Ergebnisse zeigten, dass beide Typen in vergleichbarer Verteilung bei Tauben und Hühnern vorhanden waren. Aus ihren Ergebnissen schlossen die Autoren, dass zwar das prädominante Vorkommen des SA α 2,6Gal-Rezeptors im Respirationstrakt der Tauben eine wichtige Rolle für die scheinbare Unempfindlichkeit dieser gegenüber AIV spielen, dass aber der Sialinsäuretyp (N-Ac oder N-Gc) der Rezeptoren selber keine Rolle spielt.

Zusätzlich zu den genannten Studien, welche eher auf eine Resistenz der Tauben gegenüber HPAIV H5N1 hinweisen, existieren jedoch drei Studien, in welchen Tauben sehr wohl mit (1) einem indonesischen, (2) einem mongolischen sowie (3) chinesischen Isolaten, unter der vorübergehenden Ausbildung von klinischen Symptomen infiziert werden konnten. In allen drei Studien zeigten die Viren einen ausgeprägten Neurotropismus (Klopfleisch et al., 2006; Jia et al., 2008b, Brown et al., 2009). Brown et al. (2009) infizierten Tauben mit drei unterschiedlichen Dosen eines HPAIV H5N1, welches aus einem Singschwan in der Mongolei isoliert wurde. Nur mit der höchsten Dosis ($10^{6,1}$ EID₅₀) konnte bei einigen Tauben ZNS-Symptome inklusive Todesfälle ausgelöst werden. Bei den chinesischen Isolaten handelte es sich um verschiedene AIV, isoliert von Huhn, Ente und Taube. Hier stellte es sich heraus, dass die Isolate von den beiden letzteren Vogelspezies für Tauben pathogener waren als die, die von Hühnern stammten. Nach der Inokulation einer hohen Dosis wurden mit dem indonesischen Isolat ebenfalls ZNS-Symptome und Todesfälle registriert (Klopfleisch et al., 2006). Nach dem Verenden bzw. der Euthanasie von fünf klinisch erkrankten Tauben konnte im ZNS Virus nachgewiesen werden. Die übrigen neun inokulierten Tauben blieben subklinisch infiziert, aber schieden Virus in einer geringen Menge über den Oropharynx und die Kloake aus (Werner et al., 2007). Jia et al. (2008b) und Klopfleisch et al. (2007) sprechen daher bestimmten „neueren“ HPAIV H5N1 Virusvarianten eine gewisse Pathogenität für Tauben zu. Jia et al. (2008b) postulieren ein gewisses Risiko für Vögel und dem Menschen durch den Kontakt zu HPAIV H5N1 infizierten Tauben, wie dies in mindestens einem Fall eines an HPAIV H5N1 verstorbenen Indonesiers der Fall gewesen sein soll.

Schließlich wurden von Yu et al. (2007) Tauben mit sieben verschiedenen chinesischen HPAIV H5N1-Isolaten infiziert, wobei vier Isolate bei einigen Tauben Todesfälle ohne vorherige klinische Symptome auslösten. Diese Arbeitsgruppe wies für alle sieben Isolate eine Infektion der Tauben nach, indem sie Influenza A-spezifisches Nukleoprotein im Drüsenmagen aller Tauben (außer der Kontrollgruppe) mittels ELISA detektierten. Sie wiesen darauf hin, dass Tauben daher als asymptomatische Träger in China fungieren könnten (Yu et al., 2007).

Tabelle 2.6: Infektionsversuche an Tauben mit verschiedenen AIV H5 (chronologische Reihenfolge)*

AIV-Stamm	Applikation und EID ₅₀	Anzahl und Alter der Tauben	Klinik, Pathologie sowie Laborbefunde	Referenz
A/Turkey/Ontario/7732/66 (HPAIV H5N9)	IV und IN 10 ⁸ EID ₅₀	2 juvenile, 2 adulte, Kontaktpu- ten	o.b.B.; HAH + bei Tauben, nicht bei Puten	Narayan et al., 1969
A/Turkey/Ontario/7732/66 (HPAIV H5N9)	IN 10 ³⁻⁵ EID ₅₀	19, adult	1 verstorben, Reisolierung +, HAH und AGP +/-, Übrige: o.b.B., 1 Reisolierung +,	Slemons und Easterday, 1972
A/Turkey/Wisconsin/68 (HPAIV H5N9)	IN, 1,6 x 10 ⁵ EID ₅₀	16, o.A.	o.b.B., Reisolierung + aus 3 Tauben, HAH + bei 9 Tauben, AGP -	
A/Chicken/Penn./1370/83 (HPAIV H5N2)	ON 10 ⁵ EID ₅₀	4, adult; 2 Kontakthühner und - tauben	o.b.B., HAH -, Reisolierung -	
A/Chicken/Penn./13609/93 (NPAIV H5N2)	IV, 10 ⁵ EID ₅₀	3, adult	o.b.B., HAH -, Reisolierung -	Panigrahy et al., 1996
A/Chicken/Penn./13609/93 (NPAIV H5N2)	ON 10 ⁵ EID ₅₀	4, adult; 2 Kontakthühner und - tauben	o.b.B., HAH -, Reisolierung -	
A/Chicken/HK/220/97 (HPAIV H5N1)	IN 10 ⁶ EID ₅₀	10, juvenil 4 Kontrolltauben (<i>Columba livia</i>)	o.b.B., Reisolierung -	Perkins und Swayne, 2002a; 2003a
A/Chicken/Indonesia/2003 (HPAIV H5N1)	ON und IO 10 ⁸ EID ₅₀	14, juvenil 5 Kontakthühner und 4 Kontakt- tauben, (<i>Columba livia f dom.</i>)	5 infizierte verstorben, hier ZNS-Symptome, Meningoenzephalitis (Cerebrum, Hirnstamm), IHC +; übrige inokulierte Tauben: HAH +	Klopfleisch et al., 2006

A/Chicken/Taiwan/1209/03 (NPAIV H5N2)	ON 5 x 10 ⁶ EID ₅₀	10 juvenile immunsuppr. und 10 juvenile Tauben, 5 immunsuppr. Kontakttauben, 5 Kontakttauben, (alles Brieftauben)	o.b.B., RNA-Nachweis aus diversen Organen sowie Tracheal- und Kloakentupfer -, Reisolierung -, HAH -; (2 Tauben unspezifisch verstorben)	Fang et al., 2006
A/duck/Thailand/144/2005 (HPAIV H5N1)	IN 10 ⁶ EID ₅₀	3, juvenil 2 Kontakttauben	o.b.B.	Boon et al., 2007
A/quail/Thailand/551/2005 (H5N1)	IN 10 ⁶ EID ₅₀	3, juvenil 2 Kontakttauben	o.b.B.	
A/common magpie/Hong Kong/645/2006 (HPAIV H5N1)	IN 10 ⁶ EID ₅₀	3, juvenil 2 Kontakttauben	Infizierte Tauben: Reisolierung + 3 dpi	
A/Japanese white-eye/Hong Kong/1038/2006 (HPAIV H5N1)	IN 10 ⁶ EID ₅₀	3, juvenil 2 Kontakttauben	o.b.B.	
A/Chicken/Huabei/H5N1/2004 (HPAIV H5N1)	IN, IO und oral 5 x 10 ⁴ EID ₅₀	13 adulte und 15 juvenile; 12 juvenile Kontakttauben, (Brief-, Fleisch-, Stadttauben)	o.b.B., Reisolierung 4 dpi bei 1 adulter infizierter Taube, danach wieder negativ; HAH -	Liu et al., 2007
	IM 5 x 10 ⁴ EID ₅₀	14 adulte und 15 juvenile; 12 juvenile Kontakttauben, (Brief-, Fleisch-, Stadttauben)	o.b.B., Reisolierung 6 dpi bei 1 adulter infizierter Taube, danach wieder -; HAH -	

A/Duck/Huanan/H5N1/2004 (HPAIV H5N1)	IN, IO und oral 5 x 10 ⁴ EID ₅₀	16, juvenil; 12 juvenile Kontakttauben, (Brief-, Fleisch-, Stadttauben)	o.b.B., Reisolierung -; HAH -	Liu et al., 2007
	IM 5 x 10 ⁴ EID ₅₀	16, juvenil; 12 juvenile Kontakttauben, (Brief-, Fleisch-, Stadttauben)	o.b.B., Reisolierung -; HAH -	
	IN, IO und oral 5 x 10 ⁴ EID ₅₀	16, juvenil; 12 juvenile Kontakttauben, (Brief-, Fleisch-, Stadttauben)	o.b.B., Reisolierung -; HAH -	
A/Goose/Huanan/H5N1/2004 (HPAIV H5N1)	IM 5 x 10 ⁴ EID ₅₀	16, juvenil; 12 juvenile Kontakttauben, (Brief-, Fleisch-, Stadttauben).	o.b.B., Reisolierung -; HAH -	Liu et al., 2007
	IV 5 x 10 ⁴ EID ₅₀	15, juvenil; 4 Kontrollhühner, (Brief-, Fleisch-, Stadttauben)	o.b.B., Reisolierung -; HAH -	
	IM 5 x 10 ⁴ EID ₅₀	8, juvenil; 4 Kontrollhühner, (Brief-, Fleisch-, Stadttauben)	o.b.B., Reisolierung -; HAH -	
A/Chicken/Huabei/H5N1/2006/01 (HPAIV H5N1)	IO und oral 5 x 10 ⁴ EID ₅₀	7, juvenil; 4 Kontrollhühner, (Brief-, Fleisch-, Stadttauben)	o.b.B., Reisolierung -; HAH -	Yu et al., 2007
	IV 10 ⁶ EID ₅₀	8, juvenil	3 ohne Symptome verstorben. Alle: AG-ELISA-Ergebnisse aus Drüsenmagen +	

A/Chicken/Hubei/327/2004 (HPAIV H5N1)	IV 10 ⁶ EID ₅₀	8, juvenil	2 ohne Symptome verstorben. Alle: AG-ELISA-Ergebnisse aus Drüsenmagen +	Yu et al., 2007	
A/Chicken/Hubei/JZJ/2004 (HPAIV H5N1)	IV 10 ⁶ EID ₅₀	8, juvenil	1 ohne Symptome verstorben. Alle: AG-ELISA-Ergebnisse aus Drüsenmagen +		
A/Chicken/Hubei/TMJ/2004 (HPAIV H5N1)	IV 10 ⁶ EID ₅₀	8, juvenil	o.b.B., Alle: AG-ELISA-Ergebnisse aus Drüsenmagen +		
A/Chicken/Hubei/XFJ/2004 (HPAIV H5N1)	IV 10 ⁶ EID ₅₀	8, juvenil	o.b.B., Alle: AG-ELISA-Ergebnisse aus Drüsenmagen +		
A/Goose/Hubei/ZFE/2004 (HPAIV H5N1)	IV 10 ⁶ EID ₅₀	8, juvenil	2 ohne Symptome verstorben. Alle: AG-ELISA-Ergebnisse aus Drüsenmagen +		
A/Duck/Hubei/XFY/2004 (HPAIV H5N1)	IV 10 ⁶ EID ₅₀	8, juvenil	o.b.B., Alle: AG-ELISA-Ergebnisse aus Drüsenmagen +		
A/Chicken/Anhui/85/2004 (HPAIV H5N1)	IN 10 ⁶ EID ₅₀	16, juvenil	Reisolierung bis 7 dpi (Kloake und Organe), HAH +		Jia et al., 2008b
A/Chicken/Guangxi/12/2004 (HPAIV H5N1)	IN 10 ⁶ EID ₅₀	16, juvenil	Reisolierung bis 7 dpi (Organe), HAH +		
A/Chicken/Hubei/14/2004 (HPAIV H5N1)	IN 10 ⁶ EID ₅₀	16, juvenil	Reisolierung bis 7 dpi (Choane), HAH +		
A/Chicken/Tianjin/65/2004 (HPAIV H5N1)	IN 10 ⁶ EID ₅₀	16, juvenil	Reisolierung bis 7 dpi (Organe), HAH +		

A/Duck/Guangdong/23/2004 (HPAIV H5N1)	IN 10 ⁶ EID ₅₀	16, juvenil	1 Apathie, gestäubtes Gefieder, ZNS-Symptome, nach 3 Tagen Rekonvaleszenz, Reisolierung bis 7 dpi (Kloake, Organe, Choane), HAH +	Jia et al., 2008b
A/Duck/Guangxi/13/2004 (HPAIV H5N1)	IN 10 ⁶ EID ₅₀	16, juvenil	6 Apathie, gestäubtes Gefieder, ZNS-Symptome, nach 3 Tagen Rekonvaleszenz, Reisolierung bis 7 dpi (Organe), HAH +	
A/Duck/Hunan/15/2004 (HPAIV H5N1)	IN 10 ⁶ EID ₅₀	16, juvenil	Reisolierung bis 7 dpi (Kloake, Organe, Choane), HAH +	
A/Pigeon/Hunan/39/2002 (HPAIV H5N1)	IN 10 ⁶ EID ₅₀	16, juvenil	6 Apathie, gestäubtes Gefieder, ZNS-Symptome, nach 3 Tagen Rekonvaleszenz, Reisolierung bis 7 dpi (Organe), HAH +	
A/Pigeon/Jilin/30/2004 (HPAIV H5N1)	IN 10 ⁶ EID ₅₀	16, juvenil	Reisolierung bis 5 dpi (Kloake, Organe), HAH +	
A/Pigeon/Shanxi/47/2004 (HPAIV H5N1)	IN 10 ⁶ EID ₅₀	16, juvenil	8 Apathie, gestäubtes Gefieder, ZNS-Symptome, nach 3 Tagen Rekonvaleszenz, Reisolierung bis 7 dpi (Kloake, Organe, Choane), HAH +	
A/W'hopper Swan/Mongolia/244/2005 (HPAIV H5N1)	IN 10 ^{3,1} EID ₅₀	5 (<i>Columbia livia</i>)	o.b.B., Reisolierung -, AGP und ELISA -	Brown et al., 2009
	IN 10 ^{4,9} EID ₅₀	5 (<i>Columbia livia</i>)	o.b.B., Reisolierung -, AGP und ELISA	

	IN 10 ^{6,1} EID ₅₀	5 (<i>Columbia livia</i>)	2 verstorben, hiervon 1 ZNS-Symptome; 1 vorübergehende Lethargie; Alle überlebenden Tauben: AG-Nachweis im Gehirn, AK. Alle Tauben: minimale Ausscheidung über kurze Zeit	
--	---	-----------------------------	---	--

*IZ = intrazerebral; IM = intramuskulär; IN = intranasal; IO = intraokulär; IV = intravenös; ON = okulonasal; o.b.B. = ohne besonderen Befund

Infektionsversuche mit AIV des Subtyps H7 wurden ab den neunziger Jahren des letzten Jahrtausends durchgeführt (siehe Tabelle 2.7). Kaleta und Hönicke (2004) beschreiben die erfolgreiche Infektion von Brief- und Rassetauben mit HPAIV H7N1, wobei nur wenige Tauben symptomatisch erkrankten oder gar verendeten, jedoch Virus aus allen Tauben reisoliert und eine Serokonversion nachgewiesen werden konnte. Die Inkubationszeit war in diesen Versuchen im Vergleich zu gleichfalls infizierten Hühnern und Pekingenten länger. Aus ihren Ergebnissen schlossen die Autoren, dass Tauben gegenüber HPAIV H7 empfänglicher seien. Panigrahy et al. (1996) versuchten vergeblich, Tauben mit hoch- und niedrigpathogenen H7 zu infizieren, so dass sie, analog ihrer Ergebnisse mit H5 (siehe oben), Tauben eine natürliche Resistenz gegenüber Influenza A Viren zusprachen. Klinische Symptome konnten auch in zwei Infektionsversuchen mit einer hohen Dosis eines hochpathogenen H7N7, welcher aus betroffenen Geflügel der Ausbrüche in den Niederlanden 2003 isoliert wurde, nicht ausgelöst werden. In einem der beiden Versuche fand jedoch bei der Mehrzahl der Tauben eine Serokonversion und eine vorübergehende, minimale Virusausscheidung statt (Klopfleisch, persönliche Mitteilung 2009).

Nur eine ältere und eine aktuelle Studie beschäftigen sich mit der experimentellen Empfänglichkeit von Tauben gegenüber anderen Subtypen (außer H5 und H7) (Siehe Tabelle 2.8). Kurz nach der weltweit verheerenden H3N2-Grippeepidemie des Jahres 1968 („Hong Kong Grippe“, siehe Kapitel 2.4.2) und einer lokalen H3N2-Epidemie in Ungarn wurden Türkentauben (*Streptopelia decaocto*) mit zwei H3N2-Isolaten vom Menschen infiziert und die Bildung neutralisierender Antikörper induziert (Romváry et al., 1976). In Taiwan wurde im Jahr 2000 aus einer importierten Taube ein H6N1-Virus isoliert, woraufhin einige Jahre später von einer taiwanesischen Arbeitsgruppe dieser Subtyp, neben NPAIV H5N2 (siehe oben), verwendet wurde (Fang et al., 2006). Infiziert wurden sowohl gesunde als auch durch die Anwendung von Cyclophosphamid stark immunsupprimierte Tauben. In Übereinstimmung mit ihren Ergebnissen aus der Studie mit H5N2 konnten auch mit dem H6 in keinen Tauben Symptome ausgelöst, Virus-RNA mittels RT-PCR in den Organen getöteter Tiere nachgewiesen oder eine Serokonversion festgestellt werden. Die Autoren sahen daher nicht einmal in stark immunsupprimierten Tauben einen primären Überträger von Influenzaviren, erwähnten allerdings deren Rolle als mögliche mechanische Vektoren.

Tabelle 2.7: Infektionsversuche an Tauben mit verschiedenen AIV H7 (chronologische Reihenfolge)*

AIV-Stamm	Applikation und EID ₅₀	Alter, Anzahl	Klinik, Pathologie sowie Laborbefunde	Referenz
A/FPV/ Rostock/34 (HPAIV H7N1)	IM K.A.	3, adult	2 vorübergehend ZNS-Symptome	Dinter, 1944
A/Chicken/Brescia/ 1902 (HPAIV H7N7)	IO K.A.	2, o.A.	o.b.B.; 7dpi HAH +	Weidenmüller, 1950
A/Carduelis Germany/72 (HPAIV H7N1)	IM 10 ^{2,1} EID ₅₀	11, o.A.	1 Konjunktivitis, Tremor, verendet, Petechien (Großhirn), Reisolierung +; 2 vorübergehend Konjunktivitis, alle Überlebenden: HAH +	Eckert, 1979; Kaleta und Hönicke, 2004
A/chicken/Australia/32972 /85 (HPAIV H7N7)	IO 10 ^{8,1} EID ₅₀ ON 10 ⁵ EID ₅₀ IV 10 ⁵ EID ₅₀	2, o.A., 2 Kontakttauben 4, adult, 2 Kontakthühner und –Tauben 3, adult	obB, infizierten T. HAH + obB, HAH -, Reisolierung - o.b.B, HAH -, Reisolierung -	Panigrahy et al., 1996
A/Emu/Texas/4249/93 (NPAIV H7N1)	ON 10 ⁵ EID ₅₀	4, adult, 2 Kontakthühner und –Tauben	o.b.B., HAH -, Reisolierung bei 1 Taube 3dpi (vermutlich vom Inokulum)	

*IM = intramuskulär; IO = intraokulär; IV = intravenös; ON = okulonasal; o.b.B. = ohne besonderen Befund

Tabelle 2.8: Infektionsversuche an Tauben mit verschiedenen AIV, außer H5 und H7 (chronologische Reihenfolge)*

AIV-Stamm	Applikation und EID ₅₀	Anzahl, Alter	Klinik, Pathologie sowie Laborbefunde	Referenz
A/Victoria/3/75 (H3N2)	K.A. K.A.	2, o.A.	K.A., HAH +	Romváry et al., 1976
A/Port Chalmers/1/73 (H3N2)	K.A. K.A.	1, o.A.	K.A., HAH +	
A/Port Chalmers/1/75 (H3N2)	K.A. K.A.	1, o.A.	K.A., HAH +	
A/chicken/Taiwan/3152/03 (NPAIV H6N1)	ON 5 x 10 ⁶ EID ₅₀	8 juvenile immunsupprimierte, 8 juvenile, 8 immunsupprimierte Kon- takttauben	o.b.B., RNA-Nachweis aus div. Organen sowie Tracheal- und Kloakentupfer -, Reiso- lierung -, HAH -	Fang et al., 2006

*K.A. = Keine Angabe; ON = Okulonasal; O.A. = ohne Altersangabe, o.b.B. = ohne besonderen Befund;

2.2.2 Natürliche Infektionen

Während der HPAIV H5N1-Ausbrüche seit 1996 wurde immer wieder über sporadisch auftretende, natürliche Infektionen bei Tauben berichtet. Bei der Untersuchung von Lebendgeflügelmärkten (LGM) in Hong Kong auf die Präsenz aviärer Influenzaviren durch Guan et al. (2002) isolierten diese im April 2001 ein H5N1-Isolat aus Kotproben gesund erscheinender Tauben. Hierbei muss berücksichtigt werden, dass die Untersuchungen aus Tupfern erfolgten, welche von Blechen, die unter den Taubenkäfigen standen, genommen wurden. Eine Kontamination dieser Bleche mit Kot anderer Tiere oder nicht ausreichend infizierte Bleche vorheriger Einstellungen können hier also nicht sicher ausgeschlossen werden. Jia (2007) untersuchte 205 Stadtauben auf zwei LGM in Harbin (China). Es wurden weder AIV angezüchtet, noch AIV-spezifische RNA mittels RT-PCR nachgewiesen.

Ende 2002 wurde während eines HPAIV H5N1-Ausbruchs bei Wildvögeln in einer öffentlichen Wasservogel-Parkanlage in Hong Kong dieser aus einer toten Taube isoliert. Eine weitere verendete Taube aus der unmittelbaren Umgebung zeigte negative Ergebnisse (Ellis et al., 2004; Li et al., 2004). Gleich mehrere Berichte stammen aus Thailand: Songserm et al. (2006a) beschreiben eine Infektion einer Katze, nachdem diese einen HPAIV H5N1-infizierten Taubenkörper gefressen hatte. Ebenfalls 2004 wurde aus Tauben HPAIV H5N1 isoliert, infolgedessen über 400 Tauben als Kontrollmaßnahme getötet wurden. Die Anzahl der infizierten Tauben wurde nicht genannt (Fang et al., 2006). Im Jahr 2005 erfolgte der Nachweis bei zwei Tauben in Bangkok (Uchida et al., 2008). Nach Angaben von Promedmail (2004) sollen in Zentral-Thailand Ende 2004 mehrere hundert verstorbene Tauben neben zwei Schulen aufgefunden und als Todesursache aviäre Influenza (ohne Angabe des Subtyps, aber zeitnah zu früheren HPAIV H5N1 Ausbrüchen) festgestellt worden sein. Weitere Fälle sollen Anfang 2007 aus der Suphan Buri Provinz (Zentral-Thailand) stammen (Promedmail, 2007). Für diese Meldungen fehlen jedoch bislang zuverlässige Angaben in der Literatur. Weiterhin wurden 2002 ein HPAIV H5N1-Isolat aus einer toten und 2004 ein solches aus zwei kranken Tauben in China isoliert (Jia et al., 2008b). Schließlich deutet die Suche nach Taubenisolaten in GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) auf weitere, bislang nicht publizierte Infektionen im Jahr 2006 in Indonesien (GenBank-Nr. EU124219 und EF634311) sowie der Türkei (GenBank-Nr. EU542805, EU542798 und 542748), und 2007 im europäischen Teil Russlands (GenBank-Nr. EU441937) sowie Laos (GenBank-Nr. CY030481) hin.

Natürliche Infektionen mit dem aviären Influenzavirus des Subtyps H7 bei Tauben wurden im Zusammenhang mit der HPAIV H7N1 Epidemie in Italien von 1999 bis 2000 beschrieben. Im Rahmen eines Wildvogelmonitorings bei insgesamt 103 Vögeln (19 Tauben) in einem Zeitraum von Januar bis April 2000 wurde eine Türkentaube (*Streptopelia decaocto*)

positiv getestet. Diese wurde in einem Radius von 1 km zu einer betroffenen Geflügelfarm tot aufgefunden. Ein epidemiologischer Zusammenhang erscheint hier naheliegend (Capua et al., 2000c). Zudem untersuchten Gronesová et al. (2009) in Košice (Tschechien) Kloaken- und Trachealtupfer von 50 Stadttauben mit einer nested RT-PCR, welche es ihnen erlaubte, eine direkte Subtypisierung aus den Proben durchzuführen. Bei ihrem Screening detektierten sie AIV-RNA der Subtypen H7N3 in fünf Tauben (10 %), H7N6 in zwei Tauben (4 %). Desweiteren wurden die AIV Subtypen H9N5 in vier Tauben (8 %) sowie in einer Taube H14N8 (2 %) detektiert. Der AIV-RNA-Nachweis gelang also bei zwölf Tauben (24 %), wobei aus Material von zehn Kloakentupfern sowie sechs Trachealtupfern AIV-RNA amplifiziert werden konnte. Bei vier Tauben waren beide Tupfer positiv.

Darüber hinaus berichten Koval'chuk Ivanyuk et al. (1975) über die Isolierung von H2 aus zwei Turteltauben (*Streptopelia turtur*). Im Zoo von Budapest wurde aus einer von 19 getöteten Türkentauben (5,3 %) eine Variante des H3N2 Virusstamms der Hong Kong Grippe von 1986 isoliert (Romváry und Tanyi, 1975; Romváry et al., 1976). Aus Minnesota stammt ein H1N1-Taubenisolat (Halvorson et al., 1983; Obenauer et al., 2006). Während des Screenings eines LGM in Südchina wurden aus 0,5 % der insgesamt 1190 untersuchten Kotproben von Tauben sechs AIV-Isolate, und zwar H9N2 (3 Isolate), H3N6 (2 Isolate) und H3N3 (1 Isolat), gewonnen (Liu et al., 2003). Mehrere H9N2 Isolate wurden darüber hinaus zu verschiedenen Zeitpunkten aus Kotproben, genommen auf Geflügelmärkten in Hong Kong, isoliert: Eines stammte hierbei aus Dezember 1997 (Guan et al., 1999), wobei die Autoren hier keine Angabe zur insgesamt untersuchten Anzahl bringen. Kontinuierliche Untersuchungen erbrachten im Jahr 1999 aus weiteren vier Tupfern von 137 untersuchten Kotproben (2,9 %) positive Nachweise (Guan et al., 2000). Bislang nicht publiziert bleibt ein H9N2-Isolat aus dem Jahr 2003, welches in GenBank hinterlegt wurde (GenBank-Nr. AY664710). Schließlich stammt ein H9N2-Wildtaubenisolat aus Israel (Perk et al., 2006).

Aus Deutschland wurden bisher keine Isolate publiziert, allerdings ein Sequenzabschnitt des H3 von A/Pigeon/Germany/R42/01, durch Starick und Werner in GenBank hinterlegt (Genbank-Nr. AJ746251).

Den beschriebenen AIV-Nachweisen muss entgegengesetzt werden, dass sie nur einen geringen Anteil aller untersuchten Taubenproben darstellen. In der größten Anzahl der auf AIV untersuchten Tauben-Feldproben waren die Ergebnisse negativ (Tabelle 2.9).

Tabelle 2.9: Epidemiologische Untersuchungen, bei denen kein AIV sowie deren Antikörper in Taubenproben nachzuweisen waren (chronologische Reihenfolge)*

Gebiet	Zeitraum	Taubenart/ Anzahl	Material/ Methode	Referenz
USA	1969	Carolinatauben ¹ /98	Blut/HAH(H6N2)	Carpenter et al., 1972
Spanien	Okt. 1971	Wildtauben/40	Blut/HAH (H3N2)	Vicente et al., 1973
Österreich	Nov. 1977	Palmtauben ² /10 ¹ Stahlflecktäubchen ³ /4 Kaptäubchen ⁴ /11 ¹	Tracheal- und Kloakentupfer/VI	Stünzner et al., 1980
Deutschland	Okt. 1984 bis Dez. 1985	Brieftauben/958	Blut/AGP	Heffels et al., 1981
Deutschland	1977 - 1980	Wildtauben/K.A.	Organe, Tracheal- und Kloakentupfer/VI	Ottis & Bachmann, 1983
Tschechoslowakei	Aug 1983 bis März 1984	Wildtauben/121	Blut/HAH (K.A.)	Cernik et al., 1985
USA	Nov. 1983 bis Mai 1984	Wildtauben/480 Taubenfüße/81	Tracheal- und Kloakentupfer/VI; Blut/HAH (H5N2)	Nettles et al., 1985
Neuseeland	K. A.	Wildtauben/53	Tracheal- und Kloakentupfer, Darm/VI	Motha et al., 1997
Chile	März 1996 bis März 1997	Stadttauben/100	Blut/AGP	Toro et al., 1999
Neuseeland		Brief- und Stadttauben/560	Blut/AGP	Black et al., 2004
Slowenien	2000	Stadttauben/139	Blut/AGP	Dovč et al., 2004
Australien	März 2001 bis März 2002	Wildtauben/133	Tracheal- und Kloakentupfer/VI	Peroulis & O'Riley, 2004
Deutschland	März 2003 bis Nov. 2005	Wildtaube/4	Tracheal- und Kloakentupfer/VI	Globig et al., 2006a
Norwegen	Juni bis Sept. 2003	Stadttauben/100	Kloakentupfer/VI	Lillehaug et al., 2005
Afrika	1998 bis 2006	Adamaua-Turteltaube ⁵ /64 Erzflecktäubchen ⁶ /16 Palmtauben ² /16 Stahlflecktäubchen ³ /3	Kloakentupfer/RT-PCR	Munster et al., 2007

Asien	1998 bis 2006	Orientturteltaube ⁷ /2	Kloakentupfer/RT-PCR	Munster et al., 2007
Asien und Europa	1998 bis 2006	Hohltaube ⁸ /2	Kloakentupfer/RT-PCR	
Europa	1998 bis 2006	Ringeltaube ⁹ /6	Kloakentupfer/RT-PCR	
Ägypten	Feb.2006 bis Feb. 2007	Wildtauben/194	Tracheal- und Kloakentupfer/RT-qPCR	Aly et al., 2007
Nepal	Feb. 2004 bis Dez. 2005	Wildtauben/19	Blut/c-ELISA	Pant & Selleck, 2007
Thailand	Juli 2006 bis Aug. 2007	Haustauben/6	Kloakentupfer/VI und RT-PCR	Amonsin et al., 2008

* K. A. = Keine Angabe; VI = Virusisolierung im SPF-Hühnerei; c-ELISA = kompetitiver ELISA; ¹⁾ *Zenaida macroura*; ²⁾ *Streptopelia senegalensis*; ³⁾ *Turtur afer*; ⁴⁾ *Oena capensis*; ⁵⁾ *Streptopelia hypopyrrha*; ⁶⁾ *Turtur abyssinicus*; ⁷⁾ *Streptopelia orientalis*; ⁸⁾ *Columba oenas*; ⁹⁾ *Columba palumbus*

2.2.3 Serologische Untersuchungen

Ähnlich wie die Situation mit den natürlichen AIV-Infektionen bei Tauben verliefen auch die serologischen Untersuchungen in den meisten Fällen ohne Antikörper-Nachweise gegen AIV (Tabelle 2.9).

Dahingegen wiesen Romváry und Tanyi (1975) bei vier von 19 Türkentauben (*Streptopelia decaocto*), gefangen im Zoo von Budapest, mittels HAH Antikörper gegenüber dem AIV-Subtyp H3 nach. Des Weiteren fanden sie diese bei 16 von 35 untersuchten Turteltauben (*Streptopelia turtur*) des Zoos sowie bei 14 von 27 untersuchten Turteltauben in der näheren Umgebung (Romváry et al., 1976). Darüber hinaus gelang der Nachweis von Antikörpern mittels HAH gegen H1 bei 23,6% aller untersuchten Stadtauben und 17,2% der Brieftauben im Raum Zagreb (Kroatien), während keine der untersuchten Wildtauben Antikörper gegen diesen Subtyp sowie keine der gesamten Tauben solche gegen H3 aufwiesen. Insgesamt wurden in dieser Studie 391 Taubenserum untersucht (Zupancic et al., 1986). Abubakar et al. (2008) untersuchten 212 Wildtauben in Nigeria mittels HAH, wobei als Antigene für den Test ein H3N2 (A/Moscow/10/99) sowie ein Influenza B Virus (B/Hong Kong/330/2001) eingesetzt wurden. In Seren von 123 Tauben (58%) konnten Antikörper nachgewiesen werden. Antikörper gegen das Influenza A Virus wurden bei 82 Tauben (66,6 %) nachgewiesen, gegen das Influenza B Virus bei 17 Tauben (13,8 %). 24 Tauben (19,5 %) wiesen Antikörper gegen beide Typen auf. Die HAH Titer gegen das Influenza A Virus lag bei einem durchschnittlichen Wert von 1:47, der gegen die Influenza B Viren bei 1:25. Einen noch höheren Prozentsatz positiver Seren erreichten Al-Attar et al. (2008) bei Wildtauben im Irak. Im Jahr 2007 nahmen

sie bei 60 apathisch erscheinenden Tauben Blutproben zur Untersuchung mittels kompetitiven Influenza A-ELISA und HAH. 81,8% der Taubenserum reagierten im kompetitiven Influenza A-ELISA positiv. Von diesen reagierten wiederum 50% im HAH gegenüber dem AIV-Subtyp H9 positiv. Tauben wurde daraufhin eine Rolle als Vektor für AIV in diesem Gebiet zugesprochen. In den Vereinigten Arabischen Emiraten reagierte schließlich eine von vier Tauben im HAH gegen H5N2 positiv (Obon et al., 2007). Jia (2007) konnte bei 205 untersuchten Stadtauben aus Harbin (China) Antikörper gegen den AIV Subtyp H9 mittels HAH bei 24,4 % der Tauben nachweisen. Blut von 11,2 % der Tauben ergab einen Antikörpertiter von $3 \log_2$, 7,3 % einen von $4 \log_2$, 4,9 % einen von $5 \log_2$ und 1 % von $6 \log_2$.

2.3 Aviäre Influenzavirusinfektionen bei Greifvögeln

2.3.1 Experimentelle Infektionsstudien

Maggiore und Valenti (1903) erwähnten schon Anfang des 20. Jahrhunderts die Infektion von Sperbern (*Accipiter nisus*) und Turmfalken (*Falco tinnunculus*) mit Agenzien, welche mit hoher Wahrscheinlichkeit HPAIV darstellten. Sie injizierten den Falken Blut infizierter Hühner subkutan und beobachteten zentralnervöse Symptome mit nachfolgendem Verenden der Vögel. Eine exakte Spezifizierung des Agens war zu diesem Zeitpunkt jedoch noch nicht möglich gewesen, so dass es sich durchaus auch um ein anderes Virus, in erster Linie ein Newcastle Disease Virus, gehandelt haben könnte.

Lierz et al. (2007) infizierte fünf Ger-Saker-Hybridfalken (*Falco rusticolus* x *Falco cherrug*), welche zweimalig im Abstand von vier Wochen intramuskulär oder subkutan mit einer kommerziellen, inaktivierten H5N2-Vakzine geimpft worden sind sowie fünf ungeimpfte Kontrollfalken derselben Art mit einem HPAIV H5N1, isoliert aus einem Schwan in Deutschland im Jahr 2006. Hierzu bekamen sie 1 ml einer Virussuspension mit enthaltenen 10^6 EID₅₀ oropharyngeal verabreicht. Alle Kontrolltiere verstarben zwischen drei und fünf Tagen nach der Infektion (dpi). Vier dieser Falken hatten zuvor eine reduzierte Futteraufnahme gezeigt und bei drei Tieren konnte blutiges Exsudat in der Trachea festgestellt werden. Bei der täglichen Untersuchung von Kloaken- und Oropharyngealtupfern konnte in Letzteren zu jedem Zeitpunkt HPAIV H5N1-RNA mittels RT-qPCR nachgewiesen sowie Virus im SPF-Hühnerei angezüchtet werden. Nach 2 dpi war dieses auch aus den Kloakentupfern möglich. Bei der Sektion zeigten drei Falken multifokale Hämorrhagien im Pankreas, im histopathologischen Bild zeigten sich bei allen Falken in diversen Organen (Gehirn, Rückenmark, Pankreas, Milz, Niere) multifokale, akute Zelldegenerationen und Nekrosen, welche mit milden, heterophilen Entzündungsreaktionen assoziiert vorlagen. In diesen Organen gelang der Nach-

weis von HPAIV-Antigen mittels Immunhistochemie. HPAIV-Antigen konnte außerdem in der Nasenhöhle, Trachea, Bronchialepithel und Gastrointestinaltrakt nachgewiesen werden, nicht aber in der Leber und in der Haut. Bei der Untersuchung von Organmaterial des Gehirns, Duodenums, Pankreas, der Trachea und Lunge mittels RT-qPCR konnten hohe Viruslasten aufgezeigt werden.

Dagegen überlebten in dieser Studie alle geimpften Falken die Infektion und zeigten lediglich in zwei Fällen eine kurzzeitige Inappetenz. Die Vögel wurden elf Tage nach der Infektion euthanasiert. Keine der vakzinierten Falken zeigten im makroskopischen noch im histopathologischen Bild Veränderungen oder einen immunhistochemischen HPAIV-Antigen-Nachweis. Mittels RT-qPCR wurde H5-subtypspezifische RNA in Gehirn und Trachea von drei Vögeln nachgewiesen. Dies gelang ebenso ausschließlich in der Lunge von zwei Vögeln sowie im Duodenum bzw. im Pankreas von je einem Falken. Hierbei lag jedoch in allen Fällen signifikant weniger H5-RNA in den Geweben vor als bei den nicht-vakzinierten Falken. Die VI gelang nur bei zwei Falken aus Organmaterial der Trachea und bei einem aus der Lunge.

2.3.2 Natürliche Infektionen

Die ersten Nachweise von AIV aus Greifvögeln erfolgten erst im Jahr 2000. In diesem Jahr erfolgte die fast zeitgleiche Isolierung von hochpathogenen Viren des Subtyps H7 aus zwei Falken. Hierbei handelte es sich um falknerisch gehaltene Vögel, welche beide mit Allgemeinsymptomen in zwei Tierkliniken vorgestellt wurden. Die Falken hatten untereinander keinen Kontakt. Beim ersten Fall war ein Wanderfalke (*Falco peregrinus*) aus Dubai (Vereinigte Arabische Emirate) betroffen. Zum Zeitpunkt der Vorstellung konnte dieser Falke nicht mehr stehen und verstarb kurze Zeit später. Bei der Untersuchung wurde HPAIV vom Subtyp H7N3 isoliert sowie Schrotreste angeschossener Futtermittel im Drüsenmagen gefunden und *Pasteurella multocida* aus Lunge und Leber isoliert. Somit bleibt offen, ob die Symptome durch die Influenzaviren oder die zusätzlichen Befunde ausgelöst wurden. Epidemiologische Untersuchungen ergaben keine eindeutige Infektionsquelle. HPAIV H7N3 wurde einige Jahre zuvor in Geflügel in Pakistan festgestellt, der Falke jedoch nachweislich nie in diesem Land geflogen. Möglicherweise erfolgte die Infektion daher über den Kontakt zu infizierten Wildvögeln in den Vereinigten Arabischen Emiraten (VAE). Eine eingeleitete serologische Untersuchung von 21 Wild- und Beizfalken in den VAE erbrachte allerdings keinen Nachweis von Antikörpern gegen H7 als möglichen Hinweis auf weiter verbreitete Infektionen in der Region (Manvell et al., 2000). Der zweite Fall beschreibt einen Sakerfalken (*Falco cherrug*) aus Italien, welcher nach einem Jagdtag plötzlich schwach erschien und keine Nahrung aufnahm. Auch dieser Falke erlag kurze Zeit später seinen Beschwerden. Neben einem geringgradigen Nachweis von *E. coli* aus dem Darm, wurde aus Gehirn und Leber HPAIV H7 isoliert. In

derselben Region (Norditalien) kursierte kurz zuvor eine H7-Epidemie im Geflügel. Ein epidemiologischer Zusammenhang, etwa über das Verfüttern infizierter Küken an den Sakerfalken, erscheint somit möglich. Drei weitere Falken desselben Züchters wurden umgehend untersucht, zeigten allerdings weder serologisch noch bei der virologischen Untersuchung Hinweise auf eine stattgefundene Infektion (Magnino et al., 2000).

Im Jahr 2005 gelang die Isolierung eines LPAIV H7N7 aus einem Schwarzmilan (*Milvus migrans*) in Ägypten. Dies bedeutete die erstmalige Isolierung eines niedrigpathogenen AIV aus einem Greifvogel und eröffnete somit die Möglichkeit dieser Vögel als potenzielle Überträger. Es ist nachgewiesen worden, dass dieses Isolat eine enge Verwandtschaft zu anderen H7N7-Isolaten aus England und Deutschland, nicht aber zu solchen aus den Niederlanden aufweist (AlyAly et al., 2010). Schwarzmilane gehören zu den Langstreckenziehern mit Brutgebieten in Zentraleuropa und Überwinterungsgebieten in Nordafrika und dem Mittleren Osten. Über den Ort der Infektion und der Verbreitung des Virus konnten keine Angaben gemacht werden. Während des HPAIV H5N1-Wildvogelmonitorings von Greifvögeln in Baden Württemberg konnten bei keinen der untersuchten Schwarzmilane oder übrigen Greifvogel Infektionen mit AIV detektiert werden (Anonym 2009a).

Seit dem Auftreten von HPAIV H5N1 wurden Infektionen bei Greifvögeln vermehrt berichtet. Eine mögliche Erklärung hierfür wird darin gesehen, dass Greifvögel während der Jagd vermehrt geschwächtes Beutewild fangen (Temple et al., 1987). Für HPAIV wurde ein erweitertes Wirtsspektrum festgestellt, das heißt, dass auch Vögel, welche früher als typische Reservoirwirte nicht an AIV erkrankten, für diesen Erreger hochempfindlich sind und gleichzeitig typische Beutetiere für Greifvögel darstellen. Darüber hinaus nehmen viele Arten, und hier vor allem Altweltgeier (*Aegyptiinae*) und Bussarde (*Buteo* spp.), auch Aas als Nahrung auf. Gerade während der Jahre 2006 und 2007 wurde vermehrt über tot aufgefundene und mit HPAIV H5N1-infizierte Wildvögel berichtet. Die Theorie wird dadurch gestützt, dass die Infektion von Carnivora, wie Großkatzen (*Pantherinae*), Hauskatzen (*Felis catus*), Hunde (*Canis lupus familiaris*), aber auch Falken durch den Verzehr HPAIV H5N1-infizierter Futtertiere bereits experimentell sowie im Feld mehrfach bestätigt werden konnte (Keawcharoen et al., 2004; Songserm et al., 2006a, Songserm et al., 2006b, Khan et al., 2009).

Der erste HPAIV H5N1 wurde im Jahr 2004 aus einem wildlebenden Wanderfalken aus Hongkong isoliert (Li et al., 2004; Smith et al., 2008). Im Jahr 2006, 2007 und 2008 folgte jeweils ein einzelner, weiterer Nachweis bei toten Vögeln dieser Greifvogelart in Hongkong. Zusätzlich betroffene Beutegreifer umfassten einen Mäusebussard (*Buteo buteo*), einen Schopfhabicht (*Accipiter trivirgatus*) sowie einen Turmfalken, welche alle im Jahr 2007 tot aufgefunden wurden (Smith et al., 2009).

Anfang 2004 sollen in einem Zoo in Kambodscha (Südostasien) 86 Wildvögel, unter diesen fast die gesamte Greifvogel- und Eulenkollektion, bestehend aus Graukopf-Seeadlern (*Ichthyophaga ichthyaetus*), Schlangenadlern (*Circaetus gallicus*), Habichtsadlern (*Hieraaetus spilogaster*), Pagodenkäuzen (*Strix seloputo*), Nepal-Uhus (*Bubo nipalensis*) und Fisch-eulen (*Scotopelia peli*), an HPAIV H5N1 verendet sein (FAO, 2004). In Burkina Faso (Westafrika) wurden im Rahmen des AIV-Wildvogelmonitorings von Februar bis Juni 2006 insgesamt 48 Kappengeier (*Necrosyrtes monachus*) entweder tot oder mit respiratorischen und neurologischen Symptomen sowie Diarrhoe aufgefunden und beprobt. Aus Tupferproben von Kloake und Trachea konnte in 17 Fällen eine AIV-Infektion mittels Schnelltest bestätigt werden. Die Untersuchung mittels Influenza A-spezifischer RT-qPCR sowie einer RT-qPCR spezifisch für den Subtyp H5 wies allerdings in allen Proben AIV-RNA nach. Die phylogenetische Sequenzanalyse wies eine enge Verwandtschaft zu HPAIV H5N1-Geflügelisolaten aus demselben Gebiet auf. Daher erscheint die Infektion der Geier, insbesondere unter der Berücksichtigung ihrer Ernährungsgewohnheiten, durch den Verzehr infizierten Geflügels mehr als wahrscheinlich. Da Geier gewöhnlich auch in urbanen Gebieten im direkteren Kontakt zum Menschen vorkommen und darüber hinaus in Afrika in der traditionellen Medizin Verwendung finden, könnten infizierte Kappengeier hier ein zoonothropisches Risiko für die menschliche Gesundheit darstellen. Weil sie als Aasfresser an der Spitze der Nahrungspyramide stehen, wurde vorgeschlagen, sie in Afrika als Sentinelpopulation zur Eruiierung von AIV in Wildvögeln heranzuziehen (Ducatez et al., 2007). Des Weiteren wurde als zweites afrikanisches Land an der Elfenbeinküste aus Organmaterial von Luftröhre, Herz, Leber und Gehirn bei einem Sperber HPAIV H5N1-RNA mittels RT-qPCR nachgewiesen. Nachfolgend wurde das Virus mittels VI angezüchtet (Couacy-Hymann et al., 2009).

Am Brüsseler Flughafen (Belgien) erfolgte am 18. Oktober 2004 die Konfiszierung von zwei geschmuggelten Haubenadlern (*Spizaetus nipalensis*), welche aus Thailand stammten und für einen belgischen Falkner bestimmt waren. Obgleich die Vögel keine klinischen Symptome zeigten, wurden die Vögel in der Quarantänestation euthanasiert und routinemäßig auf aviäre Influenza- sowie Newcastle Disease Viren untersucht. Es gelang die Isolierung von HPAIV H5N1. Sofort wurden allen Personen, welche mit den Vögeln direkten oder indirekten Kontakt gehabt hatten, eine Oseltamivir-Prophylaxe verschrieben. Alle Personen, bis auf den Tierarzt, welcher die Proben genommen hatte und eine Konjunktivitis entwickelte, blieben symptomlos. Ebenso wurde bei keinen Vögeln, welche zeitgleich in der Quarantänestation untergebracht waren, aviäre Influenzaviren isoliert (Van Borm et al., 2005). Die molekulare Charakterisierung dieses Virusstammes erbrachte die Zugehörigkeit zum 2003 und 2004 im Geflügel in Thailand zirkulierenden Z-Genotyp, so dass die Infektion mit großer Wahrscheinlichkeit in Thailand stattfand. Dieser Fall verdeutlicht somit das Risiko der

Verbreitung von HPAIV H5N1 über den illegalen Handel von Vögeln, einschließlich Greifvögeln (Steensels et al., 2007).

In Deutschland wurden während der HPAIV H5N1-Ausbrüche seit 2006 bis heute (Stand Februar 2010) bei insgesamt 34 Greifvögeln HPAIV H5N1 festgestellt. Hierbei handelte es sich um 28 Bussarde, darunter 20 spezifizierte Mäusebussarde, jeweils eine Kornweihe (*Circus cyaneus*), Habicht (*Accipiter gentilis*) und Falke (ohne Angabe der Art) sowie zwei Wanderfalken und einen Turmfalken (Tabelle 2.3). Die Isolate stammen allesamt aus dem Jahr 2006 und stellen hier etwa 10% der Wildvögel mit HPAIV H5N1-positiven Untersuchungsergebnis dar (Beer et al., 2006). Bei noch lebend aufgefundenen Greifvögeln wurden mehrfach ZNS-Symptome festgestellt, darüber hinaus unterstrich das histologische Bild einen neurotrophen Verlauf der Erkrankung. Eine Arbeitsgruppe der Universität Ulm untersuchte daraufhin 280 Greifvögel in Baden-Württemberg, um das Übertragungsrisiko durch diese abzuschätzen. Von diesen Vögeln war keines mit HPAIV H5N1 infiziert (Anonym 2009a).

Ebenfalls im Jahr 2006 meldete Dänemark, dass hier in sechs gestorbenen Mäusebussarden, einem Raufußbussard (*Buteo lagopus*) sowie einem Wanderfalken HPAIV H5N1 mittels RT-qPCR bestätigt werden konnte. Insgesamt waren in Dänemark 44 Wildvögel positiv getestet worden. Alle Sequenzen zeigten eine hohe Übereinstimmungen mit denen von Wildvögeln aus Deutschland (Bragstadt et al., 2007; Komar und Olsen, 2008). In Schweden und in Frankreich wurde bei je einem Mäusebussard im Jahr 2006 HPAIV H5N1-RNA nachgewiesen (Le Gall-Reculé et al., 2008; Zohari et al., 2008). In der Slowakei erfolgte im gleichen Jahr die Isolierung aus einem verstorbenen Wanderfalken (Nagy et al., 2009). In Polen wurden im Jahr 2007 die bislang letzten HPAIV H5N1-Fälle bei Greifvögeln, in diesem Fall bei zwei Mäusebussarden, erbracht (OIE , 2007).

Der erste Fall von HPAIV H5N1 bei einem Greifvogel im Mittleren Osten stammt aus Saudi-Arabien. Die Falknerei hat in diesem Land ihren Ursprung und wird hier nach wie vor intensiv betrieben. Bei dem betroffenen Vogel handelte es sich um einen trainierten Sakerfalken, welcher im Dezember 2005 Anorexie und grünliche Fäzes zeigte (Promedmail , 2006a). Nachdem der Vogel innerhalb weniger Stunden verstarb, konnte aus Organproben HPAIV H5N1 isoliert werden (Samour, 2006). In einem anderen Fall wurden 37 Beizfalken (ohne Angabe der Art) gekeult, als in einer Tierklinik in Riad in fünf Falken das Vorliegen des Subtyps H5 bestätigt wurde (Promedmail , 2006b). Im Jahr 2007 wurde HPAIV H5N1 aus weiteren Beizfalken isoliert. Hierzu gibt es bislang jedoch keine wissenschaftlichen Veröffentlichungen und die Angaben von Promedmail geben keine Hinweise auf die genauen Artzeichnungen der Falken.

Zu Trainingszwecken für Falken werden auf illegalem Wege regelmäßig Kragentrappen (*Chlamydotis undulata macqueenii*) aus Ländern wie Pakistan, Iran und Afghanistan in den Nahen Osten importiert (Bailey et al., 2000). Im Jahr 2007 kam es in Saudi-Arabien zu einem

HPAIV H5N1-Ausbruch bei 41 solcher importierten Kragentrappen mit einer Mortalitätsrate von 93% (38 Trappen). 10 von 16 Beizfalken (62,5%, keine Angabe der Art) in direktem oder indirektem Kontakt zu den infizierten Trappen erkrankten ebenfalls an dem Erreger, indem sie diese Tiere fraßen oder zumindest Jagdkontakt hatten (Khan et al., 2009). Die Diagnosestellung erfolgte über die Untersuchung von Organmaterial (Gehirn, Trachea, Lunge, Milz, Darm) sowie über Kloaken- und Trachealtupfer. Als Untersuchungsmethoden wurden zum einen die VI im SPF-Hühnerei sowie eine molekularbiologische Untersuchung mittels RT-qPCR herangezogen. Phylogenetische Untersuchungen an Isolaten von Beizfalken (keine Artangabe) und Wirtschaftsgeflügel in Saudi-Arabien konnten zeigen, dass hier zeitgleich zwei verschiedene Sublinien von HPAIV H5N1 (Klade 2.2.2 und 2.2.3) zirkulierten, von denen eine Linie im Geflügel und die andere in Falken vorkam. Folglich fand ein mindestens zweifacher Eintrag nach Saudi-Arabien statt, wobei eine Übertragung von HPAIV H5N1 aus dem Falkensektor in den Geflügelsektor und vice versa mit hoher Wahrscheinlichkeit ausblieb (Monne et al., 2008).

Kuwait berichtete 2007 von 20 HPAIV H5N1 Fällen bei Falken (ohne Angabe der Arten) in einem Zoo. Wenig später wurde ein weiterer Fall bei einem Beizfalken (ohne Angabe der Art) bekannt (Anonym, 2007d). Zwei Jahre zuvor war bereits bei einem Rosa Flamingo (*Phoenicopterus roseus*) und einem Falken (ohne Arten-Angabe) H5 nachgewiesen worden, wobei nur bei dem Flamingo HPAIV H5N1 bestätigt werden konnte. Der Falke, ein Importvogel, war mit einem H5N2 infiziert und wurde in der Quarantänestation euthanasiert (Promedmail, 2005). Die molekulare Charakterisierung von zwei HPAIV H5N1-Beizfalkenisolaten (beides Sakerfalken), je eins aus Saudi-Arabien und Kuwait, erfolgte durch Marjuki et al. (2009). Beide Isolate gehörten der Klade 2.2 an. Bei der Infektion von Hühnern verstarben diese zu 100% innerhalb von 24 Stunden, während gleichfalls infizierte Enten nur vorübergehende Symptome zeigten. Darüber hinaus konnte bei der Sequenzanalyse eine erhöhte Pathogenität für Säugetiere vermutet werden, da in beiden Isolaten ein Aminosäure-Austausch von Glutamin zu Lysin an Position 627 im PB2-Molekül zu verzeichnen war (Kapitel 2.4.2). Im Tierversuch waren beide Isolate für Mäuse letal. Dies verdeutlicht ein möglicherweise bestehendes Risiko, welches von Influenzavirus-infizierten Beizvögeln für den Menschen ausgehen könnte.

2.3.3 Serologische Untersuchungen

In Italien konnte während einer dreijährigen Untersuchungsperiode von Juli 1993 bis Dezember 1996, in welcher 55 Greifvögel und 137 Eulen untersucht wurden, in zwei Mäusebussarden und einem Wanderfalken Antikörper gegen Influenza A Viren mittels kompetitiven ELISA festgestellt werden. Eine weitere Spezifizierung dieser Antikörper wurde in der Arbeit nicht erwähnt (De Marco et al., 2003). Eine etwas länger zurückliegende Studie in den USA

untersuchte Influenza A Virus-Antikörper in Blutproben von insgesamt 36 Eulen und 50 Taggreifen im AGP. Unter den Taggreifen waren 34 Rotschwanzbussarde, ein Königsbussard (*Buteo regalis*), fünf Buntfalken (*Falco sparverinus*), drei Kornweihen (*Circus cyaneus*), zwei Rotschulterbussarde (*Buteo lineatus*), drei Rundschwanzsperber (*Accipiter cooperi*) sowie zwei Raufußbussarde. Diese Studie, welche über drei Saisons, jeweils von Oktober bis April (ohne Jahresangabe), lief, wies Antikörper bei einem wildlebenden Rotschwanzbussard (*Buteo jamaicensis*) nach (Kocan et al., 1977).

Dagegen scheiterte der Nachweis von Antikörpern gegenüber aviären Influenzaviren bei der Untersuchung von 34 wildlebenden Präriefalken (*Falco mexicanus*) in den USA (Morishita et al., 1998). In den VAE wurden bislang, bis auf einen Fall eines HPAIV H7N3 im Jahr 2000 (siehe oben), keine aviären Influenzaviren in Greifvögeln nachgewiesen. Bei der serologischen Untersuchung von 130 Beizfalken (ohne Angabe der Arten) wurden dagegen bei 7,7 % der Proben ein HAH-Titer gegen H5N2 festgestellt (Obon et al., 2007).

2.4 Aviäre Influenzavirusinfektionen beim Menschen

2.4.1 Experimentelle und natürliche Infektionen

So wie sich humane Influenzaviren nur noch schlecht im Wirt „Vogel“ replizieren, so können sich gleichsam aviäre Influenzaviren nur suboptimal im Menschen vermehren. Infektionen verlaufen in der Regel subklinisch bis mild (Beare und Webster, 1991). Bei einer experimentellen Infektion von 40 gesunden, freiwilligen Personen im Alter von 18-50 Jahren mit einer hohen Dosis von $10^{6,8}$ bis $10^{9,2}$ EID₅₀ verschiedener Influenzaviren aviären Ursprungs (H1N1, H3N2, H3N8, H4N8, H6N1, H6N2, H9N2 sowie H10N7) konnten bei elf Personen lediglich die Subtypen H4N8, H6N1 und H10N7 aus Nasenspülproben reisoliert werden. Begleitend wurden bei diesen Personen kurzzeitige, leichte respiratorische Symptome festgestellt. Ein Titeranstieg konnte mittels HAH bei einigen Personen, welche mit H1N1, H3N8, H3N2 und H9N2 infiziert wurden, festgestellt werden. Der Versuch, ein reisoliertes H6N1 auf weitere fünf Personen zu übertragen, misslang (Beare und Webster, 1991).

Natürliche humane AIV-Nachweise sind abzugrenzen von solchen Influenzaviren, welche in der Vergangenheit zu Pandemien und Epidemien in der menschlichen Bevölkerung geführt haben. Letztere Viren haben zwar ihren Ursprung im Vogel, haben sich jedoch an den Wirt „Mensch“ angepasst und gelten daher als „Humane Influenzaviren“. AIV bleiben typische „Vogelviren“ und infizieren als solche andere Spezies nur sporadisch. Solche Ereig-

nisse sind für den Menschen bislang auf die Subtypen H5, H7 und H9 beschränkt (Tabelle 2.10).

Tabelle 2.10: Humane AIV-Infektionen ohne vorheriges Reassortment (modifiziert nach Peiris et al., 2007)

Jahr	Subtyp und Klinik	Referenz
1918	H1N1; Spanische Grippe, > 50 Millionen Todesfälle weltweit	Johnson und Müller, 2002
1959	H7N7; Zufällig aus einer Person isoliert (USA)	Campbell et al., 1970
1977	H7N7; Konjunktivitis ¹ bei einer Person (Australien)	Taylor und Turner, 1977
1981	H7N7, Konjunktivitis ¹ bei fünf Personen, VI bei einer Person (USA)	Webster et al., 1981
1996	H7N7, Konjunktivitis bei einer Person (England)	Kurtz et al., 1996
1997	H5N1; 18 Fälle mit Grippe-ähnlichen Symptomen einschließlich 6 Todesfälle (Hong Kong)	Subbarao et al., 1998
1998, 1999, 2003	H9N2; milde Grippe (Hong Kong und Guangdong (China))	Butt et al., 2005
2003	H5N1; Grippe-ähnliche Symptome und 1 Todesfall (Peking)	Zhu et al., 2006
2003	H7N7; bei 89 Personen Konjunktivitis und/oder Grippe-ähnliche Symptome, 1 Todesfall (Niederlande und Deutschland)	Koopmans et al., 2004, Fouchier et al., 2004
2004	H7N3; Konjunktivitis bei zwei Personen (Kanada)	Tweed et al., 2004
Seit 2004 anhaltend	H5N1; 467 Erkrankungs- und 282 Todesfälle (Asien, Mittlerer Osten, Afrika und Südosteuropa)	OIE, Stand: 30.12.2009

¹ Infektion nach Laborkontamination

Interessanterweise waren die aus dem Menschen isolierten AIV stets solche Subtypen, die auch vom Geflügel bekannt waren und die ohne Reassortment, in erster Linie durch einen engen Kontakt zum Geflügel oder kontaminierten Geflügelprodukten, auf den Menschen übertragen wurden. Infektionen mit dem Subtyp H7 gingen in der Regel mit einer selbstlimitierenden Konjunktivitis sowie einer leichten Grippe-ähnlichen Erkrankung einher. Auch eine Infektion des Menschen mit H9N2 äußerte sich in einer milden Grippe. Erst ab dem Auftreten des Subtyps H5N1, welcher zu folgenschweren, letalen Erkrankungen des Menschen führte, wurde diesen Infektionen vermehrt Beachtung geschenkt.

Im Jahr 1959 wurde ein H7N7 aus einer Person in Amerika isoliert. Da die Person in Länder gereist war, in denen zeitgleich Geflügelpestfälle auftraten, wurde eine Infektion aus dieser Quelle angenommen (De Lay et al., 1967; Campbell et al., 1970).

Während der verheerenden HPAIV H7N7–Ausbrüche im Wirtschaftsgeflügel in den Niederlanden und Deutschland im Jahr 2003 konnte der Erreger zeitgleich aus 89 Personen isoliert werden (Koopmans et al., 2004). In der Mehrzahl der Fälle handelte es sich um Personen, welche bei der Keulung betroffener Geflügelbestände mitgearbeitet und sich mit hoher Wahrscheinlichkeit direkt beim infizierten Geflügel angesteckt hatten. Drei Personen stellten jedoch Angehörige von klinisch erkrankten Farmarbeitern dar. Für diese Personen kommt daher in erster Linie eine direkte Erregerübertragung von Mensch zu Mensch in Betracht. Es reagierten 83 Personen mit einer Konjunktivitis, bei fünf von ihnen zeigten sich zusätzlich Grippe-ähnliche Symptome. Folgeschwer entwickelte sich eine Lungenentzündung mit nachfolgendem Multi-Organversagen eines Tierarztes (Fouchier et al., 2004). Serologische Untersuchungen zeigten überdies, dass die Anzahl der asymptomatisch infizierten Personen mit bis zu 1000 Fällen deutlich höher lagen (Enserink, 2004).

Eine Konjunktivitis mit leichten respiratorischen Symptomen entwickelten ebenso zwei Farmarbeiter in Kanada, die HPAIV H7N3-infiziertem Geflügel exponiert waren. Sie gehörten zu einer Gruppe von 57 Personen, welche auf AIV untersucht wurden. Bei der einen Person konnte ein H7N3 aus einem Nasentupfer, bei der anderen Person aus einem Konjunktival-tupfer isoliert werden. Die Blutuntersuchungen dieser beiden Personen am 8., 22. und 32. Tag nach Beginn der klinischen Symptome ergaben allerdings keine Nachweise von Antikörpern gegen den Subtyp H7 (Tweed et al., 2004).

Drei weitere, jeweils zeitlich und räumlich isolierte humane H7N7-Fälle gingen mit einer Konjunktivitis einher. Die Übertragung erfolgte in zwei Fällen akzidentell während der Probenbearbeitung. Im ersten Fall handelte es sich um eine 24-jährige Laborassistentin aus Australien, welche sich ein Auge kontaminierte, als sie Allantoisflüssigkeit von H7N7-infizierten Eiern erntete. Es entwickelte sich zuerst eine Konjunktivitis, welche sich durch eine Keratitis verkomplizierte. Beides heilte jedoch innerhalb von drei Wochen vollständig aus (Taylor und Turner, 1977). Im zweiten Fall wurde ein H7N7 aus dem Auge einer Person in den USA isoliert, welche Kontakt mit einem infizierten Seelöwen (A/seal/MA/1/80) hatte. Auch diese Erkrankung heilte innerhalb von vier Tagen ohne Komplikationen aus. Bei vier weiteren Personen mit Konjunktivitis, die an Seehund-Sektionen beteiligt waren, gelang die Isolierung eines AIV jedoch nicht (Webster et al., 1981). Im dritten Fall wurde ein H7N7 aus dem Auge einer Frau aus England gewonnen, welche sich mit hoher Wahrscheinlichkeit beim Säubern ihres Entenstalls infizierte. Vorberichtlich hatte diese Frau erwähnt, dass ihr hierbei ein Stück Stroh ins Auge geraten war (Kurtz et al., 1996).

Während der NPAIV und HPAIV H7N3-Ausbrüche in Italien (1999 bis 2003) wurden insgesamt 983 Seren von Arbeitern von verschiedenen betroffenen Farmen untersucht. Die Blutproben wurden mindestens 15 Tage nach Beginn der Ausbrüche genommen. Alle Seren wurden mittels HAH und MNT gegen die beiden oben genannten Subtypen getestet. Ver-

dächtige oder positive Seren wurden danach mittels Western Blot-Verfahren überprüft. Auf diese Weise konnte bei sieben untersuchten Seren Antikörper gegen H7 festgestellt werden. Die Seren stammten von Personen, die in einem Ausbruchsgeschehen im Jahr 2003 mit dem AIV Subtyp HPAIV H7N3 involviert waren, indem sie als Angestellte auf verschiedenen Farmen mit direktem Kontakt zu Hühnern oder Puten arbeiteten. Nur eine Person hatte eine Konjunktivitis entwickelt, die restlichen sechs blieben ohne Symptome (Puzelli et al., 2005).

Seit 1999 wurden in Guangdong (China) und in Hongkong Fälle leichter Grippe-ähnlicher Erkrankungen durch AIV H9N2 ausgelöst. Dieser Subtyp gilt in Geflügel Südostasiens als endemisch verbreitet. Untersuchungen auf Lebendgeflügelmärkten (LGM) in Hong Kong ergaben eine Prävalenz von 4,4% in Hühnern und sporadische Nachweise auch in anderen Geflügelarten, zum Beispiel Tauben (siehe Kapitel 2.2.2) (Shortridge, 1999). Isolate von Geflügel der LGM's und Viren vom Menschen ergaben in phylogenetischen Untersuchungen eine enge Verwandtschaft (Lin et al., 2000). Allerdings konnte nicht in allen Fällen ein direkter Kontakt vom Mensch zum Geflügel bestätigt werden. So muss auch für diesen Subtyp eine im geringen Maße stattgefundene Infektion über Geflügelprodukte oder direkte Mensch zu Mensch Übertragung in Betracht gezogen werden. Nach Butt et al. (2005) ist infolge des engen Kontaktes zwischen Geflügel und dem Menschen eine Interspezies-Übertragung von H9N2 in Südostasien keine Seltenheit. Da für einige H9N2-Isolate eine Affinität zum „humanen“ AIV-Rezeptor bereits belegt wurde (siehe Kapitel 2.4.2), geht daher laut dieser Autoren von diesem Stamm ein hohes pandemisches Risiko aus, welches das von HPAIV H5N1 übertrifft.

Im März 1999 wurde H9N2 aus einer Nasenspülprobe zweier Kinder (vier Jahre und 13 Monate alt) aus Hongkong isoliert. Beide Kinder hatten Fieber und eine Pharyngitis. Die Symptome lösten sich nach sechs Tagen auf (Peiris et al., 1999). Bei einem fünfjährigen Kind aus Hongkong wurde vier Jahre später ebenfalls aus einer Nasenspülprobe der Erreger isoliert. Auch bei diesem Patienten äußerte sich die Erkrankung in Fieber und Husten (Butt et al., 2005). Einige H9N2-Fälle stammen darüber hinaus aus Guangdong (China), wobei fünf verschiedene H9N2-Isolate gewonnen werden konnten (genaue Zahlen nur auf Chinesisch genannt) (Guo et al., 1999).

Eine serologische Studie aus dem Jahr 1999 an 150 freiwillig mitwirkenden Personen aus Hong Kong verdeutlicht eine H9-Antikörper-Prävalenz in drei Blutproben mittels Neutralisationstests sowie HAH (Peiris et al., 1999).

Interessanterweise bergen die Gensegmente, welche für die internen Proteine im Influenza-Viruspartikel kodieren, von einem aus dem Menschen nachgewiesenen NPAIV H9N2 (A/Quail/HK/G1/97) und dem HPAIV H5N1, welches 1997 in Hongkong zu Erkrankungs- und Todesfällen führte, Sequenzhomologien von 99 – 100 % (Lin et al., 2000). Guan

et al. (1999) sowie Lin et al. (2000) postulieren daher, dass das HPAIV H5N1-Virus die Gene, welche für die internen Proteine kodieren, von diesem H9N2 erlangte, oder beide potentiellen Pandemie-Kandidaten diese von einem bislang unbekanntem Vorläufer erwarben.

Das Ausmaß der Erkrankungsintensität änderte sich grundlegend mit dem Auftreten von humanen Infektionen mit aviären HPAIV H5N1. Dass durch AIV-Infektionen beim Menschen auch schwerwiegende Erkrankungen mit Todesfällen ausgelöst werden können, zeigte schon der humane Index-Fall in Hongkong im Mai 1997 (Subbarao et al., 1998). Ein dreijähriger Junge verstarb an den Folgen einer schweren Pneumonie, verkompliziert durch das Reye-Syndrom (Claas et al., 1998). Bis Dezember des gleichen Jahres folgten 18 weitere klinische Erkrankungen, einschließlich fünf Todesfällen. Diese Fälle erfolgten zeitgleich mit dem Auftreten von gravierenden HPAIV H5N1-Ausbrüchen in mehreren Geflügelbetrieben sowie LGM's in Hongkong (Sims et al., 2003). Zu diesem Zeitpunkt waren etwa 20% des Geflügels der LGM's mit H5N1 infiziert (Shortridge, 1999). Zur Kontrolle der Ausbrüche in Hong Kong wurde der gesamte Geflügelbestand gekeult (Sims et al., 2003). Serologische Untersuchungen an 293 Regierungsmitarbeitern sowie 1525 Geflügel-Farmern, die entweder an der Keulungsaktion beteiligt waren, oder sonstigen Kontakt zu potentiell infizierten Geflügel gehabt hatten, ermittelten eine Antikörperprävalenz von 3 bzw. 10% (Buxton Buxton Bridges et al., 2002). Eine andere Studie von Buxton Bridges et al. (2000) weist auf eine Mensch zu Mensch-Übertragung hin: Eine H5-Seroprävalenz von 3,7% wurde bei Krankenhauspersonal mit direktem Kontakt zu H5N1-infizierten Patienten (n = 217) ermittelt, darüber hinaus aber auch bei 0,7% des Personals ohne solchen Kontakt (n = 309). Bei der serologischen Untersuchung von 51 Personen, die mit 17 der 18 HPAIV-infizierten Personen aus dem Jahr 1997 in einem Haushalt gelebt haben (Familienmitglieder oder Haushaltsangestellte), konnte bei sechs Personen (12 %) Antikörper gegen H5 mittels MNT festgestellt werden. In einem Fall konnte sicher der Kontakt zu infizierten Geflügel ausgeschlossen werden, so dass hier eine Mensch zu Mensch-Übertragung naheliegt. Eine der erkrankten 18 Personen aus Hongkong hatte zwei Tage nach Fieberbeginn eine viertägige Bus- und Flugreise durch Asien angetreten. Von 26 seiner mitreisenden Personen konnte bei einer Person H5-Antikörper nachgewiesen werden. Bezüglich eines anderen Patienten wurden 23 Bankangestellte untersucht, die mit dieser Person während der Krankheitsphase zusammen in einem Raum gearbeitet hatten. Hier konnten keine Antikörper gegen H5 gefunden werden (Katz et al., 1999).

Anfang Februar 2003 wurden in Hong Kong neue humane H5N1-Fälle diagnostiziert. Es handelte sich um Vater und Sohn, nachdem diese von einer Urlaubsreise in der Fujian Provinz, China, wiederkehrten (Peiris et al., 2004). Im gleichen Jahr wurde erstmals auch aus Peking (China) ein humaner, tödlich endender H5N1-Fall gemeldet (Zhu et al., 2006). Bis

Mitte 2004 wurden weitere, vereinzelte humane Infektionen in Vietnam und Thailand offenbar (Chotpitayasunondh et al., 2005; Dinh et al., 2006). Während aus diesen Ländern kontinuierlich weitere humane Fälle gemeldet wurden, traten ab Februar, bzw. Juli 2005 erste Infektionen auch in Kambodscha und Indonesien auf (Vong et al., 2006). In den folgenden Jahren wurden, zeitgleich mit der weiteren Verbreitung des Erregers im Geflügel und in Wildvögeln, humane HPAIV H5N1-Fälle in insgesamt 15 Ländern festgestellt. Das Jahr 2006 stellt mit 115 Fällen in neun Ländern das Jahr mit den meisten berichteten Fällen dar. Insgesamt wurden bislang 474 Fälle gemeldet (Stand: 10. Februar 2010). Während bis einschließlich 2009 90 % aller Fälle aus Indonesien, Vietnam, Ägypten und China gemeldet wurden, wurde im Jahr 2010 bislang nur aus Ägypten sieben Fälle gemeldet.

Aus Deutschland wurden bislang keine AIV-Infektionen bekannt. Eine serologische Untersuchung, die an Personen durchgeführt wurde, welche im Februar und März 2006 an den Bergungsarbeiten toten und kranken Wassergeflügels auf der Insel Rügen mithalfen, konnte keine H5-seropositiven Proben erfassen. Unter den untersuchten Personen befanden sich 21 Regierungsmitarbeiter, fünf Tierärzte und 71 Feuerwehrleute (Cai et al., 2009).

Das demografische Muster unterscheidet sich bei den humanen HPAIV H5N1-Fällen grundlegend von dem der Saisonalen Grippe. Während bei letzterer in erster Linie ältere Personen betroffen sind, liegt das durchschnittliche Alter bei Erkrankungszeitpunkt im Falle von HPAIV H5N1 bei 21,7 Jahren, der Median bei 20 Jahren. Das Altersspektrum reicht von 3 Monaten bis 81 Jahre. 28% der Fälle fielen in die Altersgruppe 0 bis 9 Jahre, weitere 24% bzw. 25% verteilte sich auf die 10 bis 19-jährigen, bzw 20 bis 29-jährigen.

Die Inkubationszeit lag in den meisten Fällen bei zwei bis vier Tagen. Danach stellten sich als häufigste Symptome Fieber, Husten und eine Pneumonie ein (Yuen et al., 1998; Beigel et al., 2005; Wong und Yuen, 2006). Entgegen humaner Infektionen mit H7 stellt die Konjunktivitis keine regelmäßig gesehene klinische Erscheinung dar. Häufigere, nicht-respiratorische Symptome umfassen Diarrhoe, Erbrechen und Abdominalschmerz (Apisarnthanarak et al., 2004; De Jong et al., 2005).

Insbesondere besorgniserregend an humanen HPAIV H5N1-Infektionen ist die außergewöhnlich hohe Letalitätsrate von 59.5 % (entspricht 282 von 474 Fällen).

2.4.2 Mechanismen der Wirtszellrestriktion

Mehrere Mechanismen machen eine AIV-Interspeziesübertragung vom Vogel auf Säugetiere einschließlich des Menschen und vice versa zu generell seltenen Ereignissen. Damit sich diese vollziehen und eine sichere Etablierung der Viren im neuen Wirt stattfinden kann, müssen mindestens drei Voraussetzungen erfüllt sein: (1) Eine Übertragung vom Vogel auf einen neuen Wirt, (2) eine effiziente Replikation im neuen Wirt und (3) eine leichte Übertrag-

barkeit zwischen diesen (Naffakh et al., 2000). Jedes dieser Ereignisse wird durch eine Vielzahl von unterschiedlichen Faktoren beeinflusst, die heutzutage immer noch zum größten Teil unbekannt sind.

Ursprünglich wurde angenommen, dass insbesondere eine unterschiedliche Rezeptorspezifität von humanen und aviären Influenza A Viren eine Speziespezifität bedingt, da diese die Infektion von vornherein verhindert. Für Influenza A Viren existieren allgemein zwei Rezeptortypen, die beide aus terminalen Sialinsäuren bestehen, welche an Galaktose-Reste der Membran-Glykolipide gebunden vorkommen. Grundsätzlich existieren zwei Typen von Sialinsäuren, die N-Acetylneuraminsäure (*N-Ac*) und die N-Glykolyneuraminsäure (*N-Gc*). Der Unterschied der beiden Rezeptoren besteht hierbei in der Konformation, mit welcher solche gebunden werden: Im Epithel von Vögeln werden diese über eine alpha-2,3-glykosidische Bindung an Galaktose (SA α 2,3Gal) verankert, so dass aviäre Influenzaviren in der Regel diesen Rezeptortyp spezifisch binden. Demgegenüber binden humane Isolate an Sialinsäuren, welche in einer alpha-2,6-glykosidischen Bindung konformiert vorliegen (Matrosovich et al., 1997). Dieser Rezeptortyp ist der dominierende Rezeptor im menschlichen Respirationstrakt (RT), insbesondere in den Schleimhäuten der Nasenhöhle, des Pharynx, der Trachea und den Bronchien. Wie bereits in Kapitel 2.2.1 beschrieben, besitzen auch Tauben, nicht aber Hühner, im Respirationstrakt vornehmlich den SA α 2,6Gal-Rezeptor (Liu et al., 2009). Auf dieser Tatsache heraus, so die Autoren der Studie, könnte deren scheinbare Resistenz gegenüber Infektionen mit HPAIV H5N1 begründet liegen. Dem Schwein wurde immer wieder eine Sonderstellung in der Entstehung von Pandemieviren eingeräumt. In dieser Spezies wurden erstmals beide Rezeptortypen im Respirationstrakt gefunden. Daher wurde postuliert, dass gerade im Schwein Co-Infektionen mit aviären und humanen Influenzaviren auftreten könnten, und dieses folglich als „Mischgefäß“ die Entstehung reassortanter Viren fördert (Ito et al., 1998). Zum einen ist jedoch heute bekannt, dass eine Pandemiegefahr in gleicher Weise auch von nicht vorher reassortierten Viren ausgeht (Scholtissek, 2006), zum anderen musste die Theorie der strikten Rezeptortypen-Verteilung in den verschiedenen Wirten und die der Affinität humaner und aviärer Viren gegenüber einer bestimmten Konformation inzwischen relativiert werden. Denn auch im menschlichen Respirationstrakt, hier insbesondere in den terminalen Bronchiolen und Alveolarzellen in der Lunge, als auch im Epithel der Konjunktiven, konnten inzwischen SA α 2,3Gal-Rezeptoren nachgewiesen werden (Olofsson et al., 2005; Shinya et al., 2006). Auf der anderen Seite wurde im terrestrischen Geflügel (Hühner und Wachteln (*Coturnix coturnix*)), nicht aber im Wassergeflügel, das Vorkommen von SA α 2,6Gal-Rezeptoren im Darm und der Lunge belegt (Gambaryan et al., 2004; Wan und Perez, 2006). In ihren Versuchen zur Rezeptorspezifität aviärer und humaner Influenzaviren bestätigten Shinya et al. (2006) einen grundsätzlichen Unterschied, fanden aber heraus, dass ein HPAIV H5N1, welcher 2003 aus einem Pa-

tienten in Hong Kong isoliert wurde, beide Rezeptortypen erkannte. Allerdings wurden die SA α 2,3Gal–Rezeptoren bevorzugt gebunden und eine effiziente Replikation konnte nur in den tief im Respirationstrakt gelegenen Alveolarzellen erfolgen (Shinya et al., 2006). Dies könnte erklären, warum eine effektive Mensch zu Mensch Übertragung von H5N1 bislang ausblieb. Hierfür müsste sich das Virus an den SA α 2,6Gal-Rezeptor adaptieren. Allerdings konnte von Yamada et al. (2006) schon belegt werden, dass einige humane HPAIV H5N1-Isolate Mutationen im Hämagglutinin erfuhren, welche eine allmähliche Anpassung an diesen Rezeptor bewirken könnten. Darüber hinaus konnten auch für einige aviäre H9N2 (Matrosovich et al., 2001) sowie aviäre H7N2 und H7N3 (Belser et al., 2008) eine Affinität für „humane“ Rezeptoren ermittelt werden. Im Vergleich zu Erwachsenen werden im Respirationstrakt von Kindern eine größere Anzahl SA α 2,3Gal–Rezeptoren exprimiert. Dies könnte bedeuten, dass Kinder gegenüber AIV-Infektionen empfänglicher seien (Nicholls et al., 2007a; b). Epidemiologische Daten scheinen dies zumindest für HPAIV H5N1 zu bestätigen (Kapitel 2.4.1).

Beim Vergleich aviärer und humaner Influenza A Viren identifizierten Chen et al. (2006) insgesamt 52 wirtsspezifische Sequenzen im Genom. Die meisten dieser Sequenzen (35 von 52) liegen im Ribonukleoproteinkomplex (RNP). Hier liegen sie in solchen Domänen, welche für die Transkription/Replikation eine wichtige Rolle spielen. Beim A/H1N1 der „Spanischen Grippe“ gehörten 12 der 35 speziesspezifischen Motive im RNP zu den Menschen-assoziierten. Bei 21 weiteren vom Menschen isolierten Influenza A Viren zeigten 19 Isolate (90,5%) jeweils eine oder mehrere Menschen-assoziierte Sequenzen (Taubenberger et al., 2005; Chen et al., 2006). Insbesondere das Vorhandensein eines Lysins an Position 627 im PB2 scheint eine wichtige Rolle für die effektive Replikation von AIV im menschlichen Gewebe zu spielen (Subbarao et al., 1993). Befindet sich an dieser Position, wie bei den meisten AIV, dagegen ein Glutamin, wird die Virusvermehrung im Menschen unterdrückt. Eine Mutation von Glutamin zu Lysin an Position 627 im PB2 (Glu627→Lys627) wurde bei vielen der humanen HPAIV H5N1 Isolate gefunden. Im Tierversuch waren diese Viren, nicht aber solche mit Glutamin, für Mäuse letal (Shinya et al., 2004). Ebenso konnte diese Mutation (Glu627→Lys627) im HPAIV H7N7, welches 2003 zu einer tödlichen Pneumonie eines Tierarztes führte, festgestellt werden, nicht aber in solchen H7N7, die lediglich zu einer Konjunktivitis beim Menschen führten (Fouchier et al., 2004).

Als weitere Faktoren, welche eine Wirtsrestriktion beeinflussen könnten, wurden das NP und das PB1 diskutiert (Scholtissek et al., 1985; Snyder et al., 1987; Naffakh et al., 2000). Die Ergebnisse dieser Studien sind jedoch uneindeutig und werden daher hier nicht weiter erläutert.

2.4.3 Risikofaktoren für humane AIV-Infektionen

In den meisten Fällen wurden die AIV-Infektionen des Menschen mit den Risikofaktoren „enger Kontakt zum AIV-erkrankten Geflügel“, beispielsweise durch die Haltung der Vögel im eigenen Haushalt, deren Schlachtung, Zubereitung und Verzehr oder der Teilnahme an Keulungsaktionen in Verbindung gebracht (Mounts et al., 1999; Beigel et al., 2005; Chotpitayasunondh et al., 2005; Tran et al., 2004; Dinh et al., 2006; Oner et al., 2009). In einigen Fällen kann jedoch auch von einer limitierten Mensch zu Mensch-Übertragung ohne den direkten Geflügelkontakt ausgegangen werden (Ungchusak et al., 2005; Wang, 2008a; WHO, 2006). Dies erfolgte insbesondere im Rahmen von Familien-Clustern (Olsen et al., 2005; Kandun et al., 2006). So erlag in Thailand eine Frau der HPAIV H5N1-Infektion, nachdem sie ihre Tochter, welche sich am erkrankten Geflügel angesteckt hatte, eine Zeit lang gepflegt hatte. Diese Frau war aus einer anderen Stadt angereist und hatte unter keinen Umständen mit Geflügel Kontakt gehabt (Ungchusak et al., 2005). Auch in Indonesien wurde im Jahr 2006 ein Fall bekannt, bei welchem eine Person milde Grippe-Symptome entwickelte, nachdem er sich vor Einsetzen der Symptome einige Tage lang um seine HPAIV H5N1-erkrankte Schwester gekümmert hatte (WHO, 2006). Zudem unterstreichen die bereits genannten serologischen Untersuchungen an Krankenhauspersonal eine stattgefundene, jedoch bislang limitierte Mensch zu Mensch Übertragung (Kapitel 2.4.1).

Der Risikofaktor „enger Kontakt zu AIV-erkranktem Geflügel“ könnte, wenn das Wort „Geflügel“ um die Worte „und Wildvögeln“ erweitert würde, ebenso für Stadt- und Wildtauben, wie auch für die Beizvögel und deren Beute zutreffen. Wie einleitend erwähnt, haben bestimmte Menschengruppen, hier insbesondere Stadtmenschen und Jäger, einen engen Kontakt zu Tauben. Falkner hingegen haben ein sehr enges Verhältnis zu ihrem Beizvogel sowie deren Beute. Die Fragestellung, ob diese also für Deutschland ein Risikofaktor für die Übertragung von AIV auf den Menschen darstellen, ist daher Grundlage dieser Dissertation.

3 MATERIAL UND METHODEN

Für eine Übersicht über die verwendeten Materialien wird auf Anhang 1 verwiesen. Verwendete Puffer und Medien sind im Anhang 2, Inhalte von verwendeten Kits im Anhang 3 aufgeführt.

3.1 Organisation der Probennahme

Zur Untersuchung von **Stadtauben** auf das Vorkommen von aviären Influenzaviren wurde der Kontakt zu Privatpersonen hergestellt, welche sich auf freiwilliger Basis um kranke oder verletzte Stadtauben kümmern. Es wurden Veterinärämter angeschrieben, um Stadtauben in öffentlichen Taubenschlägen, wie sie von einigen Städten zwecks Bestandsregulierung eingerichtet wurden, zu beproben. Desweiteren ist bei Vereinen zum Schutz von Stadtauben um Unterstützung geworben worden. Schließlich wurden Schädlingsbekämpfer, welche Tauben zur Bestandsregulierung fangen, gebeten, für die Studie Taubenproben zur Verfügung zu stellen. **Wildtaubenproben** wurden über die Zusammenarbeit mit Jägern gesammelt.

Zur Untersuchung von **Falknern**, ihren **Beizvögeln** sowie deren **Beutewild** wurde der Kontakt zu Falknern über den Deutschen Falkenorden (DFO) hergestellt, welcher die größte bundesweite Vereinigung von Falknern in Deutschland darstellt. Über briefliche Mitteilungen an die Vorsitzenden der einzelnen Landesverbände sowie über Vorträge auf Falknereveranstaltungen wurde die Studie bundesweit bekannt gemacht. Die Probennahme bei den Falknern erfolgte in Zusammenarbeit mit dem Robert Koch-Institut, Berlin. Das hierfür erforderliche Ethikvotum wurde von der Ethikkommission dieses Instituts abgesegnet.

3.2 Art der Proben

Folgende Proben wurden zur Untersuchung herangezogen:

- **Stadt- und Wildtauben:** Kloaken- und Trachealtupfer; Blut
- **Beizvögel:** Kloaken- und Choanentupfer; Blut
- **Beutetiere:** Kloaken- und Trachealtupfer
- **Falkner:** Blut

Die Tupferproben wurden zur virologischen Untersuchung (Kapitel 3.5) und zur molekularbiologischen Untersuchung (Kapitel 3.6) herangezogen. Die Seren wurden mittels Agar-

gelpräzipitationstests (Kapitel 3.7.1), ELISA (Kapitel 3.7.2), Hämagglutinationshemmtest (Kapitel 3.7.3) und Mikroneutralisationstest (Kapitel 3.7.4) untersucht. Die Tupferproben der Stadt- und Wildtauben sowie der Beutetiere wurden zur Untersuchung gepoolt. Für die virologische Untersuchung wurden Kloaken- und Trachealtupfer von bis zu fünf Tieren zu einem Pool vereint. Für die molekularbiologischen Untersuchungen wurden getrennte Kloaken- und Trachealtupferpools von bis zu fünf Tieren verwendet.

Die Falkner wurden vor Beginn der Studie gebeten, über sich sowie ihre Beizvögel je einen Fragebogen (siehe Anhang 4) auszufüllen sowie zu jedem gebeizten Stück Federwild einen Probenbegleitschein (siehe Anhang 4) ihren Sendungen beizufügen. Besonderes Augenmerk lag in der Zugehörigkeit der Proben, so dass jedes Beutetier einem bestimmten Beizvogel und Falkner zugeordnet werden konnte.

Die Beprobung der Falkner erfolgte in Zusammenarbeit mit dem Robert Koch Institut, Berlin. Das zur Beprobung von Menschen erforderliche Ethikvotum wurde von diesem beantragt und abgesegnet.

3.3 Technik der Probennahme

Bei den **Stadt- und Wildtauben** wurde vor der Probennahme eine Altersschätzung in juvenil (Jungtauben bis zum Ende des ersten Lebensjahres) und adult (Tauben ab dem zweiten Lebensjahr) vorgenommen. Im Jugendgefieder sind die Handdecken der Schwingen braun umsäumt und von den bläulichen Handdecken der Alttauben zu unterscheiden (Gehle, 2005). Als zusätzliche Kriterien wurden der Körperbau (bei Jungtauben graziler als bei Alttauben), die Wachshautfarbe (bei Jungtauben grau, bei Alttauben weiß) sowie bei Ringeltauben (*Columba palumbus*) die Ausbildung weißer Halsflecken, welche in der Regel nur bei Alttauben vorkommen, herangezogen (Gehle, 2005).

Erfolgte die Probenentnahme an lebenden Tauben, so wurde dies mit Hilfe von einer Hilfsperson durchgeführt. Zur Kloakentupferentnahme wurde das Bauchgefieder der Tauben gescheitelt, ein Tupfer in die Kloake eingebracht und an der Schleimhaut abgerollt. Zur Entnahme der Trachealtupfer wurde der Schnabel der Tauben gespreizt und der Tupfer unter Sichtkontrolle in die Trachealöffnung eingeführt. Die Tupfer wurden zum Transport gekühlt. Die Blutentnahme erfolgte an der *Vena cutanea ulnaris*. Hierzu wurde die Punktionsstelle desinfiziert, die Vene mittels manueller Kompression gestaut und das Blut tropfend in einem sterilen Röhrchen aufgefangen. Nach der Blutentnahme wurde die Punktionsstelle bis zum Einsetzen der Blutstase mit einem sterilen Wattetupfer abgedrückt. Wurde die Beprobung in Zusammenhang einer städtischen Schädlingsbekämpfungsmaßnahme durchgeführt, erfolgte die Blutentnahme in Verbindung mit der Tötung: Nach dem Fang der Tauben in Lebendfallen wurden diese per Kopfschlag betäubt und durch zervikale Dislokation getötet. Hierbei wurde das austretende Blut aufgefangen. Die Blutgewinnung bei den geschossenen Wildtauben

erfolgte durch Auspressen des Blutkoagels des Herzens sowie des brachialen Gefäßplexus zum frühestmöglichen Zeitpunkt nach der Erlegung. Einige Proben wurden direkt von den Jägern oder Schädlingsbekämpfern nach obigen Schema entnommen und innerhalb von 48 Stunden per Post zugestellt.

Die Probennahme bei den **Beizvögeln** erfolgte in der überwiegenden Anzahl auf Beizjagdveranstaltungen. Diese werden jährlich von den Landesverbänden des Deutschen Falkenordens (DFO) organisiert und haben üblicherweise eine Teilnehmerzahl von 20 bis 40 Falknern mit jeweils ein bis zwei Beizvögeln. Der Körper des Beizvogels wurde zur Probennahme durch eine Hilfsperson fixiert. Die Kloakentupferentnahme erfolgte analog der Entnahme bei den Tauben. Für die Choalentupferentnahme wurde der Kopf des Vogels fixiert und der Schnabel durch Einführen eines Fingers in den Schnabelwinkel offengehalten. Der Tupfer wurde in der Choane am dorsalen Rachendach abgestreift. Die Blutentnahme erfolgte aus der *Vena metatarsalis plantaris superficialis* oder der *V. ulnaris superficialis*. Die Punktionsstelle wurde zuvor gereinigt und mit einem Hautdesinfektionsmittel benetzt. Nach der Blutentnahme wurde die Blutung durch Kompression mit einem Baumwolltupfer gestillt. Bei einigen Beizvögeln, welche nicht an den gemeinschaftlichen Veranstaltungen teilnahmen, wurden die Proben durch den Haustierarzt genommen und das Blut bereits aufbereitet. Die Tupfer sowie die gewonnenen Seren wurden in diesen Fällen mit der Post zugestellt.

In der Regel werden pro Greifvogel und Tag zwischen einem und zwei Beutetieren gebeizt. Die Beprobung dieser **Beutetiere** erfolgte durch die Falkner im Feld. Die Falkner wurden hierzu entweder persönlich geschult oder erhielten eine detaillierte Beschreibung über den Ablauf der Probennahme sowie den Umgang mit den gewonnenen Proben. Die Proben sollten immer unmittelbar im Anschluss ans Erlegen des Federwildes genommen und schnellstmöglich gekühlt gelagert werden. Da die tägliche Probensendung für die Falkner zu aufwändig erschien, wurde der Kompromiss eingegangen, die Proben für einige Tage im Kühlschrank aufzubewahren, jedoch innerhalb von sieben Tagen in das Institut für Geflügelkrankheiten einzusenden. Zur Probennahme wurde jedem Falkner zu Beginn des Untersuchungszeitraumes ein Set mit Tupfern, Fragebögen sowie einer Anleitung zur Probennahme zugesendet.

Die Blutentnahme bei den **Falknern** erfolgte in Zusammenarbeit mit einem Humanmediziner bei den Beizjagdveranstaltungen vor Ort oder den Hausärzten der Falkner. Jeder Teilnehmer wurde schriftlich auf die Risiken und Nebenwirkungen einer Blutentnahme hingewiesen und bestätigte sein Einverständnis der freiwilligen Teilnahme mittels Unterschrift. Die Blutentnahme erfolgte nach Reinigung und Desinfektion der *Fossa cubitalis* aus der *Vena*

mediana cubiti. Der Stau des Blutgefäßes erfolgte mittels Stauschlauch am Oberarm. Nach der Blutentnahme wurde der Stau gelöst, die Punktionsstelle bis zur Blutstase mit einem Baumwolltupfer abgedrückt und nachfolgend mit einem Pflaster versorgt. Bei solchen Falknern, bei denen die Blutentnahme durch den Hausarzt vorgenommen wurde, wurde das Blut in den Praxen aufbereitet und als Serum an die Projektbearbeiterin versendet.

3.4 Aufbereitung und Asservierung des Probenmaterials

Die Kloaken-, Tracheal- und Choanentupfer wurden in 1 ml einer 1:10 mit PBS verdünnten Antibiotika-Lösung (Penicillin/Streptomycin) aufgenommen. Bis zur Untersuchung erfolgte die Asservierung bei -80 °C. Bei den Blutproben wurde nach Abschluss der Blutgerinnung das Serum gewonnen. Hierzu wurde der Blutkuchen mit einer Impfschlinge leicht vom Rand des Blutröhrchens gelöst und anschließend durch Zentrifugation bei 3000 rpm für 5 Minuten vom Serum getrennt. Die Seren wurden bis zur Untersuchung bei -20 °C aufbewahrt.

3.5 Virologische Untersuchungen

3.5.1 Virusisolierung im SPF-Hühnerei

Die Virusisolierung im SPF-Hühnerei (VI) erfolgte nach der Methodenbeschreibung im „Handbuch zur Diagnose der Aviären Influenza“ gemäß der Richtlinie 2005/94/EG (Anonym, 2006) durch Beimpfung der Allantoishöhle von zehn bis elf Tagen vorbebrüteten SPF-Hühnereiern. Vor dem Verimpfen wurde jede Probe (Einzelprobe oder Pool) sterilfiltriert und auf Blutagar zur Detektion bakterieller Kontaminationen ausgestrichen.

Die Vorbrut der SPF-Hühnereier erfolgte unter täglich fünfmaligem Wenden bei 37,8 °C und einer Luftfeuchte von 60%. Vor dem Beimpfen der Eier mit dem Probenmaterial wurden diese durchleuchtet und auf das Vorhandensein eines vitalen Embryos (klare Gefäßzeichnungen, Bewegungen) untersucht.

Die Beimpfung erfolgte pro Einzelprobe oder Pool in vier SPF-Hühnereier. Die Injektionsstelle wurde mit 70%igen Ethanol desinfiziert und hier sowie am stumpfen Eipol mit einem Metallorn ein Loch in die Eischale gestanzt. Durch die Injektionsstelle wurde sodann eine Injektionsnadel circa drei Millimeter tief eingeführt und 0,2 ml Probenmaterial in Richtung Eimitte verimpft. Die Löcher wurden anschließend mit Paraffin verschlossen und die beimpften Eier bei 37,8 °C und 70%iger Luftfeuchte ohne Wenden weiter bebrütet. Die Eier wurden täglich geschickt und abgestorbene Eier aussortiert. Nach sechs Tagen wurden alle überlebenden Eier zur Abtötung für mindestens fünf Stunden auf 7 °C herunter gekühlt. Von

diesen und von den abgestorbenen Eiern wurden die Allantoisflüssigkeiten geerntet, um diese auf das Vorhandensein von hämagglutinierenden Agenzien mittels Hämagglutinationstest (HA) zu untersuchen. Desweiteren wurde der Embryo makroskopisch beurteilt. Bei einem negativen Ergebnis im HA wurde das Probenmaterial der ersten Eipassage erneut in der beschriebenen Art und Weise verimpft. Konnten nach zwei Passagen keine hämagglutinierenden Agenzien nachgewiesen werden, wurde die Probe negativ beurteilt. Proben, in welchen in der molekularbiologischen Untersuchung Influenza A Virus-spezifische RNA nachgewiesen werden konnte, wurden fünfmal passagiert.

3.5.2 Hämagglutinationstest

Die Durchführung des Hämagglutinationstests (HA) richtete sich nach der Methodenbeschreibung im „Handbuch zur Diagnose der Aviären Influenza“ gemäß der Richtlinie 2005/94/EG (EG, 2005; EG, 2006).

Waren pro Pool keine Eier abgestorben, sondern alle Eier nach sechs Tagen abgetötet, wurden die Allantoisflüssigkeiten von jeweils zwei der vier Eier als Pool untersucht. Waren ein oder mehrere Eier abgestorben, wurden die Allantoisflüssigkeiten der übrigen abgetöteten Eier gepoolt. Abgestorbene Eier wurden einzeln untersucht.

Zur Versuchsdurchführung wurden in einer 96-well-Mikrotiterplatte mit V-förmigem Boden in jede Vertiefung 25 µl PBS vorgelegt. Nachdem in jeweils die erste Vertiefung jeder Reihe die gleiche Menge zu testende Allantoisflüssigkeit pipetiert wurde, wurde diese entlang der Reihe in einer geometrischen Verdünnungsreihe (2^n) verdünnt. Die letzte Vertiefung jeder Reihe diente als Erythrozytenkontrolle. Schließlich wurde jede Vertiefung nochmals mit 25 µl PBS und darauffolgend mit 50 µl einer 1%igen Hühner-Erythrozytensuspension beschickt und die Platte vorsichtig geschüttelt. Das Ergebnis des Tests wurde nach einer halbstündigen Inkubation bei RT abgelesen. HA-positive Allantoisflüssigkeiten wurden mittels molekularbiologischer Methoden auf das Vorliegen von Influenza A Viren untersucht (Kapitel 3.6), darüber hinaus wurden diese gegen APMV-1-Antiseren im Hämagglutinationshemmtest (HAH) getestet.

3.5.3 Hämagglutinationshemmtest

Die Durchführung des HA richtete sich nach der Methodenbeschreibung im „Handbuch zur Diagnose der Aviären Influenza“ gemäß der Richtlinie 2005/94/EG (EG, 2005; EG, 2006). Hier erfolgte die Spezifizierung der im HA nachgewiesenen, hämagglutinierenden Agenzien als aviäre Paramyxoviren. Die Spezifizierung hämagglutinierender Agenzien als AIV erfolgte dagegen molekularbiologisch (Kapitel 3.6). Wurde ein hämagglutinierendes Agens als APMV-1 charakterisiert, wurde das Ergebnis mittels APMV-1-spezifischer RT-

qPCR verifiziert) und an das Nationale Referenzlabor für Newcastle Disease (NRL ND, Friedrich Loeffler-Institut, Insel Riems) zur Pathotypisierung geschickt.

Vorbereitend wurden die positiven (hämagglutinierenden) Proben der VI auf vier hämagglutinierende Einheiten (HAE) eingestellt und dieses über eine vierfache Rücktitration im HA überprüft. Im Haupttest wurde in jede Vertiefung einer 96-well Mikrotiterplatte mit V-förmigem Boden 25 µl PBS vorgelegt. Sodann wurden jeweils 25 µl eines bekannten positiven Kontrollserums in die erste Vertiefung jeder Reihe pipettiert. In einer geometrischen Verdünnungsreihe um den Faktor 2^n erfolgte die weitere Verdünnung entlang der Reihe. Die letzte Vertiefung jeder Reihe wurde mit unverdünntem Serum gefüllt und diente als Serumkontrolle. Mit Ausnahme dieser wurden anschließend die übrigen Vertiefungen mit 25 µl der zu testenden Allantoisflüssigkeiten aufgefüllt. Nach vorsichtigem Schwenken der Platte wurde diese für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Hiernach wurden 50 µl einer 1%igen Hühner-Erythrozytensuspension in jede Vertiefung zugegeben, die Platte bei 8°C inkubiert und das Testergebnis nach 45 Minuten abgelesen. Pro Ansatz wurde ein Kontrollantigen mit bekanntem Titer in Bezug auf das eingesetzte Serum mitgeführt.

3.6 Molekularbiologische Untersuchungen

Für die molekularbiologische Untersuchung wurde aus den der Antibiotikälösung gelösten Proben (Einzelprobe oder Pool) die RNA extrahiert. Danach folgte die Untersuchung in zwei Schritten: Zuerst wurden die Tupfer auf das Vorhandensein von Influenza A Virus-spezifischer RNA mittels einer Influenza A-spezifischen RT-qPCR, welche das hochkonservierte Matrixgen der Influenza A Viren detektiert, untersucht. Wurde in einem der Pools Influenza A Virus-spezifische RNA nachgewiesen, wurden die in diesem Pool vorhandenen Einzelproben anschließend einzeln mit dieser Methode untersucht. Im zweiten Schritt wurden positive Einzelproben differenziert. In der Influenza A-spezifischen RT-qPCR-positive Proben wurden erneut auf SPF-Hühnereier zwecks Virusisolierung verimpft.

Zur Vermeidung von Kreuzkontaminationen erfolgte die Präparation der RNA, der Ansatz der RT-PCRs sowie die Zugabe der RNA in getrennten Räumlichkeiten und unter einer Sicherheitswerkbank. Bis auf die Präparation der RNA wurden die Arbeitsschritte auf Eisblöcken durchgeführt. Bei jedem PCR-Lauf wurden die Präparationskontrollen der entsprechenden Proben sowie eine PCR-Positiv- und eine Negativkontrolle (PBS) mitgeführt (Tabelle 3.10).

3.6.1 Extraktion der RNA

Die Präparation der RNA erfolgte mittels des „QIAamp® Viral RNA Mini Kit“ (Qiagen GmbH). Die Präparation erfolgte entweder manuell oder automatisiert unter Verwendung des QIACube®-Extraktionsgerätes.

3.6.1.1 Manuelle RNA-Präparation

Zunächst wurde pro Pool bzw. Einzelprobe 5,6 µl Carrier-RNA, welche vorbereitend in Elutionspuffer AVE gelöst worden war, in 560 µl Lysispuffer AVL suspendiert und beide Komponenten durch zehnmaliges Schwenken gemischt. Zu diesem Mix wurden 140 µl Probe gegeben, der Ansatz anschließend 15 Sekunden auf dem Vortex-Genie™ (Stufe 6) gemischt und zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 560 µl absolutem Ethanol (Raumtemperatur) wurde erneut gemischt und 630 µl auf die im Kit enthaltenen Filtersäulen gegeben. Nach einminütiger Zentrifugation (8000 rpm) wurde das Filtrat verworfen, erneut 630 µl Probengemisch auf die Filtersäule gegeben und die letzten beiden Schritte wiederholt. Es folgten zwei Waschschriffe: Zunächst wurde 500 µl Waschpuffer AW 1 auf die Säule gegeben, zentrifugiert (1 Minute, 8000 rpm) und das Filtrat verworfen. Danach wurde, nach Zugabe der gleichen Menge Waschpuffer AW 2 hochtourig (3 Minuten, 14000 rpm) zentrifugiert und das Filtrat erneut verworfen. Abschließend erfolgte nach Zugabe von 60 µl Elutionspuffer AVE durch einminütige Zentrifugation bei 8000 rpm die Auswaschung der im Filter gebundene RNA, welche in einem RNase-freiem Eppendorfgefäß aufgefangen wurde.

Pro Extraktionsansatz wurde zum Ausschluss von Kontaminationen eine Präparationskontrolle (PBS) mitgeführt. Bei nicht unmittelbar untersuchten Proben erfolgte die Lagerung der präparierten RNA und der Präparationskontrollen bei -80 °C.

3.6.1.2 Automatisierte RNA-Präparation

Zur Vorbereitung der automatisierten Extraktion wurde die integrierte Zentrifuge des QIAcube® -Extraktionsgerätes mit Rotoradaptoren, welche mit Filtersäulen und Probenauffanggefäßen beschickt waren, beladen. Außerdem wurde überprüft, ob der QIAcube® an den vorgeschriebenen Stellen mit ausreichenden Mengen Lysispuffer AVL, absolutem Ethanol, Waschpuffer AW1 und AW2, Elutionspuffer und im Elutionspuffer gelöste Carrier-RNA sowie Pipettenspitzen beschickt war. Die benötigte Menge an Reagenzien und Pipettenspitzen wurde vom Hersteller angegeben und war von der Anzahl der Proben abhängig. Zuletzt wurden 140 µl Probenmaterial in 2 ml-Schraubgefäße pipettiert und an die vorgeschriebenen Stellen im integrierten Schüttler des QIAcube® platziert und das Programm für die RNA-Extraktion gestartet.

3.6.2 Untersuchungen mittels RT-qPCR

3.6.2.1 Nachweis von Influenza A Virus-RNA sowie AIV H5-subtypspezifischer RNA

Die Methodik der Influenza A RT-qPCR zum Nachweis von Influenza A Virus-spezifischer RNA sowie H5-subtypspezifischer RNA orientierte sich an den Empfehlungen

des „Gemeinschaftlichen Referenzlabors für Aviäre Influenza“ in Weybridge, England (Anonym 2007a) und den Verfahrensanweisungen des Friedrich Loeffler-Instituts (Lüschow, persönliche Mitteilung. Die Durchführung erfolgte unter Verwendung des „QuantiTect® Probe RT-PCR Kit“ (Qiagen GmbH), bzw. des „iScript™ One-Step RT-PCR Kit for Probes“ (Bio-Rad Laboratories GmbH). Bei der Verwendung des „QuantiTect® Probe RT-PCR Kit“ (Qiagen GmbH) wurde pro Probe ein Mix hergestellt, bestehend aus 12,5 µl „QuantiTect® Probe RT-PCR Master Mix“, 0,25 µl „QuantiTect® RT Mix“, 2 µl Primer-Sonden-Gemisch und nukleasefreiem Wasser ad 20 µl. Bei Verwendung des „iScript™ One-Step RT-PCR Kit for Probes“ (Bio-Rad Laboratories GmbH) bestand dieser Mix je Probe aus 12,5 µl „iScript 2x RT-PCR Mix“, 2 µl Primer-Sonden-Gemisch, 0,5 µl „iScript RT-Mix“ und nukleasefreiem Wasser ad 20 µl. Hierzu wurde jeweils 5 µl RNA pipettiert, so dass entsprechend ein Ansatzvolumen von 25 µl vorlag. Die Temperaturprofile unter Verwendung dieser Kits sind in der Tabelle 3.1, die Primer und Sonden einschließlich deren Menge pro Ansatz (25 µl) in der Tabelle 3.2 und 3.3 aufgeführt. Die Durchführung der RT-qPCR erfolgte im iCycler iQ™ (BioRad Laboratories GmbH). Die Emissionswellenlänge für die mit dem Fluoreszenzfarbstoff 6-FAM markierte Sonde betrug 490 nm, die Detektion der Emission erfolgte während der kombinierten Anlagerungs- und Synthesephase.

Tabelle 3.1: Temperaturprofil für die Influenza A-spezifische RT-qPCR und die AIV H5-subtypspezifische RT-qPCR unter Verwendung des „QuantiTect® Probe RT-PCR Kit“ (Qiagen GmbH), bzw. des „iScript™ One-Step RT-PCR Kit for Probes“ (Bio-Rad Laboratories GmbH)

Nr.	Reaktion	Temperatur (°C)		Zeit (Std:Min:Sek)		Anzahl der Zyklen	
		Qiagen	Biorad	Qiagen	Biorad	Qiagen	Biorad
1	Reverse Transkription	50	50	00:30:00	00:10:00	1	1
2	Initiale Denaturierung	95	95	00:15:00	00:05:00	1	1
3	Denaturierung	95	95	00:00:15	00:00:15	45	45
	Anlagerung und Synthese*	60	60	00:01:00	00:00:30		

* Messung der Fluoreszenz

Tabelle 3.2: Verwendete Primer für die molekularbiologischen Untersuchungen

Subtyp	Primer	Orientierung	Sequenz 5' – 3'	Menge in 25 µl	Referenz
Influenza A	M+25	Vorwärts	AGA TGA GTC TTC TAA CCG AGG TCG	20 pmol	Spackman et al., 2002*
	M-124mod	Rückwärts	TGC AAA AAC ATC TTC AAG TYT CTG	30 pmol	
AIV-H5	H5LH1	Vorwärts	ACA TAT GAC TAC CCA CAR TAT TCA G	20 pmol	Spackman et al., 2002, modifiziert nach Slomka et al., 2007
	H5RH1	Rückwärts	AGA CCA GCT AYC ATG ATT GC	20 pmol	
AIV-H6	H6+1461N	Vorwärts	TG(C/T) TTT GAA TTT TGG CA(C/T) AA	30 pmol	Das & Suarez, 2007
	H6-1706	Rückwärts	GCA TTG CAT TGA (A/G)CC AT	30 pmol	
AIV-H7	H7 HA-1/1	Vorwärts	AGC AAA AGC AGG GGW TAC AA	10 pmol	Starick et al., 2000 Starick & Werner, 2003
	H7 HA-2/3	Rückwärts	CAA TTG GYG AYT GRG TGC T	10 pmol	
	H7 HA-1/5	Vorwärts	GAR CAG ACC AAR YTM TAT GG	10 pmol	
	H7 HA-2	Rückwärts	AGT TCC YTC YCC YTG TGC ATT	10 pmol	
AIV-H9	H9+1612	Vorwärts	ATT TAT TCG ACT G(C/T)C GCC	20 pmol	Das & Suarez, 2007
	H9-1706	Rückwärts	ATG TTG CA(C/T) CTG CAA GA	30 pmol	
APMV-1	M+4100	Vorwärts	AGT GAT GTG CTC GGA CCT TC	10 pmol	Wise et al., 2004
	M-4220	Rückwärts	CCT GAG GAG AGG CAT TTG CTA	10 pmol	

* modifiziert nach Hoffmann, FLI, persönliche Mitteilung

Tabelle 3.3: Verwendete Sonden für die molekularbiologischen Untersuchungen

Subtyp	Sonde	Fluorophor	Quencher	Sequenz 5' – 3'	Menge in 25 µl	Referenz
Influenza A	S-M+64	6-FAM	TAMRA	TCA GGC CCC CTC AAA GCC GA	2,5 pmol	Spackman et al., 2002
AIV-H5	AIV-H5-1	6-FAM	TAMRA	TCA ACA GTG GCG AGT TCC CTA GCA	2,5 pmol	Spackman et al., 2002, modifiziert nach Slomka et al., 2007
AIV-H6	H6+1620	6-FAM	BHQ1	TAT AGT ACG GTA TCG AGC AGT CT(A/G) GT	3 pmol	Das & Suarez, 2007
AIV-H9	H9+1644	6-FAM	BHQ1	TGC (A/G)AT (A/G)GG GTT TGC TGC C	9 pmol	Das & Suarez, 2007
APMV-1	M+4169	6-FAM	TAMRA	TTC TCT AGC AGT GGG ACA GCC TGC	3 pmol	Wise et al., 2004

3.6.2.2 Nachweis von AIV H6- und H9-subtypspezifischer RNA

Zur Untersuchung auf H6- und H9-subtypspezifische RNA wurden zwei RT-qPCR's am Institut für Geflügelkrankheiten, in Anlehnung an das Protokoll von Das & Suarez (2007), etabliert. Die Durchführung erfolgte unter Verwendung des „QuantiTect® Probe RT-PCR Kit“ (Qiagen GmbH). Der PCR-Mix wurde wie unter Punkt 3.6.2.1 beschrieben hergestellt und 5 µl RNA zu einem Ansatzvolumen von 25 µl hinzugefügt. Zur Optimierung der PCR wurden gegenüber den Angaben aus der Literatur die H6-Primermengen angepasst (Tabelle 3.2, 3.3 und 4.1) und das Temperaturprofil (Tabelle 3.4) geringfügig verändert.

Tabelle 3.4: Temperaturprofil für die RT-qPCR zum Nachweis von AIV H6- und H9-subtypspezifischer RNA

Nr.	Reaktion	Temperatur (°C)	Zeit (Std:Min:Sek)	Anzahl der Zyklen
1	Reverse Transkription	50	00:30:00	1
2	Initiale Denaturierung	95	00:15:00	1
3	Denaturierung	95	00:00:15	45
	Anlagerung*	54	00:01:00	
	Synthese*	72	00:00:20	

* Messung der Fluoreszenz

3.6.2.3 Nachweis von APMV-1-spezifischer RNA

Die Durchführung der RT-qPCR zum Nachweis von APMV-1-spezifischer RNA erfolgte unter Verwendung des „QuantiTect® Probe RT-PCR Kit“ (Qiagen GmbH). Der PCR-Mix wurde wie unter Punkt 3.6.2.1 beschrieben hergestellt und 5 µl RNA zu einem Ansatzvolumen von 25 µl hinzugefügt. Programmparameter siehe Tabelle 3.5. Primer und Sonde siehe Tabelle 3.2 und 3.3.

Tabelle 3.5: Temperaturprofil für die RT-qPCR zum Nachweis von APMV-1-spezifischer RNA

Nr.	Reaktion	Temperatur (°C)	Zeit (Std:Min:Sek)	Anzahl der Zyklen
1	Reverse Transkription	50	00:30:00	1
2	Initiale Denaturierung	95	00:15:00	1
3	Denaturierung	94	00:00:10	40
	Anlagerung	52	00:00:30	
	Synthese*	72	00:00:10	

* Messung der Fluoreszenz

3.6.3 Untersuchungen mittels Nested-RT-PCR

3.6.3.1 Nachweis des AIV Subtyps H7

Der erste Lauf der Nested-RT-PCR erfolgte unter Verwendung des „QIAGEN® OneStep RT-PCR Kit“ (Qiagen GmbH). Pro Probe wurden 5 µl dieses Primer-Gemisches mit 5 µl 5x Puffer, 1 µl dNTPs, 1 µl RT-PCR-Enzymemix, 10 µl nukleasefreiem Wasser und 5 µl präparierter RNA zu einem Ansatzvolumen von 25 µl pipettiert. Die RT-PCR wurde im T3-Thermocycler (Biometra® biomedizinische Analytik GmbH) mit den in Tabelle 3.6 aufgelisteten Temperaturprofil und den in Tabelle 3.2 genannten Primern durchgeführt.

Tabelle 3.6: Temperaturprofil für den ersten Lauf der Nested-RT-PCR zum Nachweis von H7-subtypspezifischer RNA

Nr.	Reaktion	Temperatur (°C)	Zeit (Std:Min:Sek)	Anzahl der Zyklen
1	Reverse Transkription	50	00:30:00	1
2	Initiale Denaturierung	95	00:15:00	1
3	Denaturierung	95	00:01:00	40
	Anlagerung	53	00:01:00	
	Synthese	72	00:02:00	
4	Finale Synthese	72	00:07:00	1

Für den zweiten Lauf wurden PuREtaq™ Ready-To-Go Beads (GE Healthcare UK Limited) verwendet. 5 µl Primergemisch (Tabelle 3.2) und 19 µl nukleasefreies Wasser wurden zusammen mit 1 µl des ersten PCR-Produktes zu PuREtaq™ Ready-To-Go Beads pipettiert

und der Ansatz durch mehrfaches Pipettieren gründlich gemischt. Das Temperaturprofil für den zweiten PCR-Lauf gibt Tabelle 3.7 wieder.

Tabelle 3.7: Temperaturprofil für den zweiten Lauf der Nested-RT-PCR

Nr.	Reaktion	Temperatur (°C)	Zeit (Std:Min:Sek)	Anzahl der Zyklen
1	Initiale Denaturierung	95	00:05:00	1
2	Denaturierung	95	00:01:00	30
	Anlagerung	50	00:01:00	
	Synthese	72	00:01:00	
3	Finale Synthese	72	00:07:00	1

Bei einer erwarteten Fragmentgröße von 534bp erfolgte die Auftrennung der Nested-PCR-Produkte in einem 1,5%igen-Agarosegel. Hierzu wurden 1,5 g Agarose in 100ml TBE aufgeschüttelt und in einem Mikrowellenherd so lange erhitzt, bis sich die Agarose in Lösung befand. Nachdem die Agaroselösung leicht abgekühlt war, wurden 2 µl Ethidiumbromid zur Sichtbarmachung der DNA zugesetzt und die flüssige Agarose in eine vorbereitete Gelkammer mit Kamm gegossen. Nach Erstarrung der Agarose wurde der Kamm entfernt und die Gelkammer mit TBE als Laufpuffer aufgefüllt.

10 µl der PCR-Produkte wurden mit 1/10 Volumen Probenladepuffer vermischt und jeweils vorsichtig in die Taschen der Agarose-Gele überführt. 8 µl eines DNA-Längenstandards (100-bp-Ladder) dienten als Längenmaßstab. Die Auftrennung der Fragmente erfolgte innerhalb von ca. 120 Minuten bei einer Spannung von 70 V. Anschließend erfolgte die Sichtbarmachung und Dokumentation der Gel-Banden unter Verwendung des Universal Hood II (Bio-Rad GmbH) und der Software „Quantity one[®]“.

3.6.4 Sonstige Untersuchungen zur Subtypisierung

Zur endgültigen Charakterisierung wurden positiven Proben, welche mit den vorher beschriebenen Methoden nicht weiter differenziert werden konnten, an das Friedrich Loeffler-Institut gesendet und hier mittels RT-PCR und im Microarray-System (Gall et al., 2008; 2009a,b) untersucht. Darüber hinaus wurde eine Nukleotidsequenzanalyse vorgenommen, um die Sequenzen mit denen anderer Influenza A Viren in der Gendatenbank zu vergleichen.

3.7 Serologische Untersuchungen

Die Vogelseren wurden zum Nachweis von Antikörpern gegen Influenza A Viren mittels Agargelpräzipitationstests (AGP) sowie eines kommerziell erhältlichen speziesunabhängigen kompetitiven ELISA untersucht. Desweiteren erfolgten bei allen Vogelseren die Untersuchung auf H5 und H7-spezifische Antikörper mittels HAH unter Verwendung von Hühnererythrozyten. Seren wurden vor Beginn der Testdurchführungen hochtourig zentrifugiert (5 Minuten bei 3000 rpm) und der Überstand verwendet.

Die Falknerseren wurden auf das Vorliegen von Antikörpern gegen Influenza A Viren im speziesunabhängigen kompetitiven ELISA untersucht. Zusätzlich erfolgte die Untersuchung auf Anti-H5- und Anti-H7-spezifische Antikörper mittels Mikroneutralisationstests sowie auf das Vorliegen von Anti-H9- und Anti-H13-Antikörpern im HAH unter Verwendung von Pferdeerythrozyten.

3.7.1 Agargelpräzipitationstest

Zur Herstellung des Präzipitationsagars wurden 5g Bacto™Agar in 495 ml 8%iger NaCl-Lösung unter Erwärmen aufgelöst und ein pH-Wert von 7,5 eingestellt. Nach Autoklavieren für 20 min bei 121 °C wurde der pH auf 7,2 korrigiert und der Agar für 20 min bei 100 °C nachsterilisiert. Anschließend wurden je 15 ml des flüssigen Agars in Petrischalen gegossen und bis zum Erstarren bei Raumtemperatur stehen gelassen.

Unmittelbar vor der Testdurchführung wurden mit einem Stempel Löcher von 7 mm Durchmesser aus dem Agar gestanzt. Hierbei lagen pro Stempel jeweils sechs Löcher mit einem Abstand von 4 mm hexagonal um ein mittleres siebtes Loch angeordnet. Nach Entfernen des Agars aus den Löchern wurden die Platten in eine Vakuumkammer gebracht und für ca. 15 Sekunden ein Unterdruck von ca. 0,8 bar angelegt. Es wurde jeweils 30 µl zu testendes Serum in die peripheren Löcher und in das zentrale Loch das Influenza-A-Antigen aufgetragen (Tabelle 3.10). Pro 23 Seren wurde ein positives Kontrollserum mitgeführt. Nach 24, 48 und 72 Stunden wurden die Platten mit Hilfe einer Lichtquelle auf das Auftreten von Präzipitationslinien zwischen den Seren und dem Antigen als Zeichen eines positiven (präzipitierende-Influenza-A-Antikörper enthaltenden-) Serums überprüft. Die Lagerung der Platten erfolgte bei Raumtemperatur. Eine Probe galt als negativ, wenn nach 72 Stunden keine Präzipitationslinie sichtbar war.

3.7.2 Kompetitiver ELISA zum Nachweis von Antikörpern gegen Influenza A Virus

Verwendet wurde ein kommerziell erhältlicher kompetitiver, speziesübergreifender Influenza A-ELISA (ID Sreen Influenza A Antibody Competition, Fa. ID Vet, Frankreich), welcher Antikörper gegen das Nukleoprotein des Influenza-A-Virus nachweist. Vor Gebrauch wurden alle Reagenzien auf Raumtemperatur gebracht und die konzentrierte Waschlösung sowie das Konjugat nach Herstellerangaben verdünnt. Die Seren wurden mit Verdünnungsmittel 13 im Verhältnis 1:10 zur Inkubation auf die mit NP-beschichteten Mikrotiterplatten gegeben. Vorbereitend wurde hierzu auf einer 96-well-Mikrotiterplatte 90 µl Verdünnungsmittel 13 in jede Vertiefung vorgelegt und danach 10 µl der Testseren zugegeben. Neben den Testseren wurden pro Ansatz jeweils zwei Vertiefungen mit zum Kit gehörigen Positiv- und Negativkontrollen sowie eine Vertiefung mit einer internen Kontrolle in den gleichen Mengenangaben beschickt. Es folgte die Übertragung der kompletten Probenmenge (100 µl) in rascher Reihenfolge auf die beschichtete Mikrotiterplatte und anschließender einstündiger Inkubation bei 37°C. Danach wurden drei Waschschritte durchgeführt, wobei jeweils 300 µl Waschlösung in jede Vertiefung pipettiert wurde. Anschließend wurden in jede Vertiefung 50 µl Anti-NP-Konjugat, an welches das Enzym Meerrettich-Peroxidase gekoppelt ist, gegeben und die Platte für eine halbe Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und dreimal gewaschen. Im letzten Schritt wurden zuerst 50 µl Substratlösung (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin, TMB) hinzugefügt, und nach zehnminütiger Inkubation unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur die Reaktion durch Zugabe von 50 µl Stopplösung beendet. Die Intensität der Farbreaktion wurde bei einer Wellenlänge von 450 nm mittels des ELISA-Readers MRX und des Programmes Revelation V. 3.04 ausgewertet. Der Test war gültig, wenn der Mittelwert der optischen Dichte der Negativkontrollen (OD_{NK}) größer als 0,7 war. Außerdem sollte der Mittelwert der optischen Dichte der Positivkontrollen (OD_{PK}) kleiner sein als 30 % der OD_{NK} . Zur Auswertung wurde die prozentuale Inhibition in % für jedes Testserum nach Formel 1 berechnet und der errechnete Wert wie in Tabelle 3.8 beschrieben gewertet.

Formel 1: Berechnung der prozentualen Inhibition

$$\text{Prozentuale Inhibition} = OD_{\text{Probe}} / OD_{NK} \times 100$$

Tabelle 3.8: Auswertung des ELISA

Prozentuale Inhibition	Auswertung
≤ 45%	Testserum positiv
> 45 % und < 50 %	Testserum fraglich
≥ 50 %	Testserum negativ

3.7.3 Hämagglutinationshemmtest

Die Vogelseren wurden aufgrund der tierartlich-bedingten geringen Menge an Probenmaterial vor der Testdurchführung 1:4 mit sterilem PBS vorverdünnt. Bei allen Vogelseren erfolgte eine Inaktivierung durch halbstündige Inkubation im Wasserbad bei 56°C. Die Humanseren wurden zur Reinigung von unspezifischen Inhibitoren mit RDE (Receptor Destroying Enzyme, Cosmos Biomedical LTD) vorbehandelt. Nach Herstellerangaben wurde das Serum mit RDE 1:3 verdünnt, gründlich gemischt und für 18-20 Stunden bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Danach wurde die Reaktion durch 45-minütige Inkubation bei 56°C gestoppt. Anschließend wurde sowohl bei den Vogel- als auch bei den Humanseren zur Entfernung unspezifischer Hämagglutinine eine Hämadsorption durchgeführt. Hierzu wurden zu jedem Serum eine konzentrierte Erythrozytensuspension im Verhältnis 20:1 pipettiert. Für die Vogelseren wurden Hühnererythrozyten, für die Humanseren Pferdeerythrozyten verwendet, da dies diejenigen Erythrozytenspezies waren, welche im eigentlichen HAH Anwendung fanden. Der Ansatz wurde für eine Stunde auf einem Elektroschüttler bei RT inkubiert, anschließend die Erythrozyten für zehn Minuten bei 1200 rpm abzentrifugiert. Das gereinigte überstehende Serum wurde für den HAH verwendet. Bei den Humanseren erfolgte eine weitere Verdünnung auf den Faktor 1:5, die Vogelseren kamen in der 1:4-Verdünnung zum Einsatz. In einer 96-well Mikrotiterplatte wurden in jede Kaverne 25 µl PBS vorgelegt und sodann in die erste sowie die letzte Kaverne einer Reihe 25 µl vorverdünntes Serum gegeben. In einer geometrischen Verdünnungsreihe um den Faktor 2ⁿ erfolgte die weitere Verdünnung entlang der Reihe aus den ersten wells. Mit Ausnahme der Kaverne am Ende jeder Reihe, die als Serumkontrolle diente, wurde in jedes well 25 µl eines auf 4 HAE eingestellten Antigens (je nach Fragestellung H5, H7, H9, H13) pipettiert. Nach halbstündiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde schließlich 50 µl einer 1 %-igen Erythrozytensuspension zugegeben. Handelte es sich um Vogelseren, erfolgte die Zugabe von Hühnererythrozyten, im Falle der Falknenserren wurden Pferdeerythrozyten verwendet (Kayali et al., 2008). Die Auswertung des Tests erfolgte nach erneuter 45-minütiger Inkubation bei 4°C. Als positiv in Bezug auf die Vogelseren galt ein Titer gleich oder höher 1:16, bezüglich der Humanseren wurde jeder Titer gleich oder höher 1:10 als positiv gewertet (OIE, 2009).

3.7.4 Mikroneutralisationstest

Für den Mikroneutralisationstest (MNT) (Rowe et al., 1999) wurden MDCK II-Zellen (Madin-Darby-Canine-Kidney-Zellen, strain II) von der 49. bis zur 60. Passage verwendet. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in 75-cm²-Zellkulturflaschen im Brutschrank bei 37°C mit einer CO₂-Konzentration von 5%. Im Abstand von drei bis vier Tagen, nach Erreichen einer etwa 95%-igen Konflueszenz der Zellen und nach mikroskopischer Kontrolle der Zellen auf Intaktheit und Reinheit, wurden diese gesplittet. Hierfür wurde der Inhalt der Zellkulturflasche

entleert und die Flasche zweimal mit PBS gewaschen. Nachdem die Flasche anschließend einmal mit Trypsin-EDTA in gleicher Weise gewaschen wurde, wurde der Zellrasen sodann mit diesem benetzt. Um das Lösen der Zellen durch das Trypsin-EDTA zu fördern, wurde die Zellkulturflasche für 15 Minuten im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Die Lysis des Zellverbandes wurde im nächsten Schritt durch Zugabe eines definierten Volumens Wachstumsmedium gestoppt und die Zellen durch mehrmaliges Pipettieren resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen mit einem Umsetzfaktor von 1:4 (entspricht etwa $1,5 \times 10^5$ Zellen/ml) neu ausgesät. Die neu ausgesäten Zellen wurden für die ersten zwei bis drei Tage in einem Wachstumsmedium (mit Zusatz von 10% Bovinem Kälberserum) kultiviert, welches nach diesem Zeitraum durch ein Erhaltungsmedium (2% Fötale Kälberserum) ersetzt wurde. Die Arbeiten mit den Zellen wurden zur Vermeidung von Zellkontaminationen in einer Kabine unter einer Sicherheitswerkbank mit Unterdruck durchgeführt.

Vor Beginn des Mikroneutralisationstests (MNT) erfolgte die Einstellung des Testvirus auf die hundertfache Zellkultur-infektiöse Dosis 50 in 50 μ l (100 TCID₅₀/50 μ l) durch Virustitration (VT). Die verwendeten Virusstämme sind der Tabelle 3.10 zu entnehmen. Im ersten Schritt wurde das Virus im Verhältnis von 1:100 mit Diluent verdünnt, wofür 20 μ l Virus mit 1980 μ l Diluent gemischt wurde. 146 μ l dieser Verdünnung wurden in die erste Vertiefung jeder Reihe einer 96-well-Zellkulturplatte pipettiert. Die übrigen Vertiefungen der Platte wurden mit jeweils 100 μ l Diluent beschickt. In einer $\frac{1}{2}$ log₁₀-Verdünnungsreihe wurde das Virus entlang einer Reihe verdünnt (von 10^{-2} bis 10^{-7}), die letzte Vertiefung jeder Reihe diente als Zellkontrolle. Zuletzt wurde in jede Vertiefung 100 μ l MDCK II-Zellen (mit einer Konzentration von ca. $1,5 \times 10^5$ Zellen/ml) hinzu gegeben und die Platte gründlich gemischt. Die Inkubation der Platte erfolgte für etwa 20 Stunden im Brutschrank bei 37°C und einer CO₂-Konzentration von 5%.

Zunächst wurde mikroskopisch geprüft, ob die VT korrekt verlaufen war. Dies war der Fall, wenn nach Ablauf der Inkubationszeit in den Zellkontrollen die MDCK II-Zellen mit einer 70 - 80%-igen Konflueszenz vorlagen und entlang der Verdünnungsstufen ein abnehmender zytopathischer Effekt (CPE) auszumachen war. Dieser CPE reichte, je nach Konzentration des Virusgehaltes, von einer vollständigen Zerstörung des Zellrasens bis zur Ablösung sowie Abkuglung einzelner Zellen. Nun erfolgte die Auswertung der VT mittels ELISA (siehe unten). Alle Verdünnungsstufen, welche im ELISA eine OD über dem doppelten Wert der Zellkontrollen aufwiesen, wurden als Verdünnungsstufen mit positivem Viruswachstum bewertet, alle Verdünnungsstufen unter diesem Wert galten als negativ. Auf diese Weise wurden alle Vertiefungen gescort. Es erfolgte die Berechnung der TCID₅₀/100 μ l mit der Methode nach Reed & Münch (1938) und die Umrechnung dieses Ergebnisses in die 100 TCID₅₀/50 μ l.

Für die Durchführung des MNT wurden die zu untersuchenden Falknerseren, das positive Kontrollserum sowie das negative Kontrollserum (FKS) vor dem Ansatz des Tests bei 56°C für 30 Minuten inaktiviert. Die Seren wurden danach im Verhältnis 1:10 mit Diluent vorverdünnt und sodann in zweifachen Verdünnungsschritten in Vorverdünnungsröhrchen weiter bis zu den folgenden Stufen verdünnt: Bei den Falknerseren erfolgte die Verdünnung in drei weiteren Schritten bis 1:40, beim positiven Kontrollserum in acht Schritten bis 1:2560 und beim negativen Kontrollserum in sieben Schritten bis 1:1280. 50 µl dieser Verdünnungsstufen (bei den Falknerseren und dem negativen Kontrollserum beginnend mit der 1:10-Verdünnung, beim positiven Kontrollserum mit der 1:40-Verdünnung) wurden aus den Vorverdünnungsröhrchen auf 96-well-Zellkulturplatten pipettiert. Die Falknerseren wurden hierbei jeweils im doppelten Ansatz aufgetragen. Zu den Serumverdünnungen wurde im nächsten Schritt 50 µl der auf 100TCID₅₀/50 µl eingestellten Testvirussuspension gegeben. Desweiteren wurde eine Rücktitration des Testvirus (VT) von 1:2 bis 1:16 zur Kontrolle von dessen Einstellung sowie eine Virus- (VK) und Zellkontrolle (ZK) auf der Platte angelegt. Nachdem die Platte für zwei Stunden im Brutschrank bei 37°C und einer CO₂-Konzentration von 5% inkubiert wurde, wurde in jedes well 100 µl MDCK II-Zellsuspension (1,5 x 10⁵ Zellen/ml) gegeben. Das Ergebnis wurde nach erneuter Inkubation für etwa 20 Stunden abgelesen.

Die Auswertung des MNT erfolgte nach Ablauf der Inkubationszeit mittels ELISA. Vor dessen Ausführung wurde die Auswertbarkeit des MNT mittels Mikroskop kontrolliert. Hierzu sollte der Zellrasen der Zellkontrollen zu 70 – 80 % konfluent vorliegen und die Viruskontrollen einen deutlichen CPE aufweisen. Bei der Virusrücktitration sollte eine Abnahme des CPE, bei der positiven Serumkontrolle eine Zunahme dessen zu verzeichnen sein.

Zu Beginn des ELISA wurde das Medium von der Platte abgesogen und jede Vertiefung mit 100 µl Fixierlösung beschickt. Nach 10 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Lösung wieder entfernt und die Platte luftgetrocknet. Die Platte wurde dreimal mit Waschpuffer gewaschen (200 µl pro Vertiefung und Waschgang) und sodann der verdünnte 1°-Anti-NP Antikörper (monoklonaler Antikörper von der Maus, verdünnt in Blocking-Puffer im Verhältnis 1:4000) in einer Menge von je 100 µl hinzu pipettiert. Die Platte wurde mit Abdeckfolie versiegelt und der Ansatz für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Hiernach erfolgten vier Waschgänge und die Zugabe des verdünnten 2°-Gegenantikörpers (Meerrettich-Peroxidase-gekoppelter Anti-Maus Ig G Antikörper von der Ziege, verdünnt mit Blocking-Puffer im Verhältnis 1:2000) in gleicher Menge. Die Platte wurde erneut versiegelt und der einstündige Inkubationsschritt wiederholt. Nach sechsfachem Waschen wurden in jede Vertiefung 100 µl Enzymsubstrat gegeben und die Reaktion nach fünfminütiger Inkubation bei Raumtemperatur mit der gleichen Menge Stopplösung beendet. Die optische Dichte (OD)

wurde bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen. Der Neutralisationstiter der Seren wurde nach Formel 2 berechnet.

Formel 2: Berechnung der Prozentualen Inhibition

$$\text{Neutralisationstiter (NT}_x\text{)} = (\text{OD}_{\text{VK}} - \text{OD}_{\text{ZK}})/2 + \text{OD}_{\text{ZK}}$$

Alle Serum-OD-Werte < NT_x galten als neutralisierend. Die höchste Verdünnung, in welcher noch eine Neutralisation feststellbar war, galt als der Neutralisationstiter.

3.8 Verwendete Virusstämme, Kontrollseren und Zelllinien

Die verwendeten Virusstämme sind in Tabelle 3.9 aufgelistet. Der Stamm NIBRG-23, einer Reassortante aus A/turkey/Turkey/1/2005 (H5N1), in welcher die multibasische Spaltstelle entfernt wurde, und A/PR/8/34 (H1N1), wurde vom „National Institut for Biological Standards and Control (NIBSC), Hertfordshire (Vereinigtes Königreich) bezogen. Die Stämme A/Turkey/Germany/R11/01 (H7N7) und (H13) wurden vom Friedrich Loeffler-Institut zur Verfügung gestellt. Die übrigen Virusstämme lagen am Institut für Geflügelkrankheiten oder dem Robert Koch-Institut vor.

Das im MNT verwendete H5 Kontrollserum wurde vom NIBSC erworben. Die übrigen Seren gegen die AIV Subtypen H5, H7 und H9 lagen in der Sammlung des Instituts für Geflügelkrankheiten vor.

Die MDCK II-Zellen waren als permanente Zelllinie am Robert Koch-Institut vorhanden.

Tabelle 3.9: Verwendete Antigenkontrollen

Methode	Antigen	
PCR und HAH	Influenza A	Siehe H6
	AIV H1	A/swine/230/92 (H1N1), Respiorc FLU Vakzinestamm
	AIV H3	A/swine/220/92 (H3N2), Respiorc FLU Vakzinestamm
	AIV H5	A/Duck/Potsdam/619/85 (H5N2)
	AIV H6	A/Turkey/Mass/3740/65 (H6N2)
	AIV H9	4/97 (H9N2)
	AIV H7	A/Swan/Potsdam/64/81 (H7N3)
	H13	A/Larus ridibundus/Germany/R2613/06 (H13N8)
	PMV-1	Newcastle Disease Virus, LaSota, LAH Vakzinestamm
	IBV	Infektiöses Bronchitis Virus, Nobilis H120 Vakzinestamm
	IBDV	Infektiöses Bursitis Virus, Winterfield
	TRTV	Turkey Rhinotracheitis Virus, SHS (STG 1439)
	ReoV	Reovirus, 1133-2/02
AGP	Influenza A	A/Swan/Potsdam/64/81 (H7N3)
MNT	H5N1 (LPAIV)	NIBRG-23
	H7N7 (LPAIV)	A/Turkey/Germany/R11/01

3.9 Verwendete Software

Die Datenerhebung sowie Speicherung erfolgte mit dem Programm Microsoft Office Excel 2007. Für die Auswertung der Daten sowie die Erstellung von Graphiken wurde das Programm SPSS für Windows 15.01 verwendet. Die Karten wurden mit dem Programm RegioGraph v.10 erstellt.

3.10 Auswertung der nationalen Wildvogeldatenbank

Zusätzlich zu den eigenen gewonnenen Proben wurden in Bezug auf die für diese Studie relevanten Vogelspezies (Tauben und Beutetiere) in Zusammenhang mit dem Institut für Epidemiologie des Friedrich Loeffler-Instituts (Wusterhausen/Dosse) die Daten der Nationalen Wildvogeldatenbank für die Jahre 2006 bis 2008 ausgewertet. Die Überwachung von Wildvögeln auf nationaler Ebene auf das Vorkommen von Influenza A Viren wurde mit der Richtlinie 2005/94/EG beschlossen, deren Leitlinien sind in der Entscheidung der Kommission 2007/268/EG festgelegt. Alle Bundesländer waren seit 2007 verpflichtet, regelmäßig verwendete (passives Monitoring) sowie lebendige (aktives Monitoring) Wildvögel zu untersuchen und die Ergebnisse in der Wildvogeldatenbank zu hinterlegen. Dies erfolgte dezentral von den einzelnen Landesuntersuchungs- und Veterinärämtern, welche die Anzahl der untersuchten Proben, nach verschiedenen Kriterien wie Spezies, Datum, Ort, online auf einen

zentralen Server am Institut für Epidemiologie in Wusterhausen (Friedrich Loeffler-Institut) übertragen. Am Institut für Epidemiologie erfolgte die zentrale Auswertung dieser Daten. Kloakentupfer, Oropharyngeal- oder Trachealtupfer sowie in Ausnahmefällen Kotproben wurden als Untersuchungsmaterial herangezogen und mittels molekularbiologischer Methoden auf das Vorkommen von Influenza A Viren, insbesondere der Subtypen H5N1 und H7 untersucht.

Für diese Studie wurden die Anzahl der absoluten Probenzahlen pro Jahr und relevanter Spezies sowie die Anzahl der dabei als positiv befundenen Proben abgefragt. Wenn möglich wurde der Subtyp sowie Pathotyp erhoben. Die Maske der Datenbank war so aufgebaut, dass die Dateneingabe zwischen verschiedenen Speziesbezeichnungen wählen, oder verallgemeinernd Daten lediglich als beispielsweise „Tauben“ einspeisen konnten. Pro Eintrag war jedoch nur eine der Möglichkeiten zu wählen, so dass ein Doppelseintrag unter „Tauben“ und zusätzlich unter einer Speziesbezeichnung ausgeschlossen war.

4 ERGEBNISSE

4.1 Untersuchungen zur Etablierung von Methoden

Die PCR's zum Nachweis von Influenza A Virus-RNA sowie RNA der AIV Subtypen H5 und H7 waren bereits am Institut für Geflügelkrankheiten etabliert. Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei RT-qPCR's zum Nachweis der AIV Subtypen H6 und H9 etabliert. Die Primersequenzen und die Temperaturprofile (leicht modifiziert) wurden direkt aus der Literatur von Das und Suarez (2007) übernommen und die Lage der Schwellenwert-Zyklen (Threshold-Cycles, C_t-Wert) mit den bekannten C_t-Werten der Influenza A-spezifischen RT-qPCR (siehe Kapitel 3.6.2.1) verglichen.

Da die Effektivität der RT-qPCR mit den in der Literatur eingesetzten Primermengen bezüglich des Nachweises von AIV H6 nicht zufriedenstellend war, wurden zur Verbesserung der Ergebnisse verschiedene Mixe, bestehend aus verschiedenen Primermengen hergestellt und an zwei verschiedenen AIV H6 getestet. Die Lagen der C_t-Werte wurden sodann mit denen aus der Influenza A-spezifischen RT-qPCR verglichen (Tabelle 4.1).

Tabelle 4.1: Getestete Primermengen (H6) sowie Vergleich der C_t-Wert-Lagen der verschiedenen Primer-Sonden-Gemische (H6) im Vergleich zur Influenza A-spezifischen RT- qPCR

Primer-Sonden-Menge	Primer/25 µl		Sonden/25 µl	Probe*	Ct-Wert	Differenz zur M-PCR
	H6+1461N	H6-1706	H6+1620			
Das und Suarez, 2007	30 pmol	10 pmol	3 pmol	1 (28,2)	33	+ 4,8
				2 (17,7)	21,9	+ 3,9
Nr. 1	30 pmol	20 pmol	3 pmol	1 (28,2)	34,4	+6,2
				2 (17,7)	23,9	+6,2
Nr. 2	30 pmol	30 pmol	3 pmol	1 (28,2)	31,3	+3,1
				2 (17,7)	20,4	+2,7
Nr. 3	40 pmol	40 pmol	3 pmol	1 (28,2)	32,6	+4,4
				2 (17,7)	19,7	+2

* Wert in Klammern gibt den C_t-Wert der Influenza A-spezifischen RT-qPCR an

Aufgrund der Ergebnisse wurde sich für Primer-Sonden-Menge Nr. 2 entschieden, mit welcher die zwei AIV H6 etwa drei Zyklen später detektiert wurden, als mit der Influenza A-spezifischen RT-qPCR (Tabelle 4.1). Unter Verwendung dieser ermittelten optimalen Menge wurde anschließend die Spezifität der H6-RT-qPCR überprüft. Wie aus Abbildung 4.1 ersichtlich, wurde durch das gewählte Primerpaar nur RNA spezifisch für den Subtyp H6 amplifiziert. Andere AIV Subtypen (H1, H3, H5, H7, H9, H13) sowie weitere RNA von Geflügelpathogenen Viren (Newcastle Disease Virus, Infektiöse Burstitis Virus, Infektiöse Bronchitis Virus, Turkey Rhinotracheitis Virus) wurden nicht nachgewiesen.

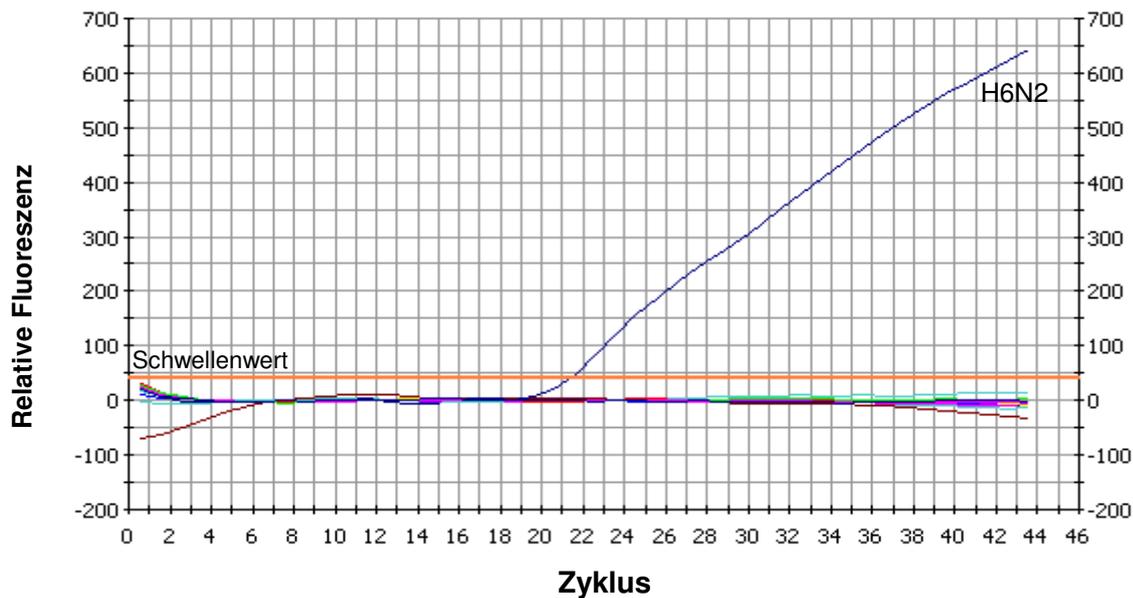


Abbildung 4.1: Überprüfung der Spezifität der AIV H6-subtypspezifischen RT-qPCR

Bezüglich der RT-qPCR zum Nachweis des AIV Subtyps H9 wurde das Temperaturprofil geringfügig zu den Angaben in der Literatur verändert, die Primer in der dort angegebenen Konzentration eingesetzt (Tabelle 3.2 und 3.3). Da die erreichten Schwellenwertzyklen von drei unterschiedlichen H9 unter diesen Bedingungen nahezu mit denen aus der Influenza A-spezifischen RT-qPCR übereinstimmten, wurden keine weiteren Modifikationen vorgenommen (Tabelle 4.2).

Tabelle 4.2: Vergleich der Lagen der C_t-Werte der unterschiedlich konzentrierten Primer-Sonden-Gemische (H9) im Vergleich zur Influenza A-spezifischen RT-qPCR

Primer-Sonde	Primer/25 µl		Sonden/25 µl	Probe*	Ct-Wert	Differenz zur M-PCR
	H9+1612	H9-1706	H9+1644			
Das und Suarez, 2007	30 pmol	10 pmol	3 pmol	1 (17,9)	17,8	- 0,1
				2 (20,7)	20	-0,7
				3 (15,1)	15,8	+ 0,7

* Wert in Klammern gibt den C_t-Wert der Influenza A-spezifischen RT-qPCR an

Die Überprüfung der Spezifität konnte zeigen, dass auch mit dieser PCR ausschließlich Influenza A Viren des Subtyps H9 nachgewiesen werden konnten und nicht RNA von anderen AIV Subtypen (H1, H3, H5, H6, H7, H13). Auch RNA anderer Geflügel-pathogener Erreger (Newcastle Disease Virus, Infektiöse Burstitis Virus, Infektiöse Bronchitis Virus, Turkey Rhinotracheitis Virus) (Abbildung 4.2) wurde nicht amplifiziert.

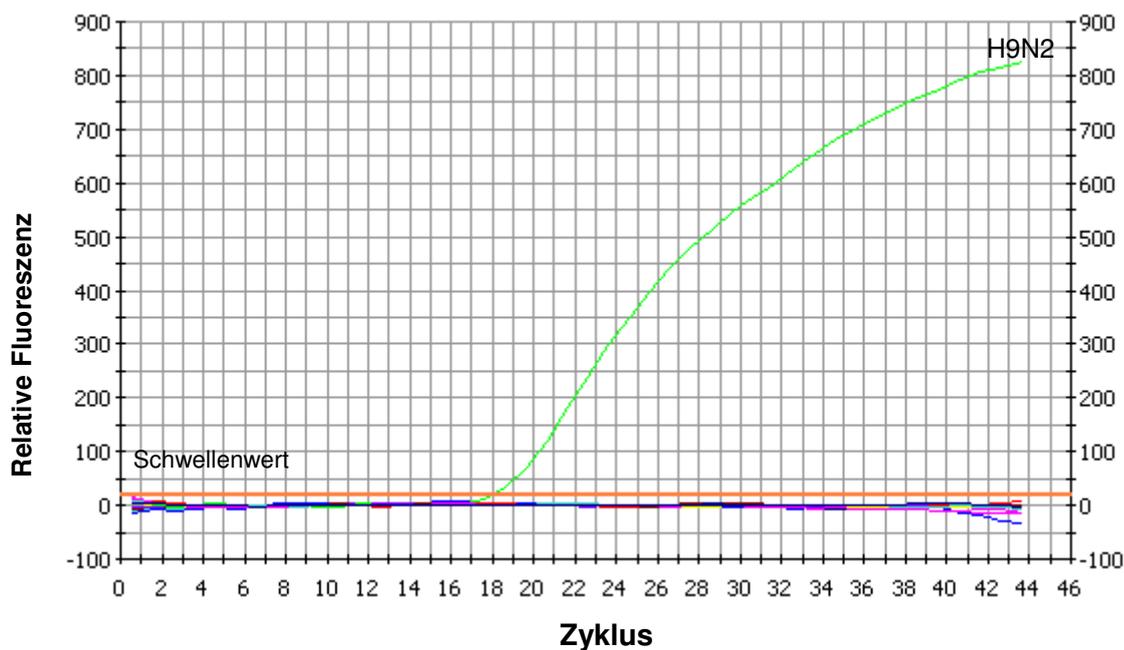


Abbildung 4.2: Überprüfung der Spezifität der AIV H9-subtypspezifischen RT-qPCR

4.2 Untersuchung der Stadt- und Wildtauben

4.2.1 Untersuchungsgut

4.2.1.1 Herkunft und Anzahl der Proben

In der Studie wurden Stadttauben (*Columba livia forma urbana*) aus Berlin, Hamburg, München sowie aus Hannover untersucht. Die Stadttauben aus Berlin wurden als Patienten in der Ziervogelklinik des Instituts für Geflügelkrankheiten während der Sprechstunde vorgestellt. Die Hamburger Tauben wurden in einer privaten Voliere beprobt, wo die Tiere nach ihrem Fang am Hamburger Hafen vorübergehend untergebracht waren. Die Stadttauben Hannovers entstammten einem Taubenschlag, welcher von der Stadt zum Zwecke der Stadttauben-Bestandsregulierung eingerichtet und betreut wurde. Aus München stammende Proben wurden mit der Unterstützung eines ortsansässigen Schädlingsbekämpfers genommen.

Bei den Wildtauben handelt es sich ausschließlich um erlegte Ringeltauben (*Columba palumbus*) aus Nordrhein-Westfalen (NRW). Die Proben wurden auf einer Gemeinschaftsjagd in der Region um Krefeld, und einer Jagd im Landkreis Wesel genommen.

Insgesamt wurden 408 Stadttauben und 170 Wildtauben untersucht. Aus der Tabelle 4.3 (Stadttauben) und Tabelle 4.4 (Wildtauben) ist die absolute sowie relative Verteilung der Proben nach Herkunft und Alter getrennt zu entnehmen. Tabelle 4.5 gibt die Anzahl der untersuchten Poolproben wieder.

Tabelle 4.3: Anzahl der Stadtaubenproben

Herkunft	Probenanzahl		Untersuchte Kloakentupfer	Untersuchte Trachealtupfer	Untersuchte Seren
Berlin	Juvenil	16	16	16	7
	Adult	136	136	102	109
	Gesamt	152	152	118	116
Hamburg	Juvenil	15	15	2	15
	Adult	88	88	49	87
	Gesamt	103	103	51	102
München	Juvenil	3	3	3	3
	Adult	110	110	110	106
	Gesamt	113	113	113	109
Hannover	Juvenil	1	1	1	1
	Adult	39	39	39	36
	Gesamt	40	40	40	37
Insgesamt	Juvenil	35	35	22	26
	Adult	373	373	300	338
	Gesamt	408	408	322	364

Tabelle 4.4: Anzahl der Wildtaubenproben*

Herkunft	Probenanzahl		Untersuchte Kloakentupfer	Untersuchte Trachealtupfer	Untersuchte Seren
Region um Krefeld	Juvenil	4	4	4	4
	Adult	125	125	125	119
	Gesamt	129	129	129	123
Landkreis Wesel	Juvenil	5	5	5	-
	Adult	36	36	36	-
	Gesamt	41	41	41	-
Insgesamt	Juvenil	9	9	9	4
	Adult	161	161	161	119
	Gesamt	170	170	170	123

Tabelle 4.5: Anzahl der untersuchten Tauben-Pools

Pool-Kategorie	Kloaken- und Trachealtupferpools vereint (Virusanzucht)	Kloakentupferpools (Molekularbiologische Untersuchung)	Trachealtupferpools (Molekularbiologische Untersuchung)
Stadttauben	82	82	65
Wildtauben	35	35	35

4.2.1.2 Zeitliche Verteilung der Probennahme

Die Probennahme bei den Stadttauben aus Berlin, Hamburg und München erfolgte mehrmals in unregelmäßigen Abständen, während die Stadttauben Hannovers nur an einem einzelnen Termin genommen wurden. Die Wildtaubenproben stammten jeweils von einem Wochenende (Tabelle 4.6).

Tabelle 4.6: Zeitliche Verteilung und Anzahl der Probennahmen bei den Stadt- und Wildtauben

Tauben	Zeitraum der Probennahme	Anzahl der Probennahmen
Stadttauben Berlin	Oktober 2006 bis September 2007	14 Termine
Stadttauben Hamburg	Oktober bis November 2006	2 Termine
Stadttauben München	Februar bis Juni 2007	8 Termine
Stadttauben Hannover	Februar 2007	1 Termin
Wildtauben Region Krefeld	Juli 2006	2 Termine
Wildtauben Landkreis Wesel	Juli 2008	2 Termine

4.2.2 Untersuchungsergebnisse

4.2.2.1 Virologische Untersuchungen

Bei der Untersuchung von 408 Stadttauben in 82 Probenpools wurden für 80 Probenpools nach zwei Eipassagen negative Ergebnisse erzielt. In zwei Pools (2,4%) konnte nach der ersten Eipassage ein hämagglutinierendes Agens nachgewiesen werden. Der Hämagglutinationshemmtest der Allantoisflüssigkeiten zeigte, dass die Hämagglutination durch Antikörper gegen das aviäre Paramyxovirus vom Serotyp 1 (APMV-1) gehemmt werden konnte. Auch mittels RT-qPCR zum spezifischen Nachweis von APMV-1-RNA konnte dieser

Erreger bestätigt werden. Die gleichzeitige Untersuchung der Allantoisflüssigkeiten in der Influenza A-spezifischen RT-qPCR erbrachte negative Befunde.

Durch vereinzelte Untersuchung der zwei Poolproben wurde eine APMV-1-Infektion bei drei adulten Tauben aus Berlin festgestellt.

Bei der Untersuchung von 170 Wildtauben in 35 Probenpools konnte nach zwei Eipassagen kein hämagglutinierendes Agens angezüchtet werden.

4.2.2.2 Molekularbiologische Untersuchungen

Bei der Untersuchung von 82 Kloakentupferpools und 65 Trachealtupferpools von Stadtauben konnte mittels Influenza A-spezifischer RT-qPCR in keiner Probe Influenza A Virus-spezifisches RNA nachgewiesen werden. Ebenso waren alle 35 Kloaken- und 35 Trachealtupferpools der Wildtauben in dieser Untersuchung negativ.

4.2.2.3 Serologische Untersuchungen

Bei der Untersuchung von 364 Stadtaubenseren im kompetitiven, speziesunabhängigen Influenza A-ELISA und im AGP konnten keine Antikörper gegen das Influenza A-spezifische Nukleoprotein nachgewiesen werden. Mittels HAH konnten keine Antikörper gegen die Subtypen H5 und H7 detektiert werden.

Die Untersuchung von 123 Wildtaubenseren im AGP erzielte ebenso stets negative Befunde. Bei Verwendung des kompetitiven, speziesunabhängigen Influenza A-ELISA's erbrachte sie jedoch in zwei Proben positive Ergebnisse. Dies entspricht 1,6% der Wildtaubenproben und 0,4% der gesamten Taubenseren (Stadt- und Wildtauben). Das Vorliegen von Antikörpern gegen den Subtyp H5 und H7 wurde mittels Hämagglutinationshemmtest ausgeschlossen (Tabelle 4.8). Eine weitere Subtypisierung konnte infolge der tierartlich-bedingten geringen Probenmenge nicht erfolgen.

4.2.3 Auswertung der nationalen Wildvogeldatenbank

In den Jahren 2006 bis einschließlich 2008 wurden Daten von insgesamt 1811 Tauben verschiedener Spezies eingegeben. Influenza A Viren wurden bei den Untersuchungen nicht nachgewiesen (Tabelle 4.7).

Tabelle 4.7: Abfrage der Dateneingabe in die nationalen Wildvogel­datenbank in Bezug auf verschiedene Taubenspezies in den Jahren 2006 bis 2008

Jahr	Spezies	Anzahl	M-PCR		H-Typ			N-Typ			Pathogenität	
			Pos	Neg	H5	H7	H(Rest)	N1	N2	N(Rest)	HPAI	LP­AI
06	Tauben	850	0	849	0	0	0	0	0	0	0	0
	Ringeltaube	71	0	71	0	0	0	0	0	0	0	0
	Felsentaube	3	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0
	Türkentaube	2	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0
07	Tauben	439	0	438	0	0	0	0	0	0	0	0
	Ringeltaube	36	0	36	0	0	0	0	0	0	0	0
	Felsentaube	38	0	38	0	0	0	0	0	0	0	0
	Türkentaube	3	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0
08	Tauben	272	0	271	0	0	0	0	0	0	0	0
	Ringeltaube	90	0	90	0	0	0	0	0	0	0	0
	Felsentaube	6	0	6	0	0	0	0	0	0	0	0
	Türkentaube	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Gesamt		1811	0	1808	0	0	0	0	0	0	0	0

4.3 Untersuchung von Beizvögeln, deren Beutewild sowie Falknern

4.3.1 Untersuchungsgut

4.3.1.1 Anzahl der Proben

Insgesamt nahmen 43 Falkner mit 54 Beizvögeln an der Untersuchung teil (im Folgenden bezieht sich der Begriff „Falkner“ auf männliche sowie weibliche Teilnehmer, wo relevant, wird speziell auf die Geschlechterunterschiede hingewiesen). Es wurden Proben von 1080 Beutetierproben eingesendet (Tabelle 4.8). Dies entspricht durchschnittlich 25,1 Beutetieren pro Falkner und 20 Beutetieren pro Beizvogel.

Tabelle 4.8: Anzahl der eingesendeten Falkner-, Beizvogel- und Beutetierproben

Probe	Insgesamt	Kloakentupfer	Trachealtupfer/Choanentupfer	Seren
Falkner	43	-	-	43
Beizvogel	54	37	40	51
Beutetiere	1080	1080	1012	-

4.3.1.2 Zeitliche Verteilung der Probennahme

Die Beprobung der **Beizvögel** und **Falkner** erfolgte jeweils einmalig während eines Zeitraumes von September 2006 bis Februar 2008.

Das Bundesjagdgesetz der Bundesrepublik Deutschland (BJagdG, in der Fassung der Bekanntmachung vom 29. September 1976, zuletzt geändert durch §5 des Gesetzes vom 26. März 2008) sowie die Verordnung über die Jagdzeiten (JagdzeitV, in der Fassung der Bekanntmachung vom 2. April 1977, zuletzt geändert durch §1 der Verordnung vom 25. April 2002) beschränken die Jagdzeiten der für diese Studie relevanten **Beutetierarten** (nur Federwild) auf die Monate September bis Februar, teilweise März (Bundesländer-abhängige Unterschiede in Bezug auf die jagdbaren Arten sowie die Jagd- und Schonzeiten). Die Probeneinsendungen erfolgten in den Monaten September 2006 bis März 2007 und September 2007 bis Februar 2008. Somit wurden die Proben der Beutetiere über einen Zeitraum von dreizehn Monaten eingesendet. Dadurch ergibt sich ein durchschnittliches Probenaufkommen von 83,1 Einsendungen im Monat. Die absoluten und prozentualen Werte der Probeneingänge pro Monat sind der Tabelle 4.9 zu entnehmen. Wie aus Abbildung 4.3 ersichtlich, wurden in den Monaten November 2006, Dezember 2006, Januar 2007, Oktober 2007, November 2007, Dezember 2007 und Januar 2008 überdurchschnittlich viele Proben eingesendet, die Eingänge der übrigen Monate lagen darunter. Bei getrennter Betrachtung der beiden Jagdsaisons entfallen 435 Probeneinsendungen (40,3%) auf die Saison 2006/2007 und 645 Proben (59,7%) auf die Saison 2007/2008.

Tabelle 4.9: Anzahl der Probeneingänge pro Monat

	Monat	Anzahl Einsendungen	Prozentualer Anteil
1. Jagdsaison	September 2006	23	2,1
	Oktober 2006	60	5,6
	November 2006	86	8,0
	Dezember 2006	104	9,6
	Januar 2007	97	9,0
	Februar 2007	59	5,5
	März 2007	6	,6
2. Jagdsaison	September 2007	16	1,5
	Oktober 2007	101	9,4
	November 2007	148	13,7
	Dezember 2007	140	13,0
	Januar 2008	173	16,0
	Februar 2008	67	6,2
	Gesamt	1080	100,0

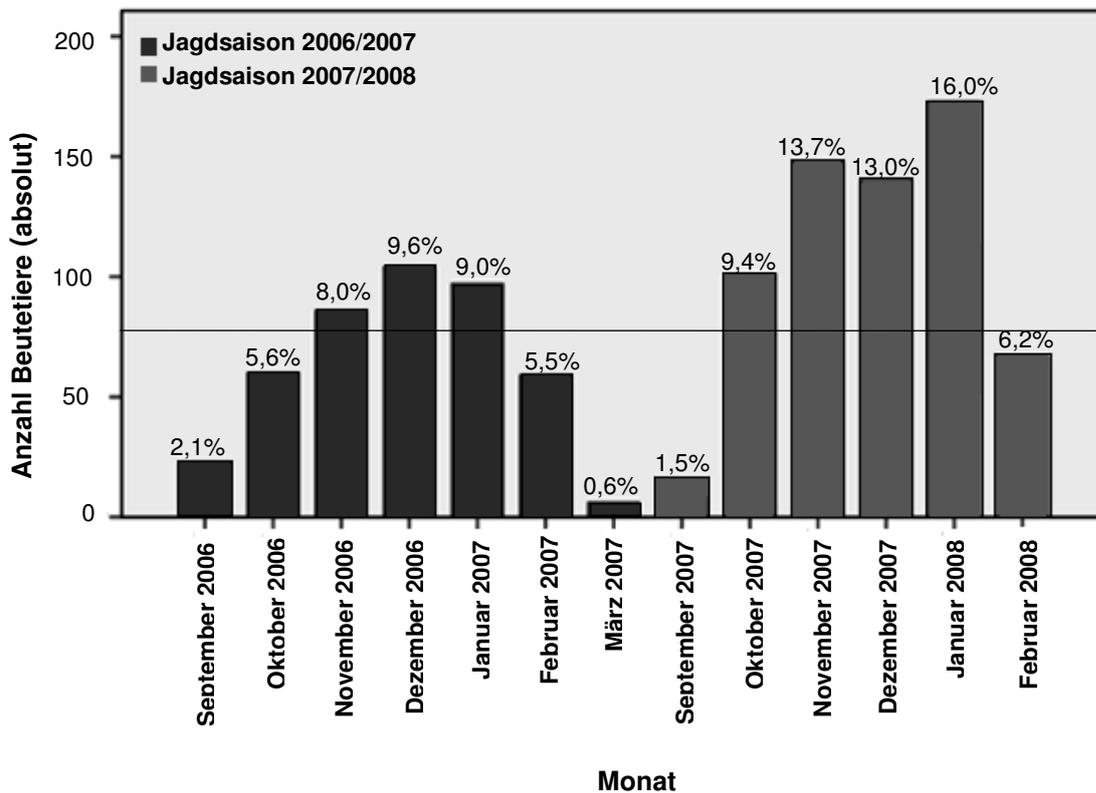


Abbildung 4.3: Anzahl der Probeneingänge pro Monat

4.3.2 Auswertung der Fragebögen

4.3.2.1 Anzahl der Beizvogelarten

An der Studie beteiligt waren 54 Beizvögel mit sechs verschiedenen Greifvogelarten aus zwei Greifvogelfamilien. Aus der Familie der Falkenartigen (*Falconidae*) waren Berberfalken (*Falco pelegrinoides*), Gerkfalken (*Falco rusticolus*), Lannerfalken (*Falco biarmicus*) und Wanderfalken (*Falco peregrinus*) und aus der Familie der Habichtsartigen (*Accipitridae*) Habicht (*Accipiter gentilis*) und Wüstenbussard (*Parabuteo unicinctus*) vertreten. Wanderfalken kamen mit 51,9% aller teilnehmenden Beizvögel zahlenmäßig am häufigsten vor. Danach folgten die Habichte (24,1%), Wüstenbussarde (16,7%), Gerkfalken (3,7%) und die Berber- und Lannerfalken (beide 1,9%). Die genaue Anzahl jeder Art ist in der Abbildung 4.4 widergegeben.

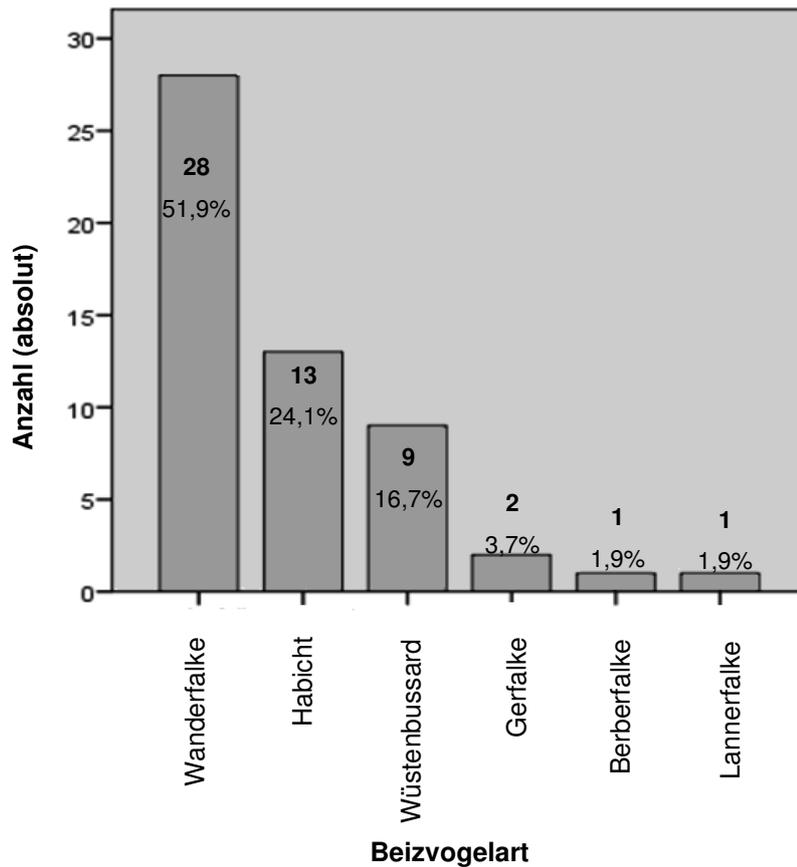


Abbildung 4.4: Anzahl der Beizvögel nach Art

4.3.2.2 Altersverteilung der Beizvögel

Drei der 54 Beizvögel waren erst im Frühjahr 2007 geschlüpft und wurden während der zweiten untersuchten Jagdsaison (2007/08) erstmals geflogen. Sechs weitere Beizvögel schlüpften ein Jahr zuvor im Frühjahr 2006 und waren zu Beginn der Studie im ersten Lebensjahr. Die restlichen 45 Vögel waren zu Beginn der Studie zwischen ein und 23 Jahren alt. Dreiviertel dieser Beizvögel (34 Tiere) hatten ein Alter zwischen zwei und fünf Jahren, der Median lag bei drei Jahren.

4.3.2.3 Angaben zur Fütterung und zu Vorerkrankungen der Beizvögel

Bezüglich der Fütterung wurden folgende Futtertiere in abnehmender Reihenfolge genannt: Eintagsküken (45 Nennungen), Brief- und Rassetauben (41 Nennungen), Wildkaninchen (24 Nennungen), Rabenkrähen (17 Nennungen), Fasan (acht Nennungen), Rebhuhn und Wachteln (jeweils fünf Nennungen), handelsübliches Putenfleisch, Laborratten und Enten (jeweils drei Nennungen), Labormäuse (zwei Nennungen) und Rinderherz sowie Möwen (jeweils eine Nennung). Für 32 Beizvögel (59,3%) wurde angegeben, dass auch selber erbeutetes Wild gefressen wird. Nur für einen Vogel (1,85%) wurde diese Aussage explizit verneint, für die restlichen 21 Vögel (38,9%) wurde keine Angabe gemacht.

Für zwei Beizvögel (3,7%), einem Lannerfalken und einem Wanderfalken, wurde über Vorerkrankungen, eine Fußballenentzündung, bzw. eine alte Beinfraktur berichtet. Für alle anderen Beizvögel wurden keine Vorerkrankungen angegeben.

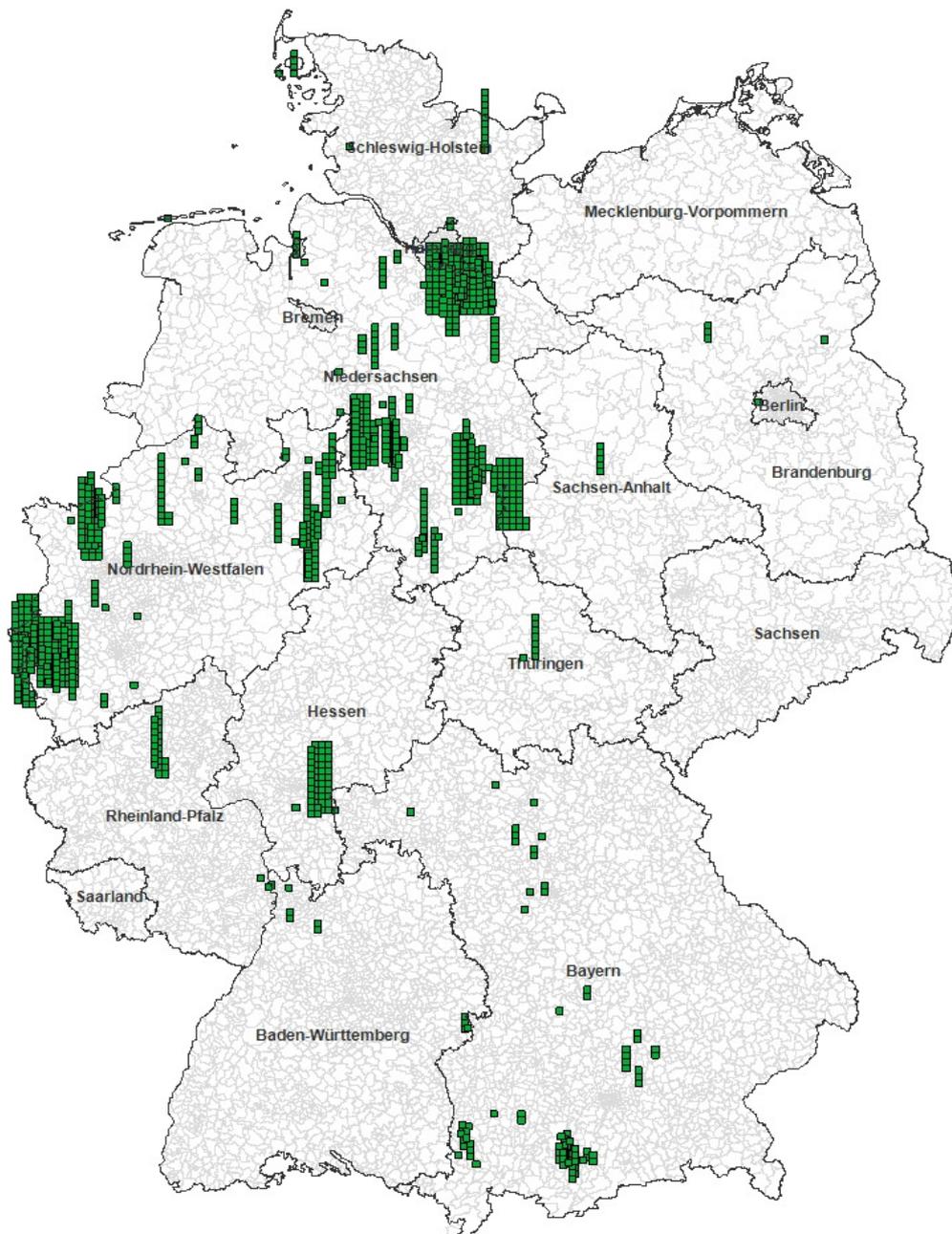
4.3.2.4 Herkunft der Beutetiere

Bei einem durchschnittlichen Probenaufkommen von 67,5 Proben pro Bundesland liegen Niedersachsen und Nordrhein-Westfalen mit 463 und 406 Proben deutlich über dem Durchschnittswert, ebenso liegt Bayern (80 Proben) geringfügig darüber. Aus drei Bundesländern, Saarland, Mecklenburg-Vorpommern und Sachsen, wurden keine Proben eingesendet, aus den übrigen Bundesländern lagen die Einsendungen mit einer bis 50 Proben unter dem Durchschnitt (Tabelle 4.10).

Tabelle 4.10: Herkunft der Beutetierproben

Bundesland	Anzahl der Proben	Prozentualer Anteil
Schleswig-Holstein	22	2,0
Hamburg	3	0,3
Niedersachsen	463	42,9
Bremen	4	0,4
Nordrhein-Westfalen	406	37,6
Hessen	50	4,6
Rheinland-Pfalz	24	2,2
Baden-Württemberg	10	0,9
Bayern	80	7,4
Berlin	1	0,1
Brandenburg	4	0,4
Sachsen-Anhalt	5	0,5
Thüringen	8	0,7
Gesamt	1080	100,0

Die räumliche Verteilung der Probeneingänge ist in Karte 4.1 grafisch dargestellt.



Karte 4.1: Räumliche Verteilung der Beutetierproben-Herkunft (ein Kasten entspricht einem Beutetier)

4.3.2.5 Anzahl der Beutetierarten

Unter den Beutetieren befanden sich in abnehmender Reihenfolge ihrer Einsendungen Rabenkrähen (*Corvus corone corone*, $n = 759$, 70,3 %), Fasane (*Phasianus colchicus*, $n = 89$, 8,2 %), Möwen (*Laridae*, $n = 74$, 6,9 %), Rebhühner (*Perdix perdix*, $n = 59$, 5,5 %), En-

tenvögel (*Anatidae*, n = 53, 4,9 %), Elstern (*Pica pica*, n = 31, 2,8 %), Ringeltauben (*Columba palumbus*, n = 7, 0,6 %) und Bläßrallen (*Fulica atra*, n = 6, 0,6 %) sowie Nilgänse (*Alopochen aegyptiacus*, n = 2, 0,2 %) (Tabelle 4.13). Während Rabenkrähen, Fasane, Rebhühner, Elstern, Ringeltauben sowie Bläßrallen auf Artenebene erfasst wurden, wurden unter der Familienbezeichnung „Möwen“ folgende Arten zusammengefasst: Lachmöwen (*Larus ridibundus*, n = 15), Sturmmöwen (*Larus canus*, n = 3) und Silbermöwen (*Larus argentatus*, n = 56). Unter der Bezeichnung „Entenvögel“ fielen folgende Arten: Stockenten (*Anas platyrhynchos*, n = 49), Krickenten (*Anas crecca*, n = 3) und Reiherenten (*Aythya fuligula*, n = 1) (Tabelle 4.11).

Tabelle 4.11: Anzahl der Beutetierproben nach Spezies

Beutetierart	Beutetierproben		Kloakentupfer	Trachealtupfer
Rabenkrähen	Juvenil	231	231	214
	Adult	399	399	373
	Ohne Angabe	129	129	129
	Gesamt	759	759	716
Fasane	Juvenil	43	43	42
	Adult	46	46	42
	Ohne Angabe	-	-	-
	Gesamt	89	89	84
Möwen	Juvenil	33	33	31
	Adult	41	41	38
	Ohne Angabe	-	-	-
	Gesamt	74	74	69
Enten	Juvenil	24	24	21
	Adult	29	29	23
	Ohne Angabe	-	-	-
	Gesamt	53	53	44
Bläßrallen	Juvenil	-	-	-
	Adult	6	6	3
	Ohne Angabe	-	-	-
	Gesamt	6	6	3

Beutetierart	Beutetierproben		Kloakentupfer	Trachealtupfer
Rebhühner	Juvenil	45	45	41
	Adult	14	14	13
	Ohne Angabe	-	-	-
	Gesamt	59	59	54
Elstern	Juvenil	3	3	3
	Adult	8	8	8
	Ohne Angabe	20	20	19
	Gesamt	31	31	30
Ringeltauben	Juvenil	1	1	1
	Adult	5	5	5
	Ohne Angabe	1	1	1
	Gesamt	7	7	7
Nilgänse	Juvenil	1	1	1
	Adult	1	1	1
	Ohne Angabe	0	0	0
	Gesamt	2	2	2
Insgesamt	Juvenil	381	381	354
	Adult	549	549	509
	Ohne Angabe	150	150	149
	Gesamt	1080	1080	1012

Zur Erstellung von Pools wurden die Proben in fünf Pool-Kategorien gepoolt (Tabelle 4.12 und Tabelle 4.13). Pro Pool wurden bis zu fünf Proben vereint.

Tabelle 4.12: Pool-Kategorien für die Beutetiere

Pool – Kategorie	Enthaltene Beutetierarten
Rabenvögel	Rabenkrähen, Elstern
Fasanenartige	Fasane, Rebhühner
Wasservögel	Bläßrallen, Nilgänse, Krickenten, Reiherenten, Stockenten
Tauben	Ringeltauben
Möwen	Silbermöwen, Sturmmöwen, Lachmöwen

Tabelle 4.13: Anzahl der untersuchten Beutetier-Pools*

Pool-Kategorie	Anzahl der im SPF-Ei untersuchten Pools (KT und TT vereint)	Anzahl KT für die Molekularbiologische Untersuchung	Anzahl TT für die Molekularbiologische Untersuchung
Rabenvögel	159	159	151
Fasanenartige	30	30	30
Wasservögel	13	13	13
Tauben	2	2	2
Möwen	16	16	15
Insgesamt	220	220	211

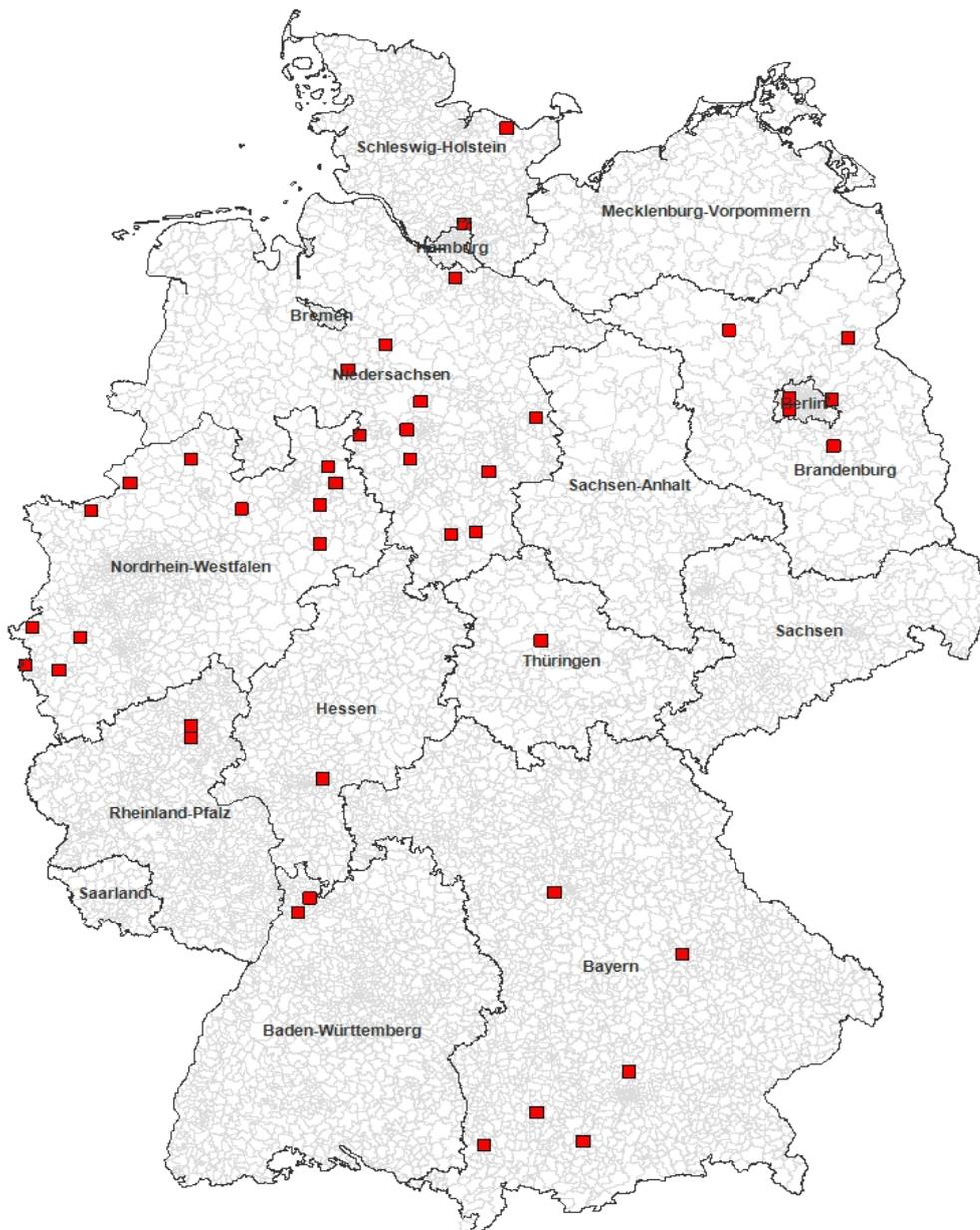
*KT = Kloakentupfer; TT = Trachealtupfer

4.3.2.6 Herkunft der Falknerproben

Die 43 Falkner stammten aus elf Bundesländern. Die Bundesländer Bremen, Saarland, Mecklenburg-Vorpommern, Sachsen und Sachsen-Anhalt waren nicht vertreten, dagegen lagen Niedersachsen sowie Nordrhein-Westfalen mit ca. 50% aller Teilnehmer deutlich über dem Durchschnitt (Tabelle 4.14). Bei insgesamt 16 Bundesländern nahmen durchschnittlich 2,7 Teilnehmer pro Bundesland an der Untersuchung teil. Die Karte 4.2 veranschaulicht die räumliche Verteilung der in den Fragebögen angegebenen Wohnorte der Falkner. Hierbei muss berücksichtigt werden, dass Falkner grundsätzlich zwar in Nähe ihres Wohnortes zur Jagd gehen, durchaus aber auch vereinzelt weiträumig davon entfernt jagen.

Tabelle 4.14: Herkunft der Falkner nach Bundesländern

Bundesland	Absolute Anzahl	Prozentuale Anzahl
Schleswig-Holstein	1	2,3%
Hamburg	1	2,3%
Niedersachsen	11	25,6%
Nordrhein-Westfalen	11	25,6%
Hessen	1	2,3%
Rheinland-Pfalz	3	6,9%
Baden-Württemberg	2	4,6%
Bayern	6	13,8%
Berlin	2	4,6%
Brandenburg	4	9,2%
Thüringen	1	2,3%



Karte 4.2: Herkunft der Falkner (ein Kasten entspricht einem Falkner)

4.3.2.7 Geschlechter- und Altersverhältnis der Falkner

Das Geschlechterverhältnis der Falkner entsprach fünf weiblichen (11,6 %) und 38 männlichen (82,4 %) Teilnehmern. Laut Fragebogen waren diese zum Zeitpunkt der Blutentnahme zwischen 23–77 Jahren alt. Insgesamt betrachtet hatten Dreiviertel aller Falkner ($n = 32$) ein Alter zwischen 39 und 59 Jahren, der Median lag bei 49 Jahren (Abbildung 4.6). Ein Falkner hatte sein Alter im Fragebogen nicht angegeben.

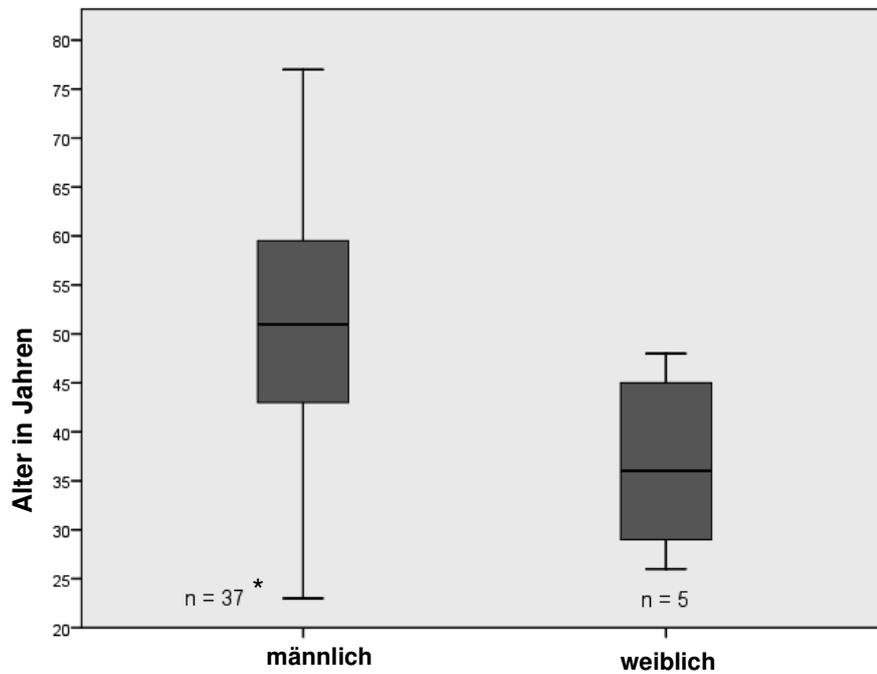


Abbildung 4.6: Altersverteilung der Falkner nach Geschlechtern getrennt

* 1 Person ohne Altersangabe

4.3.2.8 Grippeimpfungen der Falkner

13 Falkner (30,2 %) gaben an, innerhalb der letzten fünf Jahre gegen Grippe geimpft worden zu sein. 29 Falkner (67,4 %) wurden nicht geimpft. Ein Falkner (2,3 %) machte über seinen Impfstatus keine Angabe (Abbildung 4.7).

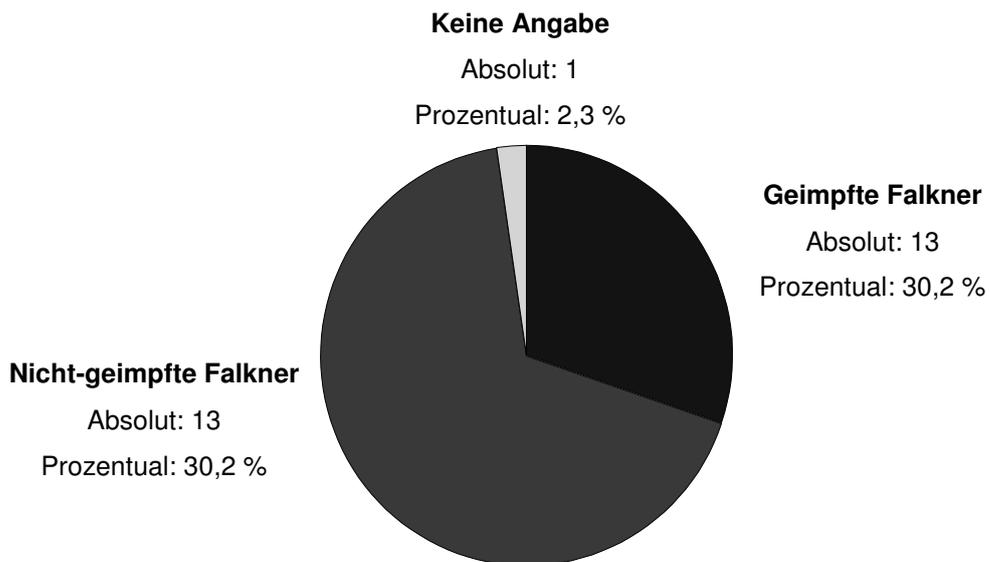


Abbildung 4.7: Anzahl der innerhalb der letzten 5 Jahre gegen Grippe geimpften und ungeimpften Falkner (n = 43)

4.3.2.9 Angaben über die Jagdtätigkeiten der Falkner

Knapp zweidrittel aller Falkner gaben an, neben der Beizjagd auch noch mit der Waffe zu jagen (31 Falkner im Vergleich zu 12 Teilnehmer, welche ausschließlich mit dem Vogel jagen). 19 dieser Personen schießen hierbei auch Federwild (hierbei fallen neun Angaben auf weniger als zehn Stück Federwild pro Jagdsaison, vier Angaben auf zehn bis 30 Stück, fünf Angaben auf 31 – 60 Stück und ein Teilnehmer gab an, pro Jagdsaison mehr als 60 Stück Federwild zu schießen).

40 Falkner gaben an, ihr geschossenes oder gebeiztes Wild nach dem Erlegen selber auszuweiden, während drei Falkner hierzu keine Angabe machten. Die überwiegende Mehrheit (34 Falkner (79,06%)) tun dies bei 90 – 100% des erbeuteten Wildes, vier Falkner bei 80-89% und je ein Falkner bei 50-59% bzw. 20-29%. Nur zwei Falkner gaben an, beim Aufbrechen des Wildes generell Handschuhe zu verwenden, sechs weitere Falkner tun dies in der Mehrzahl der Fälle. Dagegen gaben 34 Falkner an, nur selten bis nie Handschuhe zu benutzen. Ein Falkner machte keine Angabe. 16 Falkner haben sich beim Ausweiden mit dem Messer schon einmal verletzt, 21 Falkner verneinten diese Aussage und sechs Personen machten hierzu keine Angabe.

Alle Falkner gaben an, selbst gebeiztes (oder erlegtes) Wild zu verzehren.

4.3.3 **Untersuchungsergebnisse der Beizvögel**

4.3.3.1 Virologische Untersuchungen

Bei dem Versuch der Virusanzucht im SPF-Hühnerei als Einzelproben konnten nach zwei Eipassagen keine hämagglutinierenden Agenzien nachgewiesen werden.

4.3.3.2 Molekularbiologische Untersuchungen

Bei der molekularbiologischen Untersuchung der Einzelproben wurden in der Influenza A-spezifischen RT-qPCR stets negative Ergebnisse erzielt.

4.3.3.3 Serologische Untersuchungen

Bei der serologischen Untersuchung mittels AGP und kompetitiven, speziesunabhängigen Influenza A-ELISA konnten keine Antikörper gegen Influenza A Viren nachgewiesen werden. Die Untersuchung mittels Hämagglutinationshemmtest konnte keine Antikörper gegen den Subtyp H5 und H7 nachweisen.

4.3.4 Untersuchungsergebnisse der Beutetiere

4.3.4.1 Virologische Untersuchungen

Beim Versuch der Virusisolierung im SPF-Hühnerei wurde in keinen der untersuchten 220 Probenpools hämagglutinierende Agenzien nachgewiesen.

4.3.4.2 Molekularbiologische Untersuchungen

Mittels Influenza A-spezifischer RT-qPCR konnte in keinem der Rabenvögel-, Fasanenartige- und Taubenpools Influenza A Virus-spezifische RNA nachgewiesen werden. Dagegen wurde diese in fünf Möwenpools (drei Kloakentupferpools und zwei korrespondierende Trachealtupferpools) und zwei korrespondierenden Wasservogelpools detektiert.

Bei der nachfolgenden Vereinzelung der Pools wurden zwei Möwen detektiert, welche sowohl im Kloaken- als auch im Trachealtupfer positiv waren. Von einer Möwe konnte nur im Kloakentupfer AIV-RNA nachgewiesen werden. Entsprechend konnte bei einer Ente aus beiden Tupfern, bei einer anderen Ente nur aus dem Kloakentupfer AIV-RNA amplifiziert werden.

Insgesamt ergeben sich somit drei Möwen und zwei Enten, bei welchen Influenza A Virus-spezifische RNA nachgewiesen werden konnte (siehe Tabelle). Dies entspricht einem prozentualen Anteil von 4,1% positiver Proben unter allen untersuchten Einsendungen von Möwen (insgesamt 74 Einsendungen) sowie 3,4% aller Enten (59 Einsendungen). Bei Betrachtung aller Beutetiereinsendungen in ihrer Gesamtheit ergaben 0,5% der untersuchten Beutetiere den Nachweis von Influenza A Virus-spezifischer RNA. Trotz fünffacher Eipassage gelang es nicht, aus diesen Proben Influenza A Viren durch nochmaliges Verimpfen in SPF-Hühnereiern anzuzüchten.

Die Möwen (eine Sturmmöwe und zwei Silbermöwen) wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Jahre 2006 und 2007 mit einem Gerfalken in Niedersachsen gebeizt. Die Enten wurden von einem Wanderfalken eines zweiten Falkners im Jahr 2007 geschlagen (Tabelle 4.15).

Tabelle 4.15: Charakteristika der in der Influenza A-spezifischen Realtime RT-qPCR-positiven Einzelproben

Art (Bezeichnung)	Kloake (Ct-Wert)	Trachea (Ct-Wert)	Alter ¹	Herkunft	Datum	Beizvo- gel	Falk- ner
Sturmmöwe (B40.10)	+ (33,3)	+ (29,6)	Juv.	Wolfenbüttel (Niedersachsen)	03.11. 2006	V40.1 (Gerfal- ke)	M40
Silbermöwe (B40.35)	+ (33,2)	- (K.A.)	Juv.	Wolfenbüttel (Niedersachsen)	20.01. 2007	V40.1 (Gerfal- ke)	M40
Silbermöwe (B40.46)	+ (29,5)	+ (32,2)	Ad.	Salzgitter (Niedersachsen)	07.02. 2007	V40.1 (Gerfal- ke)	M40
Stockente (B50.7)	+ (21)	+ (36,3)	Ad.	Lauenhagen (Niedersachsen)	15.10. 2007	V50.1 (Wan- derfalke)	M50
Stockente (B50.8)	+ (32,6)	- (K.A.)	Juv.	Lauenhagen (Niedersachsen)	17.10. 2007	V50.1 (Wan- derfalke)	M50

1) juv. = juvenil; ad. = adult

Die Untersuchung auf das Vorliegen der Subtypen H5, H6, H7 und H9 ergab in einer Stockente (Nr. B50.8) den Nachweis von H9-spezifischer RNA (Ct-Wert = 34,8). Die Ergebnisse der weitere Subtypisierung am Friedrich Löffler-Institut ergibt die Tabelle 4.16.

Tabelle 4.16: Ergebnisse der weiteren Subtypisierung der in der Influenza A-spezifischen RT-qPCR positiven Beutetierproben mittels RT-PCR und Microarray-Analyse

Bezeichnung	H	N	Homologie (H)
Sturmmöwe Nr. B40.10	H13	N6 (Microarray)	A/Hering gull/Norway/2336/2006 (H13N6)
Silbermöwe Nr. B40.35K	Kein RNA- Nachweis möglich	N6 (Microarray)	Entfällt, da Microarray-Analyse
Silbermöwe Nr. B40.46	Kein RNA- Nachweis möglich	N6 (Microarray)	Entfällt, da Microarray-Analyse
Stockente Nr. B50.7K	H3	N2 (Microarray)	A/duck/Italy/194659/2006 (H3N2)
Stockente Nr. B50.8K	H3 (Microarray) H9 (Microarray)	N2 (Microarray)	Entfällt, da Microarray-Analyse

4.3.4.3 Auswertung der nationalen Wildvogel­datenbank

In der nationalen Wildvogel­datenbank wurde bei keiner der untersuchten Krähen, Fasanen, Rebhühnern, Elstern und Nilgänsen ein positiver Influenza A Virus-Befund eingegeben (Tabelle 4.17). In allen drei Jahren kam es dagegen zu mehreren positiven Nachweisen von Influenza A Viren, einschließlich HPAIV H5N1 in 2006 und 2007, bei verschiedenen Möwen- und Entenspezies (Beer et al., 2006; Weber et al., 2007; Starick et al., 2008; Globig et al., 2009). Die Aussage in Bezug auf die nachgewiesenen Subtypen sind in dieser Datenbank diesbezüglich jedoch insofern limitiert, als dass bei positiven Proben, bei welchen H5 und H7 ausgeschlossen werden konnten, eine weitere Subtypisierung nicht mehr erfolgen musste.

Tabelle 4.17: Abfrage der Dateneingabe in die nationale Wildvogel­datenbank in Bezug auf verschiedene Beutetierspezies in den Jahren 2006 bis 2008

Jahr	Spezies	Anzahl	M-PCR		H-Typ			N-Typ			HPAI LPAI	
			Pos	Neg	H5	H7	Hx	N1	N2	Nx		
2006	Krähen	780	0	778	0	0	0	0	0	0	0	0
	Fasane	681	0	681	0	0	0	0	0	0	0	0
	Möwen	602	4	596	4	0	0	4	0	0	4	0
	Lachmöwe	445	1	444	0	0	0	0	0	0	0	0
	Sturmmöwe	135	1	134	1	0	0	1	0	0	1	0
	Enten	2288	19	2268	18	0	0	16	0	0	17	0
	Stockente	3595	7	3587	2	0	0	0	0	0	1	1
	Krickente	78	0	78	0	0	0	0	0	0	0	0
	Reiherente	370	11	359	11	0	0	5	0	0	11	0
	Blässrallen	1548	1	1546	1	0	0	0	0	0	1	0
	Rebhuhn	62	0	62	0	0	0	0	0	0	0	0
	Elster	299	0	299	0	0	0	0	0	0	0	0
Nilgänse	242	0	242	0	0	0	0	0	0	0	0	
2007	Krähen	217	0	217	0	0	0	0	0	0	0	0
	Fasane	313	0	313	0	0	0	0	0	0	0	0
	Möwen	370	3	367	2	0	0	2	0	0	2	0
	Lachmöwe	914	2	911	0	0	0	0	0	0	0	0
	Sturmmöwe	238	0	238	0	0	0	0	0	0	0	0
	Enten	1416	14	1393	0	0	4	2	0	2	0	4
	Stockente	7117	218	6898	19	0	36	13	14	14	2	33
	Krickente	85	4	81	0	0	0	0	0	0	0	0
	Reiherente	260	6	252	0	0	0	0	0	0	0	0
	Blässrallen	848	5	841	3	0	0	3	0	0	2	0
	Rebhuhn	20	0	20	0	0	0	0	0	0	0	0
	Elster	181	0	181	0	0	0	0	0	0	0	0
Nilgänse	668	0	668	0	0	0	0	0	0	0	0	
2008	Krähen	57	0	56	0	0	0	0	0	0	0	0
	Fasane	409	0	407	0	0	0	0	0	0	0	0
	Möwen	176	0	174	0	0	0	0	0	0	0	0
	Lachmöwe	833	0	827	0	0	0	0	0	0	0	0
	Sturmmöwe	167	0	167	0	0	0	0	0	0	0	0
	Enten	1036	4	1026	0	0	3	0	1	2	0	0

Jahr	Spezies	Anzahl	M-PCR		H-Typ			N-Typ			HPAI LPAI	
			Pos	Neg	H5	H7	Hx	N1	N2	Nx		
2008	Stockente	6408	364	6008	76	0	32	3	11	35	0	105
	Krickente	71	0	71	0	0	0	0	0	0	0	0
	Reiherente	84	0	84	0	0	0	0	0	0	0	0
	Blässrallen	1219	11	1206	0	0	0	0	0	0	0	0
	Rebhuhn	24	0	24	0	0	0	0	0	0	0	0
	Elster	43	0	43	0	0	0	0	0	0	0	0
	Nilgänse	359	0	355	0	0	0	0	0	0	0	0

4.3.5 Untersuchungsergebnisse der Falkner

4.3.5.1 Serologische Untersuchungen

Die serologische Untersuchung der 43 Falknerseren im kompetitiven, speziesunabhängigen Influenza A-ELISA erbrachte in allen Seren ein positives Ergebnis. Dagegen verlief die subtypspezifische Untersuchung auf Antikörper gegen H5 und H7 im MNT sowie gegen H9 und H13 im HAH stets negativ. Auf die Untersuchung der Seren gegen Antikörper des Subtyps H3 wurde verzichtet. Dies daher, weil Antikörper gegen H3 beim Menschen generell vorkommen, da H3 (wie auch H1) ein typischer Subtyp der humanen Influenzaviren ist. Es war also von vornherein auszugehen, dass der HAH in diesem Fall positive Ergebnisse gebracht hätte.

5 DISKUSSION

Die Aviäre Influenza (AI) ist eine seit langem bekannte und zu hohen Verlusten in der Geflügelindustrie führende Tierseuche. Insbesondere während des letzten Jahrzehnts, seit dem weltweit seuchenhaften Auftreten des Subtyps HPAIV H5N1, gehört diese zu den am intensivsten erforschten Erkrankungen in der Veterinär-, aber auch in der Humanmedizin. Dies liegt insbesondere daran, dass aviäre Influenzaviren (AIV) zu einem gewissen Grad ein zooanthroponotisches Potential beherbergen. Ein besonders großes Medieninteresse im Jahr 2006 führte zu panikartigen Befürchtungen in der Bevölkerung, es könnte sich bei HPAIV H5N1 um ein neues „Killer-Virus“ handeln. In der Tat wurde und wird diesem Subtyp eine besondere Stellung als Vorläufer eines neuen Pandemievirus zugesprochen. Einige wenige Todesfälle wurden innerhalb der menschlichen Bevölkerung, allerdings nicht in Deutschland, verzeichnet. Hierbei zeigte sich, dass sobald der Mensch infiziert ist, klinische Erscheinungen auftreten und die Todesrate bei über 50% liegt. In dieser Arbeit sollte daher das Risiko der Übertragung von Influenza A Viren von Vögeln auf den Menschen, bezogen auf zwei bislang nicht erforschte Fragestellungen, weiter untersucht werden. Zum einen sollte der Infektionsstatus von Stadt- und Wildtauben erhoben werden, da Erstere mit Menschen in urbanen Ballungsräumen und Letztere mit Jägern in engen Kontakt kommen. Zum anderen sollte die Rolle der Falknerei in der Epidemiologie der AI erörtert werden. Falkner leben mit ihren Beizvögeln eng zusammen. Beizvögel und/oder deren Beutewild könnten möglicherweise mit AIV infiziert sein und so ein Risiko für den Falkner darstellen. Da Falkner zusätzlich mit humanen Influenzaviren in Kontakt kommen, könnten sie eine besondere Rolle in der Entstehung neuer Pandemievirusvarianten spielen.

Zur Untersuchung der in dieser Arbeit gewonnenen Proben wurden zunächst zwei Real-time Reverse-Transkriptase PCRs (RT-qPCRs) zum Nachweis von AIV H6 und H9-subtypspezifischer RNA etabliert. Hierzu wurden veröffentlichte Primer und Protokolle (geringfügig veränderte Temperaturen) verwendet (Das und Suarez, 2007). Da mit den in der Literatur angegebenen Parametern unter den gegebenen Laborbedingungen in Bezug auf den Nachweis von AIV H6 keine zufriedenstellenden Ergebnisse erzielt wurden, konnte unter Anpassung der eingesetzten Primermengen die Effektivität der RT-qPCR optimiert werden.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurden Stadttauben untersucht. Diese kommen mit Menschen in urbanen Räumen in sehr engen Kontakt. Die Ergebnisse der Stadttauben wurden sodann mit denen von zeitgleich untersuchten Wildtauben verglichen. Tauben wurden vor dem Auftreten von HPAIV H5N1 in den meisten Infektionsstudien mit den AIV-Subtypen H5

und H7 als wenig empfänglich gegenüber AIV eingestuft (Narayan et al., 1969; Slemons und Easterday, 1972; Panygrahy et al., 1996). Unter den verschiedenen Zooanthroponosen, welche durch Tauben übertragen werden können, führt Glünder (1989) die AIV als vernachlässigbar auf. Auch Haag-Wackernagel und Moch (2004), die in einer Literaturzusammenfassung zwar vom Vorkommen von AIV bei Stadttauben berichten, sehen diesbezüglich für den Menschen keine Gefahr ausgehend. Nach dem erstmaligen Auftreten von HPAIV H5N1 in Hong Kong im Jahr 1998 und der seuchenartigen Verbreitung ab 2002, muss die Stellung der Taube in der Epidemiologie der AIV jedoch erneut untersucht und eventuell neu bewertet werden. Ergebnisse von Studien mit verschiedenen HPAIV H5N1-Isolaten an verschiedenen Taubenarten (Brief-, Rasse-, Fleisch-, Wild-, Stadttauben) untermauern zwar in der überwiegenden Zahl die bis dato gängige Annahme, allerdings konnten in einigen Studien auch HPAIV H5N1-induzierte Todesfälle, teilweise mit voranstehenden ZNS-Symptomen, verzeichnet werden (Klopfleisch et al., 2006; Yu et al., 2007; Jia et al., 2008b, Brown et al., 2009). Es ist daher wahrscheinlich, dass die Empfänglichkeit von Tauben sehr in Abhängigkeit von dem vorherrschenden Influenzavirus-Stamm steht. Daher kann Tauben ein gewisses Risiko für die Verbreitung von HPAIV H5N1 nicht abgesprochen werden.

Stadttauben sind typische Vertreter einer synanthropen Tierart. Sie treten schwarmweise, insbesondere in Innenstadtbereichen, auf und haben hier einen Aktionsradius von nur wenigen hundert Metern (Westerlage, 1986). Hervorgerufen durch einen Überfluss an unnatürlicher Nahrung (hauptsächlich bestehend aus Speiseresten und illegalen Fütterungen), dem Fehlen wichtiger natürlicher Fressfeinde sowie einer ganzjährigen Fortpflanzungsperiode in der Stadt, erreichen diese nach wie vor zunehmende Bestandsgrößen und wurden wiederholt als hygienischer Risikofaktor für die Übertragung von infektiösen Krankheiten auf Menschen angesehen (Murton und Westwood, 1966). Als Brückenspezies kommen Stadttauben häufig in Kontakt zu anderen Wildvögeln, für welche schon AIV-Infektionen nachgewiesen wurden. In der Stadt sei hier an erster Stelle der Sperling (*Passer domesticus*) zu nennen, doch auch Stockenten (*Anas platyrhynchos*) dringen immer mehr in den urbanen Raum vor (Kaleta et al., 2005; Boon et al., 2007).

Die vorliegende Arbeit ist die erste, welche in Bezug auf die Aviäre Influenza eine größere Anzahl Stadttauben aus deutschen Großstädten serologisch, molekularbiologisch und mittels klassischer Virusanzucht im SPF-Hühnerei untersucht. Es wurden Stadttauben der drei größten deutschen Metropolen Berlin (n = 152, 37,3 %), Hamburg (n = 103, 25,2 %) und München (n = 113, 27,7 %) sowie Hannover (n = 40, 9,8 %), als Vertreter einer mittelgroßen Stadt, untersucht. Nach Untersuchungen von Vater (1998) erreicht die Stadttaube in Berlin und München eine Populationsgröße von 40.000 Tieren. Für Hamburg beläuft sich diese Zahl auf 25.000 Stadttauben (Anonym, 2009b), für Hannover sollte sich diese etwa auf der

Hälfte bewegen. Es wurde zwischen juvenilen (Tauben im ersten Lebensjahr) und adulten Tauben (Tauben ab dem zweiten Lebensjahr) unterschieden. Obgleich sich Stadttauben in der Regel ganzjährig fortpflanzen, kamen deutlich mehr adulte als juvenile Tauben zur Untersuchung. Womöglich sind die Jungtauben mobiler als Alttauben und lassen sich daher schlechter einfangen.

Es wurden keine AIV in den molekularbiologischen sowie virologischen Untersuchungen mittels Virusisolierung (VI) im SPF-Hühnerei festgestellt. Hierbei kamen 408 Kloaken- sowie 322 Trachealtupfer zur Untersuchung. Mit den gleichen Methoden wurden in Oslo (Norwegen) 100 Stadttauben durch Lillehaug et al. (2005) und in Harbin (China) 205 Stadttauben durch Jia (2007) untersucht. Diese Untersuchungen ergaben ebenso keine AIV-Nachweise. Aus der Literatur ist bekannt, dass Tauben, wenn überhaupt, AIV in nur sehr geringen Titern ausscheiden (Werner et al., 2007; Jia et al., 2008). Auf die Untersuchung von Organen wurde in dieser Studie verzichtet, da von der Tötung der Stadttauben abgesehen werden sollte. Nur in München wurde während des Versuchszeitraumes eine Taubenbekämpfung durch Tötungsmaßnahmen einzelner Tiere durchgeführt. Aufgrund der weiten Entfernung von Berlin und München sowie der mehrmaligen Probennahme an nur jeweils wenigen Stadttauben, bot sich der dort ansässige Stadttaubenbekämpfer an, Tupfer- und Blutproben, nicht aber Organe, zu entnehmen und mit der Post zuzuschicken.

Die Untersuchung mittels RT-qPCR wurde nach Empfehlung des Nationalen Referenzlabor für AIV (NRL AIV, Friedrich Loeffler-Institut, Insel Riems) durchgeführt. Dies ist eine validierte Untersuchungsmethode zum Nachweis von AIV, wie sie von allen Mitgliedstaaten der Europäischen Union (EU) im Rahmen des Wildvogelmonitorings angewendet werden sollte. Interessant ist jedoch, dass bei der Untersuchung von 50 Stadttauben aus Košice (Tschechien) bei 12 Tauben (24 %) AIV-RNA der Subtypen H7N3 (fünf Tauben), H7N6 (zwei Tauben), H9N5 (vier Tauben) sowie H14N8 (eine Taube) nachzuweisen war, indem eine nested RT-PCR aus Probenmaterial von Tupfern des Oropharynx und der Kloake verwendet wurde. Die Autoren begründeten den vergleichsweise hohen Prozentsatz positiver Taubenproben mit dem Einsatz dieser speziellen Methode und überprüften ihre Ergebnisse mittels Untersuchung der positiven Proben in zwei weiteren nested RT-PCR's. Da bislang, wie auch in dieser Studie, keine AIV bei Stadttauben nachgewiesen werden konnten, erscheint ein Nachweis in 24 % aller Tauben in Košice jedoch als sehr hoch (Gronesová et al., 2009).

Zusätzlich zu den molekularbiologischen und virologischen Untersuchungen aus Kloaken- und Trachealtupfern, wurde in der vorliegenden Arbeit auch eine serologische Untersuchung an Stadttauben durchgeführt. Hierdurch konnten nicht nur aktuelle AIV-Infektionen detektiert, sondern auch länger zurückliegende Infektionen nachvollzogen werden. Bezüglich der Serologie konnten in dieser Arbeit bei 364 Stadttaubenseren jedoch gleichermaßen keine Influenza A-spezifischen Antikörper nachgewiesen werden. In Ljubljana (Slowenien) wur-

den durch Dovč et al. (2004) eine Probenzahl von 139 Taubenseren, in Santiago de Chile durch Toro et al. (1999) 100 Taubenseren und in vier neuseeländischen Städten (Wellington, Auckland, Christchurch und Dunedin) durch Black et al. (2004) 560 Seren von Stadt- und Brieftauben (keine Trennung in Zahlen) im Agargelpräzipitationstest (AGP) untersucht. In allen Städten waren die Ergebnisse desgleichen negativ. Der AGP wurde auch in dieser Studie angewendet, jedoch darüber hinaus ein kompetitiver, speziesunabhängiger Influenza A-spezifischer ELISA. Diesem wird eine höhere Sensitivität als dem AGP zugesprochen (Meulemans et al., 1986; Wu et al., 2007; Spackman et al., 2009). Außerdem wurde der Hämagglutinationshemmtest (HAH) zum subtypspezifischen Nachweis von H5- und H7-Antikörpern verwendet. Mit dem HAH werden Antikörper speziell gegen das Hämagglutinin der einzelnen AIV-Subtypen nachgewiesen, im AGP und im ELISA solche gegen das Nukleoprotein (typspezifisches Antigen der Influenza A Viren). Da mit den verschiedenen Testsystemen somit unterschiedliche Antikörpertypen nachgewiesen werden, erhöht die Anwendung aller drei Tests den Ausschluss falsch-negativer Proben. Mit dem HAH konnte Jia (2007) in Harbin (China) bei 24,4 % der Stadttauben Antikörper gegen den AIV Subtyp H9 feststellen. Außerdem konnten in Zagreb mittels HAH H1-spezifische Antikörper in 23,6 % aller Stadttaubenseren nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse sind überraschend, da weder in diesen noch in den anderen Studien eine besondere Affinität von AIV H1 oder H9 zu Tauben bestätigt werden konnte. Eine mögliche Erklärung wäre, dass bei Tauben nur für einen sehr kurzen Zeitraum Antikörper gegenüber AIV gebildet werden und es lediglich Zupancic et al. (1986) und Jia (2007) gelang, während dieses Zeitraumes Proben zu nehmen. Es gibt bislang keine Studie, in welcher der Antikörperverlauf nach einer AIV-Infektion bei Tauben gemessen wurde. Meulmans et al. (1987) konnten spezifische Antikörper bei Hühnern nach experimenteller Infektion mit einem H6N2 mit Agargelpräzipitationstest, Hämagglutinationshemmtest sowie eines ELISA mindestens 157 Tage nach der Infektion nachweisen. Da Hühner im Vergleich zu Tauben allerdings gegenüber AIV hochempfindlich sind, ist es fraglich, ob diese Ergebnisse ohne weiteres auf Tauben zu übertragen sind. Da Tauben nicht zu den AIV-Reservoirvögeln gehören, könnten sie sich in der Arbeit von Zupancic et al. (1986) über einen Kontakt zum Menschen infiziert haben, da das H1 auch ein typischer humaner Influenza A Stamm ist. Zudem wies in dieser Studie keine der untersuchten Wildtauben einen H1-Titer auf. Unterstützt wird diese Annahme durch neueste Untersuchungen durch Liu et al. (2009), welche nachweisen konnten, dass Tauben im Respirationstrakt vor allem solche Influenza A Virus-Rezeptoren tragen, an welche insbesondere humane Influenzaviren (wie H1 und H3), nicht aber AIV, prädestiniert binden.

Als Nebenbefunde bei der Untersuchung der Stadttauben wurden aus Proben von drei Vögeln hämagglutinierende Agenzien als aviäre Paramyxoviren vom Serotyp 1 (APMV-1)

isoliert und sowohl mittels HAH als auch mittels APMV-1-spezifischer RT-qPCR identifiziert. Die anschließende Charakterisierung dieser drei Proben am Nationalen Referenzlabor für Newcastle Disease (Friedrich Loeffler-Institut, Insel Riems) ergab die Zugehörigkeit dieser Proben zum APMV-1 vom Taubentyp. Die dort durchgeführten molekularbiologischen Untersuchungen weisen auf meso-/velogene Pathotypen hin. Das Vorkommen von APMV-1 bei Tauben in Deutschland wird seit 1990 beobachtet. Inzwischen wird ein enzootischer Status eines taubenspezifischen APMV-1 bei Tauben in Deutschland vermutet (Werner et al., 1999). In einer Arbeit von Werner et al. (1999) werden 171 APMV-1-Isolate, welche in den Jahren 1992 bis 1996 von Tauben in Deutschland isoliert wurden, charakterisiert. Von diesen konnten 129 Isolate dem taubenspezifischen APMV-1 zugeordnet werden, 17 Isolate einem velogenen, epizootischen Stamm und 25 einem lentogenen Stamm. Die positiven Proben stammten hierbei von in Gefangenschaft gehaltenen Tauben oder von Wildtauben. Alle Tiere zeigten APMV-verdächtige Symptome oder wurden tot aufgefunden. Auch die drei in dieser Studie auf APMV-1 positiv getesteten Stadttauben stammten aus einer Taubenkolonie eines Bahnhofes in Berlin, in welcher vermehrt inkoordinierte oder verstorbene Tauben aufgefunden wurden. Die untersuchten Tauben waren bereits verstorben und mit dem Verdacht einer Vergiftung in der Ziervogelklinik des Instituts für Geflügelkrankheiten vorgestellt worden.

Zusätzlich zu den Stadttauben wurden in dieser Arbeit insgesamt 170 erlegte Wildtauben (Ringeltauben, *Columba palumbus*) aus zwei Regionen in Nordrhein-Westfalen untersucht. Die Ergebnisse der VI und molekularbiologischen Untersuchungen aus Kloaken- und Trachealtupfern waren durchweg negativ. Wildtauben wurden im Vergleich zu Stadttauben häufiger auf AIV untersucht. Bislang wurden zwei Studien speziell aus Deutschland veröffentlicht, in denen im Rahmen einer Wildvogeluntersuchung auch Wildtauben, mit stets negativen Ergebnis, beprobt wurden (Ottis und Bachmann, 1983; Globig et al., 2006a). Die Anzahl an Taubenproben, im Vergleich zur gesamten Probenzahl, war in diesen Studien allerdings sehr gering, es wurden ausschließlich Kloakentupfer untersucht und die Methode beschränkte sich auf die Virusisolierung im SPF-Hühnerei. In der vorliegenden Arbeit konnte zwar weder die Untersuchung von Trachealtupfern, noch zusätzliche Ergebnisse infolge der molekularbiologischen Untersuchungen einen Nachweis einer AIV-Infektion erbringen, allerdings konnte in der serologischen Untersuchung bei Verwendung des kompetitiven, speziesübergreifenden Influenza A-ELISA's in zwei von 123 Wildtaubenseren Antikörper nachgewiesen werden (1,6 %). Die Richtigkeit dieses Ergebnisses ist allerdings vorsichtig zu interpretieren. Dies, weil das Ergebnis nicht im AGP bestätigt werden konnte. Allerdings zeigen experimentelle Studien, dass bei AIV-infizierten Tauben in erster Linie mit einem sehr geringen Antikörpertiter im Blut zu rechnen ist (Slemons und Easterday, 1972; Klopffleisch et al., 2006; Jia et al., 2008b). Da die Sensitivität des AGP im Vergleich zu anderen serologischen Methoden

(ELISA, HAH) jedoch am geringsten ist, ist es durchaus denkbar, dass der Antikörpertiter so niedrig war, dass dieser im AGP nicht mehr erfasst werden konnte (Meulemans et al., 1986; Wu et al., 2007; Spackman et al., 2009). Desweiteren hängen korrekte Testergebnisse auch immer von einer optimalen Qualität der Probe sowie einer adäquaten Probenhandhabung und korrekten Testdurchführung unter angemessenen Bedingungen ab. Bezüglich der Probenahme ist zu berücksichtigen, dass das Blut von den geschossenen Wildtauben nur noch durch Ausquetschen des Herzblutkoagulums gewonnen werden konnte. Das hieraus erhaltene Serum war folglich in mehr oder weniger starkem Maße hämolytisch. Dies traf insbesondere für die beiden positiven Seren zu. Um das Ergebnis des ELISA zu verifizieren, sollten die positiven Seren im HAH getestet werden. Infolge der geringen Probenmenge war es allerdings nicht möglich, diese im HAH gegen alle 16 Subtypen zu untersuchen. Somit konnten zwar Antikörper gegen die tierseuchenrechtlich relevanten Subtypen H5 und H7 ausgeschlossen werden, ein Nachweis von Antikörpern gegen die übrigen Subtypen war jedoch nicht zu beweisen.

Vergleichbare Studien aus anderen Ländern ergaben unterschiedliche Ergebnisse. Bei Wildtauben in der Tschechoslowakei, Neuseeland und Spanien, Kroatien und den USA konnten, wie in dieser Studie, keine Antikörper gegenüber Influenza A Viren nachgewiesen werden (Vicente et al., 1973; Cerník et al., 1985; Zupancic et al., 1986; Black et al., 2004). Demgegenüber wurde von Abubakar et al. (2008) in Nigeria bei 58 % der Wildtauben Antikörper gegen AIV festgestellt. Al-Attar et al. (2008) wiesen diese mittels ELISA sogar bei 81,8 % der Wildtauben im Irak nach, währenddessen Obon et al. (2007) diese bei einer von vier untersuchten Wildtauben in den Vereinigten Arabischen Emiraten (VAE) beschrieben.

Zusätzlich zu den untersuchten Proben ergab auch die Auswertung der nationalen Wildvogeldatenbank keine Nachweise bei Tauben in Deutschland (Tabelle 4.10). Bei der Eingabe der Untersuchungsergebnisse der Ämter konnten diese bezüglich der Taubenproben zwischen verschiedenen Kategorien wählen, wobei Stadtauben als solche nicht explizit aufgeführt waren. Es bleibt allenfalls zu vermuten, dass unter dem Begriff „Tauben“ auch einige Stadtaubenproben fallen. Bezüglich der Wildtauben konnten Ringeltaubenproben separat eingetragen werden. Bei Betrachtung der Auswertungstabelle wurde allerdings deutlich, dass im Vergleich zu den als „Tauben“ eingetragenen Vögeln, die als „Ringeltauben“ eingetragenen Vögel stark in der Minderzahl waren. Somit ist zu vermuten, dass die Ergebnisse der meisten Ringeltaubenproben vereinfacht als „Tauben“-Ergebnisse abgelegt wurden. Bislang erschienen jedoch in dieser Datenbank keine positiven Nachweise, so dass dieser Ungenauigkeit der Probenzuordnung zu den einzelnen Kategorien im Ergebnis wenig Relevanz zukommt.

Stadt- und Wildtauben in Deutschland scheinen also auch nach dem Auftreten von HPAIV H5N1 keine große Rolle in der Epidemiologie der Aviären Influenza in Deutschland zu spielen. So scheinen die Stadt- und Wildtauben im Feld mit dem Erreger entweder nicht in Kontakt oder zumindest nicht infiziert worden zu sein. Es ergibt sich daher nach wie vor keine konkreten Anhaltspunkte, dass Stadt- und Wildtauben als Überträger von AIV in Frage kommen. Sollte durch Tauben AIV übertragen werden, wäre dies wohl am ehesten noch durch eine rein mechanische Transmission der Fall. Darüber hinaus scheint auch nach dem Auftreten von HPAIV H5N1 in Deutschland von Stadt- und Wildtauben, wenn überhaupt, nur ein sehr geringes Risiko für die Übertragung von AIV auf den Menschen auszugehen.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde die Rolle der Falknerei in der Epidemiologie der AI untersucht. Die Falknerei, oder Beizjagd, ist nach dem Hohenstaufenkaiser Friedrich II. (1194-1250) die Kunst, mit Vögeln zu jagen. Dies erfolgt mit abgerichteten Greifvögeln (Beizvögeln) auf frei lebendes Wild, welches nach dem Bundesjagdgesetz (BjagdG, in der Fassung der Bekanntmachung vom 29. September 1976 (BGBl. IS. 2849), zuletzt geändert durch Artikel 5 des Gesetzes vom 26. März 2008 (BGBl. I S. 426)) dem Jagdrecht unterliegt. Grundsätzlich werden die meisten Wildvögel während der Herbst- und Wintermonate bejagt und während der Brutzeiten im Frühjahr und Sommer geschont. Nach Untersuchungen von Globig et al. (2006b) variiert die Prävalenz von LPAIV in Wildvögeln in Deutschland von 0,2 % bis 7 %, in Abhängigkeit von der Vogelspezies, dem Beprobungsort und der angewandten Untersuchungsmethode. Jahreszeitliche Höchstprävalenzen finden sich hierbei gerade zu den Jagdzeiten zwischen September und Dezember. Im Gegensatz zur Jagd mit der Waffe stellt die Beizjagd eine selektive Jagd dar. Dies bedeutet, dass sich der Beizvogel aus einem Schwarm potentieller Beutevögel jeweils das schwächste Individuum aussuchen kann, um dieses gezielt anzugreifen. Gerade HPAIV H5N1 hat in jüngster Zeit vermehrt zu klinisch in Erscheinung tretenden Infektionen bei Wildvögeln, einschließlich typischer Greifvogel-Beutetiere, geführt. Geht man von einer generellen Präsenz von HPAIV H5N1 in der deutschen Wildvogelpopulation aus, wäre es demzufolge wahrscheinlich, dass Beizvögel gerade diese Tiere vermehrt anjagen. Damit bestände für die Beizvögel ein Risiko, sich nachfolgend an diesen zu infizieren. Daher sollte in dieser Arbeit zunächst eine generelle Untersuchung der von den Greifvögeln erjagten Beutetieren stattfinden, um diese Theorie zu erörtern. Neben einem kurzen Kontakt zum Beutetier, welcher durch die Jagd an sich zustande kommt, werden Beizvögel, zusätzlich zu gekauftem Futter, oftmals mit der gefangenen Beute selber gefüttert. Eine in dieser Arbeit durchgeführte Befragung mittels Fragebogen ergab, dass 25 Falkner (58,1 %) in dieser Studie dies taten.

Falkner haben einen engen Kontakt zu ihren Beizvögeln sowie deren Beutetieren. Sie nehmen ihren Beizvögeln die Beute direkt ab, darüber hinaus wird von vielen Falknern das

erbeutete Wild auch verzehrt, wie bei allen Falkner in dieser Studie der Fall war. Falkner könnten somit, im Vergleich zu Nicht-Jägern, einem höheren Risiko ausgesetzt sein, mit AIV, einschließlich HPAIV H5N1, in Kontakt zu kommen. Aufgrund dieses Risikos wurde in der Türkei während des Zeitraumes, in welchem humane Fälle beim Menschen aufgetreten waren, die Jagd auf Wildenten und Wildgeflügelarten verboten (Oner et al., 2006). Da Falkner selbstverständlich, genauso wie der Rest der Bevölkerung, mit humanen Influenza A Viren und darüber hinaus eventuell mit aviären Influenzaviren in Kontakt kommen könnten, könnten sie einen wichtigen Faktor für die Entstehung von Pandemieviren darstellen. Diese Möglichkeit wurde auch vom Friedrich Loeffler-Institut in einer Risikobewertung zur Einschleppung von aviären Influenzaviren nach Deutschland vom 31. Januar 2006 festgehalten. Hier heißt es: *„Raubvögel, die vom Menschen als Beizvögel gehalten werden, müssen als mögliche Überträger von HPAIV in Betracht gezogen werden. Sie haben auf Grund ihres hohen Domestizierungsgrades einerseits einen engen Kontakt zum Menschen. Andererseits haben sie durch die Jagd auch Kontakt zu anderen Wildvögeln und können dadurch einen epidemiologischen Link darstellen“* (FLI, 2006). Daher wurde in dieser Arbeit die Fragestellung in Zusammenarbeit mit dem Deutschen Falkenorden (DFO) aufgegriffen. Der DFO ist der weltweit älteste und in Deutschland größte Falkenverband. Im März 2009 zählte er 1307 Mitglieder (Hussong, 2009).

Im Rahmen dieser Studie wurden 1080 Beutetiere untersucht, wobei 1080 Kloakentupfer und 1012 Trachealtupfer eingesendet wurden. Die Abweichung in der Anzahl der Kloaken- und Trachealtupfer erklärt sich zum einen dadurch, dass einige Falkner prinzipiell nur Kloakentupfer gesammelt haben, andererseits durch den Ablauf des Jagdgeschehens. Da Beizvögel ihre Beute nicht apportieren, sondern am Ort des Erlegens sofort zu rupfen und fressen beginnen, müssen die Falkner so schnell wie möglich zum Greifvogel gelangen und diesem ihre Beute abnehmen. Falkenartige töten Beute durch Genickbiss und beginnen den Schlund meist vor den Innereien zu fressen. Erreichte ein Falkner seinen Beizvogel mit der Beute zu spät, konnte bei diesen Beutetieren kein Hals mit Trachea mehr aufgefunden werden.

Die meisten Beutetierproben stammten aus Niedersachsen (42,9 %) und Nordrhein-Westfalen (37,6 %). Aus den übrigen Bundesländern wurden in einer geringeren Prozentzahl, aus dem Saarland, Mecklenburg-Vorpommern und Sachsen überhaupt keine Proben, eingesendet. Eine Erklärung der unterschiedlich verteilten Einsendungszahlen ist darin zu finden, dass gerade in den beiden erstgenannten Bundesländern das Vorkommen der für diese Studie relevanten Vogelarten am höchsten ist. Dies geht aus Berichten über die Bestandsentwicklung von Wildtieren in den einzelnen Bundesländern hervor, welche von diesen jährlich erstellt werden. Zusätzlich gibt die Jagdstreckenstatistik des Deutschen Jagd-

schutzvereins (DJV), d. h. die Tierzahlen, die insgesamt während einer Jagdsaison erlegt werden, hierüber Auskunft. Die Konzentration auf bestimmte Regionen lässt sich darüber hinaus insofern erklären, als dass die Herkunft der Beutetierproben in erster Linie abhängig von den Wohnorten der Falkner war. Dies daher, weil mit Ausnahme einiger weniger im Jahr stattfindenden Gesellschaftsjagden, an denen zwischen zehn bis 50 Falkner teilnehmen, die Jagd in der Regel einzeln, im engen Umkreis des eigenen Wohnortes, ausgeübt wird. Beim Vergleich der Anzahl der eingesendeten Proben je Bundesland mit den Herkünften der teilnehmenden Falkner, lässt sich eine gewisse Übereinstimmung feststellen. Beim zusätzlichen Vergleich der Anzahl der teilnehmenden Falkner pro Bundesland mit den aktuellen DFO-Mitgliederzahlen vom März 2009 wird erkenntlich, dass auch diese in den besagten Bundesländern am höchsten sind (Hussong, 2009). Nichtsdestotrotz schienen Aufrufe zur Mitarbeit an der Studie in Westdeutschland auf eine allgemein höhere Resonanz zu treffen. Denn ungeachtet einer gewissen, wenn auch geringeren, DFO-Falkner- und Federwildichte in den ostdeutschen Bundesländern, konnten von hier nur wenig Proben bezogen werden.

Bei Betrachtung der einzelnen Beutetierarten (Tabelle 4.11) kann festgestellt werden, dass Rabenkrähen (*Corvus corone corone*) an der Spitze der Einsendungen lagen. Rabenkrähen haben in Deutschland keine bundesweite, allerdings in vielen Bundesländern eine vergleichsweise lange Jagdzeit von August bis Ende Februar. Darüber hinaus ist diese Art in der freien Wildbahn weit verbreitet und das Interesse der mit der Waffe jagenden Jäger an dieser Wildart eher gering. Aus diesem Grund spezialisieren sich zunehmend Falkner auf Rabenkrähen. Der Fasan- und Rebhuhnbestand ist in den letzten Jahren dagegen stark zurückgegangen und die Jagdzeit auf wenige Wochen beschränkt. Ebenso wie die Jagd auf Wildenten ist es daher nicht mehr vielen Falknern möglich, diese Arten in einer mit den Krähen vergleichbaren Intensität mit ihrem Beizvogel zu bejagen.

Von den insgesamt 1080 untersuchten Beutetieren wurde bei nur fünf Individuen AIV-spezifische RNA nachgewiesen, allerdings kein Virus isoliert. Das Vorliegen einer H5N1-Infektion konnte bei diesen Tieren ausgeschlossen werden. Bei den AIV-positiven Beutetieren handelt sich um drei Möwen (eine Sturmmöwe und zwei Silbermöwen) und zwei Stockenten. Somit lag in dieser Studie die Isolierungsrate unter der eines RNA-Nachweises. Ähnliche Beobachtungen wurden auch von Fouchier et al. (2000) und Globig et al. (2006b) beschrieben. Ein Grund hierfür ist darin zu sehen, dass mit der PCR auch dann noch RNA in einer Probe nachgewiesen werden kann, wenn replikationsfähiges Virus bereits verloren gegangen ist. Der Verlust von vermehrungsfähigem Virus geschieht insbesondere durch ungünstige Lagerung der Proben bis zur Untersuchung. Darüber hinaus spielt die Art der Probennahme und -handhabung für dessen Qualität eine große Rolle. Dies trifft insbesondere für Inflenzaviren zu, da diese als behüllte RNA-Viren in der Umwelt recht instabil sind. Da die Proben der Beutetiere von den Falknern im Feld genommen wurden, konnte deren richti-

ge Durchführung und die anschließende Lagerung der Proben nicht überprüft werden. Allen Teilnehmern wurde allerdings zu Beginn der Studie eine detaillierte Anleitung zur Entnahmetechnik vorgelegt. Wo möglich, wurde es persönlich demonstriert. In der Regel werden Beizvögel, je nach verfügbarer Zeit von Seiten der Falkner, mehrmals die Woche bis täglich auf Wild geflogen. Selten wird dabei mehr als ein Stück Wild am Tag erbeutet. Im optimalen Fall sollten die Proben direkt an den Anschluss des Jagderfolges genommen, und an das Institut für Geflügelkrankheiten eingeschickt werden. Dies war logistisch jedoch nicht immer möglich. Daher musste der Kompromiss eingegangen werden, die erworbenen Proben übergangsweise im Kühlschrank zu lagern und innerhalb einer Woche gesammelt einzusenden. Diese Vorgehensweise könnte ein Grund für die mögliche Entstehung falsch negativer Proben und der ausbleibenden Virusisolierung in dieser Studie darstellen, war allerdings unter den Bedingungen einer Feldstudie nicht anders zu realisieren.

In Bezug auf natürliche HPAIV H5N1-Nachweise in anderen Studien können die Beutetierarten in drei Gruppen eingeteilt werden: (1) Federwildarten, für welche in freier Wildbahn in Deutschland natürliche Infektionen nachgewiesen wurden, (2) Federwildarten, für welche natürliche Nachweise außerhalb Deutschlands in freier Wildbahn erbracht werden konnten sowie (3) Federwildarten, für welche natürliche Nachweise in freier Wildbahn bislang fehlen. In die erste Gruppe fallen die Krähenvögel, Möwen, Bläßrallen sowie Wildenten. Die zweite Gruppe umfasst die Elstern, Rebhühner, Fasane und Wildtauben (hier Ringeltauben). Schließlich bilden die Nilgänse die dritte Gruppe.

Die Beutetiere mit positiven AIV-RNA-Nachweis fallen somit beide in die Gruppe 1.

Der Nachweis von AIV bei Möwen und Stockenten in dieser Studie ist nicht überraschend und wurde bereits vielfach in diversen Studien belegt. Möwen und Enten bilden als Angehörige der *Charadriiformes*, bzw. *Anseriformes* einen Teil des AIV-Reservoirs in der Umwelt. Von den drei Möwenproben konnte nur die Proben einer juvenilen Sturmmöwe definitiv mittels RT-PCR und Microarray als H13N6 charakterisiert werden. Bei den Proben der zwei anderen positiven Möwen (eine juvenile und eine adulte Silbermöwe) konnte lediglich der Neuraminidasetyp bestimmt werden, welcher ebenfalls ein N6 war. Das Hämagglutinin konnte bei diesen Proben weder mittels Virusisolierung im SPF-Hühnerei, RT-PCR noch im Microarray nachvollzogen werden. Die Sturmmöwe sowie die juvenile Silbermöwe wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten (November 2006 und Januar 2007) am gleichen Ort (Wolfenbüttel) gebeizt. Somit ist denkbar, dass die gleiche Möwenkolonie zu unterschiedlichen Zeiten angejagt wurde. Möglicherweise zirkuliert in dieser der AIV Subtyp H13N6. In diesem Falle wäre es wahrscheinlich, dass auch das unbekannte H diesem Subtyp angehören würde, zumal sich die Neuraminidasetypen gleichen. Der Subtyp H13N6 wurde bereits häufig aus Möwen, auch in Deutschland, isoliert (Graves, 1992; Alexander, 2000; Fouchier et al., 2003; Globig, 2007). Demgegenüber wird H13 nur selten in anderen Vogelarten gefunden.

Die H13-Isolate aus Möwen unterschieden sich bezüglich ihrer Genetik stark von anderen AIV und bilden eine eigene Linie aus. Die drei positiven Proben stellen 4,1 % aller in dieser Arbeit untersuchten Möwenproben dar. Im Vergleich beschreiben Olsen et al. (2006) bei neun Möwenspezies eine durchschnittliche Prävalenz von 1,4 % (1 % bis 2,2%). Der Subtyp wird in dieser Arbeit nicht angegeben, allerdings merken die Autoren an, dass H13 bei Möwen der Subtyp sei, welcher bislang am häufigsten isoliert wurde. Globig et al. (2006a) wiesen bei Untersuchungen in Deutschland eine Prävalenz von 0,2 % nach. Aus der Wildvogel-datenbank geht für die Jahre 2006, 2007 und 2008 eine Nachweisrate von 0,5 % (6 Positive von 1182 untersuchten Proben), 0,3 % (fünf Positive von 1522 untersuchten Proben), bzw 0 % (keine Positive unter 1176 untersuchten Möwenproben) hervor. Es wäre somit durchaus denkbar, dass die in dieser Studie festgestellte, höhere Prävalenz von 4,1 % innerhalb der untersuchten Beutemöwen auf den selektiven Jagdstil von Falken zurückzuführen wäre. Allerdings variieren Prävalenzen generell stark in Abhängigkeit vom Zeitpunkt und Ort der Probennahme, wie Fouchier et al. (2003) zeigen konnten, indem sie an unterschiedlichen Orten und Zeiten AIV-Nachweise zwischen 0 und 60 % der untersuchten niederländischer Möwen detektierten. Obgleich in dieser Studie kein HPAIV H5N1-Nachweis bei gebeizten Möwen erbracht wurde, bestand ein theoretisches Risiko, da in Deutschland im Jahr 2006 insgesamt zehn, im Jahr 2007 zwei Möwen HPAIV H5N1-positiv getestet wurden. Dies geschah zeitgleich mit den HPAIV H5N1-Ausbrüchen in Wildvögeln allgemein. Brown et al. (2008) bewiesen experimentell, dass Silbermöwen über die Aufnahme HPAIV H5N1-kontaminierten Geflügelfleisches eine mit Morbidität und Mortalität einhergehende Infektion erlangen. Dieser Infektionsweg ist auch für die natürlich infizierten Möwen in Deutschland wahrscheinlich. Außerdem wiesen Brown et al. (2006) in ihren Versuchen nach, dass Aztekenmöwen (*Larus atricilla*) hochempfindlich gegenüber HPAIV H5N1 reagierten. Während die Mehrzahl der infizierten Möwen unter Ausbildung zentralnervöser Symptome akut verstarb, wurde bei einigen Vögeln gleichzeitig ein protrahierter Krankheitsverlauf festgestellt, bei dem Möwen überlebten. Da diese während einer längeren Zeit eine allgemeine Schwäche sowie inkoordinierte Bewegungen zeigten, könnten solche Möwen in der freien Wildbahn leicht Opfer und Infektionsquelle für Prädatoren, wie wildlebende Greifvögel und Beizvögel, werden. Die Möwen, aus welchen in Deutschland HPAIV H5N1 isoliert werden konnte, wurden in Cuxhaven (Niedersachsen), dem Kyffhäuserkreis (Sachsen-Anhalt und Thüringen) oder in Mecklenburg-Vorpommern aufgefunden (FLI, 2007). Aus diesen Regionen waren keine Falkner in dieser Studie vertreten. In der Annahme, dass HPAIV H5N1 nicht weiträumig in der gesamten Bundesrepublik verteilt vorkommt, sondern es sich bei den Ausbrüchen in 2006 und 2007 um selektive Einzelgeschehen handelte, wäre dies die einfachste Erklärung für die fehlenden Nachweise in den Beutetieren dieser Studie.

Bezüglich der Stockenten wurde bei einer adulten Ente ein H3N2, bei einer juvenilen Ente eine Doppelinfektion mit H3N2 und H9N2 nachgewiesen. Dies entspricht 3,8 % aller untersuchten Entenproben. Stockenten zählen zu der Vogelart mit den bislang häufigsten LPAIV-Nachweisen (Kaleta et al., 2005). Diese stammen in der nördlichen Hemisphäre vor allem von juvenilen Enten, die während der Herbstzeit beprobt wurden. Globig (2007) erfasste bei ihren Untersuchungen zum Vorkommen von AIV bei migrierenden Wasservögeln in Deutschland eine Prävalenz von 2,8 % aller von ihr untersuchten Enten mittels VI im SPF-Hühnerei. Ottis und Bachmann (1981) kamen auf einen Prozentsatz von 3,6 % während ihrer dreijährigen Studie in Deutschland zwischen 1978 und 1980. Wie bereits erwähnt, sind diese Zahlen jedoch immer nur als Momentaufnahmen zu erfassen und schwanken erheblich zwischen verschiedenen Orten und Zeiten. In Nordamerika konnten beispielsweise bei Wildenten auf dem Herbstzug AIV-Prävalenzen von bis zu 22 % nachgewiesen werden (Krauss et al., 2004). Das gleichzeitige Vorkommen von H3N2 und H9N2 in einer gebeizten Ente dieser Studie unterstützt die Ergebnisse einer Arbeit von Sharp et al. (1997). Danach kommen Doppelinfektionen bei Stockenten besonders häufig vor und diese Art fördert insbesondere als Mischgefäß die Reassortierung neuer Virusvarianten. Doppelinfektionen scheinen jedoch nicht auf zufällige Weise, sondern nach einem gewissen Schema zustande zu kommen. Hierbei kombiniert sich ein häufig vorkommender Subtyp, welcher sich an die Spezies angepasst hat, mit einem selten vorkommenden Subtyp. Darüber hinaus sind meist entweder der H- oder der N-Typ identisch. Nach einer Literaturübersicht von Kaleta et al. (2005) ist der Subtyp H3 der vorherrschende H-Subtyp bei Wildvögeln. Auch N2 wurde bezüglich der Neuraminidase bislang am häufigsten bei diesen nachgewiesen (Kaleta et al., 2005). Neben H3 wurden in verschiedenen Studien in Amerika und Europa H4 und H6 mehrheitlich bei Enten gefunden, während H1, H2, H7, H10 und H11 weniger oft, und schließlich H5, H8, H9 und H12 nur sporadisch nachgewiesen wurden (Olsen et al., 2006).

Während der HPAIV H5N1-Ausbrüche von 2005 bis 2007 wurden überraschenderweise, trotz großer Untersuchungszahlen, wenige infizierte Stockenten tot aufgefunden (Schoene et al., 2009). Auch in Deutschland wurden innerhalb dieses Zeitraumes nur fünf von 367 HPAIV H5N1-positiv getesteten Wildvögeln als Stockenten identifiziert. Die Gründe hierfür sind bislang unklar.

In dieser Studie konnte bei keiner der untersuchten 759 Rabenkrähen, 89 Fasane, sechs Bläßrallen, 59 Rebhühner, 31 Elstern, sieben Ringeltauben sowie zwei Nilgänsen AIV oder AIV-RNA nachgewiesen werden. Für diese Beutetierspezies, welche allesamt negativ befundet wurden, geben die Daten der Nationalen Wildvogelbank eine zusätzliche Auskunft darüber, ob die negativen Ergebnisse auf eine zu geringe Stichprobenzahl zurückzuführen sind, oder ob gleiche Ergebnisse auch bei in größerem Stil durchgeführten Untersuchungen

in Deutschland auftraten. Bezüglich der Beutetiere aus der Gruppe 1 mit negativen AIV-Nachweis (Krähen und Bläßrallen) wurden für die Jahre 2006 bis 2008 in die Wildvogeldatenbank Untersuchungsergebnisse von 1054 Krähen und 3615 Bläßrallen eingegeben. Auch bei den Krähen wurden, übereinstimmend mit dieser Studie, keine positiven AIV-Nachweise vermerkt. Laut Beer et al. (2006) konnten in Deutschland allerdings im Jahr 2006 eine HPAIV H5N1-infizierte Nebelkrähe (*Corvus corone cornix*) sowie ein Eichelhäher (*Garrulus glandarius*) nachgewiesen werden. Diese Fälle machen deutlich, dass auch die nationale Wildvogeldatenbank keinesfalls als vollständig aufzufassen ist, sondern lediglich ein Tool darstellen soll, die Ergebnisse verschiedener Untersuchungseinrichtungen in einer übersichtlichen Weise darzustellen. Somit scheinen die beiden HPAIV H5N1-Nachweise bei den Krähenvögeln im Jahr 2006 eher als Zufallsbefund aufzufassen zu sein, da in keiner weiteren Krähenprobe der Jahre 2006 bis 2008 AIV-RNA detektiert werden konnte. Weitere vereinzelte Nachweise während des HPAIV H5N1-Seuchenzuges durch Asien stammen außerdem aus Krähen in Thailand (GenBank Nr. AY660554 und AY590572) und Japan (Payungporn et al., 2006; Tanimura et al., 2006). Virusisolierungen sowie serologische Nachweise von AIV anderer Subtypen wurden außerhalb Deutschlands von Isachenko et al. (1974), Romváry et al. (1976) und Johnson et al. (1977) beschrieben.

Bezüglich der 3615 Bläßrallen wurden für den abgerufenen Zeitraum 17 AIV-positive Proben eingetragen (0,5 %). Drei dieser Proben wurden als HPAIV H5 charakterisiert. Eine weitere Probe wurde als H5 ohne Angabe der Pathogenität eingestellt, für die restlichen dreizehn Proben wurden keine weiteren Angaben gemacht. Somit kann festgestellt werden, dass AIV in Bläßrallen generell verbreitet vorkommen, dies jedoch für die selektive Jagd der Greifvögel keine große Rolle zu spielen scheint. Die wahrscheinlichste Erklärung hierfür wäre, dass Bläßrallen vermutlich asymptomatisch infiziert sind und daher für die Greifvögel nicht als „geschwächtes Wild“ erkannt und vermehrt angejagt werden. De Marco et al. (2004) verglichen in den Jahren 1992 bis 1998 die AIV-Prävalenzen in verschiedenen Entenspezies und Bläßrallen. Trotz der Nutzung der gleichen Habitate, fanden sie eine signifikant unterschiedliche Prävalenz von 52,2 % in den Enten und nur 7,1 % in den Rallen. Da unterschiedliche Subtypen nachgewiesen wurden, diskutierten sie die Möglichkeit getrennter Genpools für beide Vogelfamilien.

In Hinblick auf Beutetiere der Gruppe 2 (Elstern, Rebhühner, Fasane und Wildtauben) und 3 (Nilgänse) konnten ebenfalls keine positiven AIV-Nachweise in dieser Studie sowie in der Nationalen Wildvogeldatenbank gefunden werden. Somit scheint das Risiko für Greifvögel in Deutschland, sich durch die Jagd auf diese an AIV zu infizieren, vernachlässigbar. Außerhalb Deutschlands existieren allerdings Berichte über Feldinfektionen bei Elstern in Thailand (Kwon et al., 2005b) und Hong Kong (Smith et al., 2009), wobei auch diese Nachweise eher auf vereinzelte, zufällig detektierte Funde zurückzuführen sind. Das gesagte gilt in glei-

cher Weise für Rebhühner, Fasane, Wildtauben und Nilgänse. Obgleich in dieser Studie und der Nationalen Wildvogelndatenbank keine AIV-Infektionen nachgewiesen werden konnten, wurde in Thailand und Südchina vereinzelte Isolate bei Rebhühnern und in Hong Kong bei in Gefangenschaft gehaltenen Fasanen gefunden (Lipatov et al., 2003; Suwannakhon et al., 2008; Wang et al., 2008b). Bezüglich NPAIV wiesen Humberd et al. (2006) nach, dass sich diese grundsätzlich alle in Fasanen (*Phasianus colchicus*) replizieren. Eine experimentelle Infektion konnte ohne Ausbildung von Symptomen erreicht werden und die Virusausscheidung dauerte bis 14 Tage an. Perkins und Swayne (2001) dagegen infizierten Fasane mit einem HPAIV H5N1 und induzierten eine 100 % Mortalität. Über das Vorkommen von AIV bei Wildtauben wurde bereits berichtet.

Gänzlich fehlen bislang Berichte zu HPAIV H5N1-Infektionen bei Nilgänsen, womit auch diese Gruppe nicht als Risikofaktor für die Übertragung von AIV auf Greifvögel in Frage kommt (Gruppe 3). Und dies, obgleich diese zu der Familie der Anseriformes gehören. In dieser Studie sowie im Rahmen des Wildvogelmonitorings wurden stets negative Ergebnisse erzielt. Diese ursprünglich in Afrika beheimateten Wildgänse wurden jedoch in Südafrika für den Eintrag von H5N2 in Straußenfarmen verantwortlich gemacht (Thompson et al., 2008).

Bei der Untersuchung der Beizvögel konnte in keinem Vogel eine aktuelle oder zurückliegende AIV-Infektion nachgewiesen werden. Drei Vögel konnten zum Ende der Studie nicht beprobt werden, da sie entflohen oder verunglückten. Üblicherweise werden Beizvögel, welche im Frühjahr schlüpfen, im Herbst des gleichen Jahres, spätestens aber im zweiten Lebensjahr, zur Beizjagd eingesetzt. Neun der insgesamt 54 Beizvögel in dieser Studie schlüpften erst im Jahr 2006 oder 2007. Für diese stellte die Jagdsaison 2006/2007 bzw. 2007/2008 den erstmaligen jagdlichen Einsatz, und damit Beutekontakt, dar (Abbildung 4.6). Die übrigen Beizvögel wurden bereits seit mehreren Jahren wiederholt jagdlich eingesetzt. Hierdurch erhöht sich bei diesen Vögeln theoretisch das Risiko, mit AIV-infizierter Beute in Kontakt gekommen zu sein. Allerdings zeigen die Ergebnisse dieser Studie, dass trotz ihres selektiven Jagdstils die Beizvögel nicht vermehrt mit AIV-tragenden Beutetieren in Kontakt gekommen sind, als bei Betrachtung der bisherigen AIV-Nachweisraten durch das Wildvogelmonitoring in Deutschland zu erwarten gewesen wäre. Lediglich die AIV-Nachweisrate bei den Möwenproben dieser Studie lag geringfügig über den bislang in Deutschland beschriebenen Prozentzahlen. Wie bereits erwähnt, scheint dies jedoch eher auf die wiederholte Beprobung eines relativ eng umgrenzten Gebietes zurückzuführen zu sein.

Vom klinischen Gesichtspunkt her kann eine Infektion der Beizvögel mit HPAIV insofern ausgeschlossen werden, als dass laut Angaben der Falkner auf den Fragebögen keine der Beizvögel unmittelbar vor Beginn und während der Studie klinische Symptome einer Allgemeininfektion entwickelt hatte. Bislang wurden HPAIV-Infektionen bei Greifvögeln allerdings

mit Symptomen wie Apathie, Anorexie sowie zentralnervösen Symptomen bis hin zu Todesfällen beschrieben. In einem Versuch von Lierz et al. (2007) konnte gezeigt werden, dass alle Falken nach Infektion eines HPAIV H5N1 innerhalb von fünf Tagen verstarben. In Ägypten wurde kürzlich erstmals ein NPAIV H7N7 aus einem Schwarzmilan isoliert (Aly et al., 2010). Leider werden in der Arbeit keine Angaben dazu gemacht, ob dieser Vogel tot oder lebendig beprobt wurde und ob vorher klinische Symptome infolge einer Infektion mit einem NPAIV auszumachen waren. Es gibt bislang keine wissenschaftlichen Arbeiten über den Verlauf einer Infektion von Greifvögeln mit einem NPAIV.

Die Möwen- und die Stockentenproben wurden von zwei Falknern mit jeweils einem Beizvogel erjagt. Laut Angaben der Falkner waren bei den Beutetieren weder äußerliche noch innerliche Krankheitsanzeichen zu erkennen. Da die Beutetiere jedoch nicht vollständig zur Untersuchung eingesendet wurden, konnten diese Aussagen nicht selber überprüft werden. Die Möwen wurden mit einem dreijährigen Gerfalkenterzel gebeizt, die Stockenten mit einem dreijährigen Wanderfalkenweibchen. Diese Beizvögel haben somit nachgewiesenermaßen NPAIV-tragende Beutetiere angejagt, eine Infektion konnte jedoch nicht nachvollzogen werden. Möglicherweise war der Kontakt, den diese Tiere zu der infizierten Beute hatten, nicht eng genug für eine Übertragung. Zum anderen wurde in den Tupferproben nur AIV-RNA nachgewiesen und die Anwesenheit eines vermehrungsfähigen Virus durch die Anzucht im SPF-Hühnerei konnte nicht erbracht werden. Dies wäre jedoch für eine Übertragung die Voraussetzung gewesen. Somit konnte in dieser Studie keine Infektion von Beizvögeln an ihrer Beute mit AIV, einschließlich HPAIV H5N1, aufgezeigt werden. Hingegen war dies beispielsweise in Saudi-Arabien der Fall, wo sich mehrere Beizfalken bei HPAIV H5N1-infizierten Kragentrappen ansteckten (Khan et al., 2009).

An der Studie nahmen 43 Falkner teil. Bei einer Mitgliederzahl von 1307 Falknern im DFO erscheint diese Zahl sehr gering. Allerdings muss berücksichtigt werden, dass nur wenige der dem DFO angeschlossenen Falkner aktiv mit einem Vogel jagen gehen. Zusätzlich waren für diese Studie lediglich solche Falkner angesprochen worden, die auf Flugwild jagen und nicht solche, die in erster Linie Hasen und Kaninchen jagen. Bei der serologischen Untersuchung der Falkner konnten mittels speziesübergreifenden Influenza A ELISA in allen 43 Seren Antikörper gegen Influenza A Viren nachgewiesen werden. Mittels des ELISA konnte allerdings nicht zwischen Influenza A Viren der humanen und der aviären Linie unterschieden werden, wodurch eine positive Reaktion infolge Infektion oder Impfung mit humanen Viren sowie ein Kontakt zu AIV infrage kam. Bezüglich der Grippeimpfung gaben in dieser Studie 13 Falkner (67,4 %) an, innerhalb der letzten fünf Jahre gegen Grippe geimpft worden zu sein. Nach persönlicher Mitteilung von Frau Dr. Schweiger im Jahr 2009 (NRL Influenza,

Robert Koch-Institut) haben jedoch auch ohne Impfung 100 % der erwachsenen Bevölkerung in Deutschland durch sonstigen Kontakt zu humanen Feldinfluenzaviren Antikörper gegen diese. Mittels Mikroneutralisationstests wurde daher speziell auf das Vorliegen von Antikörpern gegen die Subtypen H5 und H7 untersucht. Antikörper konnten hierbei jedoch nicht festgestellt werden. Dies ist somit im Einklang mit den Ergebnissen aus der Untersuchung der Beutetiere und der Beizvögel. Daher kann festgehalten werden, dass in dieser Studie für die hier untersuchten Falkner kein höheres Risiko, mit AIV in Kontakt zu kommen und sich nachfolgend daran zu infizieren, abzuleiten war. Es existiert bislang für Deutschland eine weitere Untersuchung über das Vorkommen von H5-Antikörpern beim Menschen. Diese erfolgte nach den HPAIV H5N1-Ausbrüchen bei Wildvögeln auf der Insel Rügen von Februar bis März 2006. Dies war eine gezielte Untersuchung von Personen, welche bei Bergungsarbeiten tot aufgefundenen Wildvögel geholfen hatten. Auch bei diesen wurden keine Antikörper nachgewiesen.

Für Flugwildjäger ermittelten Siembieda et al. (2008) im Vergleich zu Bevölkerungsschichten ohne Wildvogelkontakt ein achtfach erhöhtes Risiko, mit AIV in Kontakt zu kommen. Da 31 Falkner dieser Studie angaben, neben der Beizjagd ebenfalls die Jagd mit der Waffe auszuüben, wobei auch Flugwild bejagt wird, konnten ein erhöhtes Risiko, sich an AIV zu infizieren, hieraus jedoch auch nicht abgeleitet werden. Gill et al. (2006) wiesen jedoch im Jahr 2004 Antikörper gegen AIV vom Subtyp H11N9 in einem von 39 untersuchten Flugwildjägern in Oklahoma (USA) mittels HAH unter Verwendung von Pferdeerythrozyten nach. Zudem wurden Antikörper gegen diesen Subtyp in zwei von 68 Personen, die in Wildvogel-Rehabilitationszentren arbeiteten, nachgewiesen. Auf diesen Subtyp wurde in dieser Studie nicht speziell untersucht, da dieser bislang noch nicht mit klinischen Erscheinungen beim Menschen in Verbindung gebracht wurde. Die Untersuchung auf Antikörper gegen AIV H9 und H13, da RNA dieser Subtypen bei den Beutetieren nachgewiesen werden konnte, mittels Pferdeerythrozyten-HAH, verlief negativ. Auf den Nachweis von Antikörpern gegen AIV H3, dessen RNA ebenfalls in Tupfern einer Stockente festgestellt wurde, wurde verzichtet. Dies daher, weil H3 auch als typischer humaner Influenza-Subtyp vorkommt, Menschen daher gegen diesen ohnehin Antikörper tragen und diese von solchen Antikörpern gegen aviäre H3 nicht unterschieden werden können.

Diese Befragung der Falkner über ihre Jagdtätigkeiten und die Anwendung von Hygienemaßnahmen im Umgang mit gebeizten Wild ergab, dass obgleich 34 Falkner (79,1 %) zwischen 90 % und 100 % ihrer Beute selbständig ausweiden, neun Falkner (20,9 %) dies bei 20 bis 89 % der Beute tun, nur zwei Falkner (4,7 %) dabei regelmäßig Schutzhandschuhe verwenden. Eine weitere Frage ergab, dass Verletzungen beim Ausweiden jedoch durchaus vorkommen. Auch wenn das Risiko der Infektion mit HPAIV H5N1 für Falkner in Deutschland bislang eher theoretischer Natur ist, sollten diese trotz allem angehalten wer-

den, beim Umgang mit dem gebeizten Flugwild ein Mindestmaß an hygienischen Standards anzuwenden.

Zusammenfassend ist somit festzustellen, dass Beizvögel in Deutschland bislang nicht als Transmissionsfaktor von AIV, im speziellen HPAIV H5N1, in Betracht zu ziehen sind. Auch nach dem vorübergehenden Auftreten von HPAIV H5N1 in Deutschland, scheint sich das Virus nicht großflächig in den typischen Beutetieren, welche im Zuge der Beizjagd erjagt werden, verbreitet zu haben. Auch scheinen Beizvögel trotz ihres selektiven Jagdstils nicht vermehrt AIV-infiziertes Beutewild anzujagen. Es gibt in dieser Studie keinen Hinweis darauf, dass Beizvögel in Deutschland aufgrund ihres engen Kontaktes zu Wildvögeln und dem Menschen einen epidemiologischen Link für AIV darstellen könnten. Aufgrund der besonderen Stellung der Falkner wäre es allerdings denkbar, diese, bei einem eventuellen Wiederaufflammen von HPAIV H5N1-Infektionen bei Wildvögeln in Deutschland, als Sentinelgruppe zur Detektion von AIV-Infektionen beim Menschen heranzuziehen.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Untersuchungen zum Vorkommen von aviären Influenzaviren (AIV) bei synantropen Tauben, bei Beizvögeln, deren Beutewild sowie bei Falknern

Das erste Ziel der vorliegenden Studie beinhaltete epidemiologische Untersuchungen zum Vorkommen von AIV bei Stadt- und Wildtauben in Deutschland. Hierzu wurden 152 Stadtauben (*Columba livia form. urbana*) aus Berlin, 103 aus Hamburg, 113 aus München und 40 Tauben aus Hannover gefangen und beprobt. In keinem der untersuchten 408 Kloaken- und 322 Trachealtupfer der Stadtauben konnte mittels Realtime Reverse Transkriptase PCR (RT-qPCR) und Virusisolierung im SPF-Hühnerei (VI) AIV nachgewiesen werden. Als Nebenbefund konnte allerdings mittels VI bei drei Stadtauben aus Berlin ein taubenspezifisches aviäres Paramyxovirus vom Serotyp 1 (APMV-1) isoliert und im Hämagglutinationshemmtest (HAH) sowie mittels APMV-1-spezifischer RT-qPCR identifiziert werden. Bei der gleichzeitigen Untersuchung von 364 Seren der Stadtauben mittels kompetitiven, speziesübergreifenden Influenza A-ELISA und Agargelpräzipitationstest (AGP) wurden weder Antikörper gegen AIV, noch mittels HAH spezifische Antikörper gegen die AIV-Subtypen H5 und H7 gefunden. Gleichzeitig wurden von 170 erlegten Wildtauben (Ringeltauben (*Columba palumbus*)) aus Nordrhein-Westfalen analoge Proben (170 Kloaken- und Trachealtupfer, 123 Seren) untersucht. Im Unterschied zu den Stadtauben konnte mittels ELISA, nicht jedoch mittels AGP, in den Seren von zwei Wildtauben Antikörper gegen AIV festgestellt, das Vorliegen der Subtypen H5 und H7 jedoch ausgeschlossen werden. Eine nachfolgende Auswertung der nationalen Wildvogeldatenbank in Zusammenarbeit mit dem Institut für Epidemiologie des Friedrich Loeffler-Instituts (Wusterhausen/Dosse) wies ebenfalls keine AIV-Nachweise während dieses Zeitraumes (2006 bis 2008) bei Tauben auf. Somit kann auch nach dem Auftreten von HPAIV H5N1 in Deutschland Tauben bislang keine wesentlich Rolle in der Verbreitung aviärer Influenzaviren zugesprochen werden. Ein Risiko für den Menschen, ausgehend von Stadt- und Wildtauben, konnte aus dieser Studie ebenso wenig abgeleitet werden.

Der zweite Teil der Arbeit ging der Frage nach, ob von der Ausübung der Falknerei ein generelles Risiko für die Verbreitung von AIV ausgeht und ob Falkner einem höheren Risiko ausgesetzt seien, mit diesen in Kontakt zu kommen. Hierzu wurden in einem bundesweiten Feldversuch über zwei Jagdsaisons (2006/2007 und 2007/2008) 1080 gebeizte (mit einem Greifvogel erjagte) Beutetiere mittels RT-qPCR und Virusisolierung im SPF-Hühnerei untersucht. Aus insgesamt 1080 Kloakentupfern und 1012 Trachealtupfern konnte mittels RT-qPCR, nicht aber mittels Virusisolierung im SPF-Hühnerei, in fünf Kloakentupfern und drei

Trachealtupfern Influenza A Virus-spezifische RNA nachgewiesen werden welche von drei Möwen (*Laridae* sp.) und zwei Stockenten (*Anas platyrhynchos*) stammten. Die positiven Proben entsprachen 4,1 % der 74 Möwenproben sowie 3,8 % der 53 Entenproben. Die nachfolgende Subtypisierung mittels RT-qPCR, RT-PCR und Microarray erbrachte einmal H13N6 und zweimal N6 bei den Möwen (der H-Typ konnte für zwei Möwen nicht ermittelt werden) und H3N2 sowie eine Doppelinfektion mit H3N2 und H9N2 bei den Enten. Beim Vergleich der eigenen Daten bezüglich der AIV-Nachweise der Beutetiere mit solchen aus der nationalen Wildvogelndatenbank und der Literatur über das Vorkommen von AIV bei Wildvögeln, konnte festgestellt werden, dass Beizvögel trotz ihres selektiven Jagdstils nicht vermehrt mit AIV in Kontakt kommen, als aufgrund der allgemeinen Verbreitung von niedrigpathogenen aviären Influenzaviren (NPAIV) im Wildvogelreservoir zu erwarten gewesen wäre. In 37 Kloakentupfern, 40 Choanentupfern und 51 Seren der 54 Beizvögel konnten keine Hinweise auf derzeitige oder zurückliegende Infektionen mit AIV aufgezeigt werden. Um das Risiko der Falkner zu bewerten wurde mittels eines Fragebogens deren Jagdtätigkeiten ausgewertet und eine gleichzeitige serologische Untersuchung durchgeführt. Obgleich alle Falkner Antikörper gegen Influenza A Viren aufwiesen, konnten solche gegen H5, H7, H9 und H13 nicht festgestellt werden. Somit wies diese Studie kein höheres Risiko für Falkner nach, sich durch die Ausübung der Beizjagd mit AIV zu infizieren, als für die restliche Bevölkerung ohne Wildvogelkontakt. Ebenso wenig ging aus dieser Studie hervor, dass Beizvögel eine Rolle als epidemiologischer Link zwischen AIV-infizierten Wildvögeln und dem Menschen spielen. Die Falknerei trägt, wenn überhaupt, nur in einem sehr geringen Maße zur Verbreitung von AIV in Deutschland bei.

7 SUMMARY

Investigations into the prevalence of avian Influenza viruses (AIV) in synantropic pigeons, in falconry birds, their avian prey as well as in falconers

The first aim of the study was to conduct an epidemiological research on the prevalence of AIV in urban and wild pigeons. For this, cloacal and tracheal swabbing as well as blood collections was carried out on 152 urban pigeons (*Columba livia form. urbana*) from Berlin, 103 from Hamburg, 113 from Munich and 40 pigeons from Hannover. None of the investigated 408 cloacal- and 322 tracheal swabs of the urban pigeons showed Influenza A virus-positive results either by virus isolation trail in SPF chicken eggs or by realtime reverse transverse polymerase chain reaction PCR (RT-qPCR). As a secondary finding it was possible to isolate avian Paramyxovirus serotype 1 (APMV-1) in three urban pigeons from Berlin. The concurrent investigation of 364 sera from the urban pigeons using a competitive multi-species Influenza A-specific ELISA as well as agar gel immunodiffusion test (AGID) revealed no group-specific Influenza A antibodies. Likewise, hemagglutination inhibition test (HI) revealed no antibodies specific for the AIV hemagglutinin subtypes H5 and H7. Samples from 170 shot wild pigeons (wood pigeons (*Columba palumbus*)) from North Rhine-Westphalia (170 cloacal and tracheal swabs, 123 sera) were investigated. In contrast to the urban pigeons, it was possible to detect group-specific Influenza A virus antibodies in two sera of the wild pigeons using the competitive multi-species Influenza A-specific ELISA, while AGID failed to confirm this result. Antibodies against AIV subtypes H5 and could not be detected using HI. A subsequent analysis of the "National Wild Bird Data Base" in collaboration with the Institute of Epidemiology of the Friedrich Loeffler-Institute (Wusterhausen/Dosse) consistently showed no AIV detections in pigeons during the years 2006 to 2008. Therefore, even after the occurrence of highly pathogenic avian influenza subtype H5N1 (HPAIV H5N1) in Germany, this study could not demonstrate that pigeons play an essential role in the propagation of AIV infections. Likewise, this study could not prove a high risk for humans to become infected with AIV through the contact with urban and wild pigeons in Germany.

The second part of the study aimed at the question, if falconry plays a role in the epidemiology of Avian Influenza and if falconers would be at a higher risk to come into contact with AIV compared to the rest of the human population. Samples from 1080 prey birds (1080 cloacal and 1012 tracheal swabs) that were hunted with falconry birds were investigated over two hunting seasons (2006/2007 und 2007/2008) using RT-qPCR and VI. It was possible to detect AIV-specific RNA in three gulls (*Laridae* sp.) and two mallards (*Anas platyrhynchos*). The AIV-positive samples corresponded to 4,1 % of all investigated 74 gull samples and 3,8 % of all 53 duck samples. Molecular subtyping using RT-qPCR, RT-PCR and microarray

revealed one H13N6 and two N6 in the gulls (hemagglutinin subtyping failed in two gulls). In addition, H3N2 as well as a double infection with H3N2 and H9N2 were detected in the two ducks. By comparing the results of this study with data from the „National wild Bird Database“ and literature on AIV-prevalence in wild birds, it can be noticed that falconry birds, despite their selective hunting style, do not catch AIV-infected avian prey birds at a high rate. In 37 cloacal swabs, 40 choanal swabs and 51 sera from the 54 falconry birds no evidence of current or former infection with AIV could be shown. To evaluate the risk of falconers to come into contact with AIV, the falconers were first asked to complete a questionnaire on their hunting habits and then donated blood for serological investigation. Although all falconers showed positive results using the competitive multi-species Influenza A-ELISA, antibodies against AIV subtypes H5, H7, H9 and H13 could not be detected using microneutralization assay and HI. All in all this study could not prove a higher risk for falconers to come into contact with AIV compared with the rest of the human population in Germany without contact to wild birds. All the same this study did not show any evidence that falconry birds may serve as a vector for the transmission of avian influenza viruses between wild birds and men. Falconry plays, if at all, only a minor role in the epidemiology of AIV in Germany.

8 LITERATUR

- Abubakar, M. B., Ei-Yuguda, A. D., und S. S. Baba (2008): Serological evidence of influenza virus infections in domestic animals and birds in North-Eastern Nigeria. *J Food Agr Environ* 6: 67 - 70.
- Al-Attar, M. Y., Danial, F. A., und S. Y. Al-Baroodi (2008): Detection of antibodies against avian influenza virus in wild pigeons and starlings. *J Anim Vet Adv* 7: 448 - 449.
- Alexander, D. J. (2000): A review of avian influenza in different bird species. *Vet Microbiol* 74: 3 - 13.
- Alexander, D. J. (2003): Report on avian influenza in the Eastern Hemisphere during 1997 – 2002. *Avian Dis* 47: 792 - 797.
- Aly, M. M., Arafa, A., Kilany, W. H., Sleim, A. A., und M. K. Hassan (2010): Isolation of low-pathogenicity avian influenza virus (H7N7) from a black kite (*Milvus migrans*) in Egypt in 2005. *Avian Dis*: Artikel in Druck.
- Aly, M. M., El-Kanawaty, Z., Arafa, A., Kilany, W. H., und E. M. Abdelwhab (2007): One - year surveillance on avian influenza H5N1 in backyard poultry in Egypt. In: "Proceedings of the 4th International Symposium of Turkey production, Berlin". Herausgegeben von H. M. H. Hafez. Mensch und Buch Verlag, Berlin. Seiten 293 - 302.
- Amonsin, A., Choatrakol, C., Lapkuntod, J., Tantilertcharoen, R., Thanawongnuwech, R., Suradhat, S., Suwannakarn, K., Theamboonlers, A., und Y. Poovorawan (2008): Influenza virus (H5N1) in live bird markets and food markets, Thailand. *Emerg Infect Dis* 14: 1739 - 1742.
- Anonym (2007a): Detection of influenza A matrix gene by real time Taqman® RT-PCR. Avian Influenza Community Reference Laboratory. URL: http://www.defra.gov.uk/vla/science/docs/sci_ai_vi493.pdf. (Eingesehen am 19.01.2010)

- Anonym (2007b): Eurasian H5 avian influenza RealTime PCR. URL: http://www.defra.gov.uk/vla/science/docs/sci_ai_vi492.pdf. (Eingesehen am 19.01.2010)
- Anonym (2007c): Verordnung zum Schutz gegen die Geflügelpest (Geflügelpest-Verordnung). Fassung vom 18. Oktober 2007. BGBl. I S. 2348.
- Anonym (2007d): Kuwait finds H5N1 bird flu in chicken, falcon. URL: <http://www.alertnet.org/thenews/newsdesk/L02152052.htm>. (Eingesehen am 19.01.2010)
- Anonym (2009a): Greifvögel sind keine Überträger von Influenzaviren. Zeit online, 22. Juli 2009. URL: <http://www.zeit.de/online/2009/31/erde-sd-vogelgrippe>. (Eingesehen am 19.01.2010)
- Anonym (2009b): Duft der Wildbanane soll Tauben vertreiben. Hamburger Abendblatt, 9. Juli 2004. URL: <http://www.abendblatt.de/hamburg/article257262/Duft-der-Wildbanane-soll-Tauben-vertreiben.html>. (Eingesehen am 19.01.2010)
- Apisarnthanarak, A., Kitphati, R., Thongphubeth, K., Patoomanunt, P., Anthanont, P., Auwanit, W., Thawatsupha, P., Chittaganpitch, M., Saeng-Aroon, S., Waicharoen, S., Apisarnthanarak, P., Storch, G. A., Mundy, L. M., und V. J. Fraser (2004): Atypical avian influenza (H5N1). *Emerg Infect Dis* 10: 1321 - 1324.
- Aymard-Henry, M., Coleman, M. T., Dowdle, W. R., Laver, W. G., Schild, G. C., und R. G. Webster (1973): Influenzavirus neuraminidase and neuraminidase-inhibition test procedures. *Bull World Health Organ* 48: 199 - 202.
- Bailey, T. A., Silvanose, C., Naldo, J., Combreau, O., Launay, F., Wernery, U., Kinne, J., Gough, R., und R. Manvell (2000): Health considerations of the rehabilitation of illegally traded houbara bustards (*Chlamydotis undulate macqueenii*) in the Middle East. *Oryx* 34: 325 - 334.
- Banks, J., Speidel, E. C., McCauley, J. W., und D. J. Alexander (2000): Phylogenetic analysis of H7 haemagglutinin subtype influenza A viruses. *Arch Virol* 145: 1047 - 1058.

-
- Beard, C. W. (1970): Demonstration of type-specific influenza antibody in mammalian and avian sera by immunodiffusion. *Bull World Health Organ* 42: 779 - 785.
- Beare, A. S., und R. G. Webster (1991): Replication of avian influenza viruses in humans. *Arch Virol* 119: 37 - 42.
- Becker, W. B. (1966): The isolation and classification of tern virus: Influenza virus A/Tern/South Africa/1961. *J Hyg* 64: 309 - 320.
- Beer, M., Conraths, F. J., Globig, A., Harder, T., Hoffmann, B., Mettenleiter, T. C., Starick, E., Staubach, C., Unger, F., und O. Werner (2006): Untersuchungen des Friedrich-Loeffler-Instituts zu Ausbrüchen hochpathogener Aviärer Influenza bei Wildvögeln, Säugetieren und einem Hausgeflügelbestand in Deutschland 2006. In: „Jahresbericht des Friedrich-Loeffler-Instituts 2006“ Seiten 33 - 40. URL: http://www.fli.bund.de/fileadmin/user_upload/Dokumente/Jahresberichte/2006/de/JB2006_gesamt.pdf. (Eingesehen am 19.01.2010)
- Beigel, J. H., Farrar, J., Han, A. M., Hayden, F. G., Hyer, R., de Jong, M. D., Lochindarat, S., Nguyen, T. K., Nguyen, T. H., Tran, T. H., Nicholl, A., Touch, S., und K. Y. Yuen (2005): Avian influenza A (H5N1) infection in humans. *N Engl J Med* 353: 1374 - 1385.
- Belser, J. A., Blixt, O., Chen, L. M., Pappas, C., Maines, T. R., Van Hoeven, N., Donis, R., Busch, J., McBride, R., Paulson, J. C., Katz, J. M., und T. M. Tumpey (2008): Contemporary North American influenza H7 viruses possess human receptor specificity: implications for virus transmissibility. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 7558 - 7563.
- Black, H., Stanislawek, W., Cooper, C., und W. Saunders (2004): Avian virus survey in pigeons. *Surveillance* 31: 20 - 21.
- Boon, A. C., Sandbulte, M. R., Seiler, P., Webby, R. J., Songserm, T., Guan, Y., und R. G. Webster (2007): Role of terrestrial wild birds in ecology of influenza A virus (H5N1). *Emerg Infect Dis* 13: 1720 - 1724.

- Bragstadt, K., Jørgensen, P., Handberg, K., Hammer, A., Kabell, S., und A. Fomsgaard (2007): First introduction of highly pathogenic H5N1 avian influenza A viruses in wild and domestic birds in Denmark, Northern Europe. *Virology Journal* 4: 43.
- Brown, J. D., Stallknecht, D. E., Beck, J. R., Suarez, D. L., und D. E. Swayne (2006): Susceptibility of North American ducks and gulls to H5N1 highly pathogenic avian influenza viruses. *Emerg Infect Dis* 12: 1663 - 1670.
- Brown, J. D., Stallknecht, D. E., Berghaus, R. D., und D. E. Swayne (2009): Infectious and lethal doses of H5N1 highly pathogenic avian Influenza virus for house sparrows (*Passer domesticus*) and rock pigeons (*Columbia livia*). *J Vet Diagn Invest* 21: 437 - 445.
- Brown, J. D., Stallknecht, D. E., und D. E. Swayne (2008): Experimental infections of herring gulls (*Larus argentatus*) with H5N1 highly pathogenic avian influenza viruses by intranasal inoculation of virus and ingestion of virus-infected chicken meat. *Avian Pathol* 37: 393 - 397.
- Brown, J. D., Swayne, D. E., Cooper, R. J., Burns, R. E., und D. E. Stallknecht (2007): Persistence of H5 and H7 avian influenza viruses in water. *Avian Dis* 51: 285 - 289.
- Bublot, M., Pritchard, N., Swayne, D. E., Selleck, P., Karaca, K., Suarez, D. L., Audonnet, J. C., und T. R. Mickle (2006): Development and use of fowlpox vectored vaccines for avian influenza. *Ann N Y Acad Sci* 1081: 193 - 201.
- Butt, K. M., Smith, G. J., Chen, H., Zhang, L. J., Leung, Y. H., Xu, K. M., Lim, W., Webster, R. G., Yuen, K. Y., Peiris, J. S., und Y. Guan (2005): Human infection with an avian H9N2 influenza A virus in Hong Kong in 2003. *J Clin Microbiol* 43: 5760 - 5767.
- Buxton Bridges, C., Katz, J. M., Seto, W. H., Chan, P. K., Tsang, D., Ho, W., Mak, K. H., Lim, W., Tam, J. S., Clarke, M., Williams, S. G., Mounts, A. W., Bresee, J. S., Conn, L. A., Rowe, T., Hu-Primmer, J., Abernathy, R. A., Lu, X., Cox, N. J., und K. Fukuda (2000): Risk of influenza A (H5N1) infection among health care workers exposed to patients with influenza A (H5N1), Hong Kong. *J Infect Dis* 181: 344 - 348.

-
- Buxton Bridges, C., Lim, W., Hu-Primmer, J., Sims, L., Fukuda, K., Mak, K. H., Rowe, T., Thompson, W. W., Conn, L., Lu, X., Cox, N. J., und J. M. Katz (2002): Risk of influenza A (H5N1) infection among poultry workers, Hong Kong, 1997-1998. *J Infect Dis* 185: 1005 - 1010.
- Cai, W., Schweiger, B., Buchholz, U., Buda, S., Littmann, M., Heusler, J., und W. Haas (2009): Protective measures and H5N1-seroprevalence among personnel tasked with bird collection during an outbreak of avian influenza A/H5N1 in wild birds, Ruegen, Germany, 2006. *BMC Infect Dis* 9: 170.
- Callan, R. J., Early, G., Kida, H., und V. S. Hinshaw (1995): The appearance of H3 influenza viruses in seals. *J Gen Virol* 76: 199 - 203.
- Campbell, C. H., Webster, R. G., und S. S. Breese Jr. (1970): Fowl plague virus from man. *J Infect Dis* 122: 513 - 516.
- Capua, I., Cattoli, G., und S. Marangon (2004): DIVA - a vaccination strategy enabling the detection of field exposure to avian influenza. *Dev Biol (Basel)*: 119: 229 - 233.
- Capua, I., Grossele, B., Bertoli, E., und P. Cordioli (2000c): Monitoring for highly pathogenic avian influenza in wild birds in Italy. *Vet Rec* 147: 640.
- Capua, I., Marangon, S., Cordioli, P., Bonfanti, L., und U. Santucci (2002): H7N3 avian influenza in Italy. *Vet Rec* 151: 743 - 744.
- Capua, I., und F. Mutinelli (2001): Mortality in Muscovy ducks (*Cairina moschata*) and domestic geese (*Anser anser* var. *domestica*) associated with natural infection with a highly pathogenic avian influenza virus of H7N1 subtype. *Avian Pathol* 30: 179 - 183.
- Capua, I., Mutinelli, F., Bozza, M. A., Terregino, C., und G. Cattoli (2000b): Highly pathogenic avian influenza (H7N1) in ostriches (*Struthio camelus*). *Avian Pathol* 29: 643 - 646.
- Capua, I., Mutinelli, F., Marangon, S., und D. J. Alexander (2000a): H7N1 avian influenza in Italy (1999 to 2000) in intensively reared chickens and turkeys. *Avian Pathol* 29: 537 - 543.

- Capua, I., Terregino, C., Cattoli, G., Mutinelli, F., und J. F. Rodriguez (2003): Development of a DIVA (Differentiating Infected from Vaccinated Animals) strategy using a vaccine containing a heterologous neuraminidase for the control of avian influenza. *Avian Pathol* 32: 47 - 55.
- Carpenter, J. W., Corstvet, R. E., Thilsted, J. P., Lewis, J. C., und J. A. Morrison (1972): A bacteriologic survey of the respiratory tract of mourning doves in Oklahoma and serologic survey of those doves for antibodies to certain pathogens. *Avian Dis* 16: 671 - 679.
- Cattoli, G., Drago, A., Maniero, S., Toffan, A., Bertoli, E., Fassina, S., Terregino, C., Robbi. C., Vicenzoni, G., und I. Capua (2004): Comparison of three rapid detection systems for type A influenza virus on tracheal swabs of experimentally and naturally infected birds. *Avian Pathol* 33: 432 - 437.
- Centanni, E. (1902): Die Vogelpest. Beitrag zu dem durch Kerzen filtrierbaren Virus. *Zbl Bakt Orig* 31: 145 - 152; 182 - 201.
- Cerník, K., Tůmová, B., Kaminský, B., und V. Rajtár (1985): Serologic detection of the occurrence of avian paramyxoviruses in pigeons. *Vet Med (Praha)* 30: 603 - 610.
- Chaharaein, B., Omar, A. R., Aini, I., Yusoff, K., und S. S. Hassan (2009): Detection of H5, H7 and H9 subtypes of avian influenza viruses by multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction. *Microbiol Res* 164: 174 - 179.
- Chen, G. W., Chang, S. C., Mok, C. K., Lo, Y. L., Kung, Y. N., Huang, J. H., Shih, Y. H., Wang, J. Y., Chiang, C., Chen, C. J., und S. R. Shih (2006): Genomic signatures of human versus avian influenza A viruses. *Emerg Infect Dis* 12: 1353 - 1360.
- Chen, Y. C., Chen, C. H., und C. H. Wang (2008): H5 antibody detection by blocking enzyme-linked immunosorbent assay using a monoclonal antibody. *Avian Dis* 52: 124 - 129.
- Chen, H., Smith, G. J., Zhang, S. Y., Qin, K., Wang, J., Li, K. S., Webster, R. G., Peiris, J. S., und Y. Guan (2005): Avian flu: H5N1 virus outbreak in migratory waterfowl. *Nature* 436: 191 - 192.

-
- Chotpitayasunondh, T., Ungchusak, K., Hanshaoworakul, W., Chunsuthiwat, S., Sawanpanyalert, P., Kijphati, R., Lochindarat, S., Srisan, P., Suwan, P., Osotthanakorn, Y., Anantasetagoon, T., Kanjanawasri, S., Tanupattarachai, S., Weerakul, J., Chaiwirattana, R., Maneerattanaporn, M., Poolsavathitikool, R., Chokephaibulkit, K., Apisarnthanarak, A., und S. F. Dowell (2005): Human disease from influenza A (H5N1), Thailand, 2004. *Emerg Infect Dis* 11: 201 - 209.
- Cilloni, F., Toffan, A., Giannecchini, S., Clausi, V., Azzi, A., Capua, I., und C. Terregino (2010): Increased Pathogenicity and Shedding in Chickens of a Wild Bird-Origin Low Pathogenicity Avian Influenza Virus of the H7N3 Subtype Following Multiple In Vivo Passages in Quail and Turkey. *Avian Dis*: Artikel in Druck.
- Claas, E. C., Osterhaus, A. D., van Beek, R., De Jong, J. C., Rimmelzwaan, G. F., Senne, D. A., Krauss, S., Shortridge, K. F., und R. G. Webster (1998): Human influenza A H5N1 virus related to a highly pathogenic avian influenza virus. *Lancet* 351: 472 - 477.
- Collins, R. A., Ko, L. S., Fung, K. Y., Chan, K. Y., Xing, J., Lau, L. T., und A. C. Yu (2003): Rapid and sensitive detection of avian influenza virus subtype H7 using NASBA. *Biochem Biophys Res Commun* 300: 507 - 515.
- Collins, R. A., Ko, L. S., So, K. L., Ellis, T., Lau, L. T., und A. C. Yu (2002): Detection of highly pathogenic and low pathogenic avian influenza subtype H5 (Eurasian lineage) using NASBA. *J Virol Methods* 103: 213 - 225.
- Couacy-Hymann, E., Danho, T., Keita, D., Bodjo, S. C., Kouakou, C., Koffi, Y. M., Beudje, F., Tripodi, A., de Benedictis, P., und G. Cattoli (2009): The first specific detection of a highly pathogenic avian influenza virus (H5N1) in Ivory Coast. *Zoonoses Public Health* 56: 10 - 15.
- Cui, S., und G. Tong (2008): A chromatographic strip test for rapid detection of one lineage of the H5 subtype of highly pathogenic avian influenza. *J Vet Diagn Invest* 20: 567 - 571.

- Das, A., und D. L. Suarez (2007): Development and bench validation of real-time reverse transcription polymerase chain reaction protocols for rapid detection of the subtypes H6, H9, and H11 of avian influenza viruses in experimental samples. *J Vet Diagn Invest* 19:625 - 634.
- Dawson, E. D., Moore, C. L., Dankbar, D. M., Mehlmann, M., Townsend, M. B., Smagala, J. A., Smith, C. B., Cox, N. J., Kuchta, R. D., und K. L. Rowlen (2007): Identification of A/H5N1 influenza viruses using a single gene diagnostic microarray. *Anal Chem* 79: 378 - 384.
- De Jong, M. D., Bach, V. C., Phan, T. Q., Vo, M. H., Tran, T. T., Nguyen, B. H., Beld., M., Le, T. P., Truong, H. K., Nguyen, V. V., Tran, T. H., Do, Q. H., und J. Farrar (2005): Fatal Avian Influenza A (H5N1) in a child presenting with diarrhea followed by coma. *N Engl Med J* 352: 686 - 691.
- De Lay, P. D., Casey, H. L., und H. S. Tubiash (1967): Comparative study of fowl plague virus and a virus isolated from man. *Publ Health Rep* 82: 615 - 620.
- De Marco, M. A., Campitelli, L., Foni, E., Raffini, E., Barigazzi, G., Delogu, M., Guberti, V., Di Trani, L., Tollis, und M. I. Donatelli (2004): 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* 5: 197 - 208.
- De Marco, M. A., Foni, E., Campitelli, L., Raffini, E., Delogu, M., und I. Donatelli (2003): Long-term monitoring for Avian Influenza Viruses in wild bird species in Italy. *Vet Res Comm* 27: 107 - 114.
- Dinh, P. N., Long, H. T., Tien, N. T., Hien, N. T., Mai, le T. Q., Le Phong, H., Le Tuan, V., Van Tan, H., Nguyen, N. B., Van Tu, P., Phuong, N. T. and the World Health Organization/Global Outbreak Alert and Response Network Avian Influenza Investigation Team in Vietnam (2006): Risk factors for human infection with avian influenza A H5N1, Vietnam, 2004. *Emerg Infect Dis* 12: 1841 - 1847.
- Dinter, Z. (1944): Vergleichende Untersuchungen über die atypische und klassische Geflügelpest. *Arch Ges Virusforsch* 3: 207 - 219.

-
- Di Trani, L., Bedini, B., Donatelli, I., Campitelli, L., Chiappini, B., De Marco, M. A., Delogu, M., Buonavoglia, C., und G. Vaccari (2006): A sensitive one-step real-time PCR for detection of avian influenza viruses using a MGB probe and an internal positive control. *BMC Infect Dis* 6: 87.
- Dormitorio, T. V., Giambone, J. J., Guo, K., und G. R. Hepp (2009): Evaluation of field and laboratory protocols used to detect avian influenza viruses in wild aquatic birds. *Poult Sci* 88: 1825 - 1831.
- Dovč, A., Zorman-Rojs, O., Vergles Rataj, A., Bole-Hribovšek, V., Krapež, U., und M. Dobeic (2004): Health status of free-living pigeons (*Columba livia domestica*) in the city of Ljubljana. *Acta Vet Hungar* 52: 219 - 226.
- Drake, J. W. (1993): Rates of spontaneous mutation among RNA viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 4171 - 4175.
- Ducatez, M. F., Tarnagda, Z., Tahita, M. C., Sow, A., Landtsheer, S. de, Londt, B. Z., Brown, I. H., Osterhaus, A. D. M. E., Fouchier, R. A. M., Ouedraogo, J.-B. B., und C. P. Müller (2007): Genetic characterization of HPAI (H5N1) viruses from poultry and wild vultures, Burkina Faso. *Emerg Infect Dis* 13: 611 - 613.
- Eckert, A. (1979): Charakterisierung eines hämagglutinierenden Agens aus einem Erlenzeisig (*Carduelis spinus*) - Beitrag zur Ätiologie einer Erkrankung von Sperlingsvögeln (Passeriformes). *Vet Med Diss Hannover*.
- EG (2005): Richtlinie 2005/94/EG des Rates vom 20. Dezember 2005 mit Gemeinschaftsmaßnahmen zur Bekämpfung der Aviären Influenza und zur Aufhebung der Richtlinie 92/40/EWG.
- EG (2006): Entscheidung der Kommission vom 04/VIII/2006 über die Genehmigung eines Handbuchs zur Diagnose der Aviären Influenza gemäß der Richtlinie 2005/94/EG des Rates. Aktenzeichen K(2006) 3477. (Eingesehen am 19.01.2010)
- Ellis, T. M., Bousfield, R. B., Bissett, L. A., Dyrting, K. C., Luk, G. S. M., Tsim, S. T., Sturm-Ramirez, K., Webster, R. G., Guan, Y., und J. S. M. Peiris (2004): Investigation of outbreaks of highly pathogenic H5N1 avian influenza in waterfowl and wild birds in Hong Kong in late 2002. *Avian Pathol* 33: 492 - 505.

- Ellis, J. S., und M. C. Zambon (2001): Combined PCR-heteroduplex mobility assay for detection and differentiation of influenza A viruses from different animal species. *J Clin Microbiol* 39: 4097 - 4102.
- Elvinger, F., Akey, B. L., Senne, D. A., Pierson, F. W., Porter-Spalding, B. A., Spackman, E., und D. L. Suarez (2007): Characteristics of diagnostic tests used in the 2002 low pathogenicity avian influenza H7N2 outbreak in Virginia. *J Vet Diagn Invest* 19: 341 - 348.
- Enserink, M. (2004): Infectious diseases. Bird flu infected 1000, Dutch researchers say. *Science* 306: 590.
- EWG (2005): Richtlinie 2005/94/EG mit Gemeinschaftsmaßnahmen zur Bekämpfung der Aviären Influenza und zur Aufhebung der Richtlinie 92/40/EWG vom 20. Dezember 2005. *Amtsblatt der Europäischen Union* Nr. L 10, S. 16 vom 14.1.2006.
- Fang, T.-H., Lien, Y.-Y., Cheng, M.-C. und H.-J. Tsai (2006): Resistance of immune-suppressed pigeons to subtypes H5N2 and H6N1 low pathogenic avian influenza virus. *Avian Dis* 50: 269 - 272.
- Fao (2004): Avian Influenza control in Cambodia (TCP/CMB/3002, April 2004). In: FAO update on the avian influenza situation, issue no. 16. Seiten 2 - 4. URL: <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/011/aj058e/aj058e00.pdf>. (Eingesehen am 19.01.2010)
- Feare, C. J. (2010): Role of wild birds in the spread of Highly Pathogenic Avian Influenza Virus H5N1 and implications for global surveillance. *Avian Digest*: Artikel in Druck.
- Fiedler (2008): Vortrag anlässlich der Constanze Tagung am 12./13.06.2008 in Bregenz.
- FLI (2006): Risikobewertung zur Einschleppung von hochpathogenem aviären Influenzavirus H5N1 aus den europäischen Ausbruchsländern (Russland, Türkei, Rumänien, Kroatien, Ukraine, Zypern) nach Deutschland vom 31. Januar 2006. URL: <http://www.orn.mpg.de/~vwrado/download/Vogelgrippe%20FLI-Risikobewertung.pdf>. (Eingesehen am 19.01.2010)

- FLI (2007): Epidemiologisches Bulletin Nr. 09/2007. URL: <http://www.virologie.med.tum.de/wp/images/Influenza-FLI.pdf>. (Eingesehen am 19.01.2010)
- FLI (2008a): Epidemiologisches Bulletin Nr. 3/2008. URL: www.fli.bund.de/fileadmin/user_upload/Dokumente/News/aktuelle_Krankheitsgeschehen/avi_Flu/080424_lb_influenza.pdf. (Eingesehen am 19.01.2010)
- FLI (2008b): Bewertung des Risikos zur neuerlichen Einschleppung sowie zum Auftreten von hochpathogenem aviären Influenzavirus (HPAI H5N1) in Hausgeflügelbeständen in der Bundesrepublik Deutschland. URL: http://www.fli.bund.de/fileadmin/user_upload/Dokumente/News/aktuelle_Krankheitsgeschehen/avi_Flu/081022_rb_influenza.pdf. (Eingesehen am 19.01.2010)
- FLI (2009a): Risikobewertung zum Auftreten von hochpathogenem H5N1 Virus in deutschen Geflügelbeständen vom 23.01.2009. URL: http://www.fli.bund.de/fileadmin/user_upload/Dokumente/News/aktuelle_Krankheitsgeschehen/avi_Flu/090223_Rb_Av_Influenza.pdf. (Eingesehen am 19.01.2010)
- FLI (2009b): H5N1 bei einer Wildente in Bayern. URL: http://www.fli.bund.de/fileadmin/user_upload/Dokumente/News/aktuelle_Krankheitsgeschehen/avi_Flu/090311_H5N1_Ente_Bayern.pdf. (Eingesehen am 19.01.2010)
- Fouchier, R. A. M., Besterbroer, T. M., Herfst, S., Van Der Kemp, L., Rimmelzwaan, G., S., und A. D. M. E. Osterhaus (2000): Detection of influenza A viruses from different species by PCR amplification of conserved sequences in the matrix gene. *J Clin Microbiol* 38: 4096 - 4101.
- Fouchier, R. A., Munster, V., Wallensten, A., Bestebroer, T. M., Herfst, S., Smith, D., Rimmelzwaan, G. F., Olsen, B., und A. D. Osterhaus (2005): Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls. *J Virol* 79: 2814 - 2822.
- Fouchier, R. A., Olsen, B., Bestebroer, T. M., Herfst, S., van der Kemp, L., Rimmelzwaan, G. F., und A. D. Osterhaus (2003): Influenza A virus surveillance in wild birds in Northern Europe in 1999 and 2000. *Avian Dis* 47: 857 - 860.

- Fouchier, R. A., Schneeberger, P. M., Rozendaal, F. W., Broekman, J. M., Kemink, S. A., Munster, V., Kuiken, T., Rimmelzwaan, G. F., Schutten, M., Van Doornum, G. J., Koch, G., Bosman, A., Koopmans, M., und A. D. Osterhaus (2004): Avian influenza A virus (H7N7) associated with human conjunctivitis and a fatal case of acute respiratory distress syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 1356 - 1361.
- Freese, D. (1908): Über Hühnerpest mit besonderer Berücksichtigung der pathologischen Anatomie. *Dtsch tierärztl Wschr* 16: 173 - 177.
- Gaidet, N., Cattoli, G., Hammoumi, S., Newman, S. H., Hagemeyer, W., Takekawa, J. Y., Cappelle, J., Dodman, T., Joannis, T., Gil, P., Monne, I., Fusaro, A., Capua, I., Manu, S., Micheloni, P., Ottosson, U., Mshelbwala, J. H., Lubroth, J., Domenech, J., und F. Monicat (2008): Evidence of infection by H5N2 highly pathogenic avian influenza viruses in healthy wild waterfowl. *PLoS Pathog* 54: e1000127.
- Gall, A., Hoffmann, B., Harder, T., Grund, C., und M. Beer (2008): Universal primer set for amplification and sequencing of HA0 cleavage sites of all influenza A viruses. *J Clin Microbiol* 46: 2561 - 2567.
- Gall, A., Hoffmann, B., Harder, T., Grund, C., Höper, D., und M. Beer (2009a): Design and validation of a microarray for detection, hemagglutinin subtyping, and pathotyping of avian influenza viruses. *J Clin Microbiol* 47: 327 - 334.
- Gall, A., Hoffmann, B., Harder, T., Grund, C., Ehricht, R., und M. Beer (2009b): Rapid and highly sensitive neuraminidase subtyping of avian influenza viruses by use of a diagnostic DNA microarray. *J Clin Microbiol* 47: 2985 - 2988.
- Gambaryan, A. S., Tuzikov, A. B., Pazynina, G. V., Webster, R. G., Matrosovich, M. N., und N. V. Bovin (2004): H5N1 chicken influenza viruses display a high binding affinity for Neu5Aalpha2-3Galbeta1-4(6-HSO3)GlcNAc-containing receptors. *Virology* 326: 310 - 316.
- Gehle, T. (2005): Wie man Jung- von Alttauben sicher unterscheidet. *Rheinisch-Westfälischer Jäger* 11: 4 - 5.

-
- Geraci, J. R., St Aubin, D. J., Barker, I. K., Webster, R. G., Hinshaw, V. S., Bean, W. J., Ruhnke, H. L., Prescott, J. H., Early, G., Baker, A. S., Madoff, S., und R. T. Schooley (1982): Mass mortality of harbor seals: pneumonia associated with influenza A virus. *Science* 215: 1129 - 1131.
- Gill, J. S., Webby, R., Gilchrist, M. J., und G. C. Gray (2006): Avian influenza among waterfowl hunters and wildlife professionals. *Emerg Infect Dis* 12: 1284 - 1286.
- Globig (2007): Untersuchungen zum Vorkommen von aviären Influenza- und aviären Paramyxoviren bei Wildvögeln in Deutschland. Dissertation zur Erlangung des Grades einer Doktorin der Veterinärmedizin (Dr. med. vet.) durch die Tierärztliche Hochschule Hannover.
- Globig, A., Starick, E., und O. Werner (2006a): Influenzavirus-Infektionen bei migrierenden Wasservögeln: Ergebnisse einer zweijährigen Studie in Deutschland. *Berl Münch Tierärztl Wochenschr* 119: 132 - 139.
- Globig, A., Starick, E., Harder, T., und O. Werner (2006b): Influenza- und Paramyxovirusinfektionen bei Wildvögeln in Deutschland: Wann, Wo, Wer und Woher? Referatsammlung des 70. Fachgesprächs der Fachgruppe „Geflügelkrankheiten“, Hannover. Seiten 20 - 32.
- Globig, A., Staubach, C., Beer, M., Köppen, U., Fiedler, W., Nieburg, M., Wilking, H., Starick, E., Teifke, J. P., Werner, O., Unger, F., Grund, C., Wolf, C., Roost, H., Feldhusen, F., Conraths, F. J., Mettenleiter, T. C., und T. C. Harder (2009): 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* 56: 57 - 72.
- Glünder, G. (1989): Infektionen der Tauben als Risiko für die Gesundheit von Mensch und Tier. *Dtsch tierärztl Wschr* 96: 112 - 114.
- Gorman, O. T., Bean, W. J., Kawaoka, Y., Donatelli, I., Guo, Y., und R. G. Webster (1991): Evolution of influenza virus nucleoprotein genes: implications for the origins of H1N1 human and classical swine viruses. *J Virol* 65: 3704 - 3714.

- Graves, I. L. (1992): Influenza viruses in birds of the Atlantic flyway. *Avian Dis* 36: 1 - 10.
- Greve, L. (1901): Beobachtungen über eine von der Braunschweiger Geflügelausstellung in die Stadt und das Amt Oldenburg eingeschleppte Hühnerseuche. *Dtsch Tierärztl Wschr* 9: 373 - 376.
- Gronesová, P., Mizáková, A., und T. Betáková (2009): Determination of hemagglutinin and neuraminidase subtypes of avian influenza A viruses in urban pigeons by a new nested RT-PCR. *Acta Virol* 53: 213 - 126.
- Guan, Y., Peiris, J. S., Lipatov, A. S., Ellis, T. M., Dyrting, K. C., Krauss, S., Zhang, L. J., Webster, R. G., und K. F. Shortridge (2002): Emergence of multiple genotypes of H5N1 avian influenza viruses in Hong Kong SAR. *Proc Natl Acad Sci U S.A* 99: 8950 - 8955.
- Guan, Y., Shortridge, K. F., Krauss, S., Chin, P. S., Dyrting, K. C., Ellis, T. M., Webster, R. G., und M. Peiris (2000): H9N2 influenza viruses possessing H5N1-like internal genomes continue to circulate in poultry in southeastern China. *J Virol* 74: 9372 - 9380.
- Guan, Y., Shortridge, K. F., Krauss, S., und R. G. Webster (1999): Molecular characterization of H9N2 influenza viruses: were they the donors of the 'internal' genes of H5N1 viruses in Hong Kong? *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* 96: 9363 - 9367.
- Guo, Y., Li, J., und X. Cheng (1999): Discovery of men infected by avian influenza A (H9N2) virus. *Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi* 13: 105 – 108.
- Haag-Wackernagel, D., und H. Moch (2004): Health hazards posed by feral pigeons. *J Infect* 48: 307 – 313.
- Hafez, H. M., Prusas, C., Cortez de Jackel, S., Aldehoff, D., und O. Werner (2003): Investigations on avian influenza A in meat turkey flocks in Germany. *Archiv für Geflügelkunde* 67: 11 -15.
- Halvorson, D., Karunakaran, D., Senne, D., Kelleher, C., Bailey, C., Abraham, A., Hinshaw, V., und J. Newman (1983): Epizootiology of avian influenza – simultaneous monitoring of sentinel ducks and turkeys in Minnesota. *Avian Dis* 27: 77 - 85.

-
- Harder, T. C., Teuffert, J., Starick, E., Gethmann, J., Grund, C., Fereidouni, S., Durban, M., Bogner, K.-H., Neubauer-Juric, A., Repper, R., Hlinak, A., Engelhardt, A., Nöckler, A., Smietanka, K., Minta, Z., Kramer, M., Globig, A., Mettenleiter, T. C., Conraths, F. J., und M. Beer (2009a): Highly pathogenic avian influenza virus (H5N1) in frozen duck carcasses, Germany, 2007. *Emerg Infect Dis* 15: 272 - 279.
- Harder, T. C., und T. W. Vahlenkamp (2009b): Influenza virus infections in dogs and cats. *Vet Immunol Immunopathol.* 2009 Oct 14. [Elektronische Version vor dem Druck]
- Hatchette, T. F., Walker, D., Johnson, C., Baker, A., Pryor, S. P., und R. G. Webster (2004): Influenza A viruses in feral Canadian ducks: extensive reassortment in nature. *J Gen Virol* 85: 2327 - 2337.
- He, Q., Velumani, S., Du, Q., Lim, C. W., Ng, F. K., Donis, R., und J. Kwang (2007): Detection of H5 avian influenza viruses by antigen-capture enzyme-linked immunosorbent assay using H5-specific monoclonal antibody. *Clin Vaccine Immunol* 14: 617 - 623.
- Heffels, U., Fritzsche, K., Kaleta, E. F., und U. Neumann (1981): Serologische Untersuchungen zum Nachweis virusbedingter Infektionen bei der Taube in der Bundesrepublik Deutschland. *Dtsch Tierärztl Wschr* 88: 85 - 124.
- Heine, H. G., Trinidad, L., Selleck, P., und S. Lowther (2007): Rapid detection of highly pathogenic avian influenza H5N1 virus by TaqMan reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Avian Dis* 51: 370 - 372.
- Heiß, R. (2006): Aviäre Influenza in Wermsdorf – ein Erfahrungsbericht. Referatesammlung des 71. Fachgesprächs der Fachgruppe „Geflügelkrankheiten“, Hannover. Seiten 19 - 25.
- Hinshaw, V. S., Bean, W. J., Geraci, J., Fiorelli, P., Early, G. und R. G. Webster (1986). Characterization of two influenza A viruses from a pilot whale. *J Virol* 58: 655 - 656.
- Hinshaw, V. S., Webster, R. G., und B. Turner (1979): Water-Borne transmission of influenza A viruses? *Intervirology* 111: 66 - 68.

- Ho, H. T., Qian, H. L., He, F., Meng, T., Szypota, M., Prabhu, N., Prabakaran, M., Chan, K. P., und J. Kwang (2009): Rapid detection of H5N1 subtype influenza viruses by antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay using H5- and N1-specific monoclonal antibodies. *Clin Vaccine Immunol* 16: 726 - 732.
- Hoffmann, E., Stech, J., Guan, Y., Webster, R. G., und D. R. Perez (2001): Universal primer set for full length amplification of all influenza A viruses. *Arch Virol* 146: 2275 - 2289.
- Horimoto, T., und Y. Kawaoka (1994): Reverse genetics provides evidence for a correlation of hemagglutinin cleavability and virulence of an avian influenza A virus. *J Virol* 68: 3120 - 3128.
- Humberd, J., Guan, Y., und R. G. Webster (2006): Comparison of the replication of influenza A viruses in Chinese ring-necked pheasants and chukar partridges. *J Virol* 80: 2151 - 2161.
- Hussong, H. K. (2009): DFO Mitgliederdaten p. 01.03.2009. *Tinnunculus* 29: 12.
- Isachenko, V. A., Zakstelskaya, L. Y., Roslaya, I. G., Odinok, L. D., Molibog, E. V., und D. K. Lvov (1974): Strains similar to Hong-Kong variant of influenza virus isolated from synanthropic and wild migrating birds. *Ivanovsky Inst Virol AMS USSR* 2: 156 - 165.
- Ito, T., Couceiro, J. N., Kelm, S., Baum, L. G., Krauss, S., Castrucci, M. R., Donatelli, I., Kida, H., Paulson, J. C., Webster, R. G., und Y. Kawaoka (1998): Molecular basis for the generation in pigs of influenza A viruses with pandemic potential. *J Virol* 72: 7367 - 7373.
- Jia, B. (2007): An infectious status survey of H5N1 highly pathogenic avian influenza virus in pigeons in Harbin, The People's Republic of China. Thesis submitted to Chiang Mai University and Freie Universität Berlin in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Veterinary Public Health

-
- Jia, F., Gao, R. B., Wang, M., Guo, Y. J., Wen, L. Y., Zhang, Y., Cheng, Y. H., Shu, Y. L., und H. S. Liu (2008a): Detection of influenza viruses/avian influenza viruses and identification of virulence using a microarray. *Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi*. 22: 501 - 503.
- Jia, B., Shi, J., Li, Y., Shinya, K., Muramoto, Y., Zeng, X., Tian, G., Kawaoka, Y., und H. Chen (2008b): Pathogenicity of Chinese H5N1 highly pathogenic avian influenza viruses in pigeons. *Arch Virol* 153: 1821 - 1826.
- Jin, M., Wang, G., Zhang, R., Zhao, S., Li, H., Tan, Y., und H. Chen (2004): Development of enzyme-linked immunosorbent assay with nucleoprotein as antigen for detection of antibodies to avian influenza virus. *Avian Dis* 48: 870 - 878.
- Johnson, D. C., Maxfield, B. G., und J. I. Moulthrop (1977): Epidemiologic studies of the 1975 avian influenza outbreak in chickens in Alabama. *Avian Dis* 21: 167 - 177.
- Johnson, N. P. A. S., und J. Mueller (2002): Updating the accounts: global mortality of the 1918-1919 "Spanish" influenza pandemic. *Bull Hist Med* 76: 105 - 115.
- Kaleta, E. F., Hergarten, G., und A. Yilmaz (2005): Avian influenza A viruses in birds – an ecological, ornithological and virological view. *Dtsch tierärztl Wochenschr* 112: 448 - 456.
- Kaleta, E. G., und A. Hönicke (2004): Review on the literature on avian influenza A viruses in pigeons and experimental studies on the susceptibility of domestic pigeons to influenza A virus of the haemagglutinin subtype H7. *Dtsch tierärztl Wochenschr* 111: 467 - 472.
- Kalthoff, D., Breithaupt, A., Teifke, J. P., Globig, A., Harder, T., Mettenleiter, T. C., und M. Beer (2008): Highly pathogenic avian influenza virus (H5N1) in experimentally infected adult mute swans. *Emerg Infect Dis* 14: 1267 - 1270.

- Kandun, I. N., Wibisono, H., Sedyaningsih, E. R., Yusharmen, Hadisoedarsuno, W., Purba, W., Santoso, H., Septiawati, C., Tresnaningsih, E., Heriyanto, B., Yuwono, D., Harun, S., Soeroso, S., Giriputra, S., Blair, P. J., Jeremijenko, A., Kosasih, H., Putnam, S. D., Samaan, G., Silitonga, M., Chan, K. H., Poon, L. L., Lim, W., Klimov, A., Lindstrom, S., Guan, Y., Donis, R., Katz, J., Cox, N., Peiris, M., und T. M. Uyeki (2006): Three Indonesian clusters of H5N1 virus infection in 2005. *N Engl J Med* 355: 2186 - 2194.
- Katz, J. M., Lim, W., Bridges, C. B., Rowe, T., Hu-Primmer, J., Lu, X., Abernathy, R. A., Clarke, M., Conn, L., Kwong, H., Lee, M., Au, G., Ho, Y. Y., Mak, K. H., Cox, N. J., und K. Fukuda (1999): Antibody response in individuals infected with avian influenza A (H5N1) viruses and detection of anti-H5 antibody among household and social contacts. *J Infect Dis* 180: 1763 - 1770.
- Kayali, G., Setterquist, S. F., Capuano, A. W., Myers, K. P., Gill, J. S., und G. C. Gray (2008): Testing human sera for antibodies against avian influenza viruses: horse RBC hemagglutination inhibition vs. microneutralization assays. *J Clin Virol* 43: 73 - 78.
- Keawcharoen, J., Oraveerakul, K., Kuiken, T., Fouchier, R. A., Amonsin, A., Payungporn, S., Noppornpanth, S., Wattanodorn, S., Theambooniers, A., Tantilertcharoen, R., Pattanarangsarn, R., Arya, N., Ratanakorn, P., Osterhaus, D. M., und Y. Poovorawan (2004): Avian influenza H5N1 in tigers and leopards. *Emerg Infect Dis* 10: 2189 - 2191.
- Keawcharoen, J., van Riel, D., van Amerongen, G., Bestebroer, T., Beyer, W. E., van Laveren, R., Osterhaus, A. D., Fouchier, R. A., und T. Kuiken (2008): Wild ducks as long-distance vectors of highly pathogenic avian influenza virus (H5N1). *Emerg Infect Dis* 14: 600 - 607.
- Kessler, N., Ferraris, O., Palmer, K., Marsh, W., und A. Steel (2004): Use of the DNA flow-thru chip, a three-dimensional biochip, for typing and subtyping of influenza viruses. *J Clin Microbiol* 42: 2173 - 2185.

-
- Khan, O. A., Shuaib, M. A., Rhman, S. S., Ismail, M.M., Hammad, Y. A., Baky, M. H., Fusaro, A., Salviato, A., und G. Cattoli (2009): Isolation and identification of highly pathogenic avian influenza H5N1 virus from Houbara bustards (*Chlamydotis undulata macqueenii*) and contact falcons. *Avian Pathol* 38: 35 - 39.
- Kida, H., Kawaoka, Y., Naeve, C. W., und R. G. Webster (1987): Antigenic and genetic conservation of H3 influenza in wild ducks. *Virology* 159: 109 - 119.
- Killian, M. L. (2008): Avian influenza virus sample types, collection, and handling. *Methods Mol Biol* 436: 7 - 12.
- Kilpatrick, A. M., Chmura, A. A., Gibbons, D. W., Fleischer, R. C., Marra, P. P., und P. Daszak (2006): Predicting the global spread of H5N1 avian influenza. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 19368 - 19373.
- Kiss, I., Germán, P., Sámi, L., Antal, M., Farkas, T., Kardos, G., Kecskeméti, S., Dán, A., und S. Belák (2006): Application of real-time RT-PCR utilising lux (light upon extension) fluorogenic primer for the rapid detection of avian influenza viruses. *Acta Vet Hung* 54: 525 - 533.
- Kleine, F. K., und B. Möllers (1905): Über Hühnerpest bei Gänsen. *Zbl Bakt Orig* 39: 545 - 549.
- Klingeborn, B., Englund, L., Rott, R., Juntti, N., und G. Rockborn (1985): An avian influenza A virus killing a mammalian species - the mink. *Arch Virol* 86: 347 - 351.
- Klopfleisch, R., Werner, O., Mundt, E., Harder, T., und J. P. Teifke (2006): Neurotropism of highly pathogenic avian influenza virus A/Chicken/Indonesia/2003 (H5N1) in experimentally infected pigeons (*Columbia livia* f. domestica). *Vet Pathol* 43: 463 - 470.
- Kocan, A. A., Snelling, J., und E. C. Greiner (1977): Some infectious and parasitic diseases in Oklahoma raptors. *J Wildl Dis* 13: 304 - 306.
- Kodihalli, S., Sivanandan, V., Nagaraja, K. V., Goyal, S. M., und D. A. Halvorson (1993): Antigen-capture enzyme immunoassay for detection of avian influenza virus in turkeys. *Am J Vet Res* 54: 1385 - 1390.

- Komar, N., und B. Olsen (2008): Avian influenza virus (H5N1) mortality surveillance. *Emerg Infect Dis* 14: 1176 - 1178.
- Koopmans, M., Wilbrink, B., Conyn, M., Natrop, G., Van der Nat, H., Vennema, H., Meijer, A., Van Steenberghe, J., Fouchier, R., Osterhaus, A., und A. Bosman (2004): Transmission of H7N7 avian Influenza A virus to human beings during a large outbreak in commercial poultry farms in the Netherlands. *Lancet* 363: 587 - 593.
- Koval'chuk Ivanyuk, T. V., Rogochii, E. G., und A.I. Urin (1975): A study of foci of influenza among wild and domestic birds in the Ukraine. *Ekologiya Virusov* 3: 77 - 79.
- Krauss, R., und R. Doerr (1908): Über das Verhalten des Hühnerpestvirus im Zentralnervensystem empfänglicher, natürlich und künstlich unempfindlicher Tiere. *Zbl Bakt Orig* 46: 709 - 715.
- Krauss, S., Walker, D., Pryor, S. P., Niles, L., Chenghong, L., Hinshaw, V. S., und R. G. Webster (2004): Influenza A viruses of migrating wild aquatic birds in North America. *Vector Borne Zoonotic Dis* 4: 177 - 189.
- Krumwiede, C., Gerber, H., und D. J. Provost (1925): Laboratory observations on the virus of the malignant disease recently epizootic among poultry. *J Am Vet Med Assoc* 67: 171 - 177.
- Künnemann, O. (1902): Beobachtungen über die Vogelpest. *Dtsch tierärztl Wschr* 10: 413 – 415 und 421 – 424.
- Kurtz, J., Manvell, R. J., und J Banks (1996): Avian influenza virus isolated from a woman with conjunctivitis [Letter]. *Lancet* 348: 901 - 902.
- Kwon, Y. K., Joh, S. J., Kim, M. C., Lee, Y. J., Choi, J. G., Lee, E. K., Wee, S. H., Sung, H. W., Kwon, J. H., Kang, M. I., und J. H. Kim (2005b): Highly pathogenic avian influenza in magpies (*Pica pica sericea*) in South Korea. *J Wildl Dis* 41: 618 - 623.
- Kwon, Y. K., Joh, S. J., Kim, M. C., Sung, H. W., Lee, Y. J., Choi, J. G., Lee, E. K., und J. H. Kim (2005a): Highly pathogenic avian influenza (H5N1) in the commercial domestic ducks of South Korea. *Avian Pathol* 34: 367 - 370.

-
- Lau, L. T., Banks, J., Aherne, R., Brown, I. H., Dillon, N., Collins, R. A., Chan, K. Y., Fung, Y. W., Xing, J., und A. C. Yu (2004): Nucleic acid sequence-based amplification methods to detect avian influenza virus. *Biochem Biophys Res Commun* 313: 336 - 342.
- Le Gall-Reculé, G., Briand, F. X., Schmitz, A., Guionie, O., Massin, P., und V. Jestin (2008): Double introduction of highly pathogenic H5N1 avian influenza virus into France in early 2006. *Avian Pathol* 37: 15 - 23.
- Lee, M. S., Chang, P. C., Shien, J. H., Cheng, M. C., und H. K. Shieh (2001): Identification and subtyping of avian influenza viruses by reverse transcription-PCR. *J Virol Methods* 97: 13 - 22.
- Lee, Y. J., Choi, Y. K., Kim, Y. J., Song, M. S., Jeong, O. M., Lee, E. K., Jeon, W. J., Jeong, W., Joh, S. J., Choi, K. S., Her, M., Kim, M. C., Kim, A., Kim, M. J., Ho Lee, E., Oh, T. G., Moon, H. J., Yoo, D. W., Kim, J. H., Sung, M. H., Poo, H., Kwon, J. H., und C. J. Kim (2008): Highly pathogenic avian influenza virus (H5N1) in domestic poultry and relationship with migratory birds, South Korea. *Emerg Infect Dis* 14: 487 - 490.
- Leschnik, M., Weikel, J., Möstl, K., Revilla-Fernández, S., Wodak, E., Bagó, Z., Vanek, E., Benetka, V., Hess, M., und J. G. Thalhammer (2007): Subclinical infection with avian influenza A (H5N1) virus in cats. *Emerg Infect Dis* 13: 243 - 247.
- Li, J., Chen, S., und D. H. Evans (2001): Typing and subtyping influenza virus using DNA microarrays and multiplex reverse transcriptase PCR. *J Clin Microbiol.* 39: 696 - 704.
- Li, K. S., Guan, Y., Wang, J., Smith, G. J., Xu, K., M., Duan, L., Rahardjo, A. P., Puthavathana, P., Buranathai, C., Nguyen, T. D., Estoepangestie, A. T., Chaisingh, A., Auewarakul, P., Long, H. T., Hanh, N. T., Webby, R. J., Poon, L. L., Chen, H., Shortridge, K. F., Yuen, K. Y., Webster, R. G, und J. S. Peiris (2004): Genesis of highly pathogenic and potentially pandemic H5N1 influenza virus in Eastern Asia. *Nature* 430: 209 - 213.

- Lierz, M., Hafez, H. M., Klopfleisch, R., Lüscho, D., Prusas, C., Teifke, J. P., Rudolf, M., Grund, C., Kalthoff, D., Mettenleiter, T., Beer, M., und T. Hardert (2007): Protection and virus shedding of falcons vaccinated against highly pathogenic avian influenza A virus (H5N1). *Emerg Infect Dis* 13: 1667 - 1674.
- Lillehaug, A., Monceyron Jonassen, C., Bergsjø, B., Hofshagen, M., Tharaldsen, J., Nesse, L. L., und K. Handeland (2005): Screening of feral pigeon (*Columbia livia*), mallard (*Anas platyrhynchos*) and Grayleg Goose (*Anser anser*) populations for *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp., Avian Influenza Virus and Avian Paramyxovirus. *Acta Vet Scand* 46: 193 - 202.
- Lin, B., Malanoski, A. P., Wang, Z., Blaney, K. M., Long, N. C., Meador, C. E., Metzgar, D., Myers, C. A., Yingst, S. L., Monteville, M. R., Saad, M. D., Schnur, J. M., Tibbetts, C., und D. A. Stenger (2009): Universal detection and identification of avian influenza virus by use of resequencing microarrays. *J Clin Microbiol* 47: 988 - 993.
- Lin, Y. P., Shaw, M., Gregory, V., Cameron, K., Lim, W., Klimov, A., Subbarao, K., Guan, Y., Krauss, S., Shortridge, K., Webster, R., Cox, N., und A. Hay (2000): Avian-to-human transmission of H9N2 subtype influenza A viruses: relationship between H9N2 and H5N1 human isolates. *P N A S* 97: 9654 - 9658.
- Lipatov, A. S., Krauss, S., Guan, Y., Peiris, M., Rehg, J. E., Perez, D. R., und R. G., Webster (2003): Neurovirulence in mice of H5N1 influenza virus genotypes isolated from Hong Kong poultry in 2001. *J Virol* 77: 3816 - 3823.
- Liu, Y., Han, C., Wang, X., Lin, J., Ma, M., Shu, Y., Zhou, J., Yang, H., Liang, Q., Guo, C., Zhu, J., Wei, H., Zhao, J., Ma, Z., und J. Pan (2009): Influenza A virus receptors in the respiratory and intestinal tracts of pigeons. *Avian Pathol* 38: 263 - 266.
- Liu, M., He, S., Walker, D., Zhou, N., Perez, D. R., Mo, B., Li, F., Huang, X., Webster, R. G., und R. J. Webby (2003): The influenza virus gene pool in a poultry market in South central China. *Virology* 305 : 267 - 275.
- Liu, J., Xiao, H., Lei, F., Zhu, Q., Qin, K., Zhang, X. W., Zhang, X. L., Zhao, D., Wang, G., Feng, Y., Ma, J., Liu, W., Wang, J., und G. F. Gao (2005): Highly pathogenic H5N1 influenza virus infection in migratory birds. *Science* 309: 1206.

-
- Liu, Y., Zhou, J., Yang, H., Yao, W., Bu, W., Yang, B., Song, W., Meng, Y., Lin, J., Han, C., Zhu, J., Ma, Z., Zhao, J., und X. Wang (2007): Susceptibility and transmissibility of pigeons to Asian lineage highly pathogenic avian influenza virus subtype H5N1. *Avian Pathol* 36: 461 - 465.
- Lode, A., und J. Gruber (1901): Bakteriologische Studien über die Ätiologie einer epidemischen Erkrankung der Hühner in Tirol. *Zbl Bakt Hyg 1. Abt Originale* 30: 593 - 604.
- Louisirirochanakul, S., Lerdsamran, H., Wiriyarat, W., Sangsiriwut, K., Chaichoune, K., Pookruk, P., Songserm, T., Kitphati, R., Sawanpanyalert, P., Komoltri, C., Auewarakul, P., und P. Puthavathana (2007): Erythrocyte binding preference of avian influenza H5N1 viruses. *J Clin Microbiol* 45: 2284 - 2286.
- Lvov, D. K., Zdanov, V. M., Sazonov, A. A., Braude, N. A., Vladimirtceva, E. A., Agafonova, L. V., Skljanskaja, E. I., Kaverin, N. V., Reznik, V. I., Pysina, T. V., Oserovic, A. M., Berzin, A. A., Mjasnikova, I. A., Podcernjaeva, R. Y., Klimenko, S. M., Andrejev, V. P., und M. A. Yakhno (1978): Comparison of influenza viruses isolated from man and from whales. *Bull W H O* 56: 923 - 930.
- Maggiore, A., und G. L. Valenti (1903): Über eine Seuche von exsudativen Typhus bei Hühnern. 1. Mittheilung. *Z Hyg Infektionskr* 42: 185 - 243.
- Magnino, S., Fabbi, M., Moreno, A., Sala, G., Lavazza, A., Ghelfi, E., Gandolfi, L., Pirovano, G., und E. Gasperi (2000): Avian influenza virus (H7 serotype) in a saker falcon in Italy. *Vet Rec* 146: 740.
- Manvell, R. J., McKinney, P., Wernery, U., und K. Frost (2000): Isolation of a highly pathogenic influenza A virus of subtype H7N3 from a peregrine falcon (*Falco peregrinus*). *Avian Pathol* 29: 635 - 637.
- Marché, S., und T. van den Berg (2010): Evaluation of rapid antigen detection kits for the diagnosis of highly pathogenic avian influenza H5N1 infection. *Avian Dis*: Artikel in Druck.

- Marjuki, H., Wernery, U., Yen, H.-L., Franks, J., Seiler, P., Walker, D., Krauss, S., und R. G. Webster (2009): Isolation of highly pathogenic Avian Influenza H5N1 virus from Saker Falcons (*Falco cherrug*) in the Middle East. *Advances in Virology: Artikelnr.* 294520.
- Marschall, J., und K. Hartmann (2008): Avian influenza A H5N1 infections in cats. *J Feline Med Surg* 10: 359 - 365.
- Matrosovich, M. N.; Gambaryan, A. S., Teneberg, S., Piskarev, V. E., Yamnikova, S. S., Lvov, D. K., Robertson, J. S., und K. A. Karlsson (1997): Avian influenza A viruses differ from human viruses by recognition of sialyloligosaccharides and gangliosides and by a higher conservation of the HA receptor-binding-site. *Virology* 233: 224 - 234.
- Matrosovich, M., Krauss, S., und R. G. Webster (2001): H9N2 influenza A viruses from poultry in Asia have human-like receptor specificity. *Virology* 281: 156 - 162.
- Mayr, A., Bachmann, P. A., Bibrack, B., und G. Wittmann (1977): Unspezifische Serumfaktoren. In: „Virologische Arbeitsmethoden“. Herausgegeben von A. Mayr, P. A. Bachmann, B. Bibrack und G. Wittmann. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York. Band 2: Serologie: Seiten 141–152.
- Meulemans, G., Carlier, M. C., Gonze, M., und P. Petit (1987): Comparison of hemagglutination-inhibition, agar gel precipitin, and enzyme-linked immunosorbent assay for measuring antibodies against influenza viruses in chickens. *Avian Dis* 31: 560 - 363.
- Miessner, H., und R. Berge (1926): Die Geflügelpest bei Gänsen. *Dtsch tierärztl Wschr* 34: 385 - 393.
- Mohler, J. R. (1926): Fowl pest in the United States. *J Am Vet Med Assoc* 68: 549 - 559.
- Monne, I., Fusaro, A., Al-Blawi, M. H., Ismail, M. M., Khan, O. A., Dauphin, G., Tripodi, A., Salviato, A., Marangon, S., Capua, I., und G. Cattoli (2008): Co-circulation of two sublineages of HPAIV H5N1 virus in the Kingdom of Saudi-Arabia with unique molecular signatures suggesting separate introductions into the commercial poultry and falconry sectors. *J Gen Virol* 89: 2691 - 2697.

-
- Morishita, T. Y., McFadzen, M. E., Mohan, R., Aye, P. P., und D. L. Brooks (1998): Serologic survey of free-living nestling prairie falcons (*Falco mexicanus*) for selected pathogens. *J Zoo Wildl Med* 29: 18 - 20.
- Motha, J., Gibbons, A. M., und C. E. M. Reed (1997): A survey for avian paramyxoviruses and influenza viruses in feral pigeons and native birds in New Zealand. *New Zealand Vet J* 45: 215 - 216.
- Mounts, A. W., Kwong, H., Izurieta, H. S., Ho, Y., Au, T., Lee, M., Buxton Bridges, C., Williams, S. W., Mak, K. H., Katz, J. M., Thompson, W. W., Cox, N. J., und K. Fukuda (1999): Case-control study of risk factors for avian influenza A (H5N1) disease, Hong Kong, 1997. *J Infect Dis* 180: 505 - 508.
- Munch, M., Nielsen, L. P., Handberg, K. J., und P. H. Jørgensen (2001): Detection and subtyping (H5 and H7) of avian type A influenza virus by reverse transcription-PCR and PCR-ELISA. *Arch Virol* 146: 87 - 97.
- Munster, V. J., Baas, C., Lexmond, P., Waldenström, J., Wallensten, A., Fransson, T., Rimmelzwaan, G. F., Beyer, W. E., Schutten, M., Olsen, B., Osterhaus, A. D., und R. A. Fouchier (2007): Spatial, temporal, and species variation in prevalence of influenza A viruses in wild migratory birds. *PLoS Pathog.* 3: e61.
- Murton, R. K., und N. J. Westwood (1966): The foods of rock doves and feral pigeons. *Bird Study* 13: 130 - 146.
- Mutinelli, F., Capua, I., Terregino, C., und G. Cattoli (2003): Clinical, gross, and microscopic findings in different avian species naturally infected during the H7N1 low- and high-pathogenicity avian influenza epidemics in Italy during 1999 and 2000. *Avian Dis* 47: 844 - 848.
- Naffakh, N., Massin, P., Escriou, N., Crescenzo-Chaigne, B., und S. van der Werf (2000): Genetic analysis of the compatibility between polymerase proteins from human and avian strains of influenza viruses. *J Gen Virol* 5: 1283 - 1291.

- Nagy, A., Vostinakova, V., Pindova, Z., Hornickova, J., Cernikova, L., Sedlak, K., Mojzis, M., Dirbakova, Z., und J. Machova (2009): Molecular and phylogenetic analysis of the H5N1 avian influenza virus caused the first highly pathogenic avian influenza outbreak in poultry in the Czech Republic in 2007. *Vet Microbiol* 133: 257 - 263.
- Narayan, O., Lang, G., und B. T. Rouse (1969): A new influenza A virus infection in turkeys. *Arch ges Virusforsch* 26: 149 - 165.
- Nettles, V. F., Wood, J. M., und R. G. Webster (1985): Wildlife surveillance associated with an outbreak of lethal H5N2 avian influenza in domestic poultry. *Avian Dis* 29: 733 - 741.
- Ng, L. F., Barr, I., Nguyen, T., Noor, S. M., Tan, R. S., Agathe, L. V., Gupta, S., Khalil, H., To, T. L., Hassan, S. S., und E. C. Ren (2006): Specific detection of H5N1 avian influenza A virus in field specimens by a one-step RT-PCR assay. *BMC Infect Dis* 6: 40.
- Nicholls, J. M., Bourne, A. J., Chen, H., Guan, Y. und J. S. Peiris (2007a): Sialic acid receptor detection in the human respiratory tract: evidence for widespread distribution of potential binding sites for human and avian influenza viruses. *Respir Res* 8:73 - 83.
- Nicholls, J. M., Chan, M. C., Chan, W. Y., Wong, H. K., Cheung, C. Y., Kwong, D. L., Wong, M. P., Chui, W. H., Poon, L. L., Tsao, S. W., Guan, Y., und J. S. Peiris (2007b) : Tropism of avian influenza A (H5N1) in the upper and lower respiratory tract. *Nat Med* 13: 147 - 149.
- Obenauer, J. C., Denson, J., Metha, P. K., Su, X., Mukatira, S., Finkelstein, D. B., Xu, X., Wang, J., Ma, J., Fan, Y., Rakestraw, K. M., Webster, R. G., Hoffmann, E., Krauss, S., Zheng, J., Zhang, Z., und C. W. Naeve (2006): Large-scale sequence analysis of avian influenza isolates. *Science* 311: 1576 - 1580.

-
- Obon, E., Bailey, T. A., Somma, A. di, Silvanose, C., O'Donovan, D., Mc Keown, S., Joseph, S., und U. Wernery (2007): Seroprevalence of H5 avian influenza virus in birds from the United Arab Emirates. In: *Wildlife Middle East News* 2. URL: <http://www.wmenews.com/newsletters/File/Volume-2/Issue-3/support/Seroprevalence%20of%20H5%20avian%20influenza.pdf>.
- OIE (2007): Update on highly pathogenic avian influenza in animals (type H5 and H7). Follow-up report No.: 7 OIE Ref: 6620 vom: 23.12.2007 aus Polen. URL: http://www.oie.int/wahis/reports/en_fup_0000006620_20071223_124003.pdf. (Eingesehen am 29.03.2010)
- OIE (2009): Avian Influenza. In: „Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2008“. URL: http://www.oie.int/eng/Normes/mmanual/2008/pdf/2.03.04_AI.pdf. (Eingesehen am 29.03.2010)
- Olofsson, S., Kumlin, U., Dimock, K., und N. Arnberg (2005): Avian influenza and sialic acid receptors: more than meets the eye? *Lancet Infect Dis* 5: 184 - 188.
- Olsen, B., Munster, V. J., Wallensten, A., Waldenström, J., Osterhaus, A. D., und R. A. Fouchier (2006): Global patterns of influenza a virus in wild birds. *Science* 312: 384- 388.
- Olsen, S. J., Ungchusak, K., Sovann, L., Uyeki, T. M., Dowell, S. F., Cox, N. J., Aldis, W., und S. Chunsuttiwat (2005): Family clustering of avian influenza A (H5N1). *Emerg Infect Dis* 11: 1799 - 1801.
- Oner, A. F., Bay, A., Arslan, S., Akdeniz, H., Sahin, H. A., Cesur, Y., Epcacan, S., Yilmaz, N., Deger, I., Kizilyildiz, B., Karsen, H., und M. Ceyhan (2006): Avian Influenza (H5N1) infection in eastern Turkey in 2006. *NEJM* 355: 2179 - 2185.
- Ostertag, R., und K. Wolffhügel (1902): Untersuchungen über die „Hühnerpest“, die neue Geflügelseuche. *Mh Thierheilk* 14: 49 - 70.
- Ottis, K., und P. A. Bachmann (1981): Occurrence of avian influenza type a in Germany. *Avian Dis* 47s: 46 – 51.

- Ottis, K., und P. A. Bachmann (1983): Isolation and characterization of ortho- and paramyxoviruses from feral birds in Europe. *Zentralbl Veterinaermed B* 30: 22 - 35.
- Panigrahy, B., Shafer, A. L., Pearson, J. E., Senne, D. A., und J. C. Pedersen (1996): Susceptibility of pigeons to avian influenza. *Avian Dis* 40: 600 - 604.
- Pant, G. R., und P. W. Selleck (2007): Surveillance for avian influenza in Nepal 2004-2005. *Avian Dis* 51: 352 - 354.
- Pantin-Jackwood, M. J., und D. E. Swayne (2007): Pathobiology of Asian highly pathogenic avian influenza H5N1 virus infections in ducks. *Avian Dis* 51: 250 - 259.
- Payungporn, S., Chutinimitkul, S., Chaisingh, A., Damrongwantanapokin, S., Buranathai, C., Amonsin, A., Theamboonlers, A., und Y. Poovorawan (2006): Single step multiplex real-time RT-PCR for H5N1 influenza A virus detection. *J Virol Methods* 131: 143 - 147.
- Peiris, J. S., Yu, W. C., Leung, C. W., Cheung, C. Y., Ng, W. F., Nicholls, J. M., Ng, T. K., Chan, K. H., Lai, S. T., Lim, W. L., Yuen, K. Y., und Y. Guan (2004): Re-emergence of fatal human influenza A subtype H5N1 disease. *Lancet* 363: 617 - 619.
- Peiris, M., Yuen, K. Y., Leung, C. W., Chan, K. H., Ip, P. L., Lai, R. W., Orr, W. K., und K. F. Shortridge (1999): Human infection with influenza H9N2. *Lancet*. 354: 916 - 917.
- Pensaert, M., Ottis, K., Vandeputte, J., Kaplan, M. M., und P. A. Bachmann (1981): Evidence for the natural transmission of influenza A virus from wild ducks to swine and its potential importance for man. *Bull World Health. Organ* 59: 75 - 78.
- Perdue, M. L., Garcia, M., Beck, J., Brugh, M., und D. E. Swayne (1996): An Arg-Lys insertion at the hemagglutinin cleavage site of an H5N2 avian influenza isolate. *Virus Genes* 12: 77 - 84.
- Perdue, M. L., Garcia, M., Senne, D., und M. Fraire (1997): Virulence-associated sequence duplication at the hemagglutinin cleavage site of avian influenza viruses. *Virus Res* 49: 173 - 186.

-
- Perk, S., Panshin, A., Shihmanter, E., Gissin, I., Pokamunski, S., Pirak, M., und M. Lipkind (2006): Ecology and molecular epidemiology of H9N2 avian influenza viruses isolated in Israel during 2000-2004 epizootic. *Dev Biol* 124: 201 - 209.
- Perkins, L. E., und D. E. Swayne (2001): Pathobiology of A/chicken/Hong Kong/220/97 (H5N1) avian influenza virus in seven gallinaceous species. *Vet Pathol* 38: 149 - 164.
- Perkins, L. E. L., und D. E. Swayne (2002a): Pathogenicity of a Hong Kong origin H5N1 highly pathogenic avian influenza virus for emus, geese, ducks, and pigeons. *Avian Dis* 46: 53 - 63.
- Perkins, E. L., und D. E. Swayne (2002b): Susceptibility of laughing gulls (*Larus atricilla*) to H5N1 and H5N3 highly pathogenic avian influenza virus. *Avian Dis* 46: 877 – 885.
- Perkins, L. E. L., und D. E. Swayne (2003a): Comparative susceptibility of selected avian and mammalian species to a Hong Kong origin H5N1 high-pathogenicity avian influenza virus. *Avian Dis* 47: 956 - 967.
- Perkins, E. L., und D. E. Swayne (2003b): Varied pathogenicity of a Hong-Kong-origin H5N1 avian influenza virus in four passerine species and budgerigars. *Vet Pathol* 40: 14 - 24.
- Peroulis, I., und K. O'Riley (2004): Detection of avian paramyxovirus and influenza viruses amongst wild bird populations in Victoria. *Aust Vet J* 82: 79 - 82.
- Perroncito, E. (1878): Epizoozia tifoide nei gallinacei. *Giornale della Reale Accademia d'Agricoltura di Torino* 21: 87 - 126.
- Phipps, L. P., Essen, S. C., und I. H. Brown (2004): 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* 122: 119 - 122.
- Profeta, M. L, und G. Palladino (1986): Serological evidence of human infections with avian influenza viruses. Brief report. *Arch Virol* 90: 355 - 360.

- Promedmail (2004): Dead pigeon panic: bird flu kills hundreds of birds at 2 Thai village schools. URL: <http://www.Promedmail.org>. Archiv-Nr. 20041120.3110 vom 20.11.2004. (Eingesehen am 19.01.2010)
- Promedmail (2005): Avian Influenza - Eurasia (60): Wild birds, Kuwait, Italy. URL: <http://www.promedmail.org>. Archiv-Nr. 20051112.3304 vom 12.11.2005. (Eingesehen am 19.01.2010)
- Promedmail (2006a): Avian Influenza - Eurasia (37): Saudi - Arabia, falcon. URL: <http://www.promedmail.org>. Archiv-Nr. 20060130.0299 vom 30.01.2006. (Eingesehen am 219.01.2010)
- Promedmail (2006b): Avian Influenza - Eurasia (34): Saudi - Arabia, falcon, suspected. URL: <http://www.promedmail.org>. Archiv-Nr. 10060128.0277 vom 28.01.2006 . (Eingesehen am 19.01.2010)
- Promedmail (2007): Pigeons and other wild birds died of bird flu in Thailand. URL: <http://www.promedmail.org>. Archiv-Nr. 20070117.0225 vom 17.01.2007. (Eingesehen am 19.01.2010)
- Purchase, H. S. (1931): An atypical fowl plague virus from Egypt. *J comp Pathol Therap* 44: 71 - 83.
- Puzelli, S., Di Trani, L., Fabiani, C., Campitelli, L., De Marco, M. A., Capua, I., Aguilera, J. F., Zambon, M., und I. Donatelli (2005): Serological analysis of serum samples from humans exposed to avian H7 influenza viruses in Italy between 1999 and 2003. *J Infect Dis* 192: 1318 - 1322.
- Reed, L. J., und H. Münch (1938): A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Am J Hyg* 27: 493 - 497.
- Reno, P. W., und E. M. Hoffmann (1972): Enhancement of haemagglutination inhibition by complement. *Infection and Immunity* 6: 945 – 951.
- Rinder, M., Lang, V., Fuchs, C., Hafner-Marx, A., Bogner, K. H., Neubauer, A., Büttner, M., und H. Rinder (2007): Genetic evidence for multi-event imports of avian influenza virus A (H5N1) into Bavaria, Germany. *J Vet Diagn Invest* 19: 279 - 282.

-
- Romváry, J., und J. Tanyi (1975): Occurrence of Hong Kong influenza A (H3N2) virus infection in the Budapest Zoo. *Acta Vet Acad Sci Hungar* 25: 251 - 254
- Romváry, J., Mészáros, J., Tanyi, J., Rósz, J., und L. Fábán (1976): Spreading of virus infection among wild birds and monkeys during the influenza epidemic caused by the Victoria(3)75 variant of a(H3N2) virus. *Acta Vet Acad Sci Hungar* 26: 369 - 376.
- Rossi, J., Cramer, S., und T. Laue (2007): Sensitive and specific detection of influenza virus A subtype H5 with real-time PCR. *Avian Dis* 51: 387 - 389.
- Rowan, M. K. (1962): Mass mortality among European common terns in South Africa in April-May 1961. *British Birds* 55: 103 - 114.
- Rowe, T., Abernathy, R. A., Hu-Primmer, J., Thompson, W. W., Lu, X., Lim, W., Fukuda, K., Cox, N. J., und J. M. Katz (1999): Detection of antibody to avian influenza A (H5N1) virus in human serum by using a combination of serologic assays. *J Clin Microbiol* 37: 937 - 943.
- Ryan-Poirier, K. A., Katz, J. M., Webster, R. G., und Y Kawaoka (1992): Application of Directigen FLU-A for the detection of influenza A virus in human and nonhuman specimens. *J Clin Microbiol* 30: 1072 - 1075.
- Saberfar, E., Forghani-Fard, M. M., und M. Mosavi (2007): Multiplex reverse transcriptase-PCR assay for typing and subtyping of influenza A (H5 & H9) virus in Iran. *Iran Biomed J* 11: 69 - 74.
- Sala, G., Cordioli, P., Moreno-Martin, A., Tollis, M., Brocchi, E., Piccirillo, A., und A. Lavazza (2003): ELISA test for the detection of influenza H7 antibodies in avian sera. *Avian Dis* 47: 1057 - 1059.
- Salzberg, S. L., Kingsford, C., Cattoli, G., Spiro, D. J., Janies, D. A., Aly, M. M. Brown, I. H., Couacy-Hymann, E., De Mia, G. M., Dung, D. H., Guercio, A., Joannis, T., Ali, A. S. M., Osmani, A., Padalino, I., Saad, M. D., Savic, V., Sengamalay, N. A., Yingst, S., Zaborsky, J., Zorman-Rojs, O., Ghedin, E., und I. Capua (2007): Genome analysis linking recent European and African influenza (H5N1) viruses. *Emerg Infect Dis* 13: 713 - 718.

- Samour, J. (2006): Avian Influenza in Saudi falcons. *Falco Newsletter* 27: 21.
- Sauter, A., und L. Jenni (2008): Winterbewegungen von europäischen Stockenten (*Anas platyrhynchos*). Tagungsband zur Gemeinsamen Wissenschaftlichen Tagung der Forschungsprojekte "Constanze" und "Wildvögel und Vogelgrippe". URL: <http://www.vorarlberg.at/pdf/tagungsbandconstanze.pdf>.
- Schäfer, W. (1955): Vergleichende sero-immunologische Untersuchungen über die Viren der Influenza und der klassischen Geflügelpest. *Z Naturforsch* 10b: 81 - 91.
- Scheuerlen, W., und K. Buhl (1901): Zur Kenntnis der seuchenhaften Bauchfellentzündung der Haushühner. *B tierärztl Wschr* 17: 369 - 370.
- Schoene, C. U. R., Harder, T., Globig, A., Beer, M., Conraths, F. J., und T. C. Mettenleiter (2009): Die Wildvogel-Frage: Welche Rolle spielen Wildvögel im Infektionsgeschehen der hochpathogenen aviären Influenza? *Tieraerztl Umsch* 64: 77 - 83.
- Scholtissek, C. (2006): Influenza Pandemie Planung. *Berl Münch tierärztl Wochenschr* 119: 179 - 185.
- Scholtissek, C., Bürger, H., Bachmann, P. A., und C. Hannoun (1983): Genetic relatedness of hemagglutinins of the H1 subtype of influenza A viruses isolated from swine and birds. *Virology* 129: 521 - 523.
- Scholtissek, V., Burger, H., Kistner, O., und K. F. Shortridge (1985): The nucleoprotein as a possible major factor in determining host specificity of influenza H3N2 viruses. *Virology* 147: 287 - 294.
- Sengupta, S., Onodera, K., Lai, A., und U. Melcher (2003): Molecular detection and identification of influenza viruses by oligonucleotide microarray hybridization. *J Clin Microbiol* 41: 4542 - 4550.
- Senne, D. A. (2003): Avian influenza in the Western Hemisphere including the Pacific Islands and Australia. *Avian Dis* 47: 798 - 805.

-
- Senne, D. A., Panigrahy, B., Kawaoka, Y., Pearson, J. E., Süß, J., Lipkind, M., Kida, H., und R. G. Webster (1996): Survey of the hemagglutinin (HA) cleavage site sequence of H5 and H7 avian influenza viruses: amino acid sequence at the HA cleavage site as a marker of pathogenicity potential. *Avian Dis* 40: 425 - 437.
- Shafer, A. L., Katz, J. B., und K. A. Eernisse (1998): Development and validation of a competitive enzyme-linked immunosorbent assay for detection of type A influenza antibodies in avian sera. *Avian Dis* 42: 28 - 34.
- Sharp, G. B., Kawaoka, Y., Jones, D. J., Bean, W. J., Pryor, S. P., Hinshaw, V., und R. G. Webster (1997): Coinfection of wild ducks by influenza A viruses: distribution patterns and biological significance. *J Virol* 71(8): 6128 - 635.
- Shien, J. H., Fu, L. F., Wu, J. R., Cheng, M. C., Shieh, H. K., und P. V. Chang (2008): Development of blocking ELISA for detection of antibodies against avian influenza virus of the H7 subtype. *J Microbiol Immunol Infect* 41: 369 - 376.
- Shinya, K., Ebina, M., Yamada, S., Ono, M., Kasai, N., und Y. Kawaoka (2006): Avian flu: influenza virus receptors in the human airway. *Nature* 440: 435 - 436.
- Shinya, K., Hamm, S., Hatta, M., Ito, H., Ito, T., und Y. Kawaoka (2004): PB2 amino acid at position 627 affects replicative efficiency, but not cell tropism, of Hong Kong H5N1 influenza A viruses in mice. *Virology* 320: 258 - 266.
- Shortridge, K. F. (1999): Poultry and the influenza H5N1 outbreak in Hong Kong, 1997: abridged chronology and virus isolation. *Vaccine* 17 Suppl 1: S26 - S29.
- Siembieda, J., Johnson, C. K., Boyce, W., Sandrock, C., und C. Cardona (2008): Risk for avian influenza virus exposure at human-wildlife interface. *Emerg Infect Dis* 14: 1151 - 1153.
- Sims, L. D., Ellis, T. M., Liu, K. K., Dyrting, K., Wong, H., Peiris, M., Guan, Y., und K. F. Shortridge (2003): Avian influenza in Hong Kong 1997 – 2002. *Avian Dis* 47: 832 - 838.

- Slemons, R. D., und M. Brugh (1998): Rapid antigen detection as an aid in early diagnosis and control of avian influenza. In: Proceedings of the Fourth International Symposium on Avian Influenza, Athens, Georgia, USA. Swayne D.E. & Slemons R.D., eds. U.S. Animal Health Association. Seiten 313 - 317.
- Slemons, R. D., und B. C. Easterday (1972): Host response differences among 5 avian species to an influenzavirus – A/turkey/7732/66 (Hav5N?). Bull Wild Hlth Org 47: 521 - 525.
- Slomka, M. J., Pavlidis, T., Banks, J., Shell, W., McNally, A., Essen, S., und I. H. Brown (2007): Validated H5 Eurasian real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction and its application in H5N1 outbreaks in 2005-2006. Avian Dis 51: 373 - 377.
- Smith, G. J., Vijaykrishna, D., Ellis, T. M., Dyrting, K. C., Leung, Y. H., Bahl, J., Wong, C. W., Kai, H., Chow, M. K., Duan, L., Chan, A. S., Zhang, L. J., Chen, H., Luk, G. S., Peiris, J. S., und Y. Guan (2009): Characterization of avian influenza viruses A (H5N1) from wild birds, Hong Kong, 2004 - 2008. Emerg Infect Dis 15: 402 - 407.
- Snyder, M. H., Buckler-White, A. J., London, W. T., Tierney, E. L., und B. R. Murphy (1987): The avian influenza virus nucleoprotein gene and a specific constellation of avian and human virus polymerase genes each specify attenuation of avian-human influenza A/Pintail/79 reassortant viruses for monkeys. J Virol 61: 2857 - 2863.
- Songserm, T., Amonsin, A., Jam-on, R., Sae-Heng, N., Meemak, N., Pariyothorn, N., Payungporn, S., Theamboonlers, A., und Y. Poovorawan (2006a): Avian influenza H5N1 in naturally infected domestic cat. Emerg Infect Dis 12: 681 - 683.
- Songserm, T., Amonsin, A., Jam-on, R., Sae-Heng, N., Pariyothorn, N., Payungporn, S., Theamboonlers, A., Chutinimitkul, S., Thanawongnuwech, R., und Y. Poovorawan (2006b): Fatal avian influenza A H5N1 in a dog. Emerg Infect Dis 12: 1744 - 1747.
- Spackman, E., Pantin-Jackwood, M. J., Swayne, D. E., und D. L. Suarez (2009): An evaluation of avian influenza diagnostic methods with domestic duck specimens. Avian Dis 53: 276 - 280.

-
- Spackman, E., Senne, D. A., Bulaga, L. L., Myers, T. J., Perdue, M. L., Garber, L. P, Lohman, K., Daum, L. T., und D. L. Suarez (2002): Development of real-time reverse transcriptase PCR assay for type A influenza virus and the avian H5 and H7 hemagglutinin subtypes. *J Clin Microbiol* 40: 3256 - 3260.
- Spackman, E., Senne, D. A., Bulagam L. L., Trockm S., und D. L. Suarez (2003): Development of multiplex real-time RT-PCR as a diagnostic tool for avian influenza. *Avian Dis* 47: 1087 - 1090.
- Stallknecht, D. E., Kearney, M. T., Shane, S. M., und P. J. Zwank (1990a): Effects of pH, temperature, and salinity on persistence of avian influenza viruses in water. *Avian Dis* 34: 412 - 418.
- Stallknecht, D. E., und S. M. Shane (1988): Host range of avian influenza virus in free-living birds. *Vet Res Commun* 12: 125 - 141.
- Stallknecht, D. E., Shane, S. M., Kearney, M. T. P., und J. Zwank (1990b): Persistence of avian influenza viruses in water. *Avian Dis* 34: 406 - 411.
- Starick, E., und O. Werner (2003): Detection of H7 avian influenza virus directly from poultry specimens. *Avian Dis* 47: 1187 - 1192.
- Starick, E., Beer, M., Hoffmann, B., Staubach, C., Werner, O., Globig, A., Strebelow, G., Grund, C., Durban, M., Conraths, F. J., Mettenleiter, T., und T. Harder (2008): 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.* 128: 243 - 252.
- Starick, E., Römer-Oberdörfer, A., und O. Werner (2000): Type- and subtype-specific RT-PCR assays for avian influenza A viruses (AIV). *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 47: 295 - 301.
- Starick, E., Werner, O., und V. Kaden (2005): Labordiagnose der Aviären Influenza mittels Reverser Transkription (RT)-PCR. *Berl Münch Tierärztl Wochenschr* 118: 290 - 295.

- Starick, E., Werner, O., Schirmer, H., Köllner, B., Riebe, R., und E. Mundt (2006): 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* 53: 370 - 375.
- Steensels, M., Van Borm, S., Boschmans, M., und T. Van den Berg (2007): Lethality and molecular characterization of an HPAI H5N1 virus isolated from eagles smuggled from Thailand into Europe. *Avian Dis* 51: 401 - 407.
- Stettmund von Brodorotti, H., und H. Mahnel (1982): Vergleichende Untersuchungen zur UV-Empfindlichkeit von Viren. *Zentralbl Veterinaermed B* 29: 129 - 136.
- Stünzner, D., Thiel, W., Pötsch, F., und W. Sixl (1980): Isolation of influenza viruses from exotic and Central European birds. *Zbl Bakt Hyg I. Abt Orig A* 247: 8 - 17.
- Sturm-Ramirez, K. M., Ellis, T., Bousfield, B., Bissett, L., Dyrting, K., Rehg, J. E., Poon, L., Guan, Y., Peiris, M., und R. G. Webster (2004): Reemerging H5N1 influenza viruses in Hong Kong in 2002 are highly pathogenic to ducks. *J Virol* 78: 4892 - 4901.
- Suarez, D. L., Das, A., und E. Ellis (2007): Review of rapid molecular diagnostic tools for avian influenza virus. *Avian Dis* 51: 201 - 208.
- Subbarao, E. K., London, W., und B. R. Murphy (1993): A single amino acid in the PB2 gene of influenza A virus is a determinant of host range. *J Virol* 67: 1761 - 1764.
- Subbarao, K., Klimov, A., Katz, J., Regnery, H., Lim, W., Hall, H., Perdue, M., Swayne, D., Bender, C., Huang, J., Hemphill, M., Rowe, T., Shaw, M., Xu, X., Fukuda, K., und N., Cox (1998): Characterization of an avian influenza A (H5N1) virus isolated from a child with a fatal respiratory illness. *Science* 279: 393 - 396.
- Suwannakhon, N., Pookorn, S., Sanguansermisri, D., Chamnanpood, C., Chamnanpood, P., Wongvilairat, R., Pongcharoen, S., Niomsup, P. R., Kunthalert, D., und P. Sanguansermisri (2008): Genetic characterization of nonstructural genes of H5N1 avian influenza viruses isolated in Thailand in 2004-2005. *Southeast Asian Trop. Med Public Health* 39: 837 - 847.

-
- Swayne, D. E. (2006): Principles for vaccine protection in chickens and domestic waterfowl against avian influenza: emphasis on Asian H5N1 high pathogenicity avian influenza. *Ann N Y Acad Sci* 1081: 174 - 181.
- Swayne, D. E. (2007): Understanding the complex pathobiology of high pathogenicity avian influenza viruses in birds. *Avian Dis* 51: 242 - 249.
- Swayne, D. E., und D. A. Halvorson (2008): Influenza. In: „Diseases of Poultry, 12th edition“. Herausgegeben von Y. M. Saif, A. M. Fadly, J. R. Glisson, L. R. Mc Dougald, L. K. Nolan und D. E. Swayne. Blackwell Publishing, Iowa, Oxford, Victoria. Seiten 75 - 100.
- Swayne, D. E., Beck, J. R., Perdue, M. L., Brugh, M., und R. D. Slemons (1996): Assessment of the ability of ratite-origin influenza viruses to infect and produce disease in rheas and chickens. *Avian Dis* 40: 438 - 447.
- Swayne, D. E., und D. L. Suarez (2000): Highly pathogenic avian influenza. *Rev Sci Tech* 19: 463 - 482.
- Tanimura, N., Tsukamoto, K., Okamatsu, M., Mase, M., Imada, T., Nakamura, K., Kubo, M., Yamaguchi, S., Irishio, W., Hayashi, M., Nakai, T., Yamauchi, A., Nishimura, M., und K. Imai (2006): Pathology of Fatal Highly Pathogenic H5N1 Avian Influenza Virus Infection in Large-billed Crows (*Corvus macrorhynchos*) during the 2004 Outbreak in Japan. *Vet Pathol* 43: 500 - 509.
- Taubenberger, J. K., Reid, A. H., Lourens, R. M., Wang, R., Jin, G., und T. G. Fanning (2005): Characterization of the 1918 influenza virus polymerase genes. *Nature* 437: 889 - 893.
- Taylor, H. R., und A. J. Turner (1977): A case report of fowl plague keratoconjunctivitis. *BJO* 61: 86 - 88.
- Teifke, J. P., Klopffleisch, R., Globig, A., Starick, E., Hoffmann, B., Wolf, P. U., Beer, M., Mettenleiter, T. C., und T. C. Harder (2007): Pathology of natural infections by H5N1 highly pathogenic avian influenza virus in mute (*Cygnus olor*) and whooper (*Cygnus Cygnus*) swans. *Vet Pathol* 44: 137 - 143.

- Temple, S. A. (1987): Do predators always capture substandard individuals disproportionately from prey populations? *Ecology* 63: 669 - 674.
- Terregino, C., Dilani, A., Capua, I., Marino, A. M., und N. Cavaliere (2006): Highly pathogenic avian influenza H5N1 subtype in mute swans in Italy. *Vet Rec* 158: 491.
- Thompson, P. N., Sinclair, M., und B. Ganzevoort (2008): Risk factors for seropositivity to H5 avian influenza virus in ostrich farms in the Western Cape Province, South Africa. *Prev Vet Med* 86: 139 - 152.
- Toro, H., Saucedo, C., Borie, C., Gough, R. E., und H. Alcaïno (1999): Health status of free-living pigeons in the city of Santiago. *Avian Pathol* 28: 619 - 623.
- Tran, T. H., Nguyen, T. L., Nguyen, T. D., Luong, T. S., Pham, P. M., Nguyen, V. C., Pham, T. S., Vo, C. D., Le, T. Q., Ngo, T. T., Dao, B. K., Le, P. P., Nguyen, T. T., Hoang, T. L., Cao, V. T., Le, T. G., Nguyen, D. T., Le, H. N., Nguyen, K. T., Le, H. S., Le, V. T., Christiane, D., Tran, T. T., Menno de, J., Schultsz, C., Cheng, P., Lim, W., Horby, P., Farrar, J., and the World Health Organization International Avian Influenza Investigative Team (2004): Avian influenza A (H5N1) in 10 patients in Vietnam. *N Engl J Med* 350: 1171 - 1172.
- Tweed, S. A., Skowronski, D. M., David, S. T., Larder, A., Petric, M., Lees, W., Li, Y., Katz, J., Kraïden, Tellier, R., Halpert, C., Hirst, M., Astell, C., Lawrence, D., und A. Mak (2004): Human illness from Avian influenza H7N3, British Columbia. *Emerg Infect Dis* 10: 2196 - 2199.
- Tyrrell, D. A. J., und F. L. Horsfall (1952): A procedure which eliminates nonspecific inhibitor from human serum but does not affect specific antibodies against influenza viruses. *J Immunol* 69: 563 - 574.
- Uchida, Y., Chaichoune, K., Wiriyarat, W., Watanabe, C., Hayashi, T., Patchimasiri, T., Nuanrichay, B., Parchariyanon, S., Okamatsu, M., Tsukamoto, K., Takemae, N., Ratanakorn, P., Yamaguchi, S., und T. Saito (2008): Molecular epidemiological analysis of highly pathogenic avian influenza H5N1 subtype isolated from poultry and wild bird in Thailand. *Virus Res* 138: 70 - 80.

- Ungchusak, K., Auewarakul, P., Dowell, S. F., Kitphati, R., Auwanit, W., Puthavathana, P., Uprasertkul, M., Boonnak, K., Pittayawonganon, C., Cox, N. J., Zaki, S. R., Thawatsupha, P., Chittaganpitch, M., Khontong, R., Simmerman, J. M., und S. Chunsutthiwat (2005): Probable person-to-person transmission of avian influenza A (H5N1). *N Engl J Med* 352: 333 - 340.
- Van Borm, S., Steensels, M., Ferreira, H. L., Boschmans, M., De Vriese, J., Lambrecht, B., und T. van den Berg (2007): A universal avian endogenous real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction control and its application to avian influenza diagnosis and quantification. *Avian Dis* 51: 213 - 220.
- Van Borm, S., Thomas, I., Hanquet, G., Lambrecht, B., Boschmans, M., Dupont, G., De caestecker, M., Snacken, R., und T. van den Berg (2005): Highly pathogenic H5N1 influenza virus in smuggled Thai eagles, Belgium. *Emerg Infect Dis* 11: 702 - 705.
- Van Maanen, C., und A. Cullinane (2002): Equine influenza virus infections: an update. *Vet Q* 24: 79 - 94.
- Vater, G. (1998): Wie viele Tauben gibt es in mitteleuropäischen Städten? Umfrageergebnisse und Hintergründe. *Prak Schädlingsbek* 5: 12 - 17.
- Velumani, S., Du, Q., Fenner, B. J., Prabakaran, M., Wee, L. C., Nuo, L. Y., und J. Kwang (2008): Development of an antigen-capture ELISA for detection of H7 subtype avian influenza from experimentally infected chickens. *J Virol Methods* 147: 219 - 225.
- Vicente, M., Fernandez, M. V., Perez-Breña, M. P., Valle, E., und R. Najera (1973): Antibodies against human types A and B influenzaviruses in the sera of animals in Spain. *Bull Wld Hlth Org* 48: 378 - 380.
- Villarreal-Chávez, C., und E. Rivera-Cruz (2003): An update on avian influenza in Mexico. *Avian Dis* 47: 1002 - 1005.
- Vong, S., Coghlan, B., Mardy, S., Holl, D., Seng, H., Ly, S., Miller, M. J., Buchy, P., Froehlich, Y., Dufourcq, J. B., Uyeki, T. M., Lim, W., und T. Sok (2006): Low frequency of poultry-to-human H5N1 virus transmission, southern Cambodia, 2005. *Emerg Infect Dis* 12: 1542 - 1547.

- Wan, H., und D. R. Perez (2006): Quail carry sialic acid receptors compatible with binding of avian and human influenza viruses. *Virology* 346: 278 - 286.
- Wang, H., Feng, Z., Shu, Y., Yu, H., Zhou, L., Zu, R., Huai, Y., Dong, J., Bao, C., Wen, L., Wang, H., Yang, P., Zhao, W., Dong, L., Zhou, M., Liao, Q., Yang, H., Wang, M., Lu, X., Shi, Z., Wang, W., Gu, L., Zhu, F., Li, Q., Yin, W., Yang, W., Li, D., Uyeki, T. M., und Y. Wang (2008a): Probable limited person-to-person transmission of highly pathogenic avian influenza A (H5N1) virus in China. *Lancet* 371: 1427 - 1434.
- Wang, J., Vijaykrishna, D., Duan, L., Bahl, J., Zhang, J. X., Webster, R. G., Peiris, J. S., Chen, H., Smith, G. J., und Y. Guan (2008): Identification of the progenitors of Indonesian and Vietnamese avian influenza A (H5N1) viruses from southern China. *J. Virol* 82: 3405 - 3414.
- Weber, S., Harder, T., Starick, E., Beer, M., Werner, O., Hoffmann, B., Mettenleiter, T. C., und E. Mundt (2007): Molecular analysis of highly pathogenic avian influenza virus of subtype H5N1 isolated from wild birds and mammals in northern Germany. *J Gen Virol* 88: 554 - 558.
- Webster, R. G., und W. J. Bean (1978): Genetics of influenza virus. *Annu Rev Genet* 12: 415 - 431.
- Webster, R. G., Bean, W. J., Gorman, O. T., Chambers, T. M., und Y. Kawaoka (1992): Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiol Rev* 56: 152 - 179.
- Webster, R. G., Geraci, J., Petursson, G., und K. Skirnisson (1981): Conjunctivitis in human beings caused by influenza A viruses of seals. *New Engl J Med* 304: 911.
- Webster, R. G., Kawaoka, Y., und W. J. Bean Jr (1986): Molecular changes in A/chicken/Pennsylvania/83 (H5N2) influenza virus associated with acquisition of virulence. *Virology* 149: 165 - 173.
- Webster, R. G., Yakhno, M., Hinshaw, V. S., Bean, W. J., und K. G. Murti (1978): Intestinal influenza: replication and characterization of influenza viruses in ducks. *Virology* 84: 268 - 278.

-
- Wei, H.-L., Bai, G.-R., Mweene, A. S., Zhou, Y.-C., Cong, Y.-L., Pu, J., Wang, S., Kida, H., und J.-H. Liu (2006): Rapid detection of avian influenza virus A and subtype H5N1 by single step multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction. *Virus Genes* 32: 261 - 267.
- Weidenmüller, H. (1950): Zur Frage der Infektiösität und Pathogenität des Virus N (Hühnerpest). II. Mitteilung: Die Pathogenität des Virus N für Küken, weiße Mäuse und Tauben. *Tierärztl Umsch* 5: 327 - 329.
- Werner, O., Römer-Oberdörfer, A., Köllner, B., Manvell, R. J., und D. J. Alexander (1999): Characterization of avian paramyxovirus type 1 strains isolated in Germany during 1992 to 1996. *Avian Pathol* 28: 79 - 88.
- Werner, O., Starick, E., Teifke, J., Klopffleisch, R., Prajitno, T. Y., Beer, M., Hoffmann, B., und T. C. Harder (2007): Minute excretion of highly pathogenic avian influenza virus A/chicken/Indonesia/2003 (H5N1) from experimentally infected domestic pigeons (*Columba livia*) and lack of transmission to sentinel chickens. *J Gen Virol* 88: 3089 - 3093.
- Westerlage, A. (1986): Untersuchung zur Aktivität und Raumnutzung von Stadttauben. Hann. TU, prakt. Hausarbeit zur fachwissenschaftlichen Prüfung für das Lehramt an Gymnasien.
- WHO (2006): Avian influenza – Situation in Indonesia – Update 31. URL: http://www.who.int/csr/don/2006_09_14/en/index.html. (Eingesehen am 19.01.2010)
- WHO (2009): Continuing progress towards a unified nomenclature system for the highly pathogenic H5N1 avian influenza viruses; updated March 2009. URL: http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/guidelines/nomenclature/en/print.html. (Eingesehen am 19.01.2010)
- Wise, M. G.; Suarez, D. L.; Seal, B. S.; Pedersen, J. C.; Senne, D. A.; King, D. J.; Kapczynski, D. R., und E. Spackman (2004): Development of a real-time reverse transcription PCR for detection of newcastle disease virus RNA in clinical samples. *J Clin Microbiol* 42: 329 - 338.

- Wong, S. S. Y., und K-Y. Yuen (2006): Avian Influenza virus infections in humans. *Chest* 129: 156 - 168.
- Woolcock, P. R., und C. J. Cardona (2005): Commercial immunoassay kits for the detection of influenza virus type A: evaluation of their use with poultry. *Avian Dis* 49: 477 - 481.
- Wu, R., Hu, S., Xiao, Y., Li, Z., Shi, D., und D. Bi (2007): Development of indirect enzyme-linked immunosorbent assay with nucleoprotein as antigen for detection and quantification of antibodies against avian influenza virus. *Vet Res Commun* 31: 631 - 641.
- Xie, Z., Pang, Y. S., Liu, J., Deng, X., Tang, X., Sun, J., und M. I. Khan (2006): A multiplex RT-PCR for detection of type A influenza virus and differentiation of avian H5, H7, and H9 hemagglutinin subtypes. *Mol Cell Probes* 20: 245 - 249.
- Xu, C., Fan, W., Wie, R., und H. Zhao (2004): Isolation and identification of swine influenza recombinant A/Swine/Shandong/1/2003(H9N2) virus. *Microbes Infect* 6: 919 - 925.
- Xu, X., Subbarao, K., Cox, N. J., und Y. Guo (1999): Genetic characterization of the pathogenic influenza A/Goose/Guangdong/1/96 (H5N1) virus: similarity of its hemagglutinin gene to those of H5N1 viruses from the 1997 outbreaks in Hong Kong. *Virology* 261: 15 - 19.
- Yamada, S., Suzuki, Y., Suzuki, T., Le, M. Q., Nidom, C. A., Sakai-Tagawa, Y., Muramoto, Y., Ito, M., Kiso, M., Horimoto, T., Shinya, K., Sawada, T., Kiso, M., Usui, T., Murata, T., Lin, Y., Hay, A., Haire, L. F., Stevens, D. J., Russell, R. J., Gambelin, S. J., Skehel, J. J., und Y. Kawaoka (2006): Haemagglutinin mutations responsible for the binding of H5N1 influenza A viruses to human-type receptors. *Nature* 444: 378 - 382.
- Yamamoto, Y., Nakamura, K., Okamatsu, M., Miyazaki, A., Yamada, M., und M. Mase (2008): Detecting avian influenza virus (H5N1) in domestic duck feathers. *Emerg Infect Dis* 14: 1671 - 1672.
- Yilmaz, A., und E. F. Kaleta (2004): Zur Tenazität und Desinfektion von aviären Influenza A Viren. *Lohmann Information* 3: 1 - 6.

-
- Yu, Z., Song, Y., Zhou, H., Xu, X., Hu, Q., Wu, H., Zhang, A., Zhou, Y., Chen, J., Dan, H., Luo, Q., Li, X., Chen, H., und M. Jin (2007): Avian influenza (H5N1) virus in waterfowl and chickens, central China. *Emerg Infect Dis* 13: 772 - 775.
- Yuen, K. Y., Chan, P. K., Peiris, M., Tsang, D. N., Que, T. L., Shortridge, K. F., Cheung, P. T., To, W. K., Ho, E. T., Sung, R., und A. F. Cheng (1998): Clinical features and rapid viral diagnosis of human disease associated with avian influenza A H5N1 virus. *Lancet* 351: 467 - 471.
- Zhang, A., Jin, M., Liu, F., Guo, X., Hu, Q., Han, L., Tan, Y., und H. Chen (2006): Development and evaluation of a DAS-ELISA for rapid detection of avian influenza viruses. *Avian Dis* 50: 325 - 330.
- Zhou, E. M., Chan, M., Heckert, R. A., Riva, J., und M. F. Cantin (1998): Evaluation of a competitive ELISA for detection of antibodies against avian influenza virus nucleoprotein. *Avian Dis* 42: 517 - 522.
- Zhou, E. M., Chan, M., Heckert, R. A., Riva, J., und M. F. Cantin (2003): A competitive enzyme-linked immunosorbent assay for avian influenza serological surveillance. *Avian Dis* 47: 305 - 312.
- Zhu, Q. Y., Qin, E. D., Wang, W., Yu, J., Liu, B. H., Hu, Y., Hu, F., und W. C. Cao (2006): Fatal infection with influenza A virus in China. *N Engl J Med* 354: 2731 - 2732.
- Zohari, S., Gyarmati, P., Thorén, P., Czifra, G., Bröjer, C., Belák, S., und M. Berg (2008): Genetic characterization of the NS gene indicates co-circulation of two sublineages of highly pathogenic avian influenza virus of H5N1 subtype in Northern Europe in 2006. *Virus Genes* 36: 117 - 125.
- Zupancic, Z., Ugrcic, I., Jelavic, V., Ivesa-Petricevic, S., Greguric, J., Jukic, B., und S. Smerdel (1986): Antibodies for human influenza type A virus in bird sera. *Veterinarski Arhiv* 56: 217 - 225.

Publikationsverzeichnis

Teile der Arbeit wurden bereits auf den unten genannten Kongressen/Tagungen vorgestellt und in den Proceedings/Tagungsberichten veröffentlicht:

Vorträge

Kohls, A., Lierz, M., Lüscho, D., Prusas, C. und H. M. Hafez (2007): Aviäre Influenzaviren bei synantropen Tauben, bei Greifvögeln und deren Beutewild sowie bei Falknern. Kongressband des 2. Doktoranden – Symposiums in Berlin: 16 - 17.

Kohls, A., Hafez, H. M., Jansen, A., Lierz, P., Lüscho, D., Schweiger, B. und M. Lierz (2009): Influenza virus risk assessment in falconry. Proceedings of the 10th European AAV Conference/8th Scientific ECAMS Meeting in Antwerp: 95.

Kohls, A., Lierz, M., Lierz, P., Lüscho, D., Schweiger, B. und H. M. Hafez (2009): Epidemiological investigation of avian influenza viruses in pigeons, in raptors, their prey as well as in falconers. Proceedings of the 16th Congress of the WVPA in Marrakesh: 211.

Kohls, A., Lierz, M., Lierz, P., Lüscho, D., Schweiger, B. und H. M. Hafez (2010): Untersuchungen zum Vorkommen von aviären Influenzaviren bei synantropen Tauben, bei Beizvögeln, deren Beutewild sowie bei Falknern. Proceedings der 16. DVG-Tagung über Vogelkrankheiten in München: 83 - 90.

Poster

Kohls, A., Lierz, M., Lüscho, D., Prusas, C. und H. M. Hafez (2008): Aviäre Influenzaviren bei synantropen Tauben, bei Greifvögeln und deren Beutewild sowie bei Falknern. Kongressband des 3. Doktoranden - Symposiums Berlin: 64.

Anhang 1

Verbrauchsmaterial und Geräte

1. Für die Entnahme und Asservierung der Proben (Kapitel 3.3 und 3.4)

Verbrauchsmaterial/Gerät	Firma
Einkanal-Pipette „Reference [®] “, 100 – 1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg
Einmalpipettenspitzen „Plastibrand [®] “, 10 – 200 µl	Brand GmbH & Co, Wertheim
Einmalpipettenspitzen „Safeseal-Tips [®] “	Biozym, Hessisch Oldendorf
Einmalimpfeschlingen, 10µl	Greiner Bio-One GmbH Frickenhausen
Gefrierschrank	National Lab GmbH, Mölln
Gefrierschrank „Forma [®] -86C Freezer“, Model 917	Thermo Fisher Scientific Inc., Karlsruhe
Hautdesinfektionsmittel „Kodan [®] Tinktur forte“	Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt
Standard Safe-Lock-Zentrifugengefäße, 2 ml	Eppendorf AG, Hamburg
Sterile Einmalkanülen „Terumo [®] “, 0,6 x 30mm	BSN Medical, Hamburg
„Vacuette [®] “ Blutentnahme-Set	Greiner Bio-One GmbH Frickenhausen
Universal Pflaster Hansaplast	Beiersdorf AG, Hamburg
Serumröhrchen	Vet Med Labor GmbH, Ludwigsburg
Serumröhrchen „Kabevette [®] G“	Kabe Labortechnik GmbH, Nümbrecht-Elsenroth
Sicherheitswerkbank „Hera Safe“	Thermo Electron LED GmbH, Langenselbold
Sterile Wattestäbchen	Paul Boettger oHG, Bodenmais
Tupfer „Bakterietten [®] “	EM-TE Vertrieb, Hamburg
Zentrifuge „Minifuge GL“	Heraeus Holding GmbH, Hanau

2. Für die Virologischen Untersuchungen (Kapitel 3.5)

Verbrauchsmaterial/Gerät	Firma
Columbia-Agar mit Schafsblut	Oxoid, Wesel
Eierbrutschrank	Ehret GmbH, Emmendingen
Eierbrutschrank (Typ TC 2004M)	Hemel Brutgeräte GmbH & Co KG, Verl
Einkanal-Pipette „Reference [®] “, 10 – 100 µl	Eppendorf AG, Hamburg
Einmalimpfeschlingen, 10 µl	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Einmalpipettenspitzen „Plastibrand [®] “, 10 – 200 µl	Brand GmbH & Co, Wertheim

Desinfektionsmittel „AHD 2000 [®] (Ethanol 96%)“	Lysoform Dr. Hans Rosemann GmbH, Berlin
Gefrier-Kühlkombination Liebherr Premium (KD 3164)	Liebherr-Hausgeräte Ochsenhausen-GmbH, Ochsenhausen
Kühlschrank	Liebherr-Hausgeräte Ochsenhausen-GmbH, Ochsenhausen
Mehrkanal-Pipette „Research [®] “, 8 Kanäle, 10 – 100 µl	Eppendorf AG, Hamburg
Mikrotiterplatten 96 K	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Petrischalen (Durchmesser 10 cm)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Standard Safe-Lock-Zentrifugengefäße, 2 ml	Eppendorf AG, Hamburg
Schierlampe	Hemel Brutgeräte GmbH & Co KG, Verl
Sterile Einmalspritzen „Omnifix [®] “, 2 ml	B. Braun Melsungen GmbH, Melsungen
Valo-SPF-Bruteier	Lohmann Tierzucht GmbH, Cuxhaven
Sterile Einmalfeindosierungsspritzen mit integrierter Kanüle „Omnican [®] F“, 1 ml	B. Braun Petzold GmbH, Melsungen
Sterilfilter FP 30, Porengröße 0,45 µm	Schleicher & Schüll GmbH, Dassel

3. Für die Molekularbiologischen Untersuchungen (Kapitel 3.6)

Verbrauchsmaterial/Gerät	Firma
Automatisches Extraktionsgerät „QIAcube [®] “	Qiagen GmbH, Hilden
Einmalpipettenspitzen für „QIAcube [®] “, 1000 µl	Qiagen GmbH, Hilden
Einmalpipettenspitzen „Safeseal-Tips [®] Premium“, 10 µl	Biozym, Hessisch Oldendorf
Einmalpipettenspitzen „Safeseal-Tips [®] Premium“, 100 µl	Biozym, Hessisch Oldendorf
Einmalpipettenspitzen „Safeseal-Tips [®] Premium“, 1000 µl	Biozym, Hessisch Oldendorf
Einkanal-Pipette „Pipetman [®] P10“, 1 - 10 µl	Gilson S.A.S., Villiers Le Bel, Frankreich
Einkanal-Pipette „Pipetman [®] P100“, 20 - 100 µl	Gilson S.A.S., Villiers Le Bel, Frankreich
Einkanal-Pipette „Pipetman [®] P1000“, 20 - 1000 µl	Gilson S.A.S., Villiers Le Bel, Frankreich
Elektrophoresekammer „Horizon [®] “	Lifetechnologies [™] Gibco Brl, Galthersburg, USA
Geldokumentationssystem „Bio Hood II“ und die dazugehörige Software „Quantity One [®] “	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
iScript [™] One-Step RT-PCR Kit for Probes	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Primer	Biomers.Net GmbH, Ulm
Probengefäße „CB“ für QIAcube [®] , 2 ml (Schraubverschluss, konischer Boden mit Stehrand)	Qiagen GmbH, Hilden
PuReTaq [™] Ready-To-Go PCR-Beads	GE Healthcare UK Limited, Little Chalfont, UK

QIAamp [®] Viral RNA Mini Kit	Qiagen GmbH, Hilden
Qiagen One-Step RT-PCR Kit	Qiagen GmbH, Hilden
QuantiTect [®] Probe RT-PCR Kit	Qiagen GmbH, Hilden
Reaktionsgefäße 0,2 ml, dünnwandig	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Reaktionsgefäße 0,5 ml, dünnwandig	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Reagenzgefäße für QIAcube [®] , 30 ml	Qiagen GmbH, Hilden
Reagenzgefäßhalterung für QIAcube [®]	Qiagen GmbH, Hilden
Real-time PCR Gerät „iCycler iQ [™] “ und die dazugehörige Software	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Rotoradaptatoren für QIAcube [®]	Qiagen GmbH, Hilden
Rotoradaptatorenhalterung für QIAcube [®]	Qiagen GmbH, Hilden
Sicherheitswerkbank „Hera Safe [®] “, Typ HS12	Thermo Electron LED GmbH, Langenselbold
Standard Safe-Lock-Zentrifugengefäße, 1,5 ml	Eppendorf AG, Hamburg
Standard Safe-Seal-Zentrifugengefäße, 1,5 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Standard Safe-Lock-Zentrifugengefäße, 2 ml	Eppendorf AG, Hamburg
Thermocycler „T3“	Biometra [®] biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen
Vortex-Genie [™]	Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz
Zentrifuge (Typ 5415C)	Eppendorf AG, Hamburg

4. Für die serologischen Untersuchungen (Kapitel 3.7)

Agargelpräzipitationstest (AGP)

Verbrauchsmaterial/Gerät	Firma
Autoklav	System GmbH, Wetzlar
Einkanal-Pipette „Reference [®] “, 10 – 100 µl	Eppendorf AG, Hamburg
Einmalpipettenspitzen „Plastibrand [®] “, 10 – 200 µl	Brand GmbH & Co, Wertheim
Magnetrührer (MR 3001)	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach
Membranvakuumpumpe (Typ MZ 2C)	Vacuubrand GmbH & Co, Wertheim
pH-Meter „Handylab pH11“	Schott Geräte GmbH, Mainz
Präzipitationsagar „Bacto [™] Agar“	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Pasteurpipetten aus Glas (ca. 145mm)	Brand GmbH & Co, Wertheim
Petrischalen (Durchmesser 8,5 cm)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Vakuummkammer	Kartell, Noviglio, Italien
Waage (Typ 2254)	Sartorius Werke GmbH, Göttingen
Zentrifuge (Typ 5415C)	Eppendorf AG, Hamburg

Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Verbrauchsmaterial/Gerät	Firma
96-well Mikrotiterplatte, V-Boden	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Brutschrank „Thermo Scientific B15“	Thermo Electron LED GmbH, Langenselbold
Einkanal-Pipette „Reference [®] “, 10 – 100 µl	Eppendorf AG, Hamburg
Einmalpipettenspitzen „Plastibrand [®] “, 10 – 200 µl	Brand GmbH & Co, Wertheim
ELISA-Reader „MRX“	Dynex Technologies, Denkendorf
IDscreen [®] Influenza A Antibody Competition	ID Vet, Montpellier, Frankreich
Mehrkanalpipette „Research [®] “, 8 Kanäle, 10 – 100 µl	Eppendorf AG, Hamburg
Revelation V. 3.04	Dynex Technologies, Denkendorf
Zentrifuge (Typ 5415C)	Eppendorf AG, Hamburg

Hämagglutinationshemmtest (HAH)

Verbrauchsmaterial/Gerät	Firma
96-well Mikrotiterplatte, V-Boden	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Einkanal-Pipette „Reference [®] “, 10 – 100 µl	Eppendorf AG, Hamburg
Einmalpipettenspitzen „Plastibrand [®] “, 10 – 200 µl	Brand GmbH & Co, Wertheim
Kühlschrank	Liebherr-Hausgeräte GmbH, Ochsenhausen
Mehrkanalpipette „Research [®] “, 8 Kanäle, 10 – 100 µl	Eppendorf AG, Hamburg
Schüttelmaschine „LS 10“	C. Gerhardt GmbH & Co. KG, Königswinter
Standard Safe-Seal-Zentrifugengefäße, 1,5 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Wasserbad	Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel
Zentrifuge (Typ 5415C)	Eppendorf AG, Hamburg

Mikroneutralisationstest (MNT)

Verbrauchsmaterial/Gerät	Firma
96 well Zellkulturplatte „Costar [®] “	Corning Inc., New York, USA
Abdeckfilm für Mikrotiterplatten „Linbro [®] “	MB Biomedicals LLC, Eschwege
Absaugvorrichtung „Vacusafe Comfort“	IBS Integra Biosciences
CO ₂ - Brutschrank „Haraeus [®] “ Typ B6200	Thermo Fisher Scientific Inc., Karlsruhe
CO ₂ - Brutschrank „Hera Cell 240“	Thermo Fisher Scientific Inc., Karlsruhe
Einkanal-Pipette „Finnpipette [®] “, 100 – 1000µl	Thermo Fisher Scientific Inc., Karlsruhe
Einkanal-Pipette „Finnpipette [®] “, 20 – 200 µl	Thermo Fisher Scientific Inc., Karlsruhe
Einkanal-Pipette „Finnpipette [®] “, 4 – 20 µl	Thermo Fisher Scientific Inc., Karlsruhe

Einmal-Kunststoffpipette „Falcon®“ 10 ml	Becton Dickinson Labware Europe, Le Pont De Claix, Frankreich
Mehrkanalpipette „Equalizer“, 1250 µl, 8 Kanäle	Thermo Fisher Scientific Inc., Karlsruhe
Mehrkanalpipette „Finnpipette®“, 50 - 300 µl	Thermo Fisher Scientific Inc., Karlsruhe
Mikroskop „Medical“	Askania Mikroskop Technik GmbH, Rathenow
Einmalpipettenspitzen „Finntip® 250 wide“	Thermo Fisher Scientific Inc., Karlsruhe
Einmalpipettenspitzen „Finntip® 1000 wide“	Thermo Fisher Scientific Inc., Karlsruhe
Einmalpipettenspitzen für „Equalizer“	Thermo Fisher Scientific Inc., Karlsruhe
ELISA-Reader „Titertek Multiscan® Plus“	Labsystems
Mehrkanal-Pipette „Finnpipette®“, 50 - 300 µl	Thermo Fisher Scientific Inc., Karlsruhe
Mikroskop „Nikon Eclipse TS 100“	Askania Mikroskop Technik GmbH, Rathenow
Pipettierhilfe „Accu-jet® pro“	Brand GmbH & Co, Wertheim
Sicherheitswerkbank „Biogard Hood“	The Baker Company Inc., Sanford, USA
Sicherheitswerkbank „Hera Safe®“, Typ KS12	Thermo Electron LED GmbH, Langenselbold
Vorverdünnungsröhrchen 1,4 ml	Thermo Fisher Scientific Inc., Karlsruhe
Zellkulturflasche 75qcm	TPP AG, Trasadingen, Schweiz

Anhang 2

Chemikalien und vorgefertigte Reagenzien Medien und Pufferlösungen

1. Für die Asservierung der Tupferproben der Vögel (Kapitel 3.4)

Chemikalie/Reagenz	Hersteller	Zusammensetzung	
Benzyl-Penicillin	Biochrom AG, Berlin	Benzyl-Penicillin	1664 IU/mg
Streptomycin-Sulfat	Biochrom AG, Berlin	Streptomycin-Sulfat	761 IU/mg

Medium/Pufferlösung	Zusammensetzung	
Antibiotikalösung	Benzyl-Penicillin	1,2 g
	Streptomycin-Sulfat	2,6 g
	NaCl	100 ml
PBS (pH 7,4)	NaCl	137 mM
	KCl	1,47 mM
	KH ₂ PO ₄	1,47 mM
	Na ₂ HPO ₄	6,46 mM

2. Für den Hämagglutinations- und Hämagglutinationshemmtest (Kapitel 3.5.2, 3.5.3 und 3.7.3)

Medium/Pufferlösung	Zusammensetzung	
PBS (pH 7,4)	NaCl	137 mM
	KCl	1,47 mM
	KH ₂ PO ₄	1,47 mM
	Na ₂ HPO ₄	6,46 mM

3. Für die Molekularbiologischen Untersuchungen (Kapitel 3.6)

Medium/Pufferlösung	Zusammensetzung	
Größenmarker 100 bp	100 bp DNA Ladder	30 µl
	Probenladepuffer	30 µl
	Aqua bidest	138 µl
Probenladepuffer	Bromphenolblau	0,25 ml
	Xylencyanol	0,25 ml
	Glycerin	30ml
	TBE (4x)	Ad 100 ml
TBE-Puffer (pH 7,5)	Tris	89 mM
	Borsäure	89 mM
	EDTA Dinatriumsalz	2 mM

4. Für die serologischen Untersuchungen (Kapitel 3.7)

Mikroneutralisationstest

Chemikalie/Reagenz	Hersteller	Zusammensetzung	
1°-Antikörper: Anti-NP mouse monoclonal Antibody	CDC		
2°-Antikörper: Goat anti-mouse Ig G conjugated to horseradish peroxidase	Kirkegaard and Perry		
Aceton	Merck, Darmstadt		
BSA 30%	PAA Laboratories GmbH, Pasching	Bovines Serum Albumin	30%
Chromogen TMB	Dade Behring Marburg GmbH, Marburg	Tetramethylbenzidin-dihydrochlorid	5 g/l
EMEM (pH 7,2)	Gibco® Invitrogen	MEM Earl-Salze Glutamin NaHCO ₃	
FKS	PAN™ Biotech GmbH, Aidenbach	Fötales Kälberserum	
Gentamycin	PAN™ Biotech GmbH, Aidenbach	Gentamycin	10 mg/ml

Glutamin (100x)	PAA Laboratories GmbH, Pasching	L-Glutamin NaCl	200 nM 100 ml
NEAA (100x) (Non Essential Amino Acids)	PAA Laboratories GmbH, Pasching	L-Alanin L-Asparagin L-Aspatatsäure L-Glutamatsäure L-Glyzin L-Prolin L-Serin	890 mg/l 1320 mg/l 1330 mg/l 1470 mg/l 750 mg/l 1150 mg/l 1050 mg/l
Puffer/Substrat TMB (pH 4,1)	Dade Behring Marburg GmbH, Marburg	Wasserstoffperoxid	0,1 g/l
Stopplösung POD	Dade Behring Marburg GmbH, Marburg	Schwefelsäure	0,5 N
TPCK - Trypsin	Sigma Chemical Co.		50mg/kg
Trypsin-EDTA	PAA Laboratories GmbH, Pasching	Trypsin EDTA (Titrplex III) PBS (ohne Ca und Mg)	0,5 mg/ml 0,22 mg/ml 100 ml
Tween - 20	Merck Schuchardt OHG, Hohenbrunn		

Medium/Pufferlösung	Zusammensetzung
Blockingpuffer	PBS (pH7,2) 483 ml
	BSA 30% 16,5 ml
	Tween-20 0,5 ml
Diluent	EMEM 23,875ml
	FKS 2%
	Gentamycin 0,5%
	Glutamin 1%
	NEAA 1%
Enzymsubstrat	Puffer/Substrat TMB 10 ml
	Chromogen 1 ml
Erhaltungsmedium 2%	FKS 2%
	Gentamycin 0,5%
	Glutamin 1%
	NEAA 1%
	EMEM (pH 7,2) ad 500 ml

Fixierlösung	Aceton	12 ml
	PBS 0,01M (pH 7,2)	3 ml
Wachstumsmedium 10%	FKS	10%
	Gentamycin	0,5%
	Glutamin	1%
	NEAA	1%
	EMEM (pH 7,2)	ad 500 ml
PBS 0,01M (pH 7,2)	NaCl	8 g
	KCl	0,2 g
	Na ₂ HPO ₄	1,44g
	KH ₂ PO ₄	0,24 g
	Aqua dest.	Ad 1 l
PBS (pH 7,2)	NaCl	8,2 g
	KCl	0,2 g
	Na ₂ HPO ₄ ·2 H ₂ O	1,15 g
	Na ₂ HPO ₄ ·2 H ₂ O	1,15 g
	Bidest	1000 ml

Anhang 3

Inhalte der verwendeten Kits

1. Für die Molekularbiologischen Untersuchungen (Kapitel 3.6)

QIAamp[®] Viral RNA Mini Kit

QIAamp[®] Mini Spin Säulen, Auffanggefäße, Lysispuffer AVL, Waschpuffer AW 1 und AW 2, Elutionspuffer AVE, Carrier RNA (poly A)

QuantiTect[®] Probe RT-PCR Kit

2x QuantiTect Probe RT-PCR Master Mix (enthält HotStarTaq[®] DNA Polymerase, QuantiTect[®] Probe RT-PCR Puffer, dNTP-Mix inklusive dUTP, ROX passive reference dye und 8 mM MgCl₂), QuantiTect RT Mix (enthält Omniscript[®] Reverse Transcriptase und Sensiscript[®] Reverse Transcriptase), RNasefreies Wasser

iScript[™] One-Step RT-PCR Kit for Probes

50x iScript Reverse Transkriptase, 2x RT-PCR Reaction Mix for Probes, Nukleasefreies Wasser

2. Für die Serologischen Untersuchungen (Kapitel 3.7)

IDScreen[®] Influenza A Antibody Competition (Zulassungsnummer FLI-B 438)

Mit Nukleoprotein (inaktiviert) beschichtete Mikrotiterplatten, Meerrettich-Konjugat Anti-NP, Positivkontrolle (nicht infektiös), Negativkontrolle, Verdünnungsmittel 3, Verdünnungsmittel 13, Waschlösung (20-fach konzentriert), Substratlösung (TMB), Stopplösung (H₂SO₄ 0,5M)

Anhang 4

Fragebogen über die Beizvögel

Fragebogen über den Falkner

Probenbegleitschein zu den Beutetieren

Abbildung I: Fragebogen über den Beizvogel

ANGABEN ÜBER DEN BEIZVOGEL
1. Ringnummer:
2. Art:
3. Schlupfdatum oder Alter:
4. Geschlecht: <input type="checkbox"/> Weiblich <input type="checkbox"/> Männlich <input type="checkbox"/> Unbekannt
5. Gewicht:
6. Im Besitz seit:
7. Handaufzucht? <input type="checkbox"/> Ja <input type="checkbox"/> Nein <input type="checkbox"/> Unbekannt
8. Bitte erläutern Sie kurz, wie der Vogel gefüttert wird (z.B. welche Futtertiere, Herkunft dieser, frißt der Vogel auch die selber geschlagene Beute, usw):
9. Sind Vorerkrankungen bekannt? Falls ja, welche?
10. Wie oft wird der Vogel geflogen?

Abbildung II: Fragebogen über die Falknerin/ den Falkner

I. ANGABEN ZUR IHRER PERSON					
1. Postleitzahl der Hauptwohnung (ersten drei Ziffern): <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>		2. Geburtsdatum (Monat/Jahr): <input type="text"/> <input type="text"/> / <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>		3. Geschlecht <input type="checkbox"/> Männl. <input type="checkbox"/> Weibl.	
4. Wurden Sie die letzten 5 Jahre geimpft? Gegen <input type="checkbox"/> Grippe <input type="checkbox"/> Keine Impfung					
5. Seit wann sind Sie Falkner? Seit _____					
6. Jagen Sie auch mit der Waffe? <input type="checkbox"/> Ja <input type="checkbox"/> Nein					
7. Falls ja, Welches Wild _____					
II. ANGABEN ZUR JAGDTÄTIGKEIT					
8. In welchen Bundesländern haben Sie in den letzten 5 Jahren gejagt (Mehrfachangaben möglich)?					
Bayern Brandenburg Baden-Württemberg Berlin Bremen Hessen Hamburg					
Mecklenburg-Vorpommern Nordrhein-Westfalen Niedersachsen Sachsen					
Saarland Schleswig-Holstein Sachsen-Anhalt Thüringen Rheinland-Pfalz					
9. Denken Sie an Ihre übliche Jagdstrecke in Deutschland in den letzten Jahren. Wie viele der folgenden Tiere haben Sie dabei durchschnittlich <u>pro Jahr</u> gebeizt?					
Fasan	keins	<10	10-30	31-60	> 60
Rebhuhn	keins	<10	10-30	31-60	> 60
Möwe	keins	<10	10-30	31-60	> 60
Krähe	keins	<10	10-30	31-60	> 60
Ente	keins	<10	10-30	31-60	> 60
Wildtaube	keins	<10	10-30	31-60	> 60
Feldhase	keins	<10	10-30	31-60	> 60
Wildkaninchen	keins	<10	10-30	31-60	> 60
Füchse	keins	<10	10-30	31-60	> 60
10. Brechen Sie das erlegte Wild (Vögel) immer oder zum Teil selber auf?					
<input type="checkbox"/> Ja ⇒ und zwar ca. ___ % der erlegten Stücke <input type="checkbox"/> Nein <input type="checkbox"/> Keine Angabe					
☞ Falls Ja: Benutzen Sie dabei Handschuhe? <input type="checkbox"/> Ja, immer <input type="checkbox"/> Meistens <input type="checkbox"/> Selten <input type="checkbox"/> Nie					
☞ Haben Sie sich beim Aufbrechen schon einmal verletzt? <input type="checkbox"/> Ja <input type="checkbox"/> Nein <input type="checkbox"/> Keine Angabe					
11. Brechen Sie das erlegte Wild (Säugetiere) immer oder zum Teil selber auf?					
<input type="checkbox"/> Ja ⇒ und zwar ca. ___ % der erlegten Stücke <input type="checkbox"/> Nein <input type="checkbox"/> Keine Angabe					
☞ Falls Ja: Benutzen Sie dabei Handschuhe? <input type="checkbox"/> Ja, immer <input type="checkbox"/> Meistens <input type="checkbox"/> Selten <input type="checkbox"/> Nie					
☞ Haben Sie sich beim Aufbrechen schon einmal verletzt? <input type="checkbox"/> Ja <input type="checkbox"/> Nein <input type="checkbox"/> Keine Angabe					
12. Essen Sie Wildbret von selbst erlegtem oder gebeiztem Wild?					
<input type="checkbox"/> Ja <input type="checkbox"/> Nein <input type="checkbox"/> Keine Angabe					
☞ Falls Ja: Welches Wild?:					

Danksagungen

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dr. H. M. Hafez. Zum einen hat mir Prof. Hafez durch die Überlassung des Themas sowie der Bereitstellung von Material, Geräten und Räumlichkeiten die Erstellung dieser Dissertation ermöglicht. Mein Dank gebührt ihm jedoch insbesondere daher, als dass er sich mir gegenüber immer als überaus großzügiger und hilfsbereiter „Chef“ präsentierte, welcher mich nicht nur in beruflicher Hinsicht förderte, sondern auch immer ein offenes Ohr für private Probleme hatte und in dieser Hinsicht große Anteilnahme und Verständnis aufzeigte. Ich verdanke Prof. Hafez einen enormen Wissenszuwachs auf dem Gebiet der Geflügelkrankheiten und der Mikrobiologie, und hoffe, hiervon auch zukünftig weiter profitieren zu können.

Nicht minder viel Dank gebührt Herrn Prof Dr. M. Lierz. Seien es die vielen spannenden und außergewöhnlichen Fälle, die er mir in der Ziervogelpraxis näher gebracht hat (Stichwort: „Gelbohrrenkakadu“ und „wenn uns die Harpyie jetzt entwischt, sind wir alle in Gefahr!“), die Fahrten nach Billerbeck (Stichwort: „Polizeikontrolle“ und „Autofahren statt Schlafen“), Krefeld (stundenlang im Mais sitzen) oder Sögel zwecks Probennahme im Rahmen meiner Doktorarbeit, oder die Tatsache, dass er immer wieder über die zahlreichen, kleinen chaotischen „Ausfälle“, die ich mir im Rahmen unserer Zusammenarbeit geleistet habe, lachen konnte, machten ihn für mich zu einem Mentor von unschätzbarem Wert.

Besonders bedanken möchte ich mich außerdem bei Frau Dr. D. Lüscho. Ohne ihre kritischen Anmerkungen und einer Engelsgeduld mit meinem Unwissen in Bezug auf molekularbiologische Arbeitsmethoden, wäre dieses Arbeitsgebiet für mich wahrscheinlich heute noch ein unüberschaubares Feld. Ich bedanke mich daher dafür, es geschafft zu haben, bei mir ein ehrliches Interesse für Primer & Co. erweckt zu haben.

Frau Dr. C. Prusas möchte ich dafür danken, mich in die virologischen Arbeitsmethoden sowie in die Serologie eingearbeitet zu haben. Außerdem muss ich ihr für die Ermutigungen, die sie mir vielfach hat zukommen lassen, immer wieder danken.

Frau Dr. B. Schweiger danke ich für die Möglichkeit der unkomplizierten Zusammenarbeit mit der Arbeitsgemeinschaft Influenza des Robert Koch Instituts, Berlin.

Bei meinen Mitdoktoranden Konstanze Zacharias, Valter Leonardo de Quadros, Abdul Lotfi, Wael Gad, Taan Suareet und Stefanie Balczulat und unserer studentischen Hilfskraft Sabine Düpre möchte ich mich für die interessante „interkulturelle“ Zeit bedanken! Auch wenn wir an

verschiedenen Themen in unterschiedlichen Arbeitsgruppen gearbeitet haben, waren wir doch ein Team, was sich immer wieder bei alljährlichen wiederkehrenden Organisationsarbeiten gezeigt hat. Rüdiger Hauck danke ich für gemeinsame Erforschung von „Blut, Gassner und Gram-Färbung“, jeweils montags bis freitags um 8:30 Uhr. Außerhalb dieser Zeiten bedanke ich mich bei ihm vor allem für die Kuchen und die zweiten Frühstücke.

Desweiteren bedanke ich mich bei Gabi Grotehenn, Carola Kelz und insbesondere bei Frau Bettina Valder für das Einarbeiten und die fortlaufende Unterstützung bei der Laborarbeit im Institut für Geflügelkrankheiten und Frau Ute Hopf-Guevara für gleiches im Robert Koch Institut. Zudem bedanke ich mich bei Dr. C. Staubach vom FLI Wusterhausen für die schnelle und herzliche Unterstützung mit der AI-Wildvogeldatenbank.

Schließlich bedanke ich mich bei allen freiwilligen Teilnehmern dieser Studie, die mich dabei unterstützt haben, an die hier untersuchten Proben zu gelangen. Alle Falkner, Jäger, Betreuer von Taubenanlagen oder sonstige Hilfspersonen hier namentlich zu erwähnen, würde den Rahmen sprengen, doch möchte ich dennoch Herrn Dr. P. Lierz für die Blutprobenentnahme bei den Falknern, dem „Krähenbeize-Team“ in Jülich für die immer wiederkehrenden Einladungen zu den Beizjagden (auch zukünftig!), Klaus Leix als Sprachrohr der Studie in Bayern sowie den Krähenfalkner Fred Egberts erwähnen, der leider während des Untersuchungszeitraumes nach einer der Beizjagdveranstaltungen verstorben ist.

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Berlin, den 10.02.2010

Andrea Kohls