

Aus dem Zentrum für klinische Tiermedizin der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-
Maximilians-Universität München

Arbeit angefertigt unter Leitung von PD Dr. Monika Rinder

Angefertigt am Bayerischen Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit,
Oberschleißheim (Prof. Dr. Dr. Mathias Büttner)

**Molekulare Phylogenie der H5- und N1-Gene von aviären
Influenzaviren aus den Jahren 2006 und 2007
in Bayern**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Würde eines Doktor rer. biol. vet. der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von

Victoria Lang
aus Taschkent

München, 2012

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Braun

Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Rinder

Korreferent/en: Priv.-Doz. Dr. Kölle

Tag der Promotion: 11. Februar 2012

„The saddest part of my life was when I witnessed the hundreds of deaths of the soldiers in the Army camps and did not know what to do. At that moment I decided never again to prate about the great achievements of medical science and to humbly admit our dense ignorance in this case.” **Victor Vaughan (1918)**

“The 1918 influenza virus caused a pandemic that killed minimally 20 million people and up to 40 or 50 million people in about a year’s time.... It’s still a big medical mystery. So the question was would the Institute possibly have tissue from victims of the 1918 flu and could we use these new powerful molecular technologies to analyze something about the virus to actually get a first direct look at the virus.” **Jeffery Taubenberger (2005)**

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	6
1 EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG	10
2 SCHRIFTTUM	12
2.1 Aviäre Influenzaviren	12
2.1.1 Taxonomie	12
2.1.2 Morphologie	13
2.1.3 Genomaufbau	14
2.1.4 Replikationszyklus	15
2.1.5 Genetische Variabilität	20
2.1.6 Hochpathogene und niedrigpathogene Influenzaviren	22
2.1.6.1 Begriffsbestimmungen der Pathogenität und Virulenz	22
2.1.6.2 Pathogenitätsfaktoren aviärer Influenza	22
2.2 Bekämpfung der Influenza A Virus-Infektion	24
2.2.1 Verordnungen zum Schutz gegen AIV-Infektionen	25
2.2.2 Wildvogel-Monitoringprogramme im europäischen Raum	27
2.3 Epidemiologie der H5- und H7-Virusinfektionen bei Wildvögeln	31
2.3.1 Vorkommen aviärer Influenza bei Wildvögeln	31
2.3.1.1 NPAIV H5- und H7-Subkomponente	35
2.3.1.2 HPAI H5- und H7-Viren	37
2.3.2 Evolution aviärer Influenzaviren	42
3 ZIELSETZUNG	44

4	PUBLIKATION I: Genetic evidence for multi-event imports of avian Influenza Virus A (H5N1) into Bavaria, Germany	45
5	PUBLIKATION II: Avian influenza A virus monitoring in wild birds in Bavaria: occurrence and heterogeneity of H5 and N1 encoding genes	55
6	DISKUSSION	84
	6.1 Zeitraum, Gebiete und Vogelarten der AIV-Untersuchungen	84
	6.2 Vergleichende Analyse der HPAI H5N1-Viren	92
	6.3 NPAI H5-Subkomponente (N1 negativ)	105
	6.4 NPAI N1-Viren (H5 negativ)	109
7	AUSBLICK	111
8	ZUSAMMENFASSUNG	113
9	SUMMARY	115
10	LITERATURVERZEICHNIS	117
11	ANHANG	156
	11.1 Abbildungsverzeichnis	156
	11.2 Tabellenverzeichnis	157
	11.3 Im Rahmen dieser Arbeit sequenzierte Influenza A Viren	159
13	DANKSAGUNG	162

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

α	Alpha
$^{\circ}\text{C}$	Grad-Celsius
%	Zahlenangaben in Prozent
μl	Mikroliter
μM	Mikromolar
A / Ala	Alanin (Ein- und Dreibuchstabencode)
Abb.	Abbildung
AI	Aviäre Influenza
AIV	Aviäre Influenza Virus / Viren
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
CDC	Center for Disease Control and Prevention
cRNS	Komplimentäre Ribonukleinsäure (complementary)
D / Asp	Asparaginsäure (Ein- und Dreibuchstabencode)
DEFRA	Department for Environment, Food and Rural Affairs
Del	Deletion
DNA	Deoxyribonucleic acid
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
E / Glu	Glutaminsäure (Ein- und Dreibuchstabencode)
EC	European Commission (Europäische Kommission)
EG	Europäische Gemeinschaft
EID ₅₀	50 % Ei-Infektiöse Dosen (Konzentration an Virus bei der 50 % der infizierten Eier darauf reagieren)
<i>et al.</i>	und andere (<i>et alii</i>)
EU	Europäische Union
ESKV	Das C-terminale Motiv des NS1-Proteins mit den Aminosäuren: Glutaminsäure (E), Serin (S), Lysin (K) & Valin (V)
<i>E-Wert</i>	Erwartungswert
F	Phenylalanin (Einbuchstabencode)
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations

FLI	Friedrich-Loeffler-Institut
for	forward
f.	folgende Seite
ff.	folgende Seiten
G / Gly	Glycin (Ein- und Dreibuchstabencode)
h.	Stunde (hour)
H / HA	Hämagglutinin
H?	Hämagglutinin ist nicht bestimmt
H0	Vorläuferprotein des Hämagglutinins
HA1	Hämagglutinin-Untereinheit 1
HA2	Hämagglutinin-Untereinheit 2
HPAI	Hoch pathogene aviäre Influenza
HPAIV	Hoch pathogene aviäre Influenzaviren
HPNAIV	Highly pathogenic notifiable Influenza Virus
K / Lys	Lysin (Ein- und Dreibuchstabencode)
Kb	Kilo-Basenpaaren (Kilo base)
I / Ile	Isoleucin (Ein- und Dreibuchstabencode)
ICTV	International Committee on Taxonomy of Viruses
IC2	Interne Kontrolle (Nicht-AIV-Kontroll-RNA)
i.d.F.	in der Fassung
INF	Influenza
IVPI	Intravenöser Pathogenitätsindex
L / Leu	Leucin (Ein- und Dreibuchstabencode)
LGL	Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit
log	Logarithmus
LPAI	Low pathogenic Avian Influenza
LPNAIV	Low pathogenic notifiable Influenza Virus
M / Met	Methionin (Ein- und Dreibuchstabencode)
M1	Matrixprotein 1
M2	Matrixprotein 2
min.	Minuten
mRNS	messenger Ribonukleinsäure / Ribonukleinsäuren

n	Anzahl untersuchter Tiere / Proben
n.n.	Nicht nachgewiesen
N / Asn	Asparagin (Ein- und Dreibuchstabencode)
N / NA	Neuraminidase
N?	Neuraminidase ist nicht bestimmt
NAI	Notifiable avian influenza
NCBI	National Center for Biotechnology Information
Neu5Ac	N-Acetylneuraminsäure (N-acetylneuraminic acid)
nm	Nanometer
NP	Nukleoprotein
NPAI	Niedrig pathogene aviäre Influenza
NPAIV	Niedrig pathogene aviäre Influenzaviren
NPNAIV	Niedrig pathogene notifiable Influenza Virus (Low pathogenic notifiable Influenza virus)
NP-vRNS	Nukleoprotein-virale Ribonukleinsäure/Ribonukleinsäuren
NS1	Nicht-Struktur-Protein 1
NS2	Nicht-Struktur-Protein 2
NS-vRNS	Nicht-Struktur-Protein-virale Ribonukleinsäure
nt.	Nukleotid / Nukleotide
O.I.E.	Office International des Epizooties
P	Prolin (Einbuchstabencode)
<i>P</i>	Significance level
PA	Polymerase acid
PB1	Polymerasekomplex 1 (Polymerase basic 1)
PB1-F2	Spezielle Form des Polymerasekomplexes 1
PB2	Polymerasekomplex 2 (Polymerase basic 2)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction)
pH	potentia Hydrogenii
ppt	Teile per tausend (g Salze pro Kilogramm Wasser (g / kg))
PQGERRRKR*GLF	HPAIV-Spaltstelle mit folgenden Aminosäuren: Prolin (P), Glutamin (Q), Glycin (G), Glutaminsäure (E), Arginin (R), Lysin (K), Leucin (L) und Phenylalanin (F)

PQRETR*GLF	NPAIV-Schnittstelle mit den Aminosäuren: Prolin (P), Glutamin (Q), Arginin (R), Glutaminsäure (E), Threonin (T), Glycin (G), Leucin (L) und Phenylalanin (F)
Q / Gln	Glutamin (Ein- und Dreibuchstabencode)
R / Arg	Arginin (Ein- und Dreibuchstabencode)
RARP	RNS-abhängige RNS-Polymerase
rev	reverse
RKI	Robert-Koch-Institut
RNA	Ribonukleinaminosäure (Ribonucleic acid)
RNP	Ribonukleoproteinkomplex
RNS	Ribonukleinsäure / Ribonukleinsäuren
RT-rPCR	Echtzeit (Real Time) Reverse Transkriptase-PCR
S.	Seite
S / Ser	Serin (Ein- und Dreibuchstabencode)
s.	siehe
Si	Similarität
T	Threonin (Einbuchstabencode)
Tab.	Tabelle
TCID ₅₀ /ml	Tissue Culture Infectious Dose 50 % (Virus-Endverdünnung, bei der 50 % der Kultur einen cytopathischen Effekt zeigt)
u. a.	unter anderem
V / Val	Valin (Ein- und Dreibuchstabencode)
v-mRNS	virale-messenger Ribonukleinsäure / Ribonukleinsäuren
vRNP	viraler Ribonukleoproteinkomplex
vRNS	virale Ribonukleinsäure / Ribonukleinsäuren
USA	United States of Amerika
WHO	Weltgesundheitsorganisation (World Health Organization)
z. B.	zum Beispiel
ZK	Zellkulturen

1 EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

Wildvögel, und dabei insbesondere Wildwasservögel der Ordnung Anseriformes, dienen als natürliche Reservoirwirte aviärer Influenzaviren (AIV) (EASTERDAY et al. 1968). Nahezu alle Subtypen niedrig pathogener aviärer Influenzaviren (NPAIV) wurden bereits bei diesen Tieren nachgewiesen. Allerdings verlaufen die Infektionen bei wildlebenden Vögeln meistens klinisch inapparent. Wildvögel stellen demzufolge eine Infektionsquelle mit hohem Risikopotenzial für das Wirtschaftsgeflügel dar (WEBSTER et al. 1992). Aviäre Influenzaviren besitzen eine große genetische Variabilität, und es besteht die Auffassung, dass NPAI-Viren der Subtypen H5 oder H7 nach Übertragung auf Nutzgeflügel sich schnell, nach wenigen Tier-zu-Tier-Passagen, in hoch pathogene aviäre Influenzaviren (HPAIV) umwandeln können (SENNE et al. 2006). Die HPAI-Subtypkomponenten H5 und H7 sind von großer veterinärmedizinischer Bedeutung, da sie die sogenannte aviäre Influenza oder klassische Geflügelpest, eine der weltweit bedeutendsten Viruserkrankungen bei Vögeln mit hoher Morbidität und Mortalität auslösen können (ALEXANDER 2000).

Im Zentrum der Aufmerksamkeit stehen aktuell Influenza A Viren des Subtyps HPAI H5N1, ein Virus, das in der jüngeren Vergangenheit nicht nur beim kommerziellen Geflügel, sondern auch bei Wildvögeln eine hohe Mortalität auslöste und auch als Krankheitserreger beim Menschen Bedeutung gewann. Seit Beginn des Jahres 2005 breitete sich das Influenzavirus HPAI H5N1 kontinuierlich von Südostasien in Richtung Westen aus und erreichte Mittel- und Westeuropa Anfang 2006. Es wurde vermutet, dass Wildvögel für eine rasche Verschleppung und auch für die Übertragung aviärer Influenzaviren auf Nutzgeflügel verantwortlich sind (ALEXANDER 2000). Um potentielle Risiken einer Einschleppung in Wirtschaftsgeflügelbestände zu erkennen und rechtzeitig Maßnahmen zur Bekämpfung und zur Verhinderung einer Influenzapandemie ergreifen zu können, wird der weltweiten regelmäßigen Überwachung von Wildvögeln hinsichtlich Infektionen mit Influenzaviren eine ganz wesentliche Rolle beigemessen.

Die Epidemiologie aviärer Influenzaviren, insbesondere der Subtypen H5 und H7, ist in Bayern nur unzureichend bekannt. Insbesondere vor dem Hintergrund der Ausbreitung von H5N1 stellte sich die Frage, ob in Bayern bereits ein Reservoir

hochpathogener H5N1-Viren bei Wildvögeln existiert und ob auch niedrig pathogene Influenzaviren mit den Subtypkomponenten H5 und N1 in Bayern vorkommen. Im Rahmen eines Wildvogelüberwachungsprogramms in Bayern sollten daher in der vorliegenden Arbeit aviäre Influenza, die bei Wildvögeln nachweisbar waren, hinsichtlich des Vorkommens von H5- oder N1-Viren untersucht werden. Basierend auf Nukleinsäuresequenzen von Hämagglutinin- und Neuraminidasegenen sollten ebenfalls die Viren in hoch- oder niedrigpathogene Erreger differenziert und mit molekular-epidemiologischen Methoden analysiert werden, um Rückschlüsse auf die Herkunft der betreffenden Viren ziehen zu können, also um zu entscheiden, ob in Bayern permanente Erregerreservoirs existieren oder ob Neueinschleppungen aus dem Ausland für die Epidemiologie der Influenza-A-Viren eine essentielle Rolle spielen.

2 SCHRIFTTUM

2.1 Aviäre Influenzaviren

2.1.1 Taxonomie

Die Familie *Orthomyxoviridae* besteht aus den Influenza A-, B-, C-, den Thogoto- und den Isaviren (WHO 1953, ICTV 2005). Es handelt sich um lipidumhüllte Viren mit segmentiertem, einzelsträngigem RNS-Genom negativer Orientierung. Die aviären Influenzaviren (AIV) werden den Influenza-A-Viren zugeordnet und sind als Erreger wichtiger Tierseuchen und Zoonosen veterinärmedizinisch von enormer Bedeutung. Der Begriff „fowl plague“ oder klassische Geflügelpest wurde auf dem ersten Internationalen Symposium über aviäre Influenza vorgeschlagen (BANKOWSKI 1982). Dabei handelt es sich um eine mit globalen verheerenden ökonomischen Verlusten verbundene Erkrankung des Wirtschaftsgeflügels, die durch diese Influenzaviren verursacht wird. Aviäre Influenzaviren können aber auch bei Säugern, zum Beispiel (z. B.) bei Pferden, Schweinen, Katzen und Menschen, gravierende Erkrankungen verursachen (WADDELL et al. 1963, PENSAERT et al. 1981, SONGSERM et al. 2006, PATTERSON-KANE et al. 2008). Wildlebende Wasservögel gelten als Reservoirwirte für aviäre Influenzaviren (WEBSTER et al. 1992).

Die Unterteilung der Influenzaviren in die drei verschiedenen Typen A, B und C erfolgt aufgrund antigenetischer Besonderheiten im Nukleo (NP)- und Matrix (M)-Protein. Während die Influenza-A- und B-Viren acht Segmente der Ribonukleinsäuren (RNS) aufweisen, besitzt das Influenza C-Virus nur sieben Segmente. Hier wird auf einem Segment vereint ein Hämagglutinin-Esterase-Fusionsprotein kodiert (GAO et al. 2008), während bei den Influenza-A- und B-Viren diese Funktionen auf zwei Proteine verteilt sind, das Hämagglutinin (HA, H) und die Neuraminidase (NA, N), die in unabhängigen Gensegmenten verschlüsselt werden.

Entsprechend der Zusammensetzung ihrer HA- und NA-Proteine werden die Influenza-A-Viren in Subtypen unterteilt (ANON 1980). Man unterscheidet sechzehn HA (1-16) und neun NA-Subtypen (1-9) (WEBSTER et al. 1992, FOUCHIER et al. 2005). Von 144 (16x9) möglichen Kombinationen waren bisher mindestens 105

diverse HA- und NA-Subtypen bei 26 unterschiedlichen Vogelfamilien identifizierbar (KALETA et al. 2005a, OLSEN et al. 2006).

Die Subtypen H1, H2 und H3 sind als humanpathogen und schweinepathogen bekannt. Dagegen findet man bei Vögeln alle Influenzavirus-Subtypen (KALETA et al. 2005a). Zur exakten Bezeichnung eines Isolates wird eine Nomenklatur verwendet, die neben den H- und N-Subtypen noch weitere Informationen über die Herkunft des Virus enthält. Es werden die Wirtsspezies und der Ort der Isolierung, gefolgt von der Labornummer des Isolates und dem Jahr der Isolierung zusätzlich aufgeführt (ANON 1980). So wurde beispielsweise ein bayerisches Influenza-A-Virus aus dem Jahr 2007 als *A/swan/Bavaria/2/2007 (H5N1)* bezeichnet.

2.1.2 Morphologie

Influenza A Viruspartikel sind sphärisch bis pleomorph geformt, mit einem Durchmesser von 80-120 nm und helikaler Kapsidsymmetrie (LAZAROWITZ und CHOPPIN 1975). Influenzaviren sind von einer Lipidhülle umgeben (Abbildung (Abb.) 1), in die die drei virale Proteine HA, NA und in geringerer Menge das Matrix-Protein 2 (M2) eingelagert sind (HORIMOTO und KAWAOKA 2005).

Das AIV-Genom besteht aus einzelsträngigen RNS-Segmenten negativer Polarität. Jedes RNS-Segment ist mit dem RNS-abhängigen RNS-Polymerasekomplex (RARP) assoziiert (Abb. 1), der aus den „Polymerase basic Protein“ 1 (PB1), 2 (PB2) und dem „Polymerase acidic Protein“ (PA) besteht (MODROW et al. 2003). Der Komplex aus dem Polymerasekomplex, der RNS und den Nukleoprotein (NP)-Molekülen wird als Ribonukleoprotein (RNP) bezeichnet. Durch das M1 wird die Innenseite der Hüllmembran ausgekleidet, welche mit den acht RNP verbunden ist (MARTIN und HELENIUS 1991). Die Rezeptorbindung und die Membranfusion werden durch das HA vermittelt, welches im Virion als Homotrimer vorliegt. Im Gegenzug bilden die Proteine NA und M2 jeweils Homotetramere. Während die NA endständige Neuraminsäuren von Kohlenhydraten abspaltet, weist das M2-Protein die Funktion eines Protonenkanals auf (LAMB und CHOPPIN 1981).

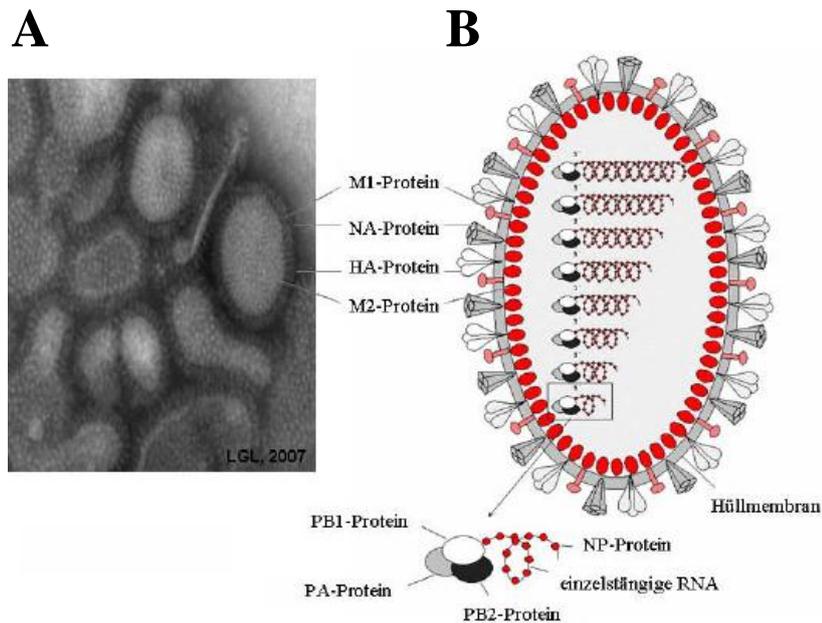


Abbildung 1: Struktur des Influenza-A-Virions

A – Elektronenmikroskopische Darstellung des AIV (Foto: F. Horvath, LGL, 2007)

B – Abbildung nach MODROW et al. 2003 (modifiziert)

HA= Hämagglutinin, LGL=Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit, M=Matrix, NA=Neuraminidase, NP=Nukleoprotein, PA=Polymerase acidic Protein, PB 1/2=Polymerase basic Protein 1 und 2, RNA=Ribonukleinaminosäure

2.1.3 Genomaufbau

Das Genom aviärer Influenza besteht aus acht RNS-Segmenten mit einem Gesamtumfang von 13 kb, die insgesamt bis zehn oder elf Proteine kodieren, da nicht alle Influenzaviren das Protein PB1-F2 besitzen (PALESE und SHAW 2007). Eine kurze Übersicht über die Schlüsselfunktionen und Eigenschaften der viral kodierten Proteine HA, NA, PB1, PB2, PA, NP, M und der Nicht-Struktur-Proteine (NS 1 und 2) ist in der Tabelle (Tab.) 1 wiedergegeben.

Neun Proteine (HA, NA, M1, M2, NP, NS2, PA, PB1, PB2) bilden die Struktur des Viruspartikels. Zwei Proteine (PB1-F2, NS1) wurden dagegen nur in AIV infizierten Zellen nachgewiesen. Das zuletzt identifizierte Protein PB1-F2 löst apoptischen Zelltod in monozytären Zellen aus, welches ebenfalls im Bereich auf dem PB1-Gen abgelesen wird (CHEN et al. 2001).

2.1.4 Replikationszyklus

Das HA-Protein spielt eine essentielle Rolle für die Bindung des Virus an eine permissive Wirtszelle, da es die Rezeptorbindung des Partikels vermittelt (SKEHEL und WILEY 2000). Die endständigen Sialinsäure-Moleküle (α -5-N-Acetylneuramin-säure) auf der Zelle des Wirtes, mit denen das virale HA-Protein interagiert, treten in mehreren Konformationen auf (WATOWICH et al. 1994).

Generell präferieren aviäre Influenzaviren die höchste Affinität zu Sialinsäure-Molekülen mit Neu5Ac α (2,3)-Galaktose-Bindung. Dieser Rezeptortyp kommt vor allem bei Vögeln (auch bei vielen Säugetieren) im epithelialen Gewebe des Darmes vor. Hingegen binden sich die humanpathogenen Influenzaviren bevorzugt an die Sialinsäuren mit Neu5Ac α (2,6)-Galaktose-Verknüpfung des Respirationstraktes (GAMBARYAN et al. 2005). Außerdem ist bekannt, dass Aminosäureänderungen an bestimmten Positionen des Hämagglutinins (Gln226Leu und Gly228Ser) bei den Subtypen H2 und H3 zu einem Wechsel der Sialinsäure-Bindungsspezifität von α (2,3)-Galaktose auf α (2,6)-Galaktose führen (ROGERS et al. 1983, CONNOR et al. 1994). Überdies wurde eine Reduktion der Bindung an α (2,3)-Galaktose nach Auftreten der Mutationen Gln226Leu und Gly228Ser im HA-Gen von H5N1-Viren aus dem Menschen festgestellt (STEVENS et al. 2008). Solche Aminosäureänderungen an bestimmten Positionen ermöglichen dem Influenzavirus die Speziesbarriere zu überschreiten und sich an neue Wirte anzupassen. Allerdings mehren sich die Hinweise, dass den Mutationen folgender AIV-Proteine ebenso eine wichtige Rolle bei der Anpassung an neue Wirtszellen zukommt:

- (i) NS1 - Glu92Lys (SEO et al. 2004), Ala149Val (LI et al. 2006), Del 80-84 (LONG et al. 2008), ESKV (das C-Terminale Motiv) (BRAGSTAD et al. 2007),
- (ii) PB2 - Glu627Lys (HATTA et al. 2007), A199 (CHEN et al. 2007), Asp701Asn und Ser714Arg (GABRIEL et al. 2008),
- (iii) NP - Asn319Lys (GABRIEL et al. 2008),
- (iv) NA - Ile398Met (BRAGSTAD et al. 2007).

Tabelle 1: Funktion der durch die RNS-Genomsegmente der aviären Influenzaviren kodierten Proteine (Stamm A/PR/8/34 (H1N1))

Genomsegment	Kodiertes Protein ¹	Proteinlänge ²	Proteinmasse ³	Funktion
1	PB2	759	83490	Bestandteil der viralen RARP, Bindung an die Cap-Strukturen zellulärer mRNS und Vermittlung des „Cap-Snatching“ (BLAAS et al. 1982, RAO et al. 2003)
2	PB1	757	83270	Bestandteil der viralen RARP, Elongation (TOYODA et al. 1996)
	PB1-F2	87	9570	Proapoptotische Aktivität (CHEN et al. 2001)
3	PA	716	78760	Bestandteil der viralen RARP, Transkription (NAKAGAWA et al. 1996)
4	HA	566	62260	Oberflächenprotein, Rezeptorbindung und Membranfusion (FLINT et al. 2000)
5	NP	498	54780	RNS-Bindung und Kernimport (PORTELA und DIGARD 2002)
6	NA	454	49940	Oberflächenglykoprotein, Spaltung der Sialinsäurereste zellulärer und viraler Glykoproteine (OHUCHI et al. 2006)
7	M1	252	27720	Bindung an die Innenseite der Lipiddoppelmembran, Stabilisierung, Kernexport (MARTIN und HELENIUS 1991)
	M2	97	10670	Transmembranprotein, Ionenkanal (LAMB und CHOPPIN 1981)
8	NS1	230	25300	Interferon-Antagonist, Regulation des zellulären RNS-Transports (BENDER et al. 1998, TAN und KATZE 1998)
	NS2	121	13310	Kernexport der vRNPs (O'NEILL et al. 1998)

¹Abgekürzte Form des kodierten Proteins, ²in Aminosäuren, ³in Dalton, mRNS=messenger Ribonukleinsäure, RARP=RNS-abhängiger RNS Polymerasekomplex, vRNPs=virale Ribonukleoproteine

Das Eindringen des Influenzavirus in die Zelle erfolgt über rezeptorvermittelte Endozytose (Abb. 2). Das HA kann nur dann als Fusionsprotein funktionieren, wenn es korrekt prozessiert im Partikel vorliegt. Dazu muss nach der Translation ein Vorläuferprotein HA0 proteolytisch in die Untereinheiten HA1 und HA2 gespalten werden. Diese Spaltung kann je nach spezifischer Spaltstellen-Sequenz des HA entweder durch spezifische intrazelluläre oder auch durch häufig vorkommende extrazelluläre Proteasen vermittelt werden (KLENK et al. 1975, FLINT et al. 2000). Aufgrund dieser Mechanismen ist die Spaltstellen-Sequenz als einer der wichtigsten Virulenzmarker der Influenzaviren zu werten. Durch die Absenkung des pH-Wertes auf 5-6 im Endolysosom erfolgt eine Konformationsänderung des HA-Proteins, die für die Fusion der Virushülle mit der Endosomenmembran verantwortlich ist (SKEHEL und WILEY 2000). Die Ansäuerung wird durch den H⁺-Ionenkanal M2 in das Innere des Virions weitergeleitet, wodurch sich die M2-Proteine und vRNP voneinander trennen. Im Schritt „Uncoating“ werden die acht viralen RNS-Genomsegmente in das Zytoplasma freigesetzt.

Nach der Influenzavirusinfektion einer Wirtszelle müssen die Virionen erst neu synthetisiert werden bevor sie ihre Wirkung entfalten können. Die Ribonukleoproteine werden erst in den Zellkern transportiert. Danach finden die Replikation und die Transkription der viralen RNS durch den Polymerasekomplex (Abb. 2) statt. Die viralen RNS-Moleküle können nicht direkt transkribiert werden, daher ist das Genom als Negativ-Strang-Genom klassifiziert. Demzufolge muss die vRNS erst durch die virale RNS-Polymerase in virale-messenger Ribonukleinsäuren (v-mRNS) umgeschrieben werden. Eine Besonderheit bei der Replikation und Translation der aviären Influenzaviren ist das sogenannte „Cap-Snatching“. Bei der Synthese der v-mRNS werden die Cap-Strukturen der zellulären mRNA durch die PB1-Untereinheiten abgespalten (RAO et al. 2003). Somit kann die Initiation der Transkription durch die zelluläre Maschinerie beginnen. Das „Cap-Snatching“ führt nicht nur zu einer effizienten Virusreplikation, sondern auch gleichzeitig zu einer Reduktion der Produktion zellulärer Proteine, im Sinne eines „Virus-Host-Shut-off“-Prozesses (FECHTER et al. 2003). Nachfolgend werden die Proteine HA, NA und M2 im Endoplasmatischen Retikulum sowie Golgi-Apparat prozessiert und in Vesikeln zur Zelloberfläche transportiert. Das M2 reguliert den pH-Wert in den Golgi-Vesikeln,

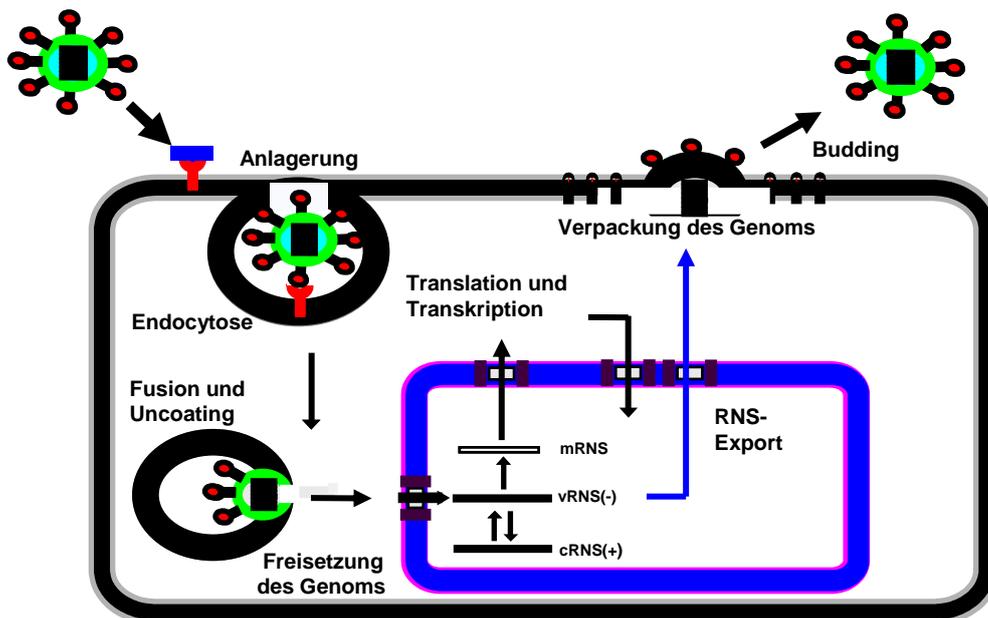


Abbildung 2: Replikation des Influenzavirus-Genoms

Darstellung nach LUDWIG et al. 2003 (modifiziert)

Ribonukleinsäure (RNS): c=komplementäre (complementary), m=messenger, v=virale

wodurch eine an dieser Stelle unerwünschte Fusionsaktivität des HA-Proteins verhindert wird.

Die Proteine NP, PA, PB1, PB2, M1, NS1 und NS2 werden an den Ribosomen im Zytoplasma synthetisiert und zurück in den Zellkern transportiert. Bei der Replikation der viralen RNA kann die generierte v-mRNS, die eine positive Polarität besitzt, dennoch aber aus zwei Gründen nicht als Vorlage dienen: (i) wegen einer Kappenstruktur, die für den Start der Translation der v-mRNS unentbehrlich ist, weil diese an den Ribosomen der eukaryontischen Wirtszelle stattfindet, (ii) wegen einer zusätzlichen Polyadenylierungsstelle am 3'-Ende. Die vRNS wird daher im Zellkern von der viralen Polymerase über eine vollständige Kopie, die als komplementäre RNS (cRNS (complementary)) bezeichnet wird, synthetisiert. Möglicherweise wird die Virus-Transkriptase durch die Virusproteine NS1 und NS2 so modifiziert, dass diese primer-unabhängig funktioniert und eine komplette Replikation der vRNS ablaufen kann. Wahrscheinlich werden in Folge einer Wechselwirkung der NS-Proteine mit der

viralen Polymerase, in einer frühen Phase der Infektion zunächst die NS- und NP-vRNS synthetisiert und erst später alle vRNS gebildet (NEUMANN et al. 2004). Der genaue Mechanismus der vRNS-Synthese ist allerdings noch unbekannt.

In der Phase der Maturation werden virale Komponenten im Zytoplasma zusammengefügt. In diesem Schritt entstehen die neuen viralen RNP durch die Assoziation der neu synthetisierten vRNS mit den Proteinen NP, PA, PB1 und PB2. Sie binden sich dann an das M1-Protein, wodurch die Polymerase-Funktion gehemmt wird (WATANABE et al. 1996). Für das komplette RNS-Genom müssen alle acht vRNS-Segmente verpackt werden. Überdies sind die genauen Verpackungsmechanismen weitgehend unklar. Es wird diskutiert, ob die einzelnen Genomsegmente zufällig verkapselt werden, oder ob eine selektive Umhüllung der acht RNS-Segmente aufgrund bestimmter Verpackungssignale innerhalb der kodierenden Sequenzen der Virussegmente stattfindet, wodurch dann exakt acht vRNP-Segmente vorliegen werden (BANCROFT und PARSLOW 2002). Die Transkription wird durch die ansteigenden Konzentrationen von freiem, nicht in vRNP gebundenem NP abgebrochen. Wahrscheinlich interagiert das NP hierzu entweder mit der Polymerase oder mit den Promoterelementen der vRNS. Dieses freie Nukleoprotein, welches zur Enkapsidierung der synthetisierten vRNS verwendet wird, ist für die Stabilität der vRNS von großer Bedeutung. Schließlich erfolgt die Freisetzung der neu gebildeten Virionen durch Knospung (Budding) (Abb. 2). Dabei erhalten die RNP / M1-Komplexe an der Zellmembran eine Lipidhülle, in die die Proteine HA und NA eingelagert sind. Nicht nur M1, sondern auch das NA-Protein spielt bei diesen zytoplasmatischen Reifungsprozessen eine entscheidende Rolle. Das M1 verhindert den Rücktransport der vRNP in den Zellkern (MARTIN und HELENIUS 1991) und die NA spaltet die terminalen Neuraminsäuren von glykosilierten Proteinen ab, so dass sowohl die unerwünschte Bindung der Tochterpartikel an die Zellmembran als auch die Bildung von Partikelaggregaten verhindert werden (MODROW et al. 2003). Generell gilt eine optimale Balance zwischen den HA- und NA-Proteinen der Influenzaviren bezogen auf ein Wirtssystem als entscheidend für die Rezeptorinteraktion (WAGNER et al. 2002), da eine Reduktion der Funktion des NA-Proteins zu einer Herabsetzung der Anlagerung des Virus an die Zellmembran des Wirtes führt (MASTROSOVICH et al. 2004).

2.1.5 Genetische Variabilität

Influenzaviren besitzen eine enorme genetische Variabilität, woraus ihre große Anpassungsfähigkeit resultiert. Die genetische Vielfalt wird durch unterschiedliche Mechanismen ermöglicht. Bedeutend sind hier vor allem die Antigendrift und die Antigen shift, darüber hinaus können ebenfalls Insertion, Deletion und Rekombination vorkommen (GARCIA et al. 1996, PERDUE et al. 1998, WEBSTER et al. 2007). Antigendrift entsteht durch Punktmutationen in Virus-Genen (WEBSTER und BEAN 1978). Die AIV-Mutationsrate wurde auf etwa $7,26 \times 10^{-5}$ Nukleotid-Austausche pro Nukleotid und Replikationszyklus geschätzt, die wie bei anderen RNS-Viren daraus resultiert, dass die RNS-Polymerase keine Korrekturlesefunktion aufweist und somit hohe Fehlerraten unvermeidlich sind (DRAKE 1993). Bekannt ist jedenfalls, dass eine Mutationsrate von annähernd einem Nukleotid pro Genom in der Vermehrungsphase aviärer Influenzaviren vorkommen kann. Bei einer Antigen shift können beliebige Gensegmente zwischen zwei oder mehreren diversen Virussubtypen bei der simultanen Infektion einer empfänglichen Zelle ausgetauscht werden (ROTT et al. 1979). Das neu gebildete, reassortante Virus enthält dabei unvorhersehbare Segmentkombinationen und somit auch Eigenschaften beider Ausgangsviren. Simultane Infektionen mit unterschiedlichen Subtypen wurden bei Wildvögeln bereits nachgewiesen, z. B. die Doppel- und Dreifachinfektionen mit H1N4-H1N1, H2N5-H4N5 bzw. H1N2-H6N5-H6N2, H3N2-H3N8-H6N2 bei Wildenten in Kanada (SHARP et al. 1993), die Koinfektionen jeweils mit zwei Subtypen wie H3/H9, H6/H13 und H9/H10 (ohne Angaben des NA-Gens) bei Stockenten in Deutschland (RABL 2010). Bei der Rekombination erfolgt ein Austausch von genetischem Material in Form eines „crossing over“ zwischen RNS-Abschnitten. Dies kann zwischen Virus-Genomen der gleichen oder unterschiedlichen Spezies erfolgen und stellt eine wichtige Grundlage für die Entstehung genetischer Vielfalt dar (DUGAN et al. 2008).

Insbesondere durch „Reassortments“ können Viren mit neuen Eigenschaften entstehen die Influenza-Pandemien auslösen können. Eine Pandemie, also eine länder- und kontinentübergreifende Ausbreitung einer Krankheit, kann sich entwickeln, wenn ein neues Influenzavirus auftritt, gegen das die menschliche Population keine schützenden Antikörper besitzt, und das aufgrund seiner guten Anpassung an den Menschen leicht und häufig von Mensch zu Mensch übertragen

werden kann (SCHOLTISSEK et al. 2006). Die krankmachende Wirkung des Virus spielt für die Definition einer Pandemie zunächst keine Rolle. Die letzte Influenzainfektionswelle, die die Kriterien einer Pandemie erfüllte, wurde in den Jahren 2009 und 2010 durch das Influenzavirus A/California/7/2009 (H1N1) hervorgerufen und als „Schweinegrippe“ oder „neue Grippe“ bekannt. Influenza-ähnliche Erkrankungen sind Anfang April 2009 in Mexiko (Veracruz) beschrieben worden (MORALES 2009). Der Erreger, der Mitte April 2009 bei zwei Kindern in den Vereinigten Staaten von Amerika (Südkalifornien) isoliert wurde (CDC 2009 a, b), stellte sich als ein Reassortantenvirus heraus, dessen Genomsequenzen Ähnlichkeiten sowohl mit amerikanischen als auch mit eurasischen Influenza A Viren besaß (GARTEN et al. 2009). Die Gene HA, NP und NS zeigten eine Verwandtschaft mit den entsprechenden Genen des seit 1918 bekannten, klassischen Schweine-Influenza-Virus. Dagegen ließen sich die Gensegmente PB2 und PA auf Influenzaviren zurückführen, bei denen eine Übertragung von Vögeln auf nordamerikanische Schweine im Jahre 1998 identifizierbar war. Die Analyse des PB1-Gens ergab eine Homologie zu Virussequenzen, die im Jahr 1968 zunächst von Vögeln auf Menschen, und danach im Jahr 1998 von Menschen auf Schweine übergingen (GARTEN et al. 2009). Die NA- und Matrixproteingene stammten von bei Vögeln weit verbreiteten Influenzaviren, die etwa seit 1979 ebenso bei Schweinen in Eurasien vorkommen (GARTEN et al. 2009). Die genaue Infektionsquelle dieses neuen Virus für den Menschen konnte bis zum heutigen Zeitpunkt noch nicht festgestellt werden.

Die Einschleppung dieses Virus A/California/7/2009 (H1N1) fand zu Beginn der Pandemie zunächst durch Reisende aus Mexiko in andere Länder und auch nach Deutschland statt (CDC 2009c, RKI 2009). Die Pandemie breitete sich infolge einer effektiven Mensch-zu-Mensch-Übertragung rasch aus. Sie war aber im Vergleich mit der saisonalen Influenza durch mildere Krankheitsverläufe gekennzeichnet. Bis zum 06.08.2010 wurden allerdings weltweit 18.449 Todesfälle beim Menschen durch H1N1-Infektion registriert (WHO 2010). Des Weiteren zeigten die letzten Ergebnisse des Influenza-Monitorings der Weltgesundheitsorganisation (WHO), dass die Erkrankungszahl des pandemischen Influenza A Virus H1N1 rückläufig ist, dennoch zirkuliert dieser Subtyp in der menschlichen Population desgleichen weltweit im Jahr 2011 (WHO 2011a).

2.1.6 Hochpathogene und niedrigpathogene Influenzaviren

2.1.6.1 Begriffsbestimmungen der Pathogenität und Virulenz

Im Allgemeinen werden aviäre Influenzaviren als hoch pathogen (HPAIV) oder als niedrig pathogen (NPAIV) eingestuft. Der Begriff der Pathogenität wird allerdings unterschiedlich verwendet. Insbesondere im deutschsprachigen Raum beschreibt „Pathogenität“ generell die Fähigkeit von definierten Mikroorganismen im Sinne der Henle-Koch'schen Postulate, eine Krankheit in einem Makroorganismus zu erzeugen. Dabei bezieht sich die Aussage „pathogen“ immer auf eine Spezies von Mikroorganismen und gleichzeitig auf eine empfängliche Wirtsspezies. Dem wird die „Virulenz“ gegenüber gestellt, die den Ausprägungsgrad der krankmachenden Eigenschaften bei einem gegebenen Stamm eines pathogenen Mikroorganismus beschreibt. Die Virulenz wird also als ein Stamm-Merkmal einer als pathogen definierten Mikroorganismusspezies angesehen (ROLLE und MAYR 2007). International und ebenfalls im deutschsprachigen Raum wird bei der Charakterisierung von aviären Influenzaviren dieser Definition häufig nicht gefolgt, z. B. bei der Formulierung der Geflügelpestverordnung. Hier wird vielmehr weitgehend auf die Verwendung des Begriffs „Virulenz“ verzichtet. Stattdessen werden sowohl Art- als auch Stammeigenschaften hinsichtlich einer krankmachenden Wirkung auf eine bestimmte Wirtsart, im Zusammenhang mit aviärer Influenza meist in Bezug auf kommerziell gehaltenes Geflügel, mit dem Begriff „Pathogenität“ qualitativ und quantitativ charakterisiert. In der vorliegenden Arbeit soll deshalb der Begriff der „Pathogenität“ in der letztgenannten Bedeutung verwendet werden.

2.1.6.2 Pathogenitätsfaktoren aviärer Influenza

Die Pathogenität der Influenzaviren für Vögel, auch für Wirtschaftsgeflügel, ist multifaktoriell bedingt. Die Beteiligung einer Vielzahl von Genen und Loci innerhalb der Gene wird vermutet, genaue Kenntnisse fehlen hier allerdings noch. Zur Pathogenität tragen sicherlich eine ganze Reihe biologischer Eigenschaften aviärer Influenzaviren bei, wie beispielweise Infektionsausbreitung im Wirt, Gewebstropismus und Vermehrungseffizienz. So gehen während des Vermehrungszyklus die

verschiedenen Virusproteine (z. B. NS, PA, PB1 und PB2) spezifische Wechselwirkungen mit Zellrezeptoren, Kernproteinen und Proteasen der Wirte ein und beeinflussen dadurch sicherlich die Pathogenität, beziehungsweise (bzw.) Apathogenität (HATTA et al. 2007, MA et al. 2010). Ferner führen Mutationen im NS1-Gen (Gly92Lys, Ala149Val, Del 80-84), NA-Gen (I29, Q39) und im Gen des PB1-Proteins (K198) zu der bekannt hohen Pathogenität der H5N1-Viren (SEO et al. 2004, LI et al. 2006, CHEN et al. 2007, LEE et al. 2007, LONG et al. 2008). Außerdem wurde festgestellt, dass die NP, PB2 - und PA-Gene eine entscheidende Rolle bei der Wirtsspezifität und Adaptationsphase an Vogelspezies spielen (GABRIEL et al. 2007 und 2008, MASTROSOVICH et al. 2009).

Eine wesentliche Funktion für die Pathogenität wird dem HA-Gen zugeschrieben, und hier der Sequenz der endoproteolytischen Spaltstelle, an der das Vorläuferprotein, das H0-Protein, in die beiden Untereinheiten HA1 und HA2 gespalten wird (ROTT 1992). Diese Spaltung dient als eine wichtige Voraussetzung für die Endozytose aviärer Influenza in die Zielzelle und damit für den Infektionsbeginn. Bei den niedrig pathogenen avären Influenzaviren (NPAIV) finden sich hier nur wenige basische Aminosäuren (nur die Aminosäure Arginin), und das H0 wird lediglich durch trypsinähnliche Enzyme, die nur in den Epithelzellen des Respirations- und Gastrointestinaltraktes zu finden sind, gespalten (WEBSTER et al. 1992). Die Spaltstelle der HPAI-Viren dagegen enthält zusätzliche basische Aminosäuren wie Arginin oder Lysin mit der Folge, dass sie von subtilisinähnlichen Endoproteasen, die extrazellulär in allen Geweben des Körpers vorhanden sind, gespalten werden kann (VEY et al. 1992). HPAIV können daher in alle Organe und Gewebe des Wirtes eindringen und sich dort replizieren, was leichter verständlich macht, dass daraus eine generalisierte Infektion und möglicherweise der Tod des Tieres resultiert. Es wird vermutet, dass sich NPAIV der Subtypen H5 und H7 nach Übertragung von Wildvögeln auf Wirtschaftsgeflügel durch Mutationen und nach einer Phase gradueller Anpassung in hochpathogene Viren umwandeln können (SENNE et al. 2006). Warum bisher nur die Subtypen H5 und H7 als HPAI-Viren gelten, ist bis zum heutigen Zeitpunkt weitgehend unklar. Nach PERDUE et al. (1997) besitzen die Spaltstellen des HA-Glykoproteins vom H5-Subtyp eine Prädilektionsstelle, wodurch eine Insertion basischer Aminosäuren wahrscheinlicher wird. Die Nukleotid- und

Aminosäurekomposition der H0 Spaltstelle dient mittlerweile als diagnostisches Kriterium zur Unterscheidung von NPAI und HPAI Virusisolaten.

Bei der Umwandlung von niedrig pathogenen Viren zu HPAIV wird der „Stalk-Region“ des NA-Gens ebenfalls eine Sonderrolle beigemessen. ZHOU et al. (2009) fanden heraus, dass ein spezielles Motiv des NA-Stalk-Regions mit 20 Deletionen (Aminosäurepositionen von 49 bis 68) zu einer Erhöhung der Pathogenität und Virulenz des H5N1-Virus führt.

Die Ausprägung der Gene ist aber nicht isoliert voneinander zu betrachten, sondern es wurde festgestellt, dass die Pathogenität von der Kompatibilität der jeweiligen HA- und NA-Gene abhängt (MASTROSOVICH et al. 1999). Ferner wird sowohl der einzigen Mutation im Gen PB1-F2 (Aminosäureposition 66) als auch den HA-, NA- und PB1-Rekombinanten eine entscheidende Rolle für die optimale Virusreplikation sowie für die Virulenzsteigerung des pandemischen Influenza A Virus H1N1 vom Jahr 1918 zugeschrieben (PAPPAS et al. 2008). Jedoch sind die Interaktionen der vier genannten Proteine und die Bedingungen für die Balance zwischen ihren Genveränderungen noch nicht abschließend geklärt.

2.2 Bekämpfung der Influenza A Virus-Infektion

Wildvögel, und hier insbesondere Wasservögel der Ordnungen Anseriformes (Enten- und Gänsevögel) sowie Charadriiformes (Möwen- und Watvögel) gelten als Reservoirwirte für aviäre Influenzaviren. Infektionen verlaufen meistens klinisch inapparent mit der Konsequenz, dass sich die Influenzaviren effizient vermehren und ausbreiten können (WEBSTER et al. 1992). Die tatsächliche Bedeutung von Wildvögeln für die Übertragung von aviären Influenzaviren auf Wirtschaftsgeflügel ist derzeit allerdings immer noch umstritten. So wurde den Wildenten für die Verbreitung der H5- und H7-Viren keine bedeutende Rolle zugeschrieben, da SHARP et al. (1993) in einer langjährigen durchgeführten Studie (1976-1990) in Kanada die H5- und H7-Prävalenz bei diesen Tieren als sporadisch bewerteten. Die Hypothese, dass Wildvögel NPAI-Viren beherbergen, die sich nach Übertragung auf Hausgeflügel infolge ihrer großen genetischen Variabilität, insbesondere der Antigendrift und Antigen shift, rasch, nach wenigen Tier-zu-Tier-Passagen, in hochpathogene Viren

umwandeln können (SENNE et al. 2006), ist jedoch allgemein anerkannt. So wird vermutet, dass die Influenzavirus-Ausbrüche mit H7N1 in Italien innerhalb der Jahre 1999 und 2000 (CAPUA et al. 2002), H7N7 in den Niederlanden 2003 (ELBERS et al. 2004) sowie H7N3 in Kanada im Jahr 2004 (BOWES et al. 2004) auf diese Weise entstanden sind. Hinweise für das Vorkommen von AIV-Übertragungen von Wildvögeln auf Wirtschaftsgeflügel ergaben sich dazu aus retrospektiven Analysen im Rahmen von Wildvogelüberwachungsstudien. So fanden WERNER und GLOBIG (2004) bei einem zweijährigen Monitoring (2003 / 2004) ein NPAIV-Vorkommen von 0,6 % bei Geflügel in geschlossenen Haltungen in Deutschland heraus, während bei Hühnern in Auslaufhaltung eine Prävalenz von 1,2 % und bei Gänsen in Freilaufhaltung sogar von knapp 3 % ermittelt wurde. Die beim Nutzgeflügel häufig nachgewiesenen NPAI-Subtypen H3, H6, H4 und H12 kamen im gleichen Zeitraum beim Wildvögeln ebenfalls häufig vor (WERNER und GLOBIG 2004). Auch CECCHINATO et al. (2010) zeigten eine hohe Homologie der HA- und NA-Sequenzen (99,8 % bzw. 99,9 %) eines NPAIV H5N2 bei wildlebenden Stockenten und bei im Freilauf gehaltenen Enten sowie Gänsen aus derselben Gegend Italiens, indem wild lebende Vögel im Juli und das kommerzielle Geflügel im August des Jahres 2007 beprobt und untersucht wurden. Desgleichen stützen Ergebnisse molekular-epidemiologischer Analysen in mehreren Studien die bedeutende Rolle der Wildvögel für Influenzavirus-Infektionen beim Wirtschaftsgeflügel (SUAREZ et al. 2004, PASICK et al. 2007a, METREVELI et al. 2010).

2.2.1 Verordnungen zum Schutz gegen AIV-Infektionen

Zum Schutz von Mensch und Tier gegen Infektionen mit aviären Influenzaviren wurden weltweit geltende Regelungen getroffen, die die Ausbreitung dieser Viren eindämmen sollen. Dabei nahm die Weltorganisation für Tiergesundheit (O.I.E.), die Europäische Union (EU) und Deutschland eine Differenzierung in hochpathogene und niedrigpathogene aviäre Influenzaviren vor, um insbesondere den internationalen Handel und die Bekämpfung im Falle eines Auftretens zu regeln. Einzelne Begriffe wurden jedoch von den mehreren Organisationen unterschiedlich verwendet. So bezog die O.I.E. (2009a) in ihren Regelungen mit Bezug auf den internationalen Handel bei der Festlegung von meldepflichtiger aviärer Influenza (notifiable -

avian influenza (NAI)) nur Geflügel (poultry) mit ein, also domestizierte Vögel, die zum Zwecke der Produktion von Fleisch / Eiern für den Konsum sowie von anderen kommerziellen Produkten eingesetzt oder die für die Wiederaufstockung jagdbaren Wildes, zur Zucht dieser Vögel oder als Kampfhühner gehalten werden. Ausdrücklich nicht einbezogen waren Vögel, die aus anderen Gründen in Gefangenschaft erzeugt werden. Bei Geflügel vorkommende meldepflichtige Influenzaviren wurden dabei als hochpathogene meldepflichtige AIV (Highly pathogenic notifiable Influenza Virus (HPNAIV)) bezeichnet, wenn sie unabhängig vom Subtyp einen intravenösen Pathogenitätsindex (IVPI) größer als 1,2 zeigen oder alternativ eine Mortalitätsrate von größer als 75 % verursachen. Zusätzlich wurden den HPNAIV alle Subtypen H5 und H7 zugerechnet, die an der Spaltstelle des HA-Vorläuferproteins multiple basische Aminosäuren vergleichbar mit denen anderer HPNAI-Isolate besitzen. Im Gegensatz hierzu wurden als niedrig pathogene meldepflichtige aviäre Influenzaviren (Low pathogenic notifiable Influenza Virus (LPNAIV)) alle aviären Influenzaviren der Subtypen H5 und H7 definiert, die nicht HPNAIV sind (O.I.E. 2009a).

Die Europäische Kommission (European Commission (EC)), die in der EU-Richtlinie 2005/94/Europäische Gemeinschaft (EG) Mindestanforderungen für Überwachungsprogramme und Bekämpfungsmaßnahmen zur aviären Influenza festgelegt hat, bezog in ihre Regelungen und Definitionen der aviären Influenza nicht nur Geflügel ein, sondern erweiterte sie auch auf andere in Gefangenschaft gehaltene Vögel (EC 2005). Der Begriff „aviäre Influenza“ umfasst hier Influenzaviren der Subtypen H5 oder H7 sowie alle Influenzaviren mit einem IVPI größer als 1,2. Ähnlich wie in der Regelung des O.I.E. (2009a) wurden Infektionen mit den Subtypen H5 und H7 mit multiplen basischen Aminosäuren im Bereich der Spaltstelle des HA oder mit aviären Influenzaviren mit einem IVPI größer als 1,2 als hochpathogene aviäre Influenza (HPAI) bezeichnet, während niedrigpathogene aviäre Influenza (NPAI) alle Infektionen mit anderen H5 oder H7 einschloss (EC 2005).

Bei der Umsetzung dieser EU-Richtlinie in deutsches Recht in Form der Verordnung zum Schutz gegen die Geflügelpest (Geflügelpest-Verordnung von 2007, zuletzt geändert am 18.12.2009) kam es erneut zur Erweiterung der entsprechenden Regelungen. Als Reaktion auf die Erfahrungen mit der aviären Influenza des Subtyps H5N1 wurden hier nicht nur gehaltene Vögel, also Geflügel oder in Gefangenschaft

gehaltene Vögel anderer Arten, sondern erstmals auch Wildvögel mit einbezogen. Unter den Begriff „Wildvogel“ fallen in dieser Verordnung allerdings nur frei lebende Vögel der Ordnungen Hühnervögel, Gänsevögel, Greifvögel, Eulen, Regenpfeiferartige, Lappentaucherartige und Schreitvögel und zu wissenschaftlichen Zwecken gehaltene Vögel dieser Ordnungen. Damit wurden nur Vögel, die sich für die Influenzaviren des Subtyps H5N1 asiatischer Herkunft als Risikoarten herausgestellt haben, berücksichtigt. Staatlich angeordnete Maßnahmen zur Folge haben bei Wildvögeln außerdem lediglich Nachweise von HPAI H5N1. Geflügelpest liegt nach dieser Verordnung einerseits vor, wenn bei einem gehaltenen Vogel hochpathogene aviäre Influenza nachweisbar war, also Viren des Subtyps H5 oder H7 mit multiplen basischen Aminosäuren an der H0-Spaltstelle oder andere aviäre Influenzaviren mit einem IVPI größer als 1,2. Die Definition niedrig pathogener aviärer Influenzaviren bezieht nur gehaltene Vögel und wie die Regelungen der O.I.E. und der Europäischen Kommission ausschließlich Influenzaviren der Subtypen H5 und H7 ein, und dort dann alle H5 und H7 mit einem IVPI kleiner als 1,2 oder ohne multiple basische Aminosäuren an der Spaltstelle des H0-Proteins. Nachweise der NPAI-Subtypen H5 oder H7 bei Wildvögeln haben demnach keine staatlich angeordneten Maßnahmen zur Folge.

2.2.2 Wildvogel-Monitoringprogramme im europäischen Raum

Die ersten europaweiten AIV-Wildvogel-Monitorings wurden gemäß der EU-Richtlinie 2002/694/EC aufgrund freiwilliger Entscheidungen der Mitgliedsstaaten durchgeführt (EC 2002). Laut der Richtlinie 2005/94/EG vom 20.12.2005 sind allerdings alle EU-Mitgliedstaaten verpflichtet, jährliche Monitorings zur aviären Influenza bei Wildvögeln durchzuführen. Dadurch sollen die Risiken einer Einschleppung von HPAIV (besonders H5N1 und H7N1) rechtzeitig erkannt werden (EC 2005). Im Rahmen dieses EU-Monitorings wurden in Deutschland seit 2005 die Wildvogelüberwachungsstudien kontinuierlich in allen 16 Bundesländern fortgesetzt und durch das Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz über das Nationale Referenzlabor für Aviäreinfluenza am Friedrich-Loeffler-Institut (FLI) koordiniert. Gesetzliche Grundlagen für eine Bekämpfung der Geflügel-

pest stellten bis Oktober 2007 folgende Regelwerke dar: (i) Verordnung zum Schutz gegen die Geflügelpest und die Newcastle-Krankheit (Geflügelpest-Verordnung) vom 20. Dezember 2005, (ii) Verordnung über Untersuchungen auf die Klassische Geflügelpest sowie zum Schutz vor der Verschleppung der Klassischen Geflügelpest (Geflügelpestschutzverordnung) vom 1. September 2005 in der Fassung (i.d.F.) vom 31.10.2006, (iii) Verordnung zur Aufstallung des Geflügels zum Schutz vor der Klassischen Geflügelpest (Geflügel-Aufstallungsverordnung) vom 9. Mai 2006 i.d.F. vom 27.02.2007, (iv) Verordnung über Schutzmaßnahmen beim Auftreten von Geflügelpest beim Nutzgeflügel (Nutzgeflügel-Geflügelpestschutzverordnung i.d.F. vom 10.08.2006, zuletzt geändert durch Bundesanzeiger vom 30.11.2006), (v) Verordnung über Schutzmaßnahmen bei Auftreten von Geflügelpest bei wildlebenden Vögeln (Wildvogel-Geflügelpestschutzverordnung i.d.F. vom 08.09.2006, zuletzt geändert durch Bundesanzeiger vom 30.11.2006). Ab dem 18. Oktober 2007 trat dann eine neue Verordnung zum Schutz gegen die Geflügelpest (Kurztitel: Geflügelpest-Verordnung, zuletzt geändert vom 18.12.2009) in Kraft, in die die oben beschriebenen Verordnungen eingegliedert wurden.

Im Rahmen der deutschlandweit koordinierten Monitoring-Aktivitäten fand darüber hinaus die Etablierung einer nationalen Datenbank zum Wildvogelmonitoring am Institut für Epidemiologie des FLI statt, die die Sammlung von Informationen aus der ganzen Bundesrepublik Deutschland und darauf basierend umfangreiche epidemiologische Analysen erlaubte (FLI 2007). Die in den einzelnen Bundesländern, auch in Bayern, in den Monitoring-Untersuchungen in den Jahren 2006, 2007, 2008, 2009 und 2010 erhobenen Daten von 69.000, 25.000, 21.815, 13.397 bzw. 10.945 Wildvögeln wurden in diese zentrale Datenbank integriert (HARDER et al. 2009, Tiergesundheitsjahresbericht 2010 und 2011).

In Bayern beauftragte das bayerische Staatsministerium für Umwelt, Gesundheit und Verbraucherschutz das bayerische Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL) mit der Durchführung der Wildvogel-Überwachungsstudien. Seit Herbst 2005 wurden Daten über das bayernweite AI-Vorkommen mittels Lebend- und Totfundmonitoring gesammelt und analysiert (Abb. 3 (Seite (S.) 30)). Für das Lebendmonitoring wurden in enger Zusammenarbeit des LGL mit dem Landesbund für Vogelschutz in Garmisch-Partenkirchen, der Klinik für Vögel, Reptilien, Amphibien

und Zierfische der Ludwig-Maximilians-Universität München sowie dem Bayerischen Jagdverband ein standardisiertes Studiendesign hinsichtlich des zeitlichen Ablaufes, einbezogener Vogelspezies, der Probenarten (Tracheal- und Kloakaltupfer) und der geographischen Regionen (Risikogebiete für Ein- und Verschleppung der Influenzaviren, also z. B. Seengebiete, Nationalparks, Zoos) erstellt. Nach Erteilung von Genehmigungen durch die Regierung von Oberbayern und der bayerischen Tier- und Naturschutzbehörden war es möglich, Beprobungen bei Wasservögeln durch Mitarbeiter des LGL und der bayerischen Veterinärämter durchzuführen. Am LGL fand die Analyse der aus Großjagden und Lebendfang von Wasservögeln stammenden Tracheal- und Kloakaltupfer sowie Kotproben mit molekularbiologischen Methoden statt. Neben den molekularbiologischen AI-Nachweisverfahren erfolgten auch die Virusvermehrung und die serologische Analyse des Virus mit klassischen virologischen Untersuchungen (Abb. 3 (S. 30)).

Nachweise der anzeigepflichtigen aviären Influenza H5/H7/N1-Subtypen folgten mittels Echtzeit Reverser Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion (RT-rPCR) nach SPACKMANN et al. (2002), also dem vom Nationalen Referenzlabor für Geflügelpest empfohlenen Test. Im Rahmen eines wissenschaftlichen Projektes wurden zudem die nachgewiesenen H5-Subtypen näher charakterisiert und durch Sequenzierung der HA-Gene diese Viren als niedrig oder hoch pathogen typisiert sowie, mittels zusätzlicher Sequenzierung von NA-, NP- und PA-Genen, deren phylogenetische Beziehungen zu anderen H5-Viren untersucht. Parallel zu den am LGL durchgeführten Untersuchungen wurden die vom LGL als für Influenza-A-Virus positiv identifizierten Proben zur Bestätigung zum Nationalen Referenzlabor für Geflügelpest am FLI versandt. Dort erfolgte die Einstufung der als H5 oder H7 differenzierten Viren als hoch oder niedrig pathogen und zusätzlich, wenn möglich, die Feststellung des Subtyps bei Nicht-H5- (oder H7-) Viren. Im Totfundmonitoring waren verendete Wildvögel, die zur Untersuchung an das LGL oder die Klinik für Vögel, Reptilien, Amphibien und Zierfische gebracht worden waren, einbezogen. Im Totfundmonitoring nachgewiesene Viren spiegeln die Präsenz des aviären Influenzavirus in diesem Gebiet wieder. Die AIV-Untersuchungen der beim Totfundmonitoring gescreenten Proben folgten nach dem gleichen Schema wie beim Lebendmonitoring (Abb. 3).

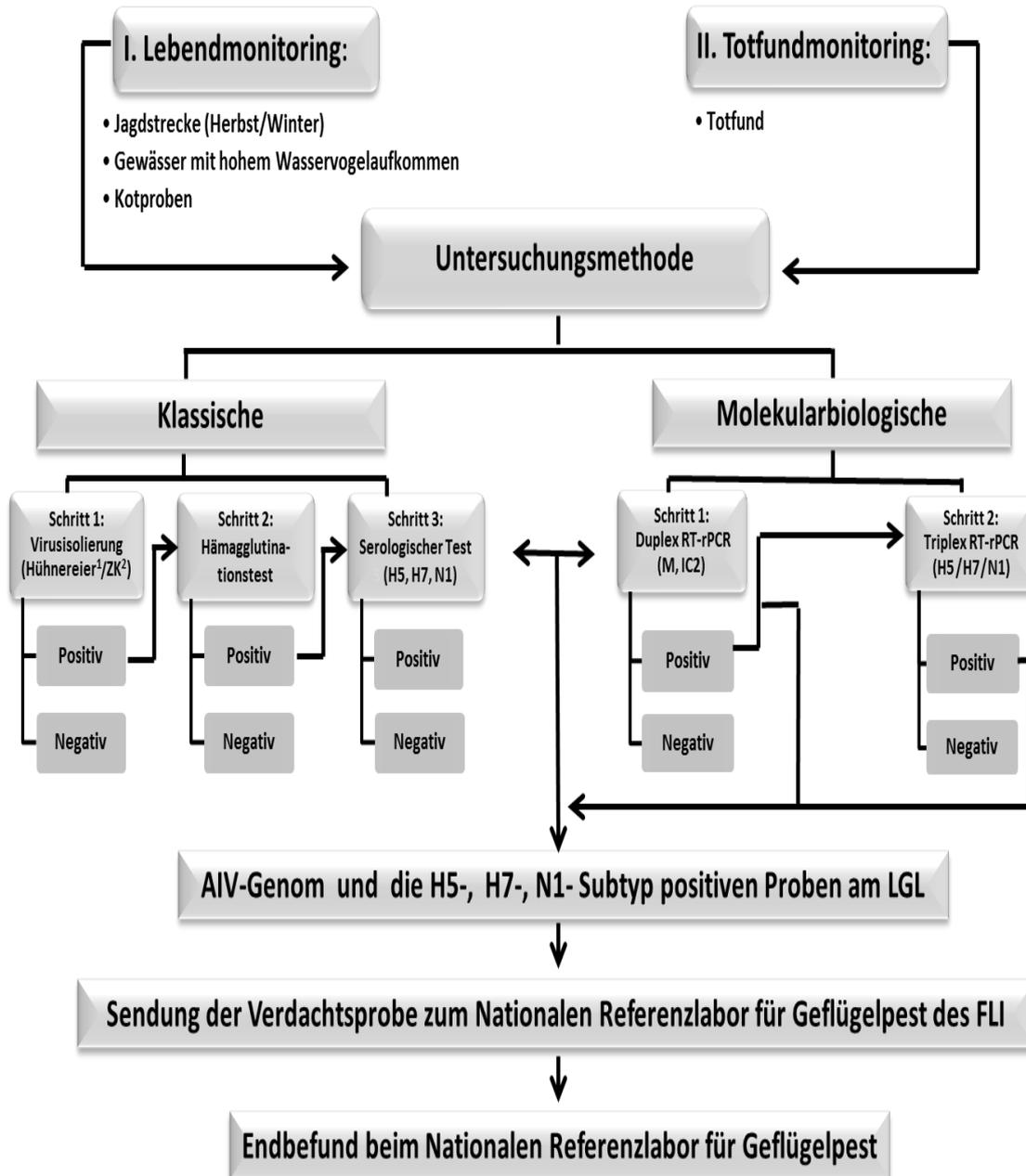


Abbildung 3: Nachweis anzeigepflichtiger aviärer Influenza H5 / H7 / N1-Subtypen

Darstellung nach EU-Diagnostikhandbuch (EC 2005) und modifiziert nach LGL-Untersuchungsmethoden

¹Embryonierete Hühnereier, ²Zellkultur, FLI=Friedrich-Loeffler-Institut, IC2=Interne Kontrolle (Nicht-AIV-Kontroll-RNA), LGL=Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit, M=Matrix, RT-rPCR=Echtzeit (Real-Time) Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion

2.3 Epidemiologie der H5- und H7-Virusinfektionen bei Wildvögeln

2.3.1 Vorkommen aviärer Influenzaviren bei Wildvögeln

Überwachungsstudien zur Erfassung des Vorkommens von Influenzaviren bei Wildvögeln sind von zentraler Bedeutung, da sie die Grundlage für die Vorhersage zukünftiger Entwicklungen und für gesetzliche Regelungen und Empfehlungen darstellen. Darüber hinaus erlauben die dabei erfassten Daten die Überprüfung der Wirksamkeit von Interventionen. Bei in den letzten Jahren weltweit durchgeführten Surveillance-Studien zur aviären Influenza bei Vögeln wurden folgende Aspekte analysiert: (i) Bestimmung der AIV-Prävalenz, (ii) molekular-epidemiologische Charakterisierung des Virusurspungs, (iii) Analyse der beginnenden Drift- und/oder Shiftereignisse von Influenzaviren, (iv) rechtzeitige Einschätzung des Eintragsrisikos hochpathogener aviärer Influenza, (v) Evaluierung der lokalen und kontinentübergreifenden Migrationswege von Wildvögeln, (vi) Erforschung des Einflusses von Ökosystemänderungen auf das Vogelzugverhalten, (vii) detaillierte Kenntnisse über die Evolution der Influenza-A-Viren.

Nach retrospektiven Analysen der Grippepandemien im 18., 19., 20. und 21. Jahrhundert und wegen des Potentials einer raschen weltweiten Ausbreitung neuer Influenzaerreger, stieg das Interesse an dieser Thematik in der Fachöffentlichkeit (LEICHTENSTERN 1896, LEICHTENSTERN 1912, ROBERTSON 1918, BERLINER MEDIZINISCHE GESELLSCHAFT 1958, ANONYM 1968, PATTERSON 1986, KILBOURNE 2006, TAUBENBERGER et al. 2007). Dennoch wurden erst seit Mitte der 70er Jahre Wildvogelüberwachungsstudien zum AIV-Vorkommen weltweit (besonders in Europa und Nordamerika) durchgeführt (ALEXANDER 2000). Bisher waren NPAI-Viren bei mindestens 105 verschiedenen Wildvogelarten identifizierbar (OLSEN et al. 2006), und dabei am häufigsten bei Vögeln der Ordnungen Anseriformes (Enten, Gänse, Säuger, Schwäne) und Charadriiformes (Watvögel, dazu gehören Alken, Möwen, Seeschwalben) (HINSHAW et al. 1980a, KALETA et al. 2005a). Vögel dieser Ordnungen gelten daher allgemein als Wildvogelreservoir für aviäre Influenzaviren (WEBSTER et al. 1992). Möglicherweise spielen Watvögel als Virusreservoir nur eine geringe oder regional/saisonal eine unterschiedlich große Rolle (IVERSON et al. 2008), denn in den letzten Jahren wurde in mehreren Studien

sowohl in Nordamerika als auch in Europa bei diesen Vögeln nur eine sehr geringe Prävalenz (0-0,01 %) festgestellt (FOUCHIER et al. 2003, HLINAK et al. 2006, MUNSTER et al. 2007, WINKLER et al. 2007, IP et al. 2008, DUSEK et al. 2009). Allerdings ergaben Untersuchungen bei Watvögeln in Australien eine AI-Prävalenz von 6 % (HURT et al. 2006) und bei Watvögeln in Nordamerika von 14,2 % (KRAUSS et al. 2004).

Differenzierung von AIV-Subtypen. Bei Stockenten (n=8.938) im nordeuropäischen Raum wurden fast alle Subtypen (H1-H13 und N1-N9) aviärer Influenzaviren nachgewiesen, dabei stellten MUNSTER et al. (2007) überwiegend die Subtypen H4, H6 und H7 fest. H13 und H16 konnten lediglich bei Watvögeln und H14 sowie H15 gar nicht detektiert werden (MUNSTER et al. 2007). In Nordamerika waren in den Jahren 1976-2001 bei Wildenten die Subtypen H6, H3, H1, H4 und H10 sowie bei Watvögeln die Subkomponenten H3, H11, H1, H10, H9 und H7 am häufigsten zu ermitteln (KRAUSS et al. 2004 und 2007). Auch hier war H13 nur bei Watvögeln identifizierbar (KRAUSS et al. 2004). Im Gegensatz hierzu zeigten die Ergebnisse einer Studie von SPACKMAN et al. (2009) die NPAIV-Isolierung der Subtypen H13 und H16 (mit den Subkomponenten N6 und N3) insgesamt aus vier Möwen, und zwar bei Lachmöwen (*Larus ridibundus*) und Mongolenmöwen (*Larus vagae mongolicus*) während des Wildvogelmonitorings 2005-2007 in der Mongolei. Interessanterweise wurde ebenfalls in Bayern ein H13-Virus aus der Kotprobe eines Blässhuhns (*Fulica*) während der Surveillance-Studie innerhalb der Jahre 2007 und 2009 isoliert (Rabl 2010).

Im Gegensatz zum Hämagglutinin ergaben sich sowohl in Europa als auch in Nordamerika bei den N-Subtypen keine Hinweise auf Wirtsspezifität (KRAUSS et al. 2004 und 2007, MUNSTER et al. 2007). Eine Zusammenfassung ausgewählter Untersuchungen zum weltweit durchgeführten Wildvogel-Monitoring mit Darstellung häufig nachgewiesener AI-Subtypen und der Prävalenz von H5 / H7-Subkomponenten bei Vögeln der Ordnungen Anseriformes und Charadriiformes findet sich in Tabelle 2 (S. 34).

Übertragungswege aviärer Influenzaviren: Der fäkal-oralen Übertragung der Influenzaviren zwischen Vögeln wird eine essentielle Rolle beigemessen (HINSHAW und WEBSTER 1982). Eine Virusexkretion mit dem Kot über 2 bis 14 Tage wurde bei experimentell mit H7N2 infizierten Hühnern beobachtet (LU et al. 2003). Mehreren wissenschaftlichen Arbeiten weisen zwar auf eine aerosole Infektionsübertragung hin (MITCHELL et al. 1968, SCHAFFER et al. 1976, TELLIER 2006, BÜTTNER et al. 2008), dennoch spielt sie bei Influenzainfektionen der Wildvögel nur eine untergeordnete Rolle. Die Virusexkretion mit dem Kot ist unter Umständen erheblich, so wurden bei Wildvögeln bis zu $10^{7,8}$ 50 %-Ei-Infektiöse Dosen (EID₅₀) pro Gramm Kot gemessen (WEBSTER et al. 1978). Bemerkenswerterweise waren infektiöse Viruspartikel in Kotproben bei 4 °C 32 Tage und bei 20 °C sieben Tage identifizierbar (WEBSTER et al. 1978).

Altersabhängige Unterschiede der Influenzavirusprävalenz bei Wildvögeln.

Influenzaviren werden im Allgemeinen bei Jungvögeln mit höherem Vorkommen erwiesen als bei Altvögeln. So stellten HINSHAW et al. (1985) unterschiedliche AIV-Prävalenz zwischen jungen und adulten Vögeln bei einem Wasservogelmonitoring bei insgesamt 10.755 untersuchten wild lebenden Vögeln in Nordamerika (Alberta und New York) im Zeitraum von 1976 bis 1983 fest. Das aviäre Influenzavirus-Genom war bei 2.113 Jungvögeln (29 % (n=7197)) im ersten Lebensjahr nachweisbar. Dagegen wurden AI-Viren lediglich bei 475 adulten Wasservögeln (13 % von 3558 untersuchten Tieren) ebenfalls in dieser Studie belegt.

In Minnesota variierte die Prävalenz von aviären Influenzaviren bei juvenilen Stockenten in den Jahren 1998-2000 zwischen 11 und 23 %, während Influenzaviren nur bei 2 % der adulten Stockenten im gleichen Zeitraum identifizierbar waren (HANSON et al. 2003). Folglich führte dies zur weithin akzeptierten Auffassung, dass immunologisch naive Jungvögel für eine AI-Infektion besonders empfänglich sind, große Mengen von Virus ausscheiden und Antikörper erst verzögert ausbilden (KIDA et al. 1980).

Tabelle 2: Prävalenz der Influenza-A-Viren bei Wildvögeln in Surveillance-Studien (Auswahl)

Land	Zeitraum der Studie	Vorkommen niedrigpathogener aviärer Influenza						Quelle
		Häufig nachgewiesene Viren ¹		H5-Viren		H7-Viren		
		Subtyp	%	Subtyp	%	Subtyp	%	
Deutschland	1977-1989 ²	H4N6, H2N3, H1N1	1,0	n.n ³		H7N3, H7N7	0,3	SÜSS et al. 1994
	2001-2002	H4N6, H3N8	0,6	n.n		n.n		HLINAK et al. 2006
	2003-2005	H10N7, H2N3, H4N6	0,6	H5N2, H5N3	0,09	H7N1, H7N7	0,06	GLOBIG et al. 2006
	2007-2008	H11, H9, H1N1	0,08	H5, H5N2, H5N3	0,9	n.n		RABL et al. 2009
	2008	H6N2, H3N8, H4N6	0,2	H5, H5N3, H5N2	0,3	H7	0,01	HARDER et al. 2009
Italien	1992-1998	H1N1, H10N8, H3N8	2,6	H5N2 ⁴	0,1	n.n		De MARCO et al. 2004
	1998-2000	H2N3, H11N6, H1N1	0,8	H5 ⁵	1,6	n.n		De MARCO et al. 2005
	2003-2005	H4N6, H1N1, H10N4	0,04	H5N1, H5N2, H5N3	0,03	H7N4, H7N7	0,08	CATTOLI et al. 2007
Kanada	1976-2001	H3N8, H6N2, H4N6	24,8	H5 mit N2-N4, N8, N9	1,2	H7 mit N1-N5, N7-N9	1,5	KRAUSS et al. 2004
	2001-2006 ⁶	H10N7, H4N6, H1N4	2,9	H5N7, H5N8	0,1	H7N3, H7N4, H7N5	1,0	KRAUSS et al. 2007
	2005-2007	H4N6, H3N8, H3N2	0,8	H5 mit N1-N3, N8, N9	0,3	H7N3, H7N4, H7N7	0,1	PASICK et al. 2010
USA	1991-1994	H4N6, H3N8, H10N7	3,3	n.n		H7N3	0,03	ITO et al. 1995
	2006-2007	H4N2, H4N6, H6N2	0,02	H5N2, H5N3, H5N9	0,1	n.n		DUSEK et al. 2009
	2007-2008	H6N1, H10N7, H3N5	0,7	H5N2, H5N7	0,06	H7N3, H7N7	0,3	HILL et al. 2010

¹H5- und H7-Subtype sind nicht einbezogen, ²Sentinel-Vögel wurden nicht berücksichtigt, ³Nicht nachgewiesen, ⁴Nur aus der Kloakal-Tupferproben isolierte Viren, ⁵Lediglich serologisch bestätigte H5-Viren, ⁶Auch in New Jersey (United States of Amerika (USA))

2.3.1.1 NPAIV mit H5- und H7-Subkomponente

Eurasien und Afrika: NPAI-Viren mit H5- oder H7-Subkomponenten perpetuieren in der Wildvogelpopulation (WALLENSTEN et al. 2007). In Nordeuropa wurden in den Jahren 1998-2006 bei der Untersuchung von 36.809 Wasservögeln niedrig pathogene aviäre Influenzaviren mit der Subkomponente H5 in einer Prävalenz von 0,07 % und H7-Subtypen mit einer Isolierungsrate von 0,1 % detektiert (MUNSTER et al. 2007).

In Deutschland in den Jahren 1977-2008 durchgeführte Wildvogelüberwachungsstudien ergaben Prävalenzbereiche von 0,09 % bis 0,9 % und 0,01 % - 0,3 % für H5- bzw. H7-Subkomponenten (eine Auswahl ist in Tab. 2 dargestellt (S. 34)) (SÜSS et al. 1994, GLOBIG et al. 2006, HLINAK et al. 2006, HARDER et al. 2009, RABL et al. 2009). Niedrig pathogene H5N1-Viren konnten in Deutschland von 1977 bis 2008 nicht festgestellt werden (Tab. 2). Des Weiteren waren 24 Proben mit NPAIV H5 (mit den Serotypen N1, N2, N3, mit unbestimmten NA-Gen (N?) (n=17)) und H7 (mit N7 sowie N? (n=7)) mit einem Vorkommen von 0,13 % bzw. 0,05 % bei untersuchten 13.397 Wildvögeln im Jahr 2009 deutschlandweit positiv (Tiergesundheitsjahresbericht 2010). Im Jahr 2010 war die Zahl der Probennahmen mit 10.945 Wildvögeln in Deutschland rückgängig (Tiergesundheitsjahresbericht 2011). Die Untersuchungen auf Influenza-A-Virus ergaben 246 positive Proben (2,2 % / 10.945) und insgesamt 40 von diesen Proben enthielten die Subtypen H5N1, H5N2, H5N3 und H5N? (eine Prävalenz von 0,4 % von 10.945). Niedrig pathogene aviäre Influenzaviren des H7-Sybtyps mit unbestimmtem NA-Gen wurden mit einer Prävalenz von 0,03 % (n=3) in diesem Zeitraum belegt (Tiergesundheitsjahresbericht 2011).

Europaweit konnte im Jahr 2006 bei H5- und H7- Surveillance-Studien (Lebend- und Totfundmonitoring sowie Sentinelsurveillance) der 14 Mitgliedstaaten der EU, bei denen 120.706 Vögel einbezogen waren, NPAI H5-Viren bei 136 Vögeln (0,11 %) eruiert werden. 26 (0,021 %) Wildvögeln waren für Viren mit H7-Subkomponente positiv gescreent (HESTERBERG et al. 2009). Bei im Jahr 2007 europaweit durchgeführten H5- und H7- Surveillance-Studien nahmen zwar sieben zusätzliche Mitgliedstaaten (n=21) der EU teil, dennoch war die Zahl untersuchter Vögel (n=79.392 Proben) im Vergleich zum Jahr 2006 geringer. In dieser Studie konnten

NPAI H5- und H7-Viren bei 105 (0,13 %) bzw. sieben Vögeln (0,009 %) festgestellt werden (BREED et al. 2010). Ferner gab es europaweit 2009 lediglich folgende NPAI-Viren-Nachweise bei Wildvögeln: die Subtypen H5N3 bei Enten (n=2) in Frankreich und H7N9 bei einer Gans in der Tschechischen Republik (BROWN 2010). Im Gegensatz hierbei konnten beim Wirtschaftsgeflügel die niedrig pathogenen AI-Subtypen H5 und H7 mit den Subkomponenten N1, N2 in Belgien, Dänemark, Deutschland, Frankreich und Italien in den Jahren 2008 und 2009 dokumentiert werden (DEFRA 2009, BROWN 2010).

In Taiwan wurden insgesamt 29.287 Wildvögel in den Jahren 1998-2007 untersucht. Dabei stellten CHENG et al. (2010) in drei Fällen NPAIV H5 fest, während niedrig pathogene H7-Subtypen aus 19 Vögeln angezüchtet werden konnten, dies entspricht Prävalenzen von 0,01 % bzw. 0,06 %.

Für Afrika liegen keine Berichte über systematische Untersuchungen zum Vorkommen von NPAI-Viren der Subtypen H5 und H7 bei Wildvögeln vor. ABOLNIK (2007) publizierte lediglich einen Nachweis eines NPAI H5N2-Virus bei einem Strauß (*Struthio camelus*) in Südafrika im Jahre 2004. Mittels der RTr-PCR war eine Kloakalprobe bei einer Eilseeschwalbe (*Sterna bergii*) mit H5N8-Virus positiv (ABOLNIK et al. 2010), zur Ermittlung der Pathogenität wurde die H0-Spaltstelle dieses Virus allerdings nicht analysiert.

Nord- und Südamerika, Australien: Untersuchungen aus den Jahren 1967 bis 2008 stellten bei Wasservögeln in Nordamerika eine stark variierende Häufigkeit der Viren mit NPAI-H5 und H7-Subkomponenten von 0,06 % bis 1,2 % bzw. 0,03-1,5 % dar (Tab. 2 (S. 34)). Kürzlich durchgeführte Studie von PEDERSEN et al. (2010) in den Vereinigten Staaten von Amerika ergaben eine stabile Prävalenz der NPAI H5-Viren, und zwar von 0,38 % (n=555). Im Gegensatz dazu stellten die Autoren den H7-Subtyp lediglich in drei Proben mit einem Vorkommen von 0,002 % fest. In dieser Arbeit wurden 145.055 Tupferproben von Wildvögeln aus 50 Bundesstaaten der USA im Zeitraum von April 2006 bis März 2008 mit der RTr-PCR untersucht. Prävalenz bei der Virusisolierung betrug dabei mit 18 % (99 / 555) für die H5-Subkomponente in Kombination mit N1-N4 und N7-N9. Insgesamt vier H7N2- und H7N3-Viren konnten in dieser Studie isoliert werden (PEDERSEN et al. 2010).

Für den südamerikanischen Raum existieren nur einzelne Berichte über Nachweise (bis 2010) von niedrig pathogenen AIV der Subtypen H5 und H7 bei Wildvögeln. So erfolgte im Jahr 2001 eine NPAI H7N3-Isolierung aus einer Zimtente (*Anas cyanoptera*) in Bolivien (SPACKMAN et al. 2007), und dieses Virus war höchstwahrscheinlich als Donor-Virus für HPAI-Ausbrüche in Chile im darauf folgenden Jahr verantwortlich (SUAREZ et al. 2004). Ein NPAI H5N9-Nachweis konnte bei einer Dominikanermöwe (*Larus dominicanus*) außerdem in Chile im Jahr 2008 geführt werden (SENNE 2010). Allerdings wurde von 2006 bis 2009 durch das Caribbean Animal Health Network ein Wildvogelmonitoring in vier karibischen Ländern durchgeführt (LEFRANÇOIS et al. 2010). In dieser Studie waren interessanterweise alle untersuchten 627 Proben von Wildvögeln (Enten, Watvögel und Tauben) in der RTr-PCR auf Influenza-A-Virus negativ.

In Australien ermittelten HANSBRO et al. (2010) mittels quantitativer Reverse Transkriptase-PCR die Subtypen H5 (n=19) und H7 (n=8) mit einer Prävalenz von 0,09 % bzw. 0,04 % bei 21.858 untersuchten Kloakal- und Fäkalproben von Wildvögeln aus den Jahren 2005-2008.

2.3.1.2 HPAI H5- und H7-Viren

Bei Wildvögeln wurden hochpathogene aviäre Influenzaviren der Subtypen H5 und H7 bisher nur selten dokumentiert (RABL et al. 2010). Nach heutigem Wissensstand geht man davon aus, dass lediglich die niedrig virulenten aviären Influenzaviren bei Wildvögeln (z. B. H1N1, H6N2, H6N8 und H7N7 bei Stockenten) vorkommen und wohl auch keine Bedeutung als Krankheitserreger besitzen (LATORRE-MARGALEF et al. 2009).

Eine Ausnahme stellt H5N1 asiatischer Herkunft dar. So war von 30.04 bis 04.05. 2005 am Qinghai-See (Volksrepublik China) ein HPAI H5N1-Seuchengeschehen mit tödlichem Ausgang für etwa 3.000 Wasservögel wie Streifengänse (*Anser indicus*), Braunkopfmöwen (*Larus brunnicephalus*), Lachmöwen (*Larus ichthyaetus*) und Kormorane (*Phalacrocorax carbo*) zu beobachten (CHEN et al. 2005).

Eurasien und Afrika. Für Eurasien und Afrika beschränken sich, wie im Folgenden dargestellt, die Nachweise hochpathogener AI bei Wildvögeln bisher auf den Subtyp H5, und hier auf H5N1, H5N2 und H5N3. Veröffentlichungen zum Vorkommen von HPAIV H7 bei Wildvögeln liegen für diese Gebiete nicht vor.

HPAI H5N1: Die derzeit zirkulierenden hochvirulenten H5N1-Viren asiatischer Herkunft wurden im Jahr 1996 erstmalig nachgewiesen, und zwar bei domestizierten Gänsen (*A/goose/Guangdong/1/96*) in Südchina (XU et al. 1999). Dieses Virus führte jedoch anschließend in Südostasien zu hohen Mortalitätsraten und zahlreichen Todesfällen unter Wildvögeln, wie beispielsweise 2002 in Hong Kong (STURM-RAMIREZ et al. 2004). In China, wo mindestens vier unterschiedliche Genotypen von H5N1 am Geschehen beteiligt waren, starben 6.184 Wasservögel (Gänse, Enten, Schwäne, Möwen und Kormorane) von 04.05.05 bis 29.06.05 (CHEN et al. 2006a). Die Volksrepublik China gilt immer noch als endemisches Gebiet für multiple HPAI H5N1-Sublinien, von wo diese diversen Virus-Sublinien (z. B. Genotype V, Z, Z+) möglicherweise stammten (CHEN et al. 2006b). Basierend auf HA-Sequenzen dieser genetisch und antigenetisch verschiedenen H5N1-Virusstämme werden insgesamt 10 Clades (von 0 bis 9) und deren Subclades (beispielsweise 2.2, 2.2.1) unterschieden (WHO 2011b).

Vermutlich über subklinisch infizierte Enten (GILBERT et al. 2006a) breitete sich das Virus schließlich nach Westen aus und wurde sowohl bei Wildvögeln als auch beim kommerziellen Geflügel inzwischen in mehr als 60 Ländern in Eurasien festgestellt (VIJAYKRISHNA et al. 2008). Die Ein- und Verschleppung der HPAI-Viren des Subtyps H5N1 aus Südostasien nach Mittelasien und Russland sowie in weitere Länder in Europa und Afrika ereignete sich möglicherweise seit 1996, da in diesem Zeitraum in oben genannten Ländern Geflügelpestausbüche beim Nutzgeflügel unter Beteiligung genetisch ähnlicher HPAI H5N1-Viren (Gs/GD-Linie) gemeldet wurden. Im Jahr 2005 ergaben so HPAI H5N1-Nachweise bei Wildvögeln, und zwar im Juli in Russland und Kasachstan, im August in der Türkei und Rumänien und im Oktober in Weißrussland (KEAWCHAROEN et al. 2008). Das Virus erreichte schließlich Ende 2005 auch Westeuropa (BRAGSTAD et al. 2007, NAGY et al. 2007, PALMAI et al. 2007, TEIFKE et al. 2007) und Anfang 2006 Deutschland (RINDER et al. 2007, STARICK et al. 2008). Diese Viren konnten in mehreren Arbeiten lediglich

bei verendeten Wildvögeln europaweit nachgewiesen werden (RINDER et al. 2007, HOFFMANN et al. 2008, SZELECZKY et al. 2009).

In Deutschland wurden die hochpathogenen aviären Influenzaviren des Subtyps H5N1 bei Wildvögeln erstmals am 15. Februar 2006 bei einem verendeten Höckerschwan im Landkreis Rügen (Mecklenburg-Vorpommern) dokumentiert. In Mecklenburg-Vorpommern waren HPAI H5N1-Viren im Jahr 2006 anschließend nicht nur bei 344 Wildvögeln, sondern auch bei drei Hauskatzen und einem Steinmarder identifizierbar (FLI 2007). Im Jahr 2007 konnten deutschlandweit 326 Wildvögel auf HPAI H5N1-Influenzaviren positiv getestet werden (FLI 2008a). Dabei wies GLOBIG et al. (2009a) diese Viren in sieben verschiedenen Bundesländern bei 30 unterschiedlichen Wildvogelspezies nach, allerdings am häufigsten auf der Insel Rügen, und hier am zahlreichsten bei Singschwänen, während am Bodensee vor allem Tafelenten betroffen waren. Im Jahr 2009 wurde H5N1 sowohl deutschlandweit als auch europaweit nur einmal, und zwar im März 2009 bei einer wildlebenden Stockente in Possenhofen in Bayern ermittelt (FLI 2009). Im Jahr 2010 gab es keine HPAI H5N1-Nachweise bei Wildvögeln in Deutschland (Tiergesundheitsjahresbericht 2011).

Europaweit wiesen HESTERBERG et al. (2009) und BREED et al. (2010) auf die hochvirulenten H5N1-Viren in den Ländern der EU im Jahr 2006 bei 591 Wildvögeln (0,5 % von 120.706) und im Jahr 2007 bei 329 wildlebenden Vögeln hin (0,4 % / 79.392). Im Jahr 2008 konnte lediglich ein einziges Mal HPAIV H5N1 bei einem Wildvogel in Europa entdeckt werden, und zwar in den Monaten Februar/März am Sempacher See in der Schweiz bei einer gesunden Tafelente (*Aythya ferina*). Andere Vögel aus diesem Gebiet, die im Rahmen eines Monitoringprogrammes untersucht wurden, waren negativ (O.I.E. 2008a). Im Jahr 2010 waren HPAI H5N1-Viren nur in Rumänien beim Hausgeflügel (in zwei Dörfern im Donaudelta) (O.I.E. 2010a) und in Bulgarien bei einem tot aufgefundenen Bussard feststellbar (O.I.E. 2010b).

In Afrika wurde das Vorkommen von HPAIV H5N1 bisher lediglich bei kommerziell gehaltenen Hühnern nachgewiesen, dabei war die Virusübertragung vermutlich über Wildvögel erfolgt. Die Nachweise beschränken sich allerdings bisher auf Nigeria und die östlichen, zentralen und westlichen Landesteile von Burkina Faso und auf die

Jahre 2006-2008 (DUCATEZ et al. 2006 und 2007, FUSARO et al. 2010). Bemerkenswert ist, dass die Nachweise von H5N1 bei Wildvögeln bis zum Jahr 2004 stets mit hohen Mortalitätsraten verbunden waren (STURM-RAMIREZ et al. 2004). Später konnten allerdings auch Infektionen mit HPAIV H5N1 mit subklinischem Verlauf identifiziert werden. So gelang in der Volksrepublik China 2004 KOU et al. (2005) die Isolierung der hochvirulenten AIV vom Subtyp H5N1 bei Untersuchungen aus drei Feldsperlingen (*Passer montanus*), die keinerlei Krankheitssymptome zeigten. Im Zeitraum vom Januar bis März 2005 wurden am chinesischen Poyang-See H5N1 (HPAI) bei gesunden Wildenten, unter anderem aus der Sichelente (*Anas falcata*), der Stockente (*Anas platyrhynchos*) und der Fleckschnabelente (*Anas poecilorhyncha*), isoliert (CHEN et al. 2006b). Bei umfangreichen AI-Untersuchungen ergab auch in Europa mittlerweile die Detektion von HPAI H5N1-Viren bei offenbar klinisch gesunden Wildvögeln, und zwar bei Lachmöwen (*Chroicocephalus ridibundus*) in Kroatien im Jahre 2006 (Savić et al. 2010), bei einer Tafelente (*Aythya ferina*) am Sempacher See in der Schweiz im Februar/März 2008 (O.I.E. 2008a) und bei einer wildlebenden Stockente im März 2009 in Possenhofen in Bayern (FLI 2009).

Im Mai 2010 wurde ein Massensterben von 170 Wildvögeln in Co Nyi (China) beobachtet, in welchem das Virus zum HPAI-H5N1-Subtyp gehörte (PromedMail 2010). Dies stützt die These eines kontinuierlichen Vorkommens dieser Viren in der Wildvogelpopulation. Des Weiteren bestätigt ebenso das weltweite Vorkommen von H5N1- und H7N1-Viren und die von 2004 bis heute kontinuierlich nachgewiesenen Fälle der oben genannten Subtypen bei Wildvögeln und beim Wirtschaftsgeflügel diese Vermutung (O.I.E. 2004, 2005a, 2006a, 2007, 2008b, 2009b, 2010c, 2011a). Trotz umfangreicher internationaler Bemühungen die AIV-Seuchengeschehen unter Kontrolle zu bringen, werden regelmäßig neue Krankheitsherde bei kommerziellen Geflügelbeständen registriert. Es muss sogar angenommen werden, dass das Ausmaß der Problematik noch unterschätzt wird, da nur mangelhafte Informationen aus Staaten wie Indonesien und Kambodscha vorliegen (DESVAUX et al. 2006, ELLY 2007). Außerdem kommt HPAIV H5N1 in Indonesien und Ägypten weiterhin endemisch beim Geflügel vor (SMITH et al. 2006, VAN KERKHOVE et al. 2011). Eradikationsmaßnahmen wie flächendeckende Impfkampagnen und Keulung von Wirtschaftsgeflügel gelten in den oben genannten Ländern aufgrund der strukturellen Gegebenheiten der betroffenen Geflügelhaltungen als unzureichend.

H5N2

Bei Wildvögeln besitzen hochpathogene AIV vom Subtyp H5N2 bisher, im Gegensatz zum Wirtschaftsgeflügel, keine große Bedeutung als Krankheitserreger, und es existieren nur vereinzelte Publikationen zum Nachweis dieser Viren bei Wildvögeln. So wurden HPAI H5N2-Viren serologisch bei klinisch unauffälligen Sträußen und Hühnern im Rahmen eines Monitoringprogrammes (insgesamt bei sechs kommerziellen Unternehmen) vom November 2005 bis Februar 2006 in Zimbabwe identifiziert (O.I.E. 2005b und 2006b). Ferner konnten hochvirulente H5N2-Viren im Februar 2007 in Nigeria bei anscheinend gesunden Wildvögeln, und zwar einer Witwenente (*Dendrocygna viduata*) und mehreren Sporngänsen (*Plectropterus gambensis*), nachgewiesen werden (GAIDET et al. 2008). Vielmehr waren ebenfalls mehrere Betriebe für kommerzielle Straußenzucht von HPAI H5N2-Ausbrüchen innerhalb der Monaten Februar und September 2011 in Südafrika betroffen (O.I.E. 2011b).

H5N3

Das erste Massensterben unter Wildvögeln durch aviäre Influenza wurde erst im Jahr 1961 dokumentiert, und zwar bei Fluss-Seeschwalben (*Sterna hirundo*) in Südafrika. Dabei war ein HPAIV vom Subtyp H5N3 feststellbar, das eine nahe Verwandtschaft mit einem hochpathogenen Virus A/Chicken/Scotland/1959 (H5N1) aufwies, welches die Geflügelpest bei kommerziellen Hühnerbeständen in Schottland ausgelöst hatte (BECKER 1966 und 1967).

H7N1

Dieses hoch pathogene Virus wurde im Jahr 1972 aus einem erkrankten Wildvogel, und zwar einem Erlenzeisig (*Carduelis spinus*) in Deutschland isoliert. KALETA und HÖNICKE (2005b) wiesen auf die Virusübertragung vom Erlenzeisig auch auf Kanarienvögel (*Serinus canaria* forma domestica) hin. Allerdings war im Jahr 1979 eine Probe von einem Erlenzeisig in Deutschland positiv für hoch pathogene aviäre Influenzaviren des Sybtyps H7N1 (ECKERT 1979). Interessanterweise kam es außerdem in diesem Zeitraum zum massiven Seuchengeschehen mit HPAI H7N7 beim Wirtschaftsgeflügel (Hühner und Enten) in Leipzig (RÖHM et al. 1996).

Nord-und Südamerika, Australien

Infektionen mit hoch virulenten Viren der Subtypen H5 und H7 konnten, trotz extensiver Wildvogelüberwachungsstudien bis zum 07.10.2011 weder in Nord- und Südamerika (ITO et al. 1995, KRAUS et al. 2004 und 2007, IP et al. 2008, DELIBERTO et al. 2009, JINDAL et al. 2010) noch in Australien (DOWNIE und LAWER 1973, MACKENZIE et al. 1985, PEROULIS und O`RILEY 2004) ermittelt werden. Es ist ein rätselhaftes Phänomen, da die Wildvogelpopulationen von Asien und Amerika geographisch nicht vollständig getrennt sind, sondern jährlich während der Migrationszeiten zwischen 1.5-2.3 Millionen Wildvögel (Anatidae, Charadriidae und Scolopacidae) aus Asien nach Alaska fliegen (WINKLER et al. 2007). Weitgehend unverstanden bleibt diese Sondersituation bislang auch, weil in mehreren Studien der interkontinentale Austausch von NPAI-Subtypen zwischen Nordamerika und Asien belegt ist (HATCHETTE et al. 2004, KOEHLER et al. 2008, DUGAN et al. 2008). Als mögliche Ursache für die fehlenden Nachweise von HPAI-Inflenzaviren bei Wildvögeln in Nordamerika wurde die sehr geringe aviäre Influenza-Prävalenz bei Zugvögeln vermutet (WINKLER et al. 2007, IVERSON et al. 2008).

2.3.2 Evolution aviärer Inflenzaviren

Kenntnisse über die Evolution aviärer Inflenzaviren basieren auf molekular-epidemiologischen Untersuchungen, die die phylogenetischen Beziehungen zwischen unterschiedlichen Inflenzaviren mittels Sequenzanalysen verschiedener Gene erfassen. Mehrere AIV-Subtypen haben sich an diversen Spezies (Vögel und Säugetiere) im Laufe der Fortentwicklung adaptiert, so dass sie innerhalb dieser Tierarten eigene Hauptlinien etablierten und weltweit bis zum heutigen Zeitpunkt bei bestimmten Wirten zirkulieren (WEBSTER et al. 1992). Basierend auf Analysen des NP-Gens werden derzeit fünf genetische Hauptlinien von Influenza-A-Viren mit verschiedener Wirtsspezifität unterschieden: (i) die equine Linie 1 (H7N7), (ii) die equine Linie 2 (H3N8), (iii) eine Linie der klassischen Schweineinflenzaviren (H1N1, H3N1) und der AI-Menschen (H1N1, H2N2, H3N2), (iv) die Linie des H13Nx-Inflenzavirus der Möwen, (v) Inflenzavirus der Vögel (GORMAN et al. 1991). Bei Betrachtung des Hämagglutiningens H5 ließen sich eine amerikanische und eine eurasische Linie voneinander abgrenzen (RÖHM et al. 1995, DUAN et al. 2007).

Evolution der amerikanischen Linie: Bei den in Nordamerika vorkommenden H5-Viren stellten GARCIA et al. (1997) vier genetische Linien fest. Dabei konnte Viren aus drei Linien bei Wildwasservögeln und Watvögeln sowie bei unterschiedlichen Arten von Wirtschaftsgeflügel identifiziert werden, während die vierte Linie nur H5-Viren enthielt, deren Detektion bei einem Influenzavirus-Ausbruch in Mexiko folgte. Bei oben genannten Vogelarten waren also multiple H5-Virus-Linien aufrechterhalten, die räumlich und zeitlich koexistierten und sich fortlaufend veränderten und weiterentwickelten. Einzelne Viren von Wildvögeln waren zudem nahe verwandt mit H5-Viren aus Wirtschaftsgeflügel. Daher wurde gefolgert, dass Viren aus Wildvögeln sporadisch in Wirtschaftsgeflügelbestände eingeschleppt werden (GARCIA et al. 1997).

Evolution der eurasischen Linie: Molekulargenetische Analysen aviärer Influenzaviren des Subtyps H5 aus Europa und Asien von DUAN et al. (2007) zeigten auch hier eine Heterogenität und die Existenz unterschiedlicher Linien. Zwei Hauptlinien der Hämagglutiningene ließen sich voneinander abgrenzen, eine sogenannte frühe („early“) und eine heutige („contemporary“) Linie.

Die frühe Hauptlinie enthielt vor allem „ältere“ Influenzaviren, die aus ganz Eurasien von 1959 bis 1991 isoliert worden waren. Diese Linie galt daher als Repräsentant eines frühen einheimischen eurasischen Genpools (DUAN et al. 2007).

Die heutige („contemporary“) H5-Hauptlinie bestand aus drei Gruppen. Die Gruppe 1 enthielt Isolate aus ganz Eurasien, also desgleichen vom westlichen und östlichen Rand dieses Gebietes. Dies wurde als Hinweis auf einen gemeinsamen Genpool mit kontinuierlichem genetischem Austausch zwischen den H5-Viren dieser Linie in diesem Gebiet interpretiert. Zur Gruppe 2 gehörten ausschließlich Viren aus Westeuropa bis auf eine Ausnahme, ein Isolat aus Sibirien, A/Anas platyrhynchos/Chany Lake/9/2003 (H5N3), das sich ebenfalls hier eingruppierte. Demgegenüber umfasste die dritte Gruppe nur die aktuellen H5N1-Influenzaviren aus Singapur und Japan, die aus Vögeln der westpazifischen Flugroute („western Pacific flyway“) stammten.

3 ZIELSETZUNG

Wie aus den Abschnitten 2.2, 2.3.1 und 2.3.2 deutlich hervorgeht, ist es aufgrund des effizienten Ausbreitungspotenzials der Subtypen H5N1 und H7N1 der aviären Influenzaviren in Hausgeflügelbeständen und aufgrund einer möglichen Übertragung der Viren von Wildvögeln auf Wirtschaftsgeflügel oder den Menschen von enormer Bedeutung, das Vorkommen von Influenzaviren bei Wildvögeln zu erfassen und ständig zu überwachen. Kenntnisse über Vorkommen und Fluktuation von Influenza A Viren (NPAI ebenso wie HPAI) in der Wildvogelpopulation stellen eine rationale und wissenschaftliche Grundlage dafür dar, gegebenenfalls Maßnahmen zur Unterbrechung potentieller Infektionswege und zur Minimierung des Risikos des Auftretens dieser Infektionen beim Wirtschaftsgeflügel und dem Menschen zu treffen. Ein besonderes Augenmerk ist dabei auf die möglichen Influenza-Übertragungswege über Wildvögel aus Südostasien nach Deutschland zu richten.

Ziel dieser Arbeit war es, anhand repräsentativer Stichproben von verschiedenen Wildvogelarten einen umfassenden Überblick über das Vorkommen von aviären Influenzaviren in den Jahren 2006 und 2007 in Bayern zu gewinnen. Dabei wurde dem Vorkommen der veterinärmedizinisch bedeutenden Influenza-A-Virus-Subtypkomponenten H5, H7 und N1 besondere Beachtung geschenkt und deren geographische Herkunft sowie mögliche Übertragungswege durch molekular-epidemiologische Analysen bestimmt.

4 PUBLIKATION I:

Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 2007, 19(3):279-282

BRIEF COMMUNICATION

Genetic evidence for multi-event imports of avian influenza virus A (H5N1) into Bavaria, Germany

Monika Rinder, Victoria Lang, Cordula Fuchs, Angela Hafner-Marx, Karl-Heinz
Bogner, Antonie Neubauer, Mathias Büttner and Heinz Rinder¹

Bavarian Health and Food Safety Authority, Oberschleissheim (Rinder M, Lang, Fuchs, Büttner, Rinder H) and Erlangen (Bogner), and the Institute for Medical Microbiology, University of Munich, Munich (Neubauer), Germany

¹Corresponding author: Heinz Rinder, Bavarian Health and Food Safety Authority, Veterinaerstr. 2, 85764 Oberschleissheim, Germany. Tel.: 49-89-31560214, E-mail: heinz.rinder@lgl.bayern.de

Abstract

The almost simultaneous initial detections of H5N1 viruses in central Europe in February 2006, at a time devoid of migratory bird activity, raised the question of the origin of these viruses. This report presents molecular data from Europe providing evidence for multiple and spatially overlapping H5N1 introductions into Bavaria, Germany.

Key words: H5N1 virus; influenza A virus; phylogeny; epidemiology.

Since 2003, highly pathogenic avian influenza A (HPAI) subtype H5N1 viruses have spread and become endemic in several Southeast Asian countries,^{3,5,7-8,10} causing more than two hundred human infections with fatal outcomes in more than half of them. In 2005, a novel epidemiologic trend was observed for the first time when thousands of wild birds died at Qinghai Lake in central China, a congregational place for hundreds of thousands of migratory birds. By August 2005, HPAI outbreaks in poultry were reported along migratory bird flight routes in northwest China, Russia and Kazakhstan. It was feared that the virus could spread further west towards Europe via migratory birds. This became evident when HPAI subtype H5N1 was detected in poultry and wild birds in Turkey, Romania and Croatia during October, 2005. Thereafter, coinciding with the end of the migratory bird season, there were no further reports from countries further west and it was widely believed that central Europe would not be in danger until the following spring, when migratory birds were expected to return from their winter quarters in Africa.

It was therefore quite unexpected when, in the absence of migratory bird activity, the first HPAI detections were almost simultaneously reported during one week of mid-February 2006 in Germany, Austria, and France. Hence, the role of migratory birds was questioned, as well as that of possible illegal imports of bird products from other affected countries as an explanation for these almost simultaneous reports. In an effort to elucidate the origin and the relatedness of HPAI viruses, the molecular phylogeny of the hemagglutinin and neuraminidase genes of 21 H5N1 HPAI samples from 10 different species of dead wild birds from throughout Bavaria were analyzed. Bavaria represents the largest state of Germany, covering 70,547 square kilometers in central Europe. The data were compared with those of HPAI viruses from neighboring and other countries involved in the current avian flu pandemic.

For this study, the Bavarian State Ministry of the Environment, Public Health and Consumer Protection coordinated the collection of dead birds which were screened at the Bavarian Health and Food Safety Authority in Erlangen and Oberschleissheim for the presence of influenza A in tracheal swabs and internal organs. RNA extractions using "Trizol" reagent (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA) were done according to the instructions of the manufacturer and were followed by a real-time screening PCR for the matrix protein gene using the "OneStep RT-PCR" kit

(Qiagen, Hilden, Germany) with primers, probes and cycling conditions according to Spackman et al.⁹ Positive cases were further examined with H5 and N1 subtype specific real-time PCR for which primer and probe sequences as well as the cycling conditions were provided by the German Reference Center for Avian Influenza (Friedrich Loeffler Institute, Boddenblick 5a, 17493 Greifswald-Insel Riems, Germany, unpublished, available from the Reference Center upon request). Between the first case in February 2006 and the last H5N1 detection in May 2006, 7825 birds were screened. Out of 93 (1.2 %) influenza A virus positive birds, 74 (0.9 %) tested positive for the H5N1 subtype (Table 1).

Table 1. Summary of influenza A/H5N1 screening results

Species (or higher taxon)	No. influenza A virus positive	No. H5N1 positive	No. included in this study
Swan	46	40	6
Goose, unspecified	2	1	0
Mallard	2	1	1
Gadwall duck	1	1	0
Common pochard	4	4	1
Tufted duck	5	5	3
Goldeneye duck	1	1	1
Duck, unspecified	12	8	0
Goosander	3	3	2
Great crested grebe	3	3	1
Buzzard	5	4	4
Falcon	2	1	1
Eagle owl	2	2	1
Eurasian coot	4	0	0
Crow	1	0	0

For 21 of these birds for which additional material was available and which were chosen to best possibly represent the affected host species and their geographic distribution, the complete coding sequences of their hemagglutinin and neuraminidase genes were determined by four and three PCR amplifications, respectively, targeted to overlapping gene sections. These newly developed primers (Table 2) could also be used for directly sequencing the PCR products thus facilitating the simultaneous determination of the entire coding regions without subcloning.

Table 2. Forward (for) and reverse (rev) PCR primers used for amplification and sequencing of the hemagglutinin gene (HA, primers INF-1 to INF-8) and the neuraminidase gene (NA, primers INF-23 to INF-28). Locations of primer positions are relative to the start of the coding regions of the hemagglutinin gene (reference sequence: GenBank accession number DQ458992) and the neuraminidase gene (reference sequence: DQ458993).

Gene	Primer name	Sequence (5'-3')	base positions relative to the coding region
HA (1st fragment)	INF-1b (for)	aaa gca ggg gtm yva tct	-24 to -7
	INF-2 (rev)	ttc ttt ttg ata agc cat a	509 to 491
HA (2nd fragment)	INF-3 (for)	gtg agc tca gca tgt cc	439 to 455
	INF-4b (rev)	atg gtg agr ggg tgc at	944 to 928
HA (3rd fragment)	INF-5 (for)	acc aag tgt caa act cca	874 to 891
	INF-6 (rev)	tgc gac ctt gtc gta aag	1407 to 1390
HA (4th fragment)	INF-7 (for)	gat gtc tgg act tay aat	1306 to 1323
	INF-8 (rev)	aca atc tga act cac aaa t	1708 to 1726
NA (1st fragment)	INF-23 (for)	caa aag cag gag tty aaa	-18 to -4
	INF-24 (rev)	caw gcr ctt gcy gac ca	491 to 475
NA (2nd fragment)	INF-25 (for)	tga caa rca ytc haa tgg	363 to 380
	INF-26 (rev)	att dgg rtc cca aat cat	1070 to 1057
NA (3rd fragment)	INF-27 (for)	gga tay atm tgc agy gg	883 to 899
	INF-28 (rev)	agt aga aac aag gag ttt	1378 to 1361

In detail, after reverse transcription with random primers (Invitrogen), PCR reactions were done in a total volume of 50 µl containing 2.5 units of HotStar Taq DNA polymerase (Qiagen), 250 µM of each dNTP and 1 µM of each primer. Amplifications were performed with an initial 14.5 min Taq polymerase activation step at 95°C followed by 50 cycles of denaturation at 95°C for 1 min, annealing at 45°C for 1 min and elongation at 72°C for 1 min. PCR products were purified from agarose gels using the "QIAquick Gel Extraction" kit (Qiagen) and sequenced using the same primers. All polymorphic sites were confirmed by at least one additional DNA sequence originating from an independent PCR amplification to rule out PCR polymerase artifacts. Sequences were aligned using the CLUSTAL W algorithm (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>) and phylogenetic analysis was done using the PHYLIP phylogeny package (version 3.5c)² employing the maximum parsimony method using the DNAPARS algorithm, with gaps counted as one event each. Support for phylogenies was measured by bootstrapping 1,000 replicates with the programs SEQBOOT and CONSENSE. Trees were drawn with the programs RETREE and DRAWGRAM from the same PHYLIP package.

Sequence analysis demonstrated the HPAI cleavage site PQGERRRKKRGLF (single-letter amino-acid notation) in all 21 specimens. Alignment of the complete coding regions showed two separated genetic groups with 18 and 3 specimens for both the hemagglutinin genes (GenBank accession numbers DQ458992, DQ659679, EF165048-EF165066) and the neuraminidase genes (DQ458993, DQ659680, EF165571-EF165588). The first genotype ("Bavaria 1") was found throughout Bavaria and in all host species (Table 1). The second genotype ("Bavaria 2") was found in 1 swan, 1 great crested grebe and 1 buzzard from eastern Bavaria. For the hemagglutinin genes, the identities within the two groups were >99.65 % and >99.77 %, identities between these groups were 98.65 % to 98.89 %. For neuraminidase, the identities within the two groups were >99.70 % and >99.93 %, identities between these groups were 98.74 % to 98.96 %.

The demonstration of two genotypically distinct, non-overlapping groups of isolates is indicative of separate introductions of HPAI H5N1 viruses into Bavaria. Phylogenetic analysis of the hemagglutinin genes (Fig. 1) resulted in a clustering of

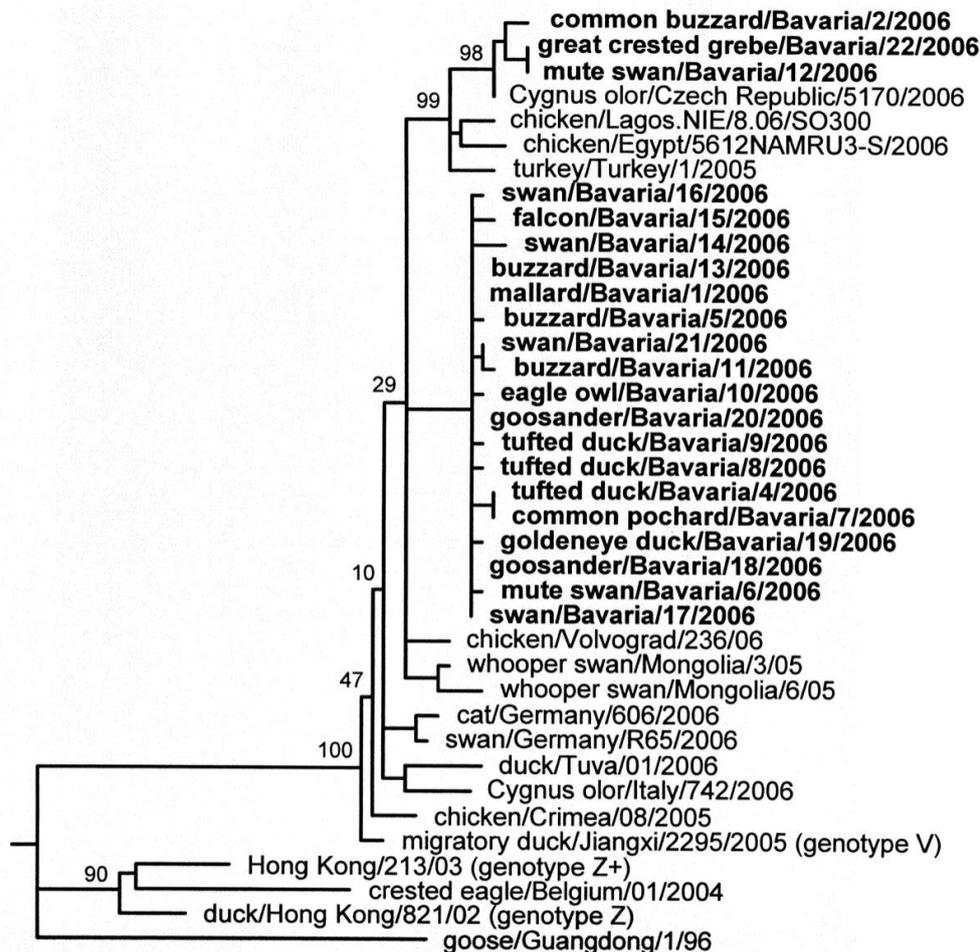


Figure 1. Phylogenetic analysis of the H5 hemagglutinin genes, based on 1559 base pairs of commonly reported coding region (position 64 to 1652), for 21 Bavarian isolates from this study (written in bold) in relation to closely related and representative strains: *Cygnus olor*/Czech Republic/5170/2006 (Genbank accession number DQ515984), chicken/Lagos.NIE/8.06/SO300 (AM262546), chicken/Egypt/5612NAMRU3-S/2006 (DQ837589), turkey/Turkey/1/2005 (DQ407519), chicken/Volvograd/236/06 (DQ864719), whooper swan/Mongolia/3/05 (AB233322), whooper swan/Mongolia/6/05 (AB233320), cat/Germany/606/2006 (DQ643982), swan/Germany/R65/2006 (DQ464354), duck/Tuva/01/2006 (DQ861291), *Cygnus olor*/Italy/742/2006 (DQ412997), chicken/Crimea/08/2005 (DQ650663), migratory duck/Jiangxi/2295/2005 (DQ320920), Hong Kong/213/03 (AB212054), crested eagle/Belgium/01/2004 (DQ182483), duck/Hong Kong/821/02 (AY676033), and goose/Guangdong/1/96 (AF144305).

these isolates within the previously described "genotype V"⁶ and showed close relationships of the "Bavaria 1" genotype (type isolate A/mallard/Bavaria/1/2006, GenBank accession number DQ458992) with previously reported sequences from Russia (A/chicken/Volvograd/236/06) and Mongolia (A/whooper swan/Mongolia/3/05 and A/whooper swan/Mongolia/6/05). Genotype "Bavaria 2" (type isolate A/common buzzard/Bavaria/2/2006, GenBank accession number DQ659679) was closely related to isolates from the Czech Republic (A/Cygnus olor/Czech Republic/5170/2006), Turkey (A/turkey/Turkey/1/2005), Egypt (A/chicken/Egypt/5612 NAMRU3-S/2006) and Nigeria (A/chicken/Lagos.NIE/8.06/SO300). For the above mentioned isolates, neuraminidase gene sequences have been reported only for the two Mongolian isolates A/whooper swan/Mongolia/3/05 and A/whooper swan/Mongolia/6/05 (GenBank accession number AB239311 and AB239325, respectively), which also clustered with genotype "Bavaria 1".

The distribution of the above mentioned countries (Russia and Mongolia versus Czech Republic, Turkey, Egypt, Nigeria) is suggestive of the two main bird migratory routes to central Europe, one being East-West from Asia, the other being South-North from Africa (via Spain, Italy or Turkey). This finding supports the role of migratory birds as the main vector for the H5N1 HPAI virus import to central Europe and suggests that the current outbreak results from separate introductions. Multiple imports of HPAI H5N1 virus by different migratory bird routes have previously been reported from Nigeria¹ but not from Europe, where thus far only an outbreak with a single genotype was reported for the Czech Republic.⁴

The observed time lag between the main migratory season in this study and the time of detections supports the view that these introductions can go unnoticed for periods of several months, until, possibly after accumulation of large numbers of birds at still unfrozen watering places, virus transmission increases. It can further be speculated that the extraordinarily hard winter season 2005/2006 increased fatalities which might have been unnoticed in previous years when monitoring activities were less intense.

Acknowledgements

This work was supported by a grant from the Bavarian State Ministry of the Environment, Public Health and Consumer Protection (project 05/19). The authors like to thank Heike Lang, Oberschleissheim for excellent technical assistance and Dr. Peter Kreuzer, Erlangen, for coordinating laboratory examinations.

References

1. Ducatez MF, Olinger CM, Owoade AA, et al.: 2006, Multiple introductions of H5N1 in Nigeria. *Nature* 442:37.
2. Felsenstein J: 1989, PHYLIP - phylogeny inference package (version 3.2). *Cladistics* 5:164-166.
3. Guan Y, Poon LLM, Cheung CY, et al.: 2004, H5N1 influenza: A protean pandemic threat. *Proc Nat Acad Sci USA* 101:8156-8161.
4. Holko I, Machova J, Hornickova JH, et al.: 2006, Highly pathogenic avian influenza in the Czech Republic. *Vet Rec* 158:741-742.
5. Lee CW, Suarez DL, Tumpey TM, et al.: 2005, Characterization of highly pathogenic H5N1 avian influenza A viruses isolated from South Korea. *J Virol* 79:3692-3702.
6. Li KS, Guan Y, Wang J, et al.: 2004, Genesis of a highly pathogenic and potentially pandemic H5N1 influenza virus in eastern Asia. *Nature* 430:209-213.
7. Muramoto Y, Le TQM, Phuong LS, Nguyen T, et al.: 2006, Molecular characterization of the hemagglutinin and neuraminidase genes of H5N1 influenza A viruses isolated from poultry in Vietnam from 2004 to 2005. *J Vet Med Sci* 68:527-531.
8. Puthavathana P, Auewarakul P, Charoenying PC, et al.: 2005, Molecular characterization of the complete genome of human influenza H5N1 virus isolates from Thailand. *J Gen Virol* 86:423-433.

9. Spackman E, Senne DA, Myers TJ, et al.: 2002, Development of a real-time reverse transcriptase PCE assay for type A influenza virus and the avian H5 and H7 hemagglutinin subtypes. *J Clin Microbiol* 40:3256-3260.

10. World Health Organization Global Influenza Program Surveillance Network: 2005, Evolution of H5N1 avian influenza viruses in Asia. *Emerg Inf Dis* 11:1515-1521.

5 PUBLIKATION II:

Zoonoses Public Health, 2010, 57(7-8):e184-194

Avian influenza A virus monitoring in wild birds in Bavaria: occurrence and heterogeneity of H5 and N1 encoding genes

V. Lang¹, M. Rinder^{1,2}, Angela Hafner-Marx¹, S. Rabl¹, K.H. Bogner³,
A. Neubauer-Juric¹, and M. Büttner¹

¹ Bavarian Health and Food Safety Authority, Oberschleissheim, Germany,

² Clinic for Birds, Reptiles, Amphibians and Pet Fish, Ludwig-Maximilians-Universität
München, Oberschleissheim, Germany,

³ Bavarian Health and Food Safety Authority, Erlangen, Germany

Corresponding author:

Mathias Büttner
Bavarian Health and Food Safety Authority
Veterinaerstrasse 2
85764 Oberschleissheim
Germany
Phone: +49 89 31560389
Fax: +49 89 31560 459
E-mail address: mathias.buettner@lgl.bayern.de

Summary

To define avian influenza virus (AIV) prevalence in wild birds in Bavaria, 12,930 tracheal, cloacal swabs, or tissue samples from various waterfowl species were screened between January 2006 and December 2007. In 291 (2.3%) birds genomes of influenza A viruses were detected by real-time reverse transcription PCR (RTr-PCR) targeting the matrix protein genes. Furthermore, solitary H5 hemagglutinin or N1 neuraminidase encoding genes were identified in 35 (0.3%) apparently healthy birds; whereas highly pathogenic (HPAI) H5N1 virus genomes were only diagnosed in dead wild birds ($n = 93$; 0.7%) found across this federal state region. In this study, multiple import events for H5N1 viruses were confirmed during 2006 and 2007. In addition, our findings argue against an existing HPAI H5N1 reservoir in aquatic birds in Bavaria. By contrast, phylogenetic analyses of the H5 or N1 sequences of low pathogenic avian influenza (LPAI) viruses revealed a marked diversity and multiple genetic lineages. This diversity of LPAI H5 and N1 subtype components indicates the existence of LPAI HA and NA gene pools which differ from the Bavarian HPAI H5N1. Moreover, the hemagglutinin amino acid differences between LPAI H5 viruses of a western European genotypic lineage observed in wild birds suggest a continuous evolution of LPAI viruses in Bavaria.

Keywords

Avian influenza; phylogeny; H5; N1; genetic diversity

Impact:

- To reveal distinctions and co-existences of multiple genetic lineages of H5 as well as of N1 viruses (LPAI) within a small geographic region.
- To argue for a continuous evolution of LPAI viruses occurring in wildfowls.
- To demonstrate multiple-event imports of avian influenza A subtype H5N1 into Bavaria arguing against an H5N1 reservoir of epidemiological importance in healthy wild birds in Bavaria.

Introduction

Avian influenza virus (AIV) of the genus influenza A virus in the *Orthomyxoviridae* family is distributed worldwide. Wild birds, particularly aquatic birds are natural hosts and the primary reservoir for transmission of influenza A virus to domestic poultry. AIV are classified on the basis of the hemagglutinin (HA) and neuraminidase (NA) surface glycoproteins. To date, 16 HA and nine NA antigenic types have been identified (Fouchier et al., 2005) which can occur in multiple combinations, designated as subtypes (Webster et al., 1992; Kaleta et al., 2005). Although AIV from over 105 wild bird species of 26 different families have been isolated (Olsen et al., 2006), the main reservoirs for the perpetuation of influenza A virus are water birds of the orders *Anseriformes* (mostly ducks, goose and swans) and *Charadriiformes* (particularly gulls, terns and waders) (Alexander, 2000).

While AIV infections in wild birds usually are clinically inapparent, it is accepted that after introduction into domestic poultry, LPAI viruses can change to HPAI viruses causing severe disease in poultry characterized by high morbidity and mortality (Alexander, 2008). Such a switch to the highly pathogenic phenotype has so far only been described for H5 and H7 subtypes (Alexander, 2000). This mechanism can occur by point mutations, insertions, and recombination events (Garcia et al., 1996). However, even some H5 and H7 viruses, highly pathogenic for chicken usually do not cause disease in wild water birds (Webster et al., 2007).

Since 2002, HPAI H5N1 epidemics in Asia and Europe have been observed (Chen et al., 2006). This has created a new paradigm about these viruses because of the high mortality in wild birds, especially swans, ducks and geese (Li et al., 2004; Sturm-Ramirez et al., 2004). Nevertheless, differences in pathogenicity have been described for H5N1 strains (Kishida et al., 2005; Sturm-Ramirez et al., 2005) which include varying susceptibility of host bird species (Brown et al., 2008) and age-related resistance (Pasick et al., 2007). Furthermore, as a result of the ongoing H5N1 epidemics in wild birds, the World Organization for Animal Health revised the definition of notifiable avian influenza (NAI) for poultry in 2005 (O.I.E., 2005). Instead of the previous restriction of notification for HPAI viruses only, NAI is now extended to include H5 and H7 subtype AIV of low virulence as well. Similarly, in the new European Union Directive (CEC, 2006) control measures were extended to H5 and H7 viruses that do not show molecular nor *in vivo* criteria of high virulence (Alexander, 2008).

Detailed knowledge of the epidemiology of H5 or H7 subtypes of influenza A virus is a prerequisite to assess infection risks for poultry and the risk of interspecies transmission (Hulse-Post et al., 2005). However, at present, transmission routes for avian influenza are not yet fully identified. This is especially important considering the current H5N1 epidemic situation (Kilpatrick et al., 2006; Feare, 2007). Furthermore, seasonality of certain subtypes is unpredictable, and it is not clear whether regional reservoirs of HPAI H5N1 viruses have been established in Europe.

Multiple import events for HPAI H5N1 viruses were demonstrated in 2006 in Bavaria (Rinder et al., 2007), but information regarding the overall prevalence of AIV in Bavaria particularly that of H5 and H7 containing subtypes in living wild birds is largely missing. Therefore, within the frame of a monitoring program that was initiated by the European Union and executed by the Bavarian Ministry of Environment, Health and Consumer Protection samples from wild birds across this federal state were collected and tested for influenza A viruses between 2006 and 2007. The aim of this work was to obtain a comprehensive overview of the prevalence of H5, H7, and N1 genes based on AIV positive samples isolated from a variety of wild bird species in diverse districts of Bavaria in both years.

Materials and Methods

Samples. Samples collected during an influenza A monitoring program were either from the internal organs of wild birds found dead or tracheal and cloacal swabs of apparently healthy birds probed during hunting activities between 2006 and 2007 in Bavaria.

RNA extraction, PCR, and sequencing. RNA was extracted from the respective samples using TRIzol[®] Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) according to the instructions of the manufacturer. Screening for viral RNA was done according to a protocol described by Spackman et al. (2002) using a one-step RTr-PCR targeting the matrix protein gene. AIV-PCR reactive RNA was further examined with H5, H7, and N1 subtype-specific RTr-PCR protocols which were provided by the German Reference Laboratory for Avian Influenza (Friedrich Loeffler Institute, Greifswald-Insel Riems, Germany, available from the Reference Laboratory upon request). The complete coding sequences of positive H5 or N1 RNA were determined as previously described (Rinder et al., 2007). Selected HA and NA gene sequences of other types and individual nucleoprotein (NP) and protein PA polymerase gene (PA) sequences were amplified using published primers and PCR conditions (Hoffmann et al., 2001) or with in-house primers and protocols which are available upon request. PCR products were purified from agarose gels using the QIAquick gel extraction kit (Qiagen, Hilden, Germany). Template DNA was sequenced by the MWG Biotech AG using BDTv3.1 (Applied Biosystems, Inc. Foster City, California) and analyzed (ABI 3730 XL DNA sequencer; Applied Biosystems, Inc.). To rule out PCR polymerase induced artefacts, all polymorphic sites were analyzed by at least one additional analysis of sequences using DNA originating from an independent PCR amplification.

Sequence alignments and phylogenetic analyses. Sequence alignments were done using the CLUSTAL W Algorithm (Thompson et al., 1994; www.ebi.ac.uk/clustalw). Pairwise identities were calculated using the Quick alignment method (Wilbur and Lipman, 1983) included in the DNAMAN software package.

Phylogenetic analysis was done employing distance matrix, maximum likelihood, and maximum parsimony methods using the DNADIST and NEIGHBOR as well as the DNAML and the DNAPARS algorithms included in the PHYLIP version 3.5c software (Felsenstein, 1989). Support for phylogenies was measured by

Bootstrapping 1000 and 100 replicates with the programs SEQBOOT and CONSENSE for Neighbor joining and maximum parsimony methods, respectively. Phylogenetic trees were drawn with the programs RETREE and DRAWGRAM of the same PHYLIP package.

The similarities (S_i) of the virus sequences were analysed with the Expectation value (E -Value) using the FASTA (Nucleotide Similarity Search) online-program provided by the European Bioinformatics Institute (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/fasta33-/index.html>).

Nucleotide sequence accession numbers. Influenza A virus sequences reported here have been deposited in the NCBI GenBank database under the accession numbers GU046706 - GU046783.

Results

A total of 9561 and 3369 wild birds from all administrative districts of Bavaria were screened for AIV in 2006 and 2007, respectively. As shown in table 1, at least 16 different bird species were found to be infected. Matrix protein genes of influenza A virus were detected in 152 birds (1.6%) in 2006 and in 139 birds (4.1%) in 2007 using RTr-PCR. HPAI H5N1 subtype was specified for 74 (0.8% of 9561) samples of wild birds found dead in 2006 and for 19 (0.6% of 3369) in 2007 (Table 1). Phylogenetic analysis was performed with 33 H5N1 sequences from 2006. From these 33 HPAI H5N1 samples 21 sequences have been published in a previous report (Rinder et al., 2007). To complete the data of the year 2006, in this study additional nucleotide sequences from twelve new H5N1 strains were determined. The subtype HPAI H5N1 originated from various species of wild birds from several counties of Bavaria in this particular year (Table 1). Altogether, in this study HPAI H5N1 was investigated from distinct bird species (common pochard, great crested grebe, goosander, and tufted duck), some not exactly specified (swans) from 2006. The subtype H5N1 emerged again in Bavaria in 2007; however, the positive samples were collected only in two counties, i.e. Munich and Nuremberg, from mute swans, Canada goose, graylag goose, also from unspecified swans and wild duck nestlings.

Table 1. Prevalence of wild-bird-origin Avian Influenza viruses in Bavaria

Species	2006							2007						
	No. of screened samples				No. samples investigated in two studies [■]			No. of screened samples				No. samples investigated in this study		
	AIV	H5N1	H5 [▲]	N1 [▼]	H5N1	H5 [▲]	N1 [▼]	AIV	H5N1	H5 [▲]	N1 [▼]	H5N1	H5 [▲]	N1 [▼]
Mallard	47	1	7	4	1	7	4	104	1	7	8	-	1	-
Tufted duck	7	5	1	-	5	-	-	3	-	-	-	-	-	-
Goosander	5	3	-	-	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Common pochard	4	4	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Goldeneye duck	1	1	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Red-crested pochard	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-
Gadwall duck	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Common teal	1	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-
Shoveler	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-
Duck, unspecified	21	8	-	4	-	-	4	5	3	-	-	3	-	-
Mute swan	3	2	-	-	1	-	-	9	6	-	-	1	-	-
Swan, unspecified	47	38	2	-	12	-	-	7	7	1	-	5	1	-
Graylag goose	-	-	-	-	-	-	-	3	1	-	-	1	-	-
Canada goose	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-	-	1	-	-
Goose, unspecified	2	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Great crested grebe	-	3	-	-	2	-	-	3	-	-	-	-	-	-
Eurasian coot	4	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-
Common buzzard	1	1	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Buzzard, unspecified	3	3	-	-	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Falcon, unspecified	2	1	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Eagle owl	2	2	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Crow, unspecified	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Total	152	74	10	9	33	7	8	139	19	8	8	11	2	-

[■]Samples investigated in this work and in previous study of Rinder *et al.* (2007); [▲]Not in association with N1; [▼]Not in combination with H5.

The aim of our monitoring program was to obtain a comprehensive overview of the prevalence of LPAIV containing H5 HA or N1 NA encoding genes. Furthermore, the H5 and N1 sequences of Bavarian HPAI and LPAI strains from both years were compared. Based on the cleavage sites, ten (0.1% of 9561) and eight (0.2% of 3369) positive LPAI H5 samples (not with N1) were detected in 2006 and 2007, respectively. A total of nine LPAI H5 sequences from both years were analyzed completely (Table 1). Moreover, the NA type N1 without H5 and H7 association were detected in Bavaria. Nine (0.1% in 2006) and eight (0.2% in 2007) birds were positive for the gene N1 (not in combination with H5 and H7). In this work eight LPAI N1 viruses were investigated from mallards and a duck from 2006 (Table 1). Interestingly, the hemagglutinin type H7 was not observed in wildfowl in Bavaria in either year.

Phylogenetic analyses based on neighbour joining, maximum likelihood and maximum parsimony algorithms were always confirmed in nearly identical trees (data not shown). Therefore, only the results of dendrographic plots produced by neighbour joining methods are presented in detail below.

Molecular analysis of H5N1 viruses from 2006 and 2007

Hemagglutinin

A total of 44 HPAI H5N1 virus sequences from 2006 ($n = 33$; 21 sequences Rinder et al., 2007; 12 sequences determined in this study) and 2007 ($n = 11$) were compared. In preceding analyses the existence of two H5 genotypic clusters was demonstrated for the Bavarian wild-bird-origin H5N1 strains found between February and May 2006. These viruses belonged to the subclade 2.2.1 and were named Bavaria 1 and 2 (Rinder et al., 2007). All the twelve additional sequences from 2006 described in this investigation corroborated previous results and clearly grouped to the genotype Bavaria 1 (subclade 2.2.1). Analyses of a representative subset of the sequences from Bavaria are shown in figure 1A. This cluster also comprised sequences from Switzerland. The HA genes of H5N1 were most similar to the isolates from Nigeria, Burkina Faso, Turkey, Iraq, Mongolia, and Russia ($Si = 92.90\% - 95.75\%$, $E\text{-Value} = 2.1 \times e^{-179}$). As described previously (Rinder et al., 2007) the genotype Bavaria 2 was

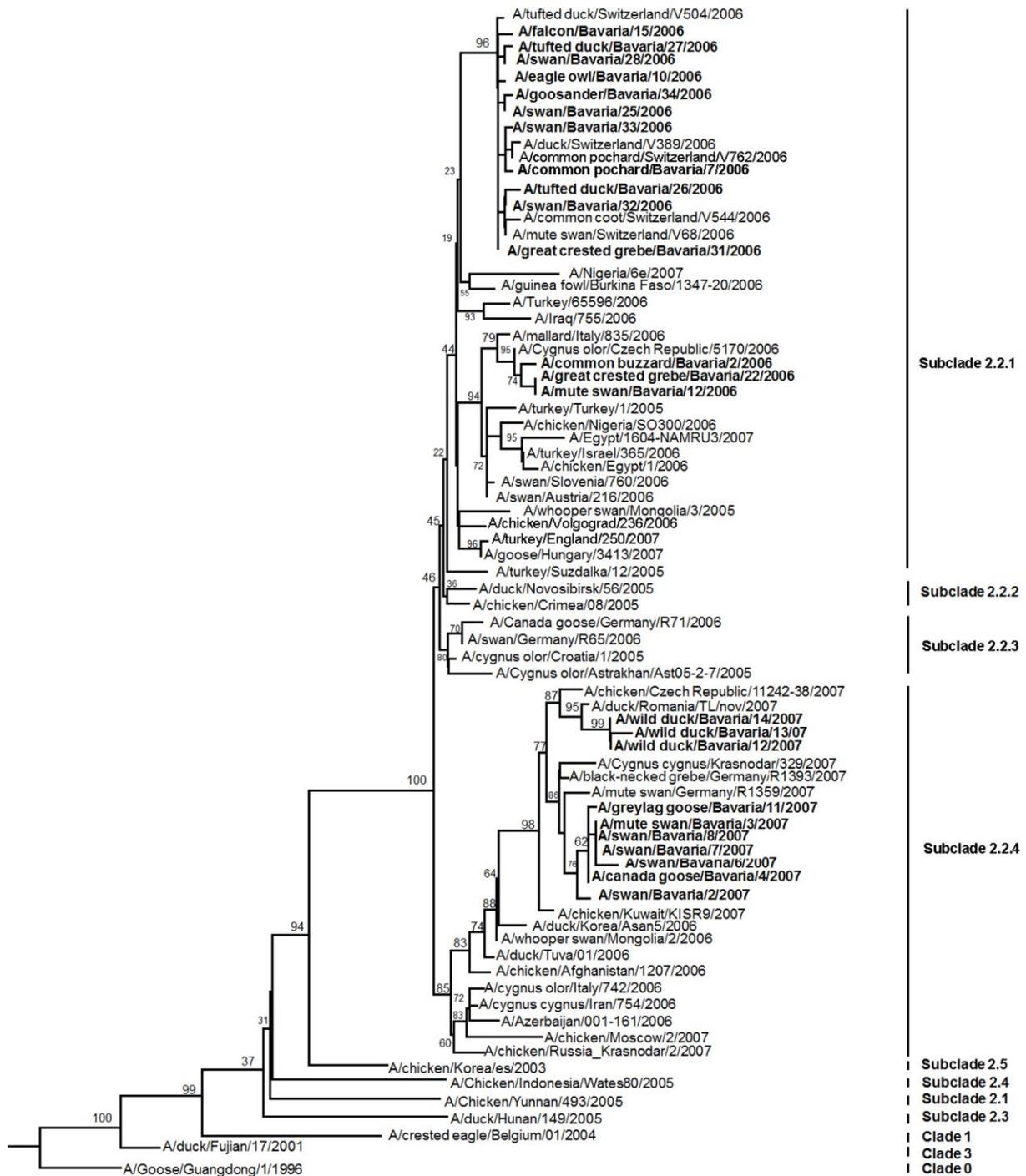


Fig. 1A. Phylogenetic tree of HPAI H5 sequences from selected wild-bird-origin viruses in Bavaria (2006, 2007)

Analyses were based on nucleotide sequences of HA (positions 76-1706). This tree was produced by neighbour joining analysis and rooted to A/Goose/Guangdong/1/96/ (H5N1). Support for major branch subdivision is given as percentage bootstrap values. The Bavarian strains are written in bold.

detected only in three wild birds from eastern Bavaria in 2006 and clustered with AIV originating from Italy and the Czech Republic, Austria, Slovenia, Turkey, Israel, and Egypt (Si = 94.34% - 95.82%, E -Value = $2.8 \times e^{-179}$) (Figure 1A). In contrast to the results from 2006, phylogenetic analysis of HA sequences from 2007 demonstrated the existence of two new distinct clusters of H5N1 viruses (named genotypes Bavaria 3 and 4) in this work (Figure 1A). All wild-bird-origin AI viruses observed in the county of Nuremberg built the genotype Bavaria 3 (subclade 2.2.4), while the samples from the county of Munich grouped to the genotype Bavaria 4 (subclade 2.2.4). The sequences of the genotype Bavaria 3 showed the closest relationship to the viruses from other parts of Germany and Russia (Si = 86.31% - 95.53%, E -Value = $3.4 \times e^{-179}$), while those of the genotype Bavaria 4 were most closely related to the H5N1 strains from Romania and the Czech Republic (Si = 87.20%-95.51%, E -Value = $1.3 \times e^{-174}$). Both genotypes were related to the sequences from Kuwait, Korea, Mongolia, Tuva (Russia), and Afghanistan (Si = 83.43% - 98.79%, E -Value = $1.2 \times e^{-171}$).

The HA cleavage site of the Bavarian H5N1 genotypes 1, 2, and 3 was composed of the multiple basic amino acids PQGERRRKKR*GLF. Interestingly, three sequences of the genotype 4 from 2007 differed in a single amino acid with the sequence PQEERRRKKR*GLF. Nevertheless, the multi basic character of the HA cleavage site for HPAI viruses remained unchanged.

Pairwise sequence comparisons of the H5 coding regions revealed high nucleotide and amino acid identities within and between the genotypes Bavaria 1 and 2. The similar relations of both identities were also found for the genotypes Bavaria 3 and 4 (Table 2).

Neuraminidase

Phylogenetic analysis of the NA gene elucidated tree topologies nearly identical to the hemagglutinin gene (Figure 1B). Two genotypic groups were found corresponding to the genotypes Bavaria 1 and 2 as described above. The sequences of the genotype Bavaria 1 were most closely related to the viruses from Switzerland (Si = 97.97% - 98.42%, E -Value = $2.7 \times e^{-152}$); while the genotype Bavaria 2 grouped together with isolates from the Czech Republic and Italy (Si = 98.13% - 99.18%, E -Value = $1.5 \times e^{-156}$). The NA gene of the genotype Bavaria 3 presented the closest

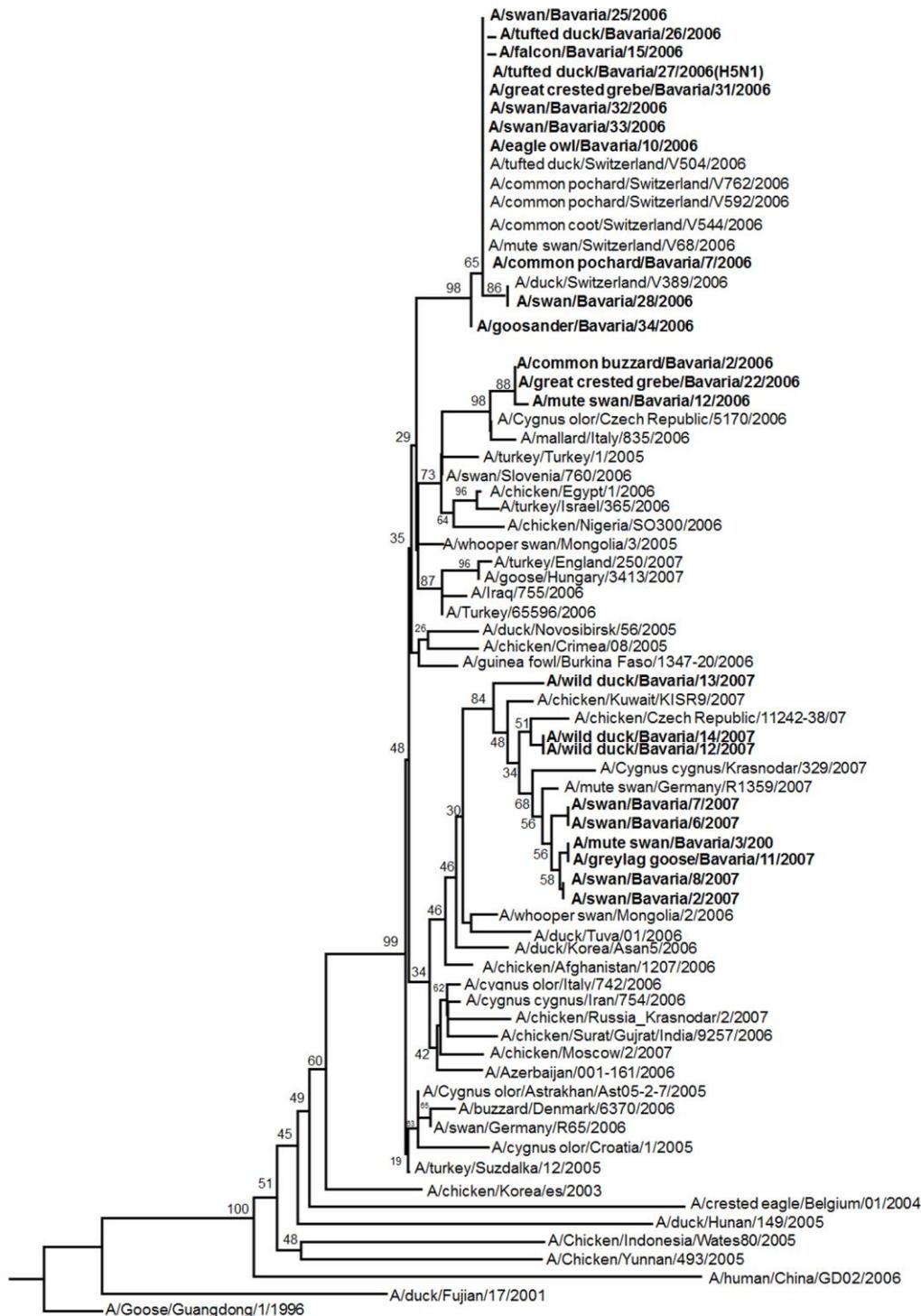


Fig. 1B. Phylogenetic tree of HPAI N1 sequences from selected wild-bird-origin viruses in Bavaria (2006, 2007)

Analyses were based on nucleotide sequences of NA (positions 48-1373). The tree was produced by neighbour joining analysis and rooted to A/Goose/Guangdong/1/96/ (H5N1). Support for major branch subdivision is given as percentage bootstrap values. The Bavarian strains are written in bold.

relationship to H5N1 sequences from Germany and Russia (Si = 67.82% - 79.22%, $E\text{-Value} = 2.9 \times e^{-152}$). In contrast to this result, the sequence of the genotype Bavaria 4 clustered with the sequences from the Czech Republic and Kuwait (Si = 84.12% - 91.72%, $E\text{-Value} = 2.0 \times e^{-154}$) (Figure 1B). Pairwise sequence comparisons of the N1 gene showed high nucleotide and amino acid identities within all Bavarian genotypes (Table 2).

Sequence of non subtype determining genes in H5N1

The putative differences of H5N1 samples were determined with the conserved NP and PA genes. For this phylogenetical analysis, the following four AIV isolates were chosen to represent the different genotypes from both years: A/tufted duck/Bavaria/26/2006 (Bavaria 1), A/great crested grebe/Bavaria/22/2006 (Bavaria 2), A/swan/Bavaria/2/2007 (Bavaria 3) and A/wild duck/Bavaria/13/2007 (Bavaria 4).

Nucleoprotein

Interestingly, based on sequence comparisons, the genotype Bavaria 1 was shown to be most closely related with 99.4% similarity to A/Bar-headed Goose/Qinghai/60/05 (H5N1). However, the Bavarian genotypes 2, 3, and 4 presented the same similarity as that of their HA and NA genes to A/mallard/Italy/835/2006, A/mute swan/Germany/R1359/2007 (also A/Cygnus cygnus/Krasnodar/329/07) and A/chicken/Czech Republic/11242-38/07, respectively (Si = 99.3% - 99.6%).

PA polymerase

The genotype Bavaria 1 revealed the closest relationship with high similarity of 99.5% to an AIV sequence from China [(A/Bar-headed Goose/Qinghai/75/05 (H5N1)]. In addition, the PA gene phylogenic analysis revealed that genotypes 2, 3, and 4 were most similar to sequences of the same strains as their HA, NA, and NP genes (Si = 99.1% - 99.7%).

**Table 2. Intra-and inter-genotypic sequence identities in HA and NA H5N1 (2006, 2007)
based on pairwise sequence comparisons**

Genotype	HA		NA	
	Nukleotid (%)	Amino acid (%)		
Bavaria 1	≥ 99.71	≥ 99.65	≥ 99.85	≥ 99.65
Bavaria 2	≥ 99.77	≥ 99.83	≥ 99.93	100
Bavaria 3	≥ 99.67	≥ 99.47	≥ 99.76	≥ 99.86
Bavaria 4	≥ 99.82	≥ 99.64	≥ 99.68	≥ 99.82
Bavaria 1 and 2	98.76-98.84	98.82-99.47	99.04-99.81	98.89-99.11
Bavaria 3 and 4	98.65-99.84	98.85-99.43	98.21-99.61	98.80-99.76

HA, hemagglutinin; NA, neuraminidase; HPAI, high pathogenic avian influenza.

Analyses of H5 sequences not linked to N1

A total of nine H5 positive samples (not in combination with N1) were analyzed in this work from both years. The HA cleavage site of eight viruses identified with the amino acid sequence PQR^{*}ETR*GLF; however, the sequence of A/mallard/Bavaria/41/2006 differed in one amino acid (PKR^{*}ETR*GLF). All H5 subtypes were classified as LPAI based on the cleavage sites (Table 3).

Phylogenetic analysis of this relatively small number of samples already indicated the existence of at least three separate LPAI H5 lineages. The first lineage includes closely related seven viruses from both years (Figure 2A). Furthermore, all these H5 sequences clustered together with the sequence A/mallard/Bavaria/1/2005 (H5N2). These sequences built a monophyletic group with other recent H5N2 and H5N3 strains detected in Europe (Italy and France) and South Africa (Si = 97.13% - 99.63%, E -Value = $1.9 \times e^{-177}$). The HA of the Bavarian viruses within the first lineage differed by one to eleven amino acids with the identities ranging between 98.05% and 99.82% during the time frame of 2005 to 2007.

To the second lineage belonged the sequence of A/mallard/Bavaria/1/2007 (H5N2) which was a clearly distinct to the first group (Figure 2A). It was most closely related to isolates from Sweden (Si = 99.61%, E -Value = $1.2 \times e^{-181}$) in 2002 and clustered with viruses from Eurasian countries including Mongolia, China, Japan, Russia, Malaysia, France and Italy (Si = 97.37% - 99.02%, E -Value = $1.4 \times e^{-169}$).

The third lineage with A/mallard/Bavaria/41/2006 (H5N?) was even more distantly related to the main phylogenetic group of the Bavarian LPAI H5 viruses described here. This strain clustered with viruses from France, England, and Italy (Si = 94.17% - 96.33%, E -Value = $1.4 \times e^{-151}$) isolated from 1991 to 2002 (Figure 2A). It is noteworthy that the HPAI H5N1 lineage including the Bavarian H5N1 subtype was again clearly separated from the LPAI H5 lineages (Figure 2A).

Amino acids at HA-positions 113, 124, 142, 154, 228, and 233 (numbering from the initiating methionine residue) are known to affect the pathogenicity of HPAI viruses (Hulse et al., 2004). All the Bavarian LPAI H5 subtypes were completely identical to each other at these positions, but two viruses: A/mallard/Bavaria/36/2006 (H5N3) and A/mallard/Bavaria/41/2006 (H5N?) differed by one and two amino acids, respectively (Table 3).

Table 3. Amino acid comparison of H5 gene between HPAI and LPAI viruses

Virus strain	Amino acid position ^a						
	113	124	142	154	228	233	337-345
<i>A/swan/Bavaria/2/2007 (H5N1)</i> ^b	D	I	E	Q	K	S	PQ G ERRRKKR
<i>A/wild duck/Bavaria/13/2007(H5N1)</i> ^c	D	I	E	Q	K	S	PQ E ERRRKKR
<i>A/mallard/Bavaria/36/2006 (H5N3)</i> ^d	D	T	D	N	K	P	P- - - - QRETR
<i>A/mallard/Bavaria/41/2006 (H5N?)</i>	V	T	D	N	E	P	P- - - - K RETR
<i>A/mallard/Bavaria/1/2007 (H5N2)</i>	D	T	D	N	E	P	P- - - - QRETR

HPAI, high pathogenic avian influenza; LPAI, low pathogenic avian influenza.

^aNumbering of the amino acid positions from the initiating methionine residue.

^bRepresentative for HPAI genotypes Bavaria 1-3.

^cRepresentative for HPAI genotype Bavaria 4.

^dRepresentative for a group of LPAI H5 virus strains including also Bavaria/1/2005, Bavaria/35/2006, Bavaria/37/2006, Bavaria/38/2006, Bavaria/39/2006, Bavaria/40/2006 and Bavaria/15/2007.

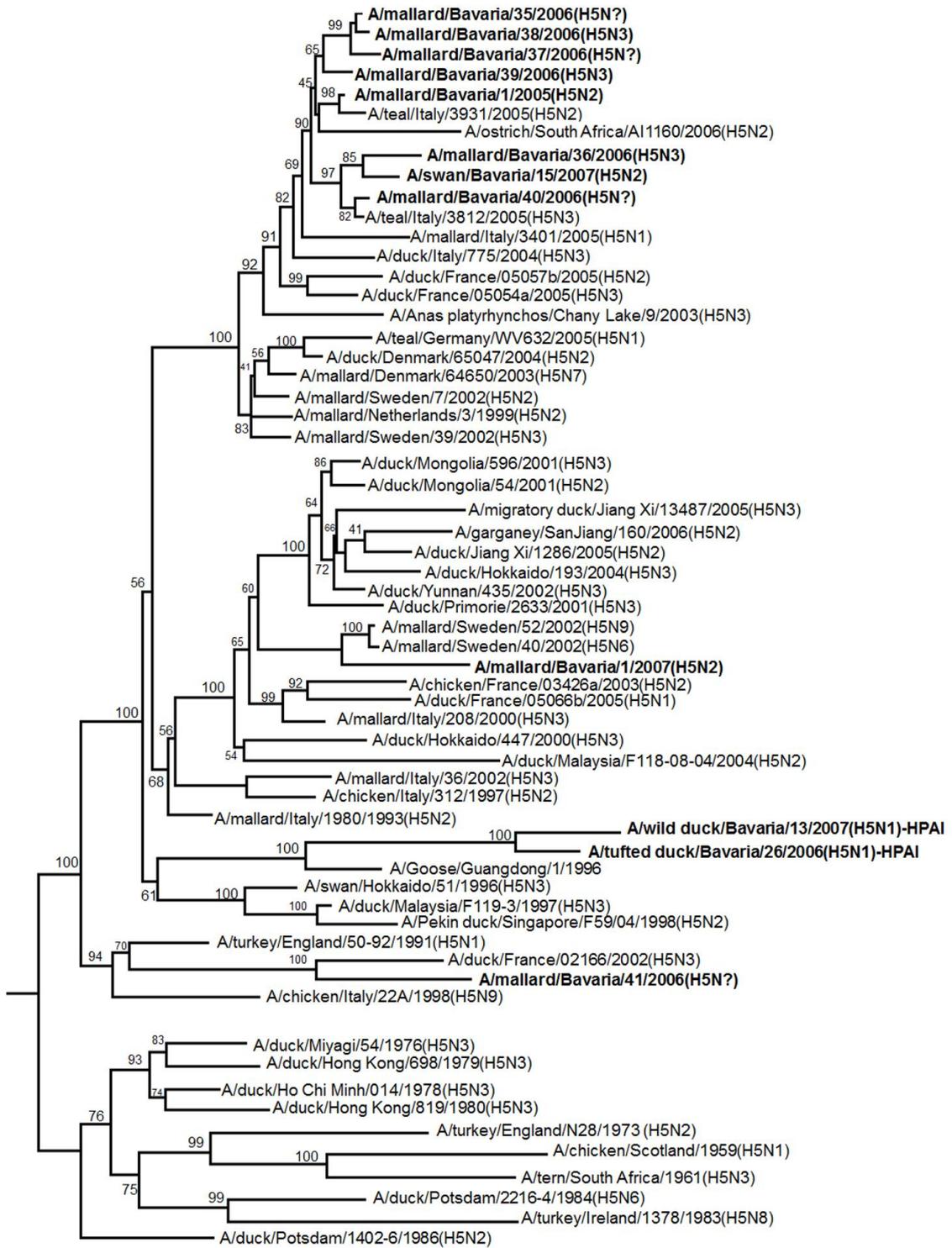


Fig. 2A. Phylogenetic tree of H5 sequences with selected LPAI viruses in Bavaria (2006, 2007)

Analyses were based on the gene HA (nucleotide positions 93-1677). This tree was produced by neighbour joining analysis and rooted to *A/duck/Potsdam/1402-6/86* (H5N2). Support for major branch subdivision is given as percentage bootstrap values. The Bavarian strains are written in bold.

Analyses of N1 neuraminidase sequences not linked to H5

In this study eight N1 sequences (without H5 component) from mallards and ducks were compared from 2006. Similar to the results obtained for H5 sequences, phylogenetic analysis revealed several separate N1-lineages. A group of three viral sequences, Bavaria/43 (H1N1), Bavaria/44 (H?N1) and Bavaria/45 (H1N1), were nearly identical (Figure 2B). They were most closely related to two isolates from Italy of 2002 and 2005 and clustered with strains from France, Taiwan, and Mongolia (Si = 99.83% - 99.67%, $E\text{-Value} = 1.5 \times e^{-158}$).

The second lineage was represented by Bavaria/42 (H1N1) which was closely related, but separable from the first N1-cluster (Figure 2B).

A third lineage was specified by Bavaria/46, Bavaria/47, and Bavaria/48 with the closest relationship to viruses from France in 2002 (Si = 99.43%, $E\text{-Value} = 4.3 \times e^{-156}$). Interestingly, the N1 sequence of a LPAI H11N1 virus isolated from domestic duck was only distantly related to the N1 sequences from other birds determined in this work (Figure 2B). This virus grouped together with isolates of domestic and wild ducks from France in 2001 (Si = 98.93% - 99.47%, $E\text{-Value} = 1.6 \times e^{-156}$) and from Taiwan in 1999 (Si = 98.71%, $E\text{-Value} = 6.4 \times e^{-156}$).

The N1 containing viruses were only distantly related to the H1N1 viruses of swine origin circulating in humans during 2009 (data not shown). In none of the eight LPAI N1 sequences was a deletion in the stalk region similar to one observed in Bavarian HPAI H5N1 genes. Taken together, the phylogenetic analysis of LPAI H5 sequences as well as LPAI N1 viruses showed only a very distant relation to the H5N1 strains found in Bavaria during both years (Figure 2B).

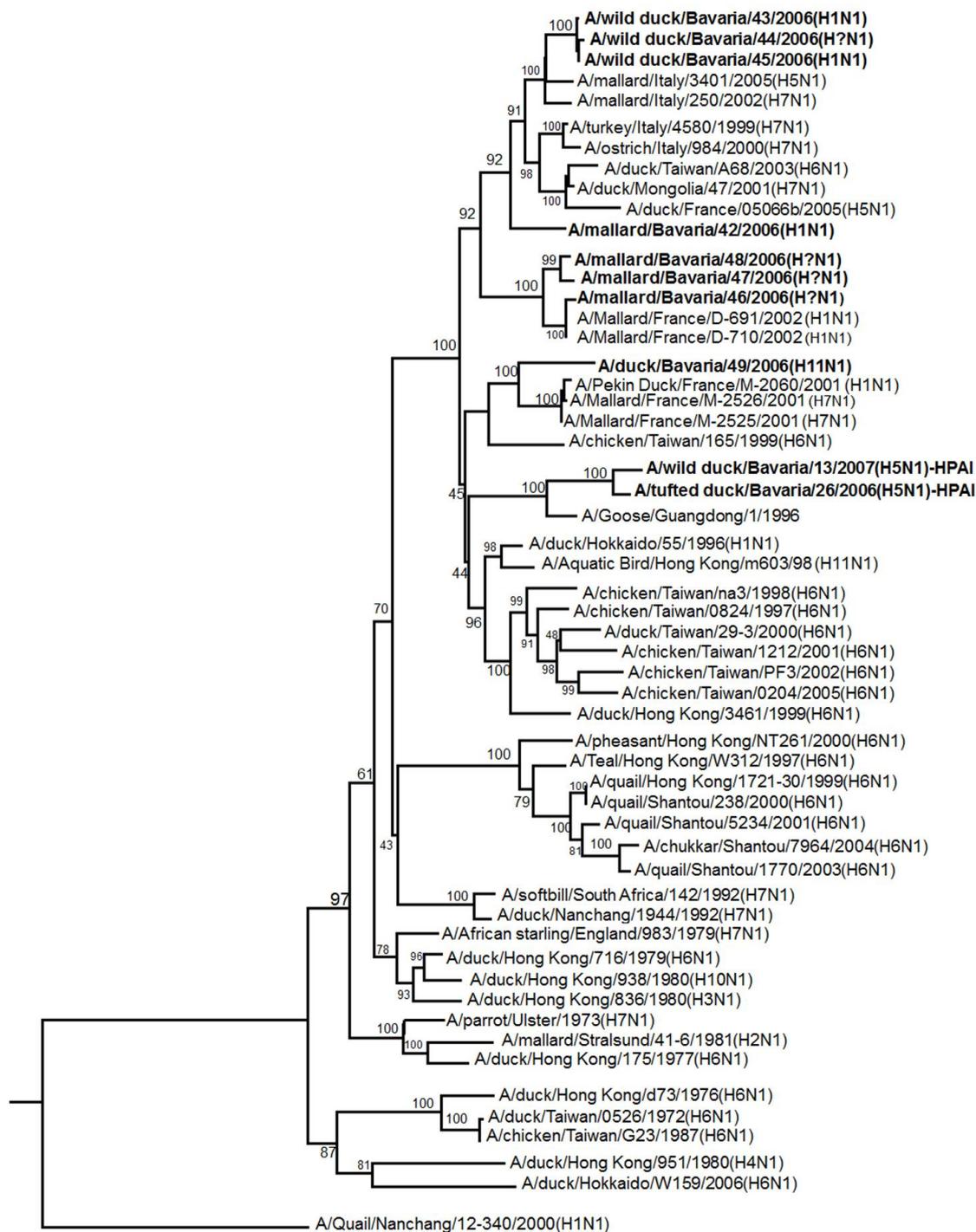


Fig. 2B. Phylogenetic tree of N1 sequences with selected LPAI viruses in Bavaria (2006, 2007)

Analyses were based on the gene NA (nucleotide positions 57-1448). The tree was produced by neighbour joining analysis and rooted to A/quail/Nanchang/12-340/2001 (H1N1). Support for major branch subdivision is given as percentage bootstrap values. The Bavarian strains are written in bold.

DISCUSSION

To gain more knowledge about HPAI as well as LPAI subtype spectra, sequence analyses were performed to further characterize HA, NA, NP, and PA encoding genes from samples collected in Bavaria during 2006 and 2007. Using rRT-PCR, AIV genomes of the H5 type were positive in a total of 84 (2006) and 27 (2007) swab and organ samples from wild birds (Table 1), thus substantially adding data to the initial results reported for H5N1 sequences in a previous study (Rinder et al., 2007). The N1 type was verified in 83 and 27 birds in 2006 and 2007, respectively (Table 1).

Interestingly, the HA type H7 was not observed in wildfowls in Bavaria in either year. This, of course, does not exclude the presence of H7 in Bavaria possibly either at low frequency or at higher prevalences in other years. There is evidence that the frequency of AIV subtypes varies between years (Olsen et al., 2006), and in other regions within Germany not only H5 but also H7 viruses were confirmed in aquatic birds. In Germany, wild-bird-origin LPAI H5 and H7 subtypes were isolated during 2003-2007 (Globig et al., 2006; Wilking et al., 2009). In eastern Germany, the H7 genomes (no H5 subtype) were determined in feral ducks during a period from 1977 to 1989 (Süss et al., 1994).

A total of 12 HPAI H5N1 sequences of the genotype Bavaria 1 investigated in this work completed the data in 2006. The genotypes 1 and 2 from 2006 were unequivocally separated in the phylogenetic tree indicating independent viruses (Figure 1A and B). Similarly, the two genotypes newly detected in Bavaria in 2007 differed from each other (Figure 1A and B). The distinct genotypic feature of these viruses suggests multiple introductions into Bavaria not only in 2006, but also in 2007. Furthermore, the phylogenetic analysis of the H5N1 Bavarian genotypes also demonstrated that these AIV were distinct although they belonged to the subclade 2.2 (Qinghai-like viruses) according to the WHO nomenclature system for HPAI H5N1 viruses (WHO, 2007). The sequences of H5N1 from 2006 were part of the subclade 2.2.1, while the Bavarian sequences from 2007 were classified to the subclade 2.2.4 (Salzberg et al., 2007; Starick et al., 2008). Our findings do not support the view of a persistence and resurgence of viruses between both years

because of the vast extent of genotypic differences and only distant relation found between viral genes from both years which cannot be explained by evasion and evolution of a persisting virus strain. As ongoing wild bird monitoring in the years 2008 and 2009 did not reveal HPAI H5N1 in more than 6.000 samples screened by RTr-PCR, separate introductions of HPAI H5N1 found in 2007 are most likely. The actual data argue against an existing HPAI H5N1 reservoir in wild birds in Bavaria. Multiple introductions of H5N1 strains also were assumed to have occurred in Nigeria (Ducatez et al., 2006), in other regions of Germany (Starick et al., 2008) and in France (Le Gall-Reculé et al., 2008).

The geographical distributions of H5N1 positive birds all-over Bavaria in 2006 contrasts with the limited detection of only two geographically restricted outbreaks in 2007. The cause of the limited spread of AIV in 2007 is not clear. However, it could be the result of a ceasing import of HPAI viruses by migrating birds. Only three dead nestling ducks were tested positive for H5N1 in a pond of a bird observation area in the county of Munich in August 2007. Although the area was carefully searched for additional AIV positive dead birds, none were found. It is possible that these nestling ducks (infected with viruses of the genotype Bavaria 4) were especially susceptible to HPAI H5N1 which caused disease. An age dependent pathogenicity of AIV has previously been suggested for water birds (Pantin-Jackwood et al., 2007).

Moreover, the H5 sequences of the genotype Bavaria 4 differed in one amino acid at position 339 (G→E) within the HA cleavage site to the other three Bavarian H5N1 genotypes without further changes of the multi basic HPAI characteristic (Table 3). The impact of this amino acid exchange on the virus pathogenicity is still unclear, but it might influence pathogenicity especially in young birds. Further experiments are necessary to confirm this hypothesis.

Substantial genetic differences should become obvious in highly conserved genes, e.g. PA and NP. Therefore, both genes were sequenced for selected samples. Interestingly, the phylogeny for the PA and NP genes of the genotype 1 revealed a close relationship to sequences from China in 2005. These results lead to the suggestion of the possible Asian origin of A/tufted duck/Bavaria/26/2006 (genotype Bavaria 1). This might support the theory that wild birds play a significant role in the spreading of influenza A virus, and also possibly the subtype HPAI H5N1 from Asia to Europe during times of migration (Gilbert et al., 2006; Kilpatrick et al., 2006; Wal-

lace et al., 2008). However, this speculation is argumentative because HPAI H5N1 viruses were not proven from infected wildfowls (clinically inapparent) during the long migration time (Weber and Stilianakis, 2007). Furthermore, based on the distinct origins of HA, NA, PA and NP sequences this virus might be a reassortant. Conversely further investigations are necessary to verify this proposal. In contrast to the results described above, the results of the phylogenetic analysis of the genotypes 2, 3, and 4 were comparable to those demonstrated for the HA and NA genes. Our findings uphold the fact that the H5N1 strains isolated in both years do not appear to be genetically similar to each other. This indicates multiple virus introductions between 2006 and 2007 in Bavaria.

LPAI virus and even HPAI infection do not necessarily cause clinical symptoms in wild birds. It is possible that the infection with a certain AIV subtype can raise an efficient immune protection to this influenza subtype, but presumably could not protect wild fowls from re-infection with other LPAI subtypes. There is no information about the dynamics of mutation and transition of LPAI subtypes into HPAI in free ranging wild birds. Consequently, it is important to achieve a better understanding about LPAI virus prevalence, pathogenicity and their genetic diversity in wild bird species.

To gain information about the totality of circulating H5 and N1 pools, LPAI H5 or N1 subtypes were also studied. Phylogenetic analyses of H5-LPAI sequences of both years presented an unexpected heterogeneity, which so far has been demonstrated only when influenza viruses from large geographic areas were compared. The separation of the Eurasian isolates from African and North American strains had shown similar variations in previous investigations (Röhm et al., 1995; Garcia et al., 1997; Duan et al., 2007, Ma et al., 2007). All Bavarian H5 sequences clearly belonged to the Eurasian lineage (Figure 2A). Phylogenetic analyses of the H5 subtypes from Eurasia and Africa resulted in the description of an “early” and a “contemporary” genetic sublineage (Duan et al., 2007). The early lineage included viruses from across Eurasia found before 1991, and one more recent strain from Italy detected in 1997. This lineage was therefore interpreted as representing the early domestic Eurasian H5 gene pool (Duan et al., 2007). Interestingly, the virus A/mallard/Bavaria/41/2006 (the third lineage of LPAI H5 reported here) belonged to this early sublineage, indicating that this lineage still circulates within wild water birds.

Duan et al. (2007) showed the existence of three distinct contemporary H5 AIV groups. Noteworthy, in this study we found that two Bavarian LPAI H5 sublineages and the HPAI H5N1 viruses comprised representatives of all these contemporary groups of Duan et al. (2007). Our first lineage of H5 LPAI viruses presented a high similarity to viruses of a Western European group described by Duan et al. (2007) which included sequences from viruses nearly exclusively from Western Europe. In this group, H5N2 from Bavaria in 2005, Europe (Italy and France) and South Africa are found. These phylogenetic relationships were already confirmed for A/mallard/Bavaria/1/2005 (H5N2) by Gaidet et al. (2008). It supports the hypothesis that influenza strains might circulate mainly in resident birds or in birds migrating over rather short distances and/or thus form a more regional gene pool. Distinct amino acid sequence differences between the HA of the Bavarian viruses of this lineage suggest a continuous evolution of LPAI H5 viruses. The virus Bavaria/1/2007 (the second lineage of LPAI H5 observed in this work) clustered within the first group of Duan et al. (2007), the contemporary Eurasian gene pool. This specifies a link of the Bavarian LPAI virus with the Eurasian gene flow. The third H5 genotypic group of Duan et al. (2007) subtype represent the western Pacific migratory flyway and includes the recent H5N1 viruses which were isolated during 1996 and 2005 in Asia (Duan et al., 2007). The Bavarian H5 sequences of HPAI H5N1 clustered with this group. These might support the assumption of the potential origin of influenza A viruses in Asia and their spreading worldwide through wild birds migration routes as previously described by Boyce et al. (2008) and Dugan et al. (2008).

Taken together, our findings point for the first time the co-existence of the whole range of genetic variety of the Eurasian-African H5 isolates within a confined geographical area. The view is supported that LPAI viruses show a continuous evolution in wild birds. Recently, clear H5 sequence variations elucidated in influenza strains from wild water birds in North America also suggested a continuous Influenza virus evolution (Spackman et al., 2007). Virus transmission via surface waters and the frequency of contacts within and among species of aquatic birds during long migration times are a major risk factor for the spreading of influenza A virus (Garamszegi and Møller, 2007). In this context, the continuous evolution of LPAI in birds could not only increase the risk of recombining new H5N1 viruses out of the

existing gene pool, but also the risk of introducing mutated strains into domestic poultry. On the one hand, the rate of virus mutations has previously been assumed to enhance when AIV is introduced into domestic poultry from wild bird sources (Garcia et al., 1997). On the other hand, no differences in the evolutionary mutation rates between wildfowls and poultry were shown (Spackman et al., 2006). However, influenza virus sequences will continue to change, and evolution is unpredictable when large numbers of susceptible water birds accumulate in stopovers on their way to breeding and wintering areas worldwide. Especially in the view of the second ongoing influenza virus threat, the H1N1 pandemic, it is important to continue worldwide monitoring of wild birds representing the classical reservoir for all Influenza A virus subtypes.

Acknowledgements

This work was supported by a grant from the Bavarian State Ministry of the Environment, Public Health and Consumer Protection (project number 05/19). We thank Heike Lang, Susanne Gellert, Franziska Horvath, Sandra Müller, and Isabella Stöhr, Oberschleissheim, for excellent technical assistance and Dr. Peter Kreuzer, Erlangen, for coordinating laboratory examinations.

References

- Alexander, D.J., 2000: A review of avian influenza in different bird species. *Vet. Microbiol.* 74, 3-13.
- Alexander, D.J., 2008: Avian influenza - diagnosis. *Zoonoses Public Health* 55, 16-23.
- Boyce, W.M., C. Sandrock, C. Kreuder-Johnson, T. Kelly, and C. Cardona, 2008: Avian influenza viruses in wild birds: a moving target. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 32: 275-286.
- Brown, J.D., D.E. Stallknecht, and D.E. Swayne, 2008: Experimental infection of swans and geese with highly pathogenic avian influenza virus (H5N1) of Asian lineage. *Emerg. Infect. Dis.* 14, 136-142.
- CEC, 2006: Council Directive 2005/94/EC of 20 December 2005 on community measures for the control of avian influenza and repealing 92/40/EEC. *Official J. Europ. Commission* L 10, 16-65.
- Chen, H., G. J.D. Smith, K.S. Li, J. Wang, X.H. Fan, J.M. Rayner, D. Vijaykrishna, J.X. Zhang, L.J. Zhang, C.T. Guo, C.L. Cheung, K.M. Xu, L. Duan, K. Huang, K. Qin, Y.H.C. Leung, W.L. Wu, H.R. Lu, Y. Chen, N.S. Xia, T.S.P. Naipospos, K.Y. Yuen, S.S. Hassan, S. Bahri, T.D. Nguyen, R.G. Webster, J.S.M. Peiris, and Y. Guan, 2006: Establishment of multiple sublineages of H5N1 influenza virus in Asia: Implications for pandemic control. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 2845-2850.
- Duan, L., L. Campitelli, X. H. Fan, Y.H.C. Leung, D. Vijaykrishna, J.X. Zhang, I. Donatelli, M. Delogu, K.S. Li, E. Foni, C. Chiapponi, W.L. Wu, H. Kai, R.G. Webster, K.F. Shortridge, J.S.M. Peiris, J. Gavin, D. Smith, H. Chen, and Y. Guan, 2007: Characterization of low-pathogenic H5 subtype influenza viruses from Eurasia: implications for the origin of highly pathogenic H5N1 viruses. *J. Virol.* 81, 7529-7539.
- Ducatez M. F., C.M. Olinger, A.A. Owoade, S. De Landtsheer, W. Ammerlaan, H.G. Niester, A.D. Osterhaus, R.A. Fouchier, and C.P. Muller, 2006: Avian flu: multiple introductions of H5N1 in Nigeria. *Nature* 442, 37.
- Dugan, V.G., R. Chen, D.J. Spiro, N. Sengamalay, J. Zaborsky, E. Ghedin, J. Nolting, D.E. Swayne, J.A. Runstadler, G.M. Happ, D.A. Senne, R. Wang, R.D.

- Slemons, E.C. Holmes, and J.K. Taubenberger, 2008: The evolutionary genetics and emergence of avian influenza viruses in wild birds. *PLoS Pathog.* 4, e1000076.
- Feare, C.J., 2007: The role of wild birds in the spread of HPAI H5N1. *Avian Dis.* 51, 440-447.
- Felsenstein J., 1989: PHYLIP - phylogeny inference package (version 3.2). *Cladistics* 5, 164-166.
- Fouchier, R.A.M, B. Olsen, T.M. Bestebroer, S. Herfst, L. van der Kemp, G.F. Rimmelzwaan, and A. Osterhaus, 2003: Influenza A virus surveillance in wild birds in Northern Europe in 1999 and 2000. *Avian Dis.* 47:857-860.
- Fouchier, R. A., V. Munster, A. Wallenstein, T.M. Bestebroer, S. Herfst, D. Smith, G. F. Rimmelzwaan, B. Olsen, and A.D. Osterhaus. 2005: Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls. *J. Virol.* 79, 2814-2822.
- Gaidet, N., G. Cattoli, S. Hammoumi, S.H. Newman, W. Hagemeijer, J.Y. Takekawa, J. Cappelle, T. Dodman, T. Joannis, P. Gil, I. Monne, A. Fusaro, I. Capua, S. Manu, P. Micheloni, U. Ottosson, J.H. Mshelbwala, J. Lubroth, J. Domenech, and F. Monicat, 2008: Evidence of infection by H5N2 highly pathogenic avian influenza viruses in healthy wild waterfowl. *PLoS Pathog.* 4, e1000127.
- Garamszegi, L.Z., and A.P. Møller, 2007: Prevalence of avian influenza and host ecology. *Proc. Biol. Sci.* 274, 2003-2012.
- Garcia, M., J.M. Crawford, J.W. Latimer, M.V.Z.E. Rivera-Cruz, and M.L. Perdue, 1996: Heterogeneity in the hemagglutinin gene and emergence of the highly pathogenic phenotype among recent H5N2 avian influenza viruses from Mexico. *J. Gen. Virol.* 77, 1493-1504.
- Garcia, M., D.L. Suarez, J.M. Crawford, J.W. Latimer, R.D. Slemons, D.E. Swayne, and M.L. Perdue, 1997: Evolution of H5 subtype avian influenza A viruses in North America. *Virus Res.* 51, 115-124.
- Gilbert, M., X. Xiao, J. Domenech, J. Lubroth, V. Martin, and J. Slingenbergh, 2006: Anatidae migration in the western Palearctic and spread of highly pathogenic avian influenza H5N1 virus. *Emerg. Infect. Dis.* 12, 1650-1656.

- Globig, A., E. Starick, and O. Werner, 2006: Influenza-Infektionen bei migrierenden Wasservögeln: Ergebnisse einer zwei-jährigen Studie in Deutschland. *Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschrift* 119, 132-139.
- Hoffmann, E., J. Stech, Y. Guan, R.G. Webster, and D.R. Perez, 2001: Universal primer set for the full-length amplification of all influenza A viruses. *Arch. Virol.* 146, 2275-2289.
- Hulse-Post D.J., Sturm-Ramirez, K.M., Humberd, J., Seiler, P., Govorkova, E.A., Krauss, S., Scholtissek, C., Puthavathana, P., Buranathai, C., Nguyen, T.D., Long, H.T., Naipospos, T.S., Chen, H., Ellis, T.M., Guan, Y., Peiris, J.S., and R. G. Webster, 2005: Role of domestic ducks in the propagation and biological evolution of highly pathogenic H5N1 influenza viruses in Asia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 10682-10687.
- Hulse, D.J., D.R. Perez, and R.G. Webster, 2004: Molecular determinants of the pathogenicity of H5N1 influenza viruses in chickens. *Inter. Congr. Ser.* 1263, 114-117.
- Kaleta, E.F., G. Hergarten, and A. Yilmaz, 2005: Avian influenza viruses in birds - an ecological, ornithological and virological view. *Dtsch. Tierärztl. Wochenschr.* 112, 448-456.
- Kilpatrick, A.M., A.A. Chmura, D.W. Gibbons, R.C. Fleischer, P.P. Marra, and P. Daszak, 2006: Predicting the global spread of H5N1 avian influenza. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 19368-19373.
- Kishida, N., Y. Sakoda, N. Isoda, K. Matsuda, M. Eto, Y. Sunaga, T. Umemura, and H. Kida, 2005: Pathogenicity of H5 influenza viruses for ducks. *Arch. Virol.* 150, 1383-1392.
- Le Gall-Reculé, G., F.Y. Briand, A. Schmitz, O. Guionie, P. Massin, and V. Jestin, 2008: Double introduction of highly pathogenic H5N1 avian influenza virus into France in early 2006. *Avian Pathol.* 37, 15-23.
- Li, K. S., Y. Guan, J. Wang, G.J. Smith, K.M. Xu, L. Duan, A.P. Rahardjo, P. Puthavathana, C. Buranathai, C. Nguyen, A.T. Estoepangestie, A. Chaisingh, P. Auewarakul, H.T. Long, N.T. Hanh, R.J. Webby, L.L. Poon, H. Chen, K.F. Shortidge, K.Y. Yuen, R.G. Webster, and J.S. Peiris, 2004: Genesis of a highly pathogenic and potentially pandemic H5N1 influenza virus in eastern Asia. *Nature* 430, 209-213.

- Ma, H.C., J.M. Chen, J.W. Chen, Y.X. Sun, J.M. Li, and Z.L. Wang, 2007: The panorama of the diversity of H5 subtype influenza viruses. *Virus Genes* 34, 283-287.
- O.I.E. 2005: Word Organization for Animal Health, Terrestrial Animal Health Code, 14th edn, chapter 2.7.12. Avian Influenza.
Available at: http://www.oie.int/fr/normes/mmanual/A_00037.htm (last accessed on 25 January 2010)
- Olsen, B., V.J. Munster, A. Wallensten, J. Waldenström, A.D.M.E. Osterhaus, and R. A.M. Fouchier, 2006: Global patterns of influenza A virus in wild birds. *Science* 312, 384-388.
- Pantin-Jackwood, M., J., D.L. Suarez, E. Spackman, and D.E. Swayne, 2007: Age at infection affects the pathogenicity of Asian highly pathogenic avian influenza H5N1 viruses in ducks. *Virus Res.* 130, 151-161.
- Pasick, J., Y. Berhane, C. Embury-Hyatt, J. Copps, H. Kehler, K. Handel, S. Babiuk, K. Hooper-McGrevy, Y. Li, Q. Mai Le, and S. Lien Phuong, 2007: Susceptibility of Canada Geese (*Branta canadensis*) to highly pathogenic avian influenza virus (H5N1). *Emerg. Infect. Dis.* 13, 1821-1827.
- Rinder, M., V. Lang, C. Fuchs, A. Hafner-Marx, K.H. Bogner, A. Neubauer, M. Buettner, and 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.
- Röhm, C., T. Horimoto, Y. Kawaoka, J. Süß, and R. G. Webster, 1995: Do hemagglutinin genes of highly pathogenic avian influenza viruses constitute unique phylogenetic lineages? *Virology* 209, 664-670.
- Salzberg, S.L., C. Kingsford, G. Cattoli, D.J. Spiro, D.A. Janies, M.M. Aly, I.H. Brown, E. Couacy-Hymann, G.M. De Mia, H. do Dung, A. Guercio, T. Joannis, A.S. Ali Maken, A. Osmani, I. Padalino, M.D. Saad, V. Savic, N.A. Sengamalay, S. Yingst, J. Zaborsky, O. Zorman-Rojs, E. Ghedin, and I. Capua, 2007: Genome analysis linking recent European and African influenza (H5N1) viruses. *Emerg. Infect. Dis.* 13, 713-718.
- Spackman, E., D.A. Senne, T.J. Myers, L.L. Bulaga, L.P. Garber, M.L. Perdue, K. Lohman, L.T. Daum, and D.L. Suarez, 2002: Development of a real-time reverse transcriptase PCR assay for type A influenza virus and the avian H5

- and H7 hemagglutinin subtypes. *J. Clin. Microbiol.* 40, 3256-3260.
- Spackman, E., K.G. McCracken, K. Winker, and D.E. Swayne, 2006: H7N3 avian influenza virus found in a South American wild duck is related to the Chilean 2000 poultry outbreak, contains genes from equine and North American wild bird lineages, and is adapted to domestic turkeys. *J. Virol.* 80, 7760-7764.
- Spackman, E., D.E. Swayne, D.L. Suarez, D.A. Senne, J.C. Pedersen, M.L. Killian, J. Pasick, K. Handel, S.P. Pillai, C.W. Lee, D. Stallknecht, R. Slemons, H.S. Ip, and T. Deliberto, 2007: Characterization of low-pathogenicity H5N1 avian influenza viruses from North America. *J. Virol.* 81, 11612-11619.
- Starick, E., M. Beer, B. Hoffmann, C. Staubach, O. Werner, A. Globig, G. Strebelow, C. Grund, M. Durban, F. J. Conraths, T. Mettenleiter, and 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.
- Sturm-Ramirez, K. M., T. Ellis, B. Bousfield, L. Bissett, K. Dyrting, J. E. Rehg, L. Poon, Y. Guan, M. Peiris, and R. G. Webster, 2004: Reemerging H5N1 influenza viruses in Hong Kong in 2002 are highly pathogenic to ducks. *J. Virol.* 78, 4892-4901.
- Sturm-Ramirez, K.M., D.J. Hulse-Post, E.A. Govorkova, J. Humberd, P. Seiler, P. Puthavathana, C. Buranathai, T. D. Nguyen, A. Chaisingh, H.T. Long, T.S. Naipospos, H. Chen, T.M. Ellis, Y. Guan, J.S. Peiris, and R.G. Webster, 2005: Are ducks contributing to the endemicity of highly pathogenic H5N1 influenza virus in Asia? *J. Virol.* 79, 11269-11279.
- Süss, J., J. Schäfer, H. Sinnecker, and R. G. Webster, 1994: Influenza virus subtypes in aquatic birds of eastern Germany. *Arch. Virol.* 135, 101-114.
- Thompson, J.D., D.G. Higgins, and T.J. Gibson, 1994: CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22, 4673-4680.
- Wallace, R.G., and W.M. Fitch, 2008: Influenza A H5N1 immigration is filtered out at some international borders. *PLoS ONE*. 27, e1697.
- Weber, T.P., und N.I. Stilianakis, 2007: Ecologic immunology of avian influenza (H5N1) in migratory birds *Emerg. Infect. Dis.* 13, 1139-1143.

- Webster, R.G., S. Krauss, D. Hulse-Post, and K. Sturm-Ramirez, 2007: Evolution of influenza A viruses in wild birds. *J. Wildl. Dis.* 43, 1-6.
- Webster, R.G., W.J. Bean, O.T. Gorman, T.M. Chambers, and Y. Kawaoka, 1992: Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiol. Rev.* 56, 152-178.
- WHO, 2007: WHO/FAO/O.I.E.: H5N1 Evolution Working group: Towards a unified nomenclature system for the highly pathogenic H5N1 avian Influenza viruses. Available at: <http://www.who.int/csr/disease/influenza/nomen.ppt> (last accessed on 25 January 2010)
- Wilbur, W.J., and D.J. Lipman, 1983: Rapid similarity searches of nucleic acid and protein data banks. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80, 726-730.
- Wiling, H., M. Ziller, C. Staubach, A. Globig, T.C. Harder, and F.J. Conraths, 2009: Chances and Limitation of Wild Bird Monitoring for the Avian Influenza Virus H5N1-Detection of Pathogens Highly Mobile in Time an Space. *PLoS ONE* 4, e6639.

6 DISKUSSION

6.1 Zeitraum, Gebiete und Vogelarten der AIV-Untersuchungen

Die vorliegende Arbeit präsentiert Ergebnisse, die im Rahmen einer Wildvogelüberwachungsstudie zur Erkennung des Vorkommens Influenza A Virus, und hier insbesondere der Subtypen H5, H7 und N1, sowie des Ursprungs aviärer Influenza aus den Jahren 2006 und 2007 in Bayern erarbeitet wurden. Diese Studie ist vom Bayerischen Staatsministerium für Umwelt, Gesundheit und Verbraucherschutz in Auftrag durchgeführt und gefördert worden. Neben dem Erkenntnisgewinn zu Prävalenz und Phylogenie der Influenzaviren in Bayern stand die Fragestellung nach der Existenz sowohl eines HPAI H5N1-Reservoirs als auch eines NPAI-Reservoirs der H5- und N1-Subkomponente (in Kombination mit anderen N- bzw. H-Komponenten) im Mittelpunkt. Ein weiterer wichtiger Aspekt dieser Arbeit war ebenfalls die Analyse der Sequenzverwandtschaft zwischen bayerischen HPAI H5N1 und NPAI-H5- und N1-Viren.

Vorkommen von Influenzaviren. In den Jahren 2006 und 2007 waren bayernweit 12.930 Wildvögel in die Untersuchung einbezogen und aviäre Influenza bei 152 (1,2 %) bzw. 139 (1,1 %) Vögeln identifizierbar (Tab. 1, siehe (s.) Abschnitt 5, (S. 61)). Influenzaviren konnten in beiden Untersuchungsjahren in einem breiten Spektrum verschiedener Vogelarten (mindestens 16 unterschiedliche Arten) entdeckt werden (Tab. 1 (S. 61)). Bei wild lebenden Vögeln in Bayern ließen sich in beiden Untersuchungsjahren ebenfalls Viren mit H5- und N1-Subkomponenten, und dabei sowohl HPAIV als auch NPAIV, festzustellen.

Wie in Untersuchungen von RABL et al. (2009) und RABL (2010) gezeigt wurde, variiert die Prävalenz der Influenza-A-Viren in Bayern saisonal. So waren in den Jahren 2007 und 2008 bei 5.864 untersuchten Tieren insgesamt 219 AIV-positiv, also mit einem Vorkommen von 3,7 % (RABL et al. 2009). Die Nachweisrate lag im September 2007 und 2008 mit 9,3 % (31 / 334) bzw. mit 19,5 % (75 von 384) am höchsten (RABL et al. 2009). Diese Saisonalität konnte ebenso in anderen Regionen Deutschlands beobachtet werden. Im Zeitraum von März 2003 bis Januar 2005 ergab so die Untersuchungen an Wildvögeln (3.182 Kloakenabstriche) in einer deutschlandweit durchgeführten Wildvogelüberwachungsstudie, die 80 unterschied-

liche Gebiete aus 12 Bundesländern umfasste. Peaks der AI-Vorkommen der untersuchten Vögel lagen im Oktober mit 0,5 % (16 / 3.182) (GLOBIG 2007). Desgleichen waren im Jahr 2008 ebenso deutschlandweit aviäre Influenzaviren überwiegend im Herbst nachweisbar, und zwar im September (57 von 2.185 - 2,6 %) bei Wildvögeln (HARDER et al. 2009). Im Jahr 2010 war die AI-Nachweisrate im Oktober mit einer Prävalenz von 0,3 % (34 / 10.945) in Deutschland am höchsten, die zweit- und dritthöchste Prävalenz (jeweils mit 0,2 %) aviärer Influenzaviren konnte in den Monaten Februar bzw. November (n=21 und n=20 von 10.945 beprobten Wildvögeln) beobachtet werden (Tiergesundheitsjahresbericht 2011).

Europaweit durchgeführte Untersuchungen zum Vorkommen aviärer Influenza spiegeln das obengenannte Bild wider. So war in der Wildvogel-Surveillance im europäischen Raum bei einer ganzjährigen Beprobung der Wildvögel eine hohe Influenza-A-Virus-Prävalenz bei Stockenten in den Herbstmonaten (September und Oktober (MUNSTER et al. 2007) und Oktober / November (WALLENSTEN et al. 2007)) feststellbar. Dieses Muster des zeitlich gehäuften Auftretens aviärer Influenza im Herbst ist möglicherweise sowohl für Europa als auch für Nordamerika charakteristisch (WEBSTER et al. 1992, MUNSTER et al. 2007, IP et al. 2008). Die erhöhte Prävalenz in Herbstmonaten kann im Hinblick auf den Wildvogelzug und daraus folgenden enormen Vogelansammlungen sowie mit der Influenzavirusübertragungen zwischen diversen Vogelspezies begründet werden kann. In den Wintermonaten wurde demgegenüber ein niedriges Vorkommen aviärer Influenzaviren (DE MARCO et al. 2005, BREED et al. 2010, HANSBRO et al. 2010). Dieses Phänomen einer niedrigen Prävalenz im Winter könnte mit einer Immunität gegen Influenzaviren in dieser Jahreszeit erklärt werden.

Allerdings waren bei Wildvogel-Monitoringuntersuchungen aviärer Influenza (diverse AI-Subtypen einschließlich H5 und H7) nicht nur im Herbst, sondern auch zu anderen Jahreszeiten identifizierbar, z. B. im Frühling bis in den Monat April (CHENG et al. 2010) und im Sommer sowie Frühherbst (LEBARBENCHON et al. 2010), gelegentlich sogar im Januar und März (GOUJGOULOVA et al. 2010). Im Sommer kommen aviäre Influenzaviren anscheinend nur sehr selten bei Wildvögeln in nachweisbarer Menge vor. So konnte in Tupferproben, die von Wildvögeln zwischen den Monaten Mai und August gesammelt wurden, AIV nicht nachgewiesen werden (CHENG et al.

2010). Diese Differenzen in der Prävalenz und in der Virusisolierungsrate könnten dennoch nicht nur mit dem Alter und der Art der untersuchten Vögel, sondern auch mit der Logistik des Probentransportes sowie mit der Sensitivität der virologischen Methoden zum Influenza-A-Virus-Nachweis zusammenhängen.

Das höchste AI-Vorkommen ergab sich bei Stockenten mit 1,2 % (151 (47 und 104 positive Proben in 2006 bzw. 2007) von 12.930 gescreenten Tieren) unter der verschiedenen Wildvogelarten in der vorliegenden Studie (Tab. 1, s. Publikation II (S. 61)). Bereits von SLEMONS et al. (1974) wurde den Wildenten eine Rolle als AIV-Reservoirwirt und somit mögliche Rolle als Entstehungsort für rekombinante Viren zugeschrieben. Des Weiteren sprechen die oben genannten Daten dafür, dass Stockenten als subklinisch infizierte Trägerwirte und somit als AIV-Indikatoren bei Monitoringstudien in Frage kommen könnten. Auch in anderen Arbeiten, die sowohl in Bayern als auch deutschlandweit durchgeführt wurden, konnten aviäre Influenzaviren am häufigsten bei Stockenten festgestellt werden (HARDER et al. 2009, RABL et al. 2009). Die Befunde mehrerer Studien wiesen auf die höchste Influenzavirus-Präsenz bei Vögeln der Ordnungen Anseriformes (Enten, Gänse, Säuger, Schwäne) hin (HINSHAW et al. 1980a, KALETA et al. 2005).

Wie von RABL et al. (2009) beschrieben, stammten in Bayern nachgewiesene niedrig virulente aviäre Influenzaviren im Wesentlichen von Wildvögeln aus bayerischen Seengebieten. Bereits mehrere Arbeiten belegten einen kausalen Zusammenhang zwischen Gewässer und aviäre Influenzavirus-Prävalenz (ZHANG et al. 2006, LANG et al. 2008). Seengebiete stellen den wichtigsten Lebensraum der als Reservoir angesehenen Vogelarten der Anseriformes dar. Zudem gilt Wasser offenbar ein optimales Medium für die Ausbreitung der Influenzavirusinfektion (HINSHAW und WEBSTER 1982).

Zur Dauer der Aufrechterhaltung der AIV-Infektiosität in kontaminiertem Wasser existieren allerdings unterschiedliche Studienergebnisse. So wurden für die Dauer der Virusstabilität bei 20 °C sieben Tage und bei 4 °C mehr als 30 Tage (WEBSTER et al. 1978) ermittelt, wobei belegten STALLKNECHT et al. (1990a) die Überlebenszeit des H6N2-Virus (1×10^6 TCID₅₀ / ml) bei 28 °C (0 ppt Salzgehalt, pH=6,2-8,2) von 12 bis 50 Tage, aber beim Salzgehalt von 20 ppt (mit gleichen Testbedingungen) bis einschließlich 26 Tage. Desweiteren zeigten die Untersuchungen

mit destilliertem Wasser die Verluste diverser Virus-Infektiosität (u.a. H4N6, H6N2, H12N5 mit 1×10^6 TCID₅₀ / ml) bei 17 °C bis zu 207 Tage, dennoch senkte dieser Parameter bei 28 °C bis zu 102 Tage (STALLKNECHT et al. 1990b).

Weiterhin variierte die Überlebenszeit von NPAI-Viren je nach Subtyp (minimale 2,2621 TCID₅₀ / ml), und zwar H5-Subtyp mit N2, N3, N7, N8 und H7-Subtyp mit N3,N4 (bei 28 °C): (i) bei 0 ppt Salzgehalt - von 36 bis 118 Tage bzw. 24-74 Tage, (ii) bei 15 ppt Salzgehalt - innerhalb 42-61 Tage bzw. 19-29 Tage, (iii) bei 30 ppt Salzgehalt - von 22 bis 42 Tage bzw. 22-32 Tage (BROWN et al. 2007). Bemerkenswert blieb die Infektiosität von HPAI-H5N1-Viren (n=2) unter gleichen oben genannten Bedingungen bis 30 Tage (bei 0 ppt Salzgehalt), 28 Tage (bei 15 ppt Salzgehalt) und bis 18 Tage (bei 30 ppt Salzgehalt) erhalten (BROWN et al. 2007). Diese Daten zeigen eindeutig, dass die Überlebenszeit aviärer Influenzaviren nicht nur von physikalisch-chemischen Parametern des Bodens und Wassers und anderen abiotischen ökologischen Faktoren abhängig ist, sondern auch zwischen verschiedenen AI-Viren variiert.

Zudem existieren bei Wildvögeln, also den Reservoirwirten, kaum Daten zur Pathogenese nach Exposition mit niedrig und hoch pathogenen Viren. Man geht allerdings davon aus, dass aviäre Influenzaviren vor allem im Darmtrakt der Wildvögel replizieren, in großen Mengen mit den Faeces ins Wasser ausgeschieden werden und so innerhalb der Wasservogelpopulation zirkulieren. Auf diese Weise infizieren sich insbesondere auch Jungvögel, die erst nach dieser Erstinfektion in der Jugend langsam eine Immunität gegen diese Viren aufbauen können (GARAMS-ZEGI und MOLLER 2007). Folglich ist anzunehmen, dass diese erstmals infizierten Jungvögel als inapparente Träger für die Weiterverbreitung der Influenzaviren während der Zugzeiten dienen könnten. Auch im Winter in Eis (also in gefrorenem Wasser) waren NPAI-H1-Viren nachweisbar (ZHANG et al. 2006). Ferner konnte ITO et al. (1995) und KIDA (1997) aviäre Influenzaviren im Wasser isolieren, obwohl in diesem Zeitraum keine Wildvögel in den beprobten Wassergebieten beobachtet wurden. Daher vermutet man, dass Eis das Überleben der Viren über einen langen Zeitraum ermöglicht und dieses nach Auftauen eine denkbare Quelle für Virusinfektionen der Wasservögel darstellt. Es ist jedoch anzumerken, dass die Hypothese einer epidemiologischen Bedeutung der Influenza-A-Virus-Persistenz im Wasser bisher nicht belegt ist. Problematisch ist, dass Influenzaviren im Wasser sehr

stark verdünnt werden und möglicherweise nur in niedrigeren Mengen von einem Ort zum anderen verbreitet werden. Die dadurch bedingten Schwierigkeiten beim Nachweis der Viren erschwert die Überprüfung der Richtigkeit dieser Theorie der Influenzavirus-Persistenz im Wasser.

HPAI-H5-Viren. In der vorliegenden Studie konnte in den Jahren 2006 und 2007 hochpathogene H5N1-Viren lediglich bei tot aufgefundenen Wildvögeln nachgewiesen werden. Im gleichen Zeitraum gab es deutschlandweit Belege zum Auftreten des HPAI H5N1 bei Wildvögeln im Totfundmonitoring (RINDER et al. 2007, STARICK et al. 2008, GLOBIG et al. 2009a, MÜLLER et al. 2009, WILKING et al. 2009).

In Bayern wurden die hochpathogenen aviären Influenzaviren bei einem breiten Spektrum von Wirten belegt, wobei 16 bis zum Artniveau differenziert und sechs nicht identifiziert waren (Tab. 1, s. Publikation II (S. 61)). Interessanterweise stammten die HPAI H5N1 allerdings nahezu ausschließlich von Schwänen (Höckerschwäne und Schwäne, die nicht bis zum Artniveau differenziert worden waren), und zwar mit 54 % (40 von 74) in 2006 und mit 68 % (13 / 19) in 2007 (Tab. 1, Abschnitt 5). Bei den anderen Arten lagen nur Einzelnachweise vor. Ferner stammten auf der Insel Rügen vom Februar bis April 2006 ein Großteil, und zwar 76 % der gefundenen HPAI H5N1, ebenfalls aus Schwänen (94 von 124 H5N1 positiv getesteten Wildvögeln) (GLOBIG et al. 2009a). Folglich könnten Schwäne demnach eine Sonderrolle als „Sentinel“ Tiere für den Nachweis des HPAIV H5N1 spielen.

Desgleichen erwiesen sich in mehreren anderen Studien Schwäne und Gänse für HPAIV des Subtyps H5N1 als hoch empfänglich für HPAI (PALMAI et al. 2007, TEIFKE et al. 2007, BROWN et al. 2008). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass Schwäne einer Infektion mit H5N1 nicht immer sofort erliegen. So überlebten adulte Schwäne eine experimentelle Infektion mit einer niedrigen Dosis ($<10^4$ EID₅₀ / Tier) des HPAI H5N1-Subtyps (KALTHOFF et al. 2008). Demzufolge könnten Schwäne gleichfalls eine essentielle Rolle als Vektor bei HPAI H5N1-Infektionen in der Wildvogelpopulation einnehmen. Um diese Annahmen zu überprüfen, ob Schwäne als „Sentinel“ und/oder als „Vektor“ für aviäre Influenza (auch HPAI H5N1) in Frage kommen könnten, sind dennoch weitere Untersuchungen notwendig.

Hoch pathogene H5N1-Viren waren in der vorliegenden Studie nicht nur bei Vertretern der Anseriformes, sondern auch bei Greifvögeln und Eulen identifizierbar (Tab. 1 (S. 61)). Ergebnisse zum Vorkommen dieser Viren bei Raubvögeln wurden ebenfalls in anderen Studien präsentiert (KHAN et al. 2009, MARJUKI et al. 2009).

Die Nachweise der hochvirulenten H5N1-Viren in Bayern zeigten sowohl räumlich als auch zeitlich in den Jahren 2006 und 2007 unterschiedliche Muster (Abb. 4 (S. 90)). So waren im Jahr 2006 insgesamt 26 Landkreise Bayerns von HPAI H5N1-Viren betroffen, während dieser Subtyp im Jahr 2007 nur in zwei Landkreisen (Nürnberg und München) festgestellt wurde. Im Jahr 2006 erfolgten die Nachweise fast ausschließlich in einem Zeitraum von Ende Februar bis Mitte Mai. Hingegen waren im Jahr 2007 die HPAIV H5N1 bei Wildvögeln lediglich in zwei getrennten Ausbrüchen in den Monaten Juli und August nachweisbar (Abb. 4). Die Gründe für die Differenzen in diesen Jahren sind dennoch weitgehend unbekannt.

Bemerkenswert ist, dass im Jahr 2008 HPAI H5N1-Viren bei Wildvögeln bayernweit nicht mehr detektiert werden konnten (LGL 2011). In Deutschland war in diesem Jahr lediglich bei einer in einem Geflügelbetrieb in Markersdorf (Sachsen) gehaltenen Ente hoch virulentes H5N1-Virus während einer Surveillance-Untersuchung feststellbar (FLI 2008b). Im Jahr 2009 gab es deutschlandweit nur im März einen HPAI H5N1-Einzelgenomnachweis bei einer wildlebenden Stockente in Possenhofen (Freistaat Bayern) (FLI 2009). Dieser Nachweis erfolgte im Rahmen des Wildvogelmonitorings, bei dieser Stockente wurden allerdings keine Symptome einer aviären Influenza-Infektion beobachtet, auch wenn es sich in diesem Fall um ein Genom des hoch virulenten H5N1-Virus Typ Asia handelte (FLI 2009). Stockenten könnten also möglicherweise nicht nur für die NPAIV sondern auch für die HPAIV als subklinisch infizierte Carrier und somit als Langzeitvektoren für die Verbreitung über kurze oder weite Distanzen in Fragen kommen. Dass Stockenten subklinisch mit HPAIV infiziert sein können, belegen Studienergebnisse ebenso von KEAWCHAROEN et al. (2008). Hier zeigten experimentell mit HPAIV H5N1 infizierte Stockenten keine klinischen Symptome oder pathologischen Befunde, aber eine signifikante Virusexkretion über den gesamten Versuchszeitraum. Zudem fanden die Autoren mehrerer Arbeiten ebenso natürliche HPAI-H5N1-Infektionen bei anscheinend gesunden Wildvögeln sowohl in Europa als auch in Asien (ausführlich beschrieben im Abschnitt 2.3.1.2

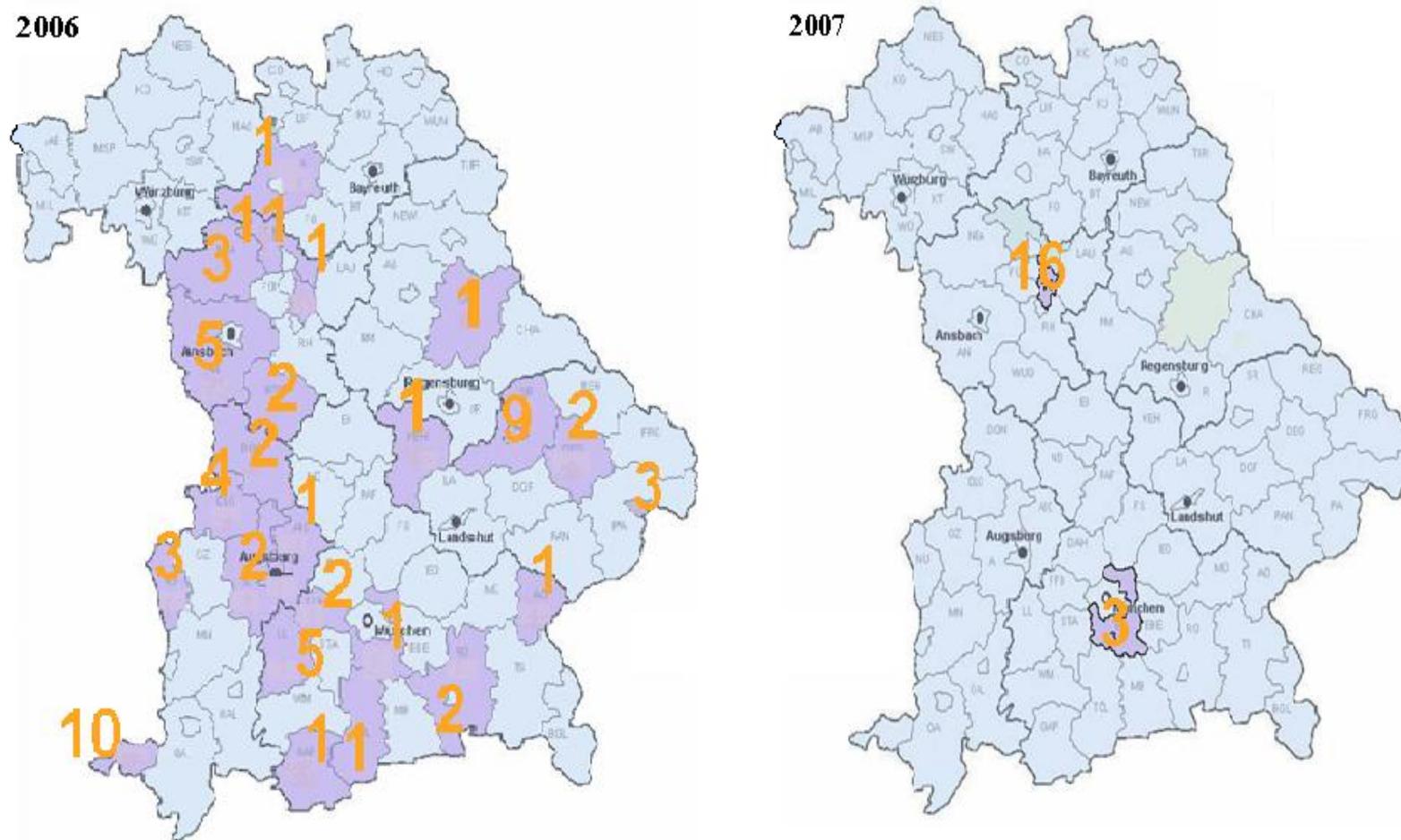


Abbildung 4: Geographische Verteilung der Fundorte von H5N1-positiven Wildvögeln in Bayern
(Modifizierte Darstellung, <http://www.stmugv.bayern.de/tiergesundheit/vogelgrippe/index.htm>)

(S. 37-40)) (KOU et al. 2005, O.I.E. 2008a, FLI 2009, SAVIĆ et al. 2010). Folglich kann also auch bei fehlenden Krankheitssymptomen bei Wildvögeln ein gewisses Risiko einer HPAIV-Übertragung zwischen Wildvögeln und von subklinisch infizierten wild lebenden Vögeln auf Wirtschaftsgeflügel nicht ausgeschlossen werden.

NPAI-Viren mit H5- oder N1-Komponente. In der vorliegenden Arbeit konnten bei Wildvögeln NPAI-Virus-Komponente mit H5 und N1 (n=18 bzw. n=17) mit einer Prävalenz von 0,3 % (35 / 12.930) in den Jahren 2006 und 2007 identifiziert werden, allerdings nie in Kombination miteinander. Es ist auffällig, dass die Mehrzahl sowohl der NPAIV H5-Subtypen mit 78 % (14 / 18) als auch der niedrig virulenten N1-Genome mit 71 % (12 von 17) von Stockenten stammten (Tab. 1 (S. 61)). Daraus ergibt sich, dass sich Stockenten als Indikatoren für ein Vorkommen veterinärmedizinisch bedeutender H5-Viren im Rahmen des Wildvogelmonitorings ganz besonders eignen könnten. Die Ergebnisse anderer Monitorings zeigten ebenfalls, dass Stockenten die höchste NPAIV-Prävalenz aller Wildvögel aufwiesen. So waren bis zu 20 % der Tiere Virusträger (MUNSTER et al. 2007), und auch in Deutschland ergab sich ein hohes NPAIV-Vorkommen bei Anseriformes, und hier insbesondere bei Stockenten, in Studien von GLOBIG et al. (2006), HARDER et al. (2009) und RABL et al. (2009).

Versuche, Stockenten als Sentinels im Rahmen von „aktiven“ Wildvogelüberwachungsstudien zu verwenden, um die Prävalenz von Influenza A Viren realnah abzuschätzen, wurden bereits durchgeführt (SINNECKER et al. 1982 a und b, SÜSS et al. 1994, GLOBIG et al. 2009b). In einer Surveillance-Studie erfolgte dabei die Feststellung der NPAIV-Prävalenz von 37 % bei Sentinel-Pekingenten (*Anas platyrhynchos domestica*) im Vergleich zu 8,7 % bei Wildenten. Niedrig pathogene aviäre Influenzaviren des Subtyps H4N6 konnten sowohl bei den Sentinels als auch bei den freilebenden Wildvögeln nachgewiesen werden, während Viren des Subtyps H7N7 nur bei Sentinelenten feststellbar waren (SÜSS et al. 1994). In einem weiteren Wildvogel-Monitoring gelang die Isolierung diverser NPAIV-Subtypen bei Sentinel-Stockenten in Deutschland, Österreich und in der Schweiz innerhalb der Jahre 2006 und 2008 (GLOBIG et al. 2009b). Die höchste Nachweisrate von AIV mit Subtypen H3, H3N2 und H6N8 wurde in dieser Studie festgesellt, und betrug 0,3 %. Ebenfalls konnten H5- und H7-Viren (H5N?, H5N3 bzw. H7N?, H7N3) mit einem Vorkommen

jeweils von 0,1 % identifizierbar. Ob die Subtypenverteilung und die aviäre Virus-Prävalenz zwischen Sentinels und Wildvögeln übereinstimmen, wurde in dieser Studie allerdings nicht untersucht. Aus diesem Grund ist es schwer zu beurteilen, ob Sentinel-Stockenten realitätsnah die Influenza-A-Virus-Prävalenz widerspiegeln können.

Influenzaviren des H7-Subtyps. Der Influenzavirus-Subtyp H7 konnte bei Wildvögeln innerhalb der Jahren 2006 und 2007 in Bayern nicht detektiert werden. Außerdem waren die H7-Viren auch bayernweit bei wildlebenden Vögeln in 2008 nicht nachweisbar (RABL et al. 2009). Trotz dieses Befundes kann man jedoch das Vorkommen des Subtyps H7 nicht mit Sicherheit ausschließen, da dieses sporadisch in Bayern vorhanden sein könnte. In anderen Regionen Deutschlands wurden in den Jahren 1977-2008 NPAIV mit H7-Subkomponenten bei Wildvögeln durchaus dokumentiert (detaillierte Subtypangaben in der Tabelle 2 (S. 34) (SÜSS et al. 1994, GLOBIG et al. 2006, HARDER et al. 2009). Auch gelang der Nachweis von H7-Viren deutschlandweit in den Jahren 2009 und 2010 bei Wildvögeln in mehreren Surveillance-Studien (ausführlich beschrieben im Abschnitt 2.3.1.1 (S. 35 ff.)) und diese erlangten dadurch große epidemiologische Bedeutung (Tiergesundheitsjahresbericht 2010 und 2011). Darüber hinaus wird aus diesen Studienergebnissen ersichtlich, dass nicht nur zeitliche, sondern auch geographische Unterschiede des Virus-Vorkommens in verschiedenen Teilen Deutschlands vorhanden sind. Daten von OLSEN et al. (2006) belegten ebenfalls, dass die Häufigkeitsrate der Influenzavirus-Subtypen in bestimmten Regionen Europas mit den Jahren variiert.

6.2 Vergleichende Analyse der HPAI H5N1-Viren

Die vorliegende Arbeit umfasste phylogenetische Untersuchungen zu den HPAI H5N1-Viren, um mögliche Einschleppungswege zu ermitteln und um die Frage zu beantworten, ob möglicherweise in Bayern ein Wildvogelreservoir für diese Viren existiert. Dabei erfolgte die Ermittlung von Identitäten und Similaritäten für Nukleotidsequenzen unterschiedlicher Gene (s. Publikation I, II (S. 45-83)). Die Identität wurde als prozentuale Basenübereinstimmung zwischen Sequenzen berechnet, während

bei der Similaritätsanalyse ein Erwartungswert zugrunde liegt, der eine Auffassung der Zufallsübereinstimmung berücksichtigt (KARLIN und ALTSCHUL 1990, DEMBO et al. 1994). Phylogenetische Stammbäume wurden generell mit Distanz-Matrix- (Neighbor Joining), Maximum Parsimony und Maximum Likelihood-Methoden analysiert. Da die erhaltenen phylogenetischen Beziehungen mit allen drei Methoden nahezu identisch waren, wurden im Folgenden nur Stammbäume, deren Bezeichnungen mittels Neighbor-Joining-Methode folgte, dargestellt (s. Publikation I, II sowie die Abschnitte 6.2, 6.3 und 6.4).

Beim Vergleich repräsentativer Sequenzen der HA-Gene der in Bayern in den Jahren 2006 und 2007 nachgewiesenen H5N1 mit Viren aus Eurasien und der NPAI H5N1-Viren aus Amerika ergab sich, wie zu erwarten war (RÖHM et al. 1995, DUAN et al. 2007), eine Trennung der eurasischen und der amerikanischen Viren in zwei Hauptäste. Die bayerischen Influenzaviren des Subtyps H5N1 aus beiden Jahren gruppieren sich mit den Viren aus Eurasien und grenzen sich von der amerikanischen Linie ab (Abb. 5 (S. 94)). Ein Ursprung der bayerischen Viren aus dem eurasischen Raum ist also zu folgern.

Weitere Untersuchungen zum Ursprung der bayerischen HPAI-H5N1 ergaben explizit eine entfernte Verwandtschaft dieser Viren bei Vergleich der Jahre 2006 und 2007. So waren vier HPAI-H5N1-Genotypen (Bavaria 1, 2, 3 und 4) in Bayern differenzierbar. Die hochvirulenten Viren der Genotypen Bavaria 1 und 2 aus dem Jahr 2006 gruppieren sich in einem Hauptast zusammen und getrennt von den im Jahr 2007 festgestellten Genotypen Bavaria 3 und 4 (Abb. 1A (S. 63)). Bemerkenswert ist, dass die H5N1-Viren des Genotyps 4 nur bei drei jungen, tot aufgefundenen Enten isoliert wurden. Dies lässt durchaus annehmen, dass diese immunologisch naiven Vögel für diese Influenzaviren sehr empfänglich waren. Auch deuten Befunde anderer Studien generell auf eine besonders hohe Empfänglichkeit von Jungvögeln für die Influenzaviren hin (PERKINS und SWAYNE 2003, PASICK et al. 2007b).

Die bayerischen Viren der Genotypen 1 und 2 aus dem Jahr 2006 unterschieden sich jedoch weiterhin voneinander und konnten basierend auf ihren Verwandtschaftsbeziehungen mit anderen H5N1-Viren diversen Herkünften zugeordnet werden: Genotyp Bavaria 1 war nahe verwandt mit Sequenzen von Viren aus der Schweiz, Nigeria, Burkina Faso, der Türkei, Irak, der Mongolei und Russland; der Genotyp

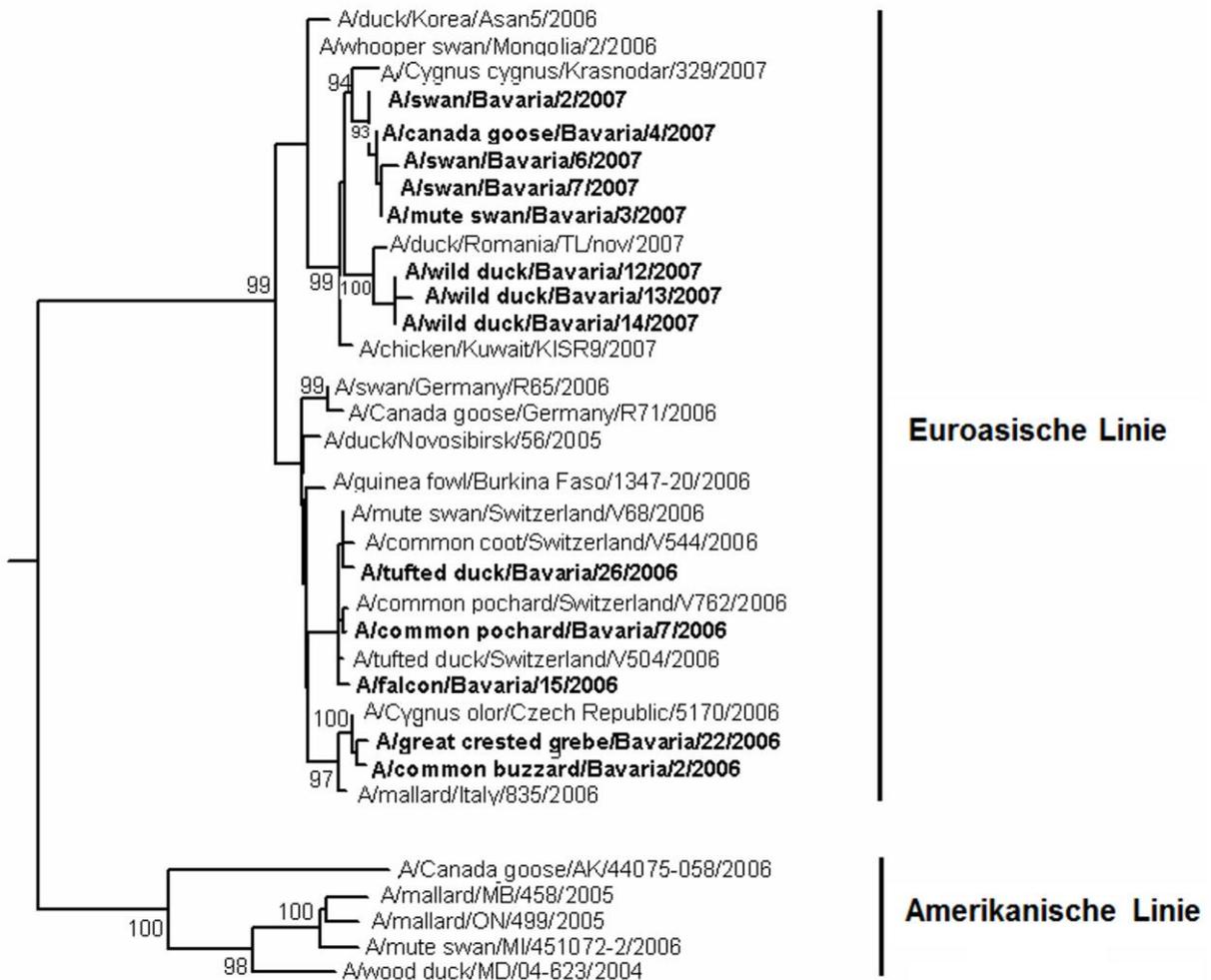


Abb. 5: Phylogenetische Analyse des HA-Gens der HPAI H5N1-Viren aus Eurasien und der NPAI H5N1-Viren aus Amerika

Nukleotid-Positionen der H5-Gene von 76 bis 1706 waren einbezogen. Die Bootstrap-Werte sind in Prozent für die Hauptknotenpunkte angegeben. Die bayerischen Stämme sind fett gedruckt. HA=Hämagglutinin, HPAI=Hoch pathogene aviäre Influenza, NPAI=Niedrig pathogene aviäre Influenza

Bavaria 2 zu den Stämmen aus der Tschechischen Republik, Italien, Österreich, Slowenien, der Türkei, Israel, Ägypten und Nigeria (Abb. 1A, s. Publikation II (S. 63)). In später durchgeführten phylogenetischen Vergleichen des HA-Gens zeigte sich zudem eine nahe Verwandtschaft der bayerischen H5N1-Viren von 2006 mit H5N1-Viren aus der Schweiz und Tschechischen Republik aus dem gleichen Jahr (HOFFMANN et al. 2008, NAGY et al. 2007 und 2009, SZELECZKY et al. 2009).

Bei der Identifizierung der Herkunft der bayerischen HPAI-Viren von 2007 ergab sich, dass der Genotyp 3 hohe Sequenzähnlichkeit mit H5N1-Viren aus anderen Regionen Deutschlands und Russland hatte, während der Genotyp 4 nahe verwandt mit den Viren aus Rumänien und der Tschechischen Republik war. Beide Genotypen gruppierten sich im Dendrogramm zudem zusammen mit Sequenzen von Influenzaviren aus Kuwait, Korea, der Mongolei, Russland und Afghanistan (Abb. 1A, (S. 63)). Die Ergebnisse der vorliegenden Studie wurden in anderen phylogenetischen Analysen bestätigt (STARICK et al. 2008, NAGY et al. 2009, SZELECZKY et al. 2009).

Eine zentrale Fragestellung unserer Studie war, ob ein H5N1-Reservoir bei Wildvögeln in Bayern existiert. In Abbildung 1A ist deutlich zu sehen, dass während der Jahre 2006 und 2007 multiple Einträge von HPAI H5N1-Viren nach Bayern stattfanden. Alle eingeschleppten H5N1-Viren gehörten zum Subclade 2.2. Allerdings gruppierten sich alle HPAI H5N1-Stämme von 2006 mit den Viren des Subtyps H5N1 aus Eurasien im Subclade 2.2.1, während sich die hochvirulenten Influenzaviren von 2007 in das Subclade 2.2.4 einordnen ließen (Abb. 1A, Abschnitt 5). Demnach sind die Viren der Jahre 2006 und 2007 auf getrennte HPAI H5N1-Importe zurückzuführen. Aber auch die innerhalb 2006 und 2007 nachgewiesenen diversen Genotypen 1 und 2 bzw. 3 und 4 wurden als getrennte, also multiple Einschleppungen interpretiert, da sie sich in den phylogenetischen Bäumen in getrennten Ästen darstellten und andere, nicht in Bayern identifizierte H5N1-Viren in ihren HA-Genen näher mit den einzelnen bayerischen Genotypen verwandt waren als die bayerischen H5 miteinander. Basierend auf den HA-Gensequenzvergleichen der bayerischen Genotypen Bavaria 1, 3 und 2, 4 ist eine AI-Einschleppung über eine ost-westliche Wildvogelmigrationsroute aus Asien bzw. über eine Süd-Nord-Wanderroute aus Afrika (über Spanien, Italien oder die Türkei) denkbar. In der vorliegenden Arbeit fanden sich keine Hinweise dafür, dass ein HPAIV H5N1-Reservoir in Wildvögeln in

Bayern existiert. Die Ergebnisse unserer Studie stützen vielmehr die Ansicht, dass die aus wild lebenden Vögeln isolierten Viren vermutlich während der Migration nach Bayern verbreitet worden waren.

Desgleichen bekräftigen andere Arbeiten die weithin akzeptierte Auffassung, dass die HPAI H5N1-Viren über Wildvogelzug eingeschleppt wurden. So schlug FINK et al. (2010) zwei Subcluster der HPAIV H5N1 vor, die die beiden in der vorliegenden Arbeit angenommenen Verbreitungswege bestätigen: (i) Subcluster-Süd mit H5N1-Viren aus Österreich, Slowenien, der Türkei, Ägypten und Nigeria, (ii) Subcluster Nordwest (Subgroup Bavaria) mit Isolaten aus Bayern, der Tschechischen Republik, Italien und der Slowakei. Zudem präsentierten ebenfalls weitere Studien multiple Einschleppungen von HPAI-Virus H5N1 in den Jahren 2006 und 2007 in den Westen Afrikas (DUCATEZ et al. 2006 und 2007, FUSARO et al. 2010), nach Deutschland (RINDER et al. 2007, STARICK et al. 2008), Frankreich (LE GALL-RECUÉ et al. 2008), Italien (SALZBERG et al. 2007), Österreich (FINK et al. 2010), Ungarn (SZELECZKY et al. 2009), Polen (SMIETANKA et al. 2010), Schweden (KISS et al. 2008, ZOHARI et al. 2008), in die Schweiz (HOFFMANN et al. 2008) und die Tschechische Republik (NAGY et al. 2009) sowie nach Saudi-Arabien (MONNE et al. 2008). Ferner lassen Infektionen sowohl bei Wildvögeln als auch beim Hausgeflügel von H5N1-Viren der Subclade 2.2 in diesen oben genannten Ländern eine H5N1-Ausbreitung über den Schwarzmeer-Mittelmeerregion-Migrationsweg in die Länder Europas und möglicherweise eine Virusübertragung von Wasservögeln auf Wirtschaftsgeflügel vermuten.

Bis zum heutigen Zeitpunkt gibt es allerdings keine eindeutigen Erkenntnisse über den Ursprung des Subclades 2.2. Beim HPAI H5N1 / 2005-Ausbruch in Qinghai wurden die Viren (detailliert beschrieben im Abschnitt 2.3.1.2 (S. 37 f.)), welche zum Subclade 2.2 gehören, isoliert, die mindestens vier Genotypen angehörten (CHEN et al. 2006a). Die Aminosäureanalyse dieser Viren ergab die Änderung Glu627Lys im PB2-Gen, welche als ein Indikator der AIV-Passage durch Säugetiere angesehen wird und bereits bei Viren des pandemischen H1N1-Virus 1918 (TAUBENBERGER et al. 2005) sowie beim einen H7N7-Isolat in den Niederlanden 2003 (FOUCHIER et al. 2004) lediglich bei der menschlichen Population erwiesen wurde. Das Phänomen dieses Aminosäureaustausches war erstmals bei Viren des Subclade 2.2 bei Wildvögeln nachweisbar, die Ursachen für diese Mutation sind jedoch unbekannt.

Die Entstehung eines virulenten HPAI H5N1-Subtyps bei Wildvögeln aus einem in Bayern permanent vorhandenen Reservoir an NPAI-Viren ist nicht mit letzter Sicherheit auszuschließen, wird aber durch die vorliegenden Daten nicht gestützt. Eine Umwandlung von NPAI-Viren in HPAI-Viren ist beispielsweise über Reassortments denkbar. Es ist anzunehmen, dass ein Reassortment des Influenzavirus dann entstehen kann, wenn ein empfänglicher Wirt gleichzeitig mit mehreren AI-Subtypen befallen wird (HINSHAW et al. 1980b). So wies MUKHTAR et al. (2007) auf die Sequenzähnlichkeit der HA- und PA-Gene zwischen den Viren A/Goose/Guangdong/1/96 (H5N1) und A/Swan/Hokkaido/51/96 (H5N3) hin. Ebenfalls konnte in dieser Studie eine große Similarität der N1-Gene der Isolate A/Gs/Gd/1/96 (H5N1) und A/Dk/Hokkaido/55/96 (H1N1) identifiziert werden. Überdies waren die Sequenzen der PB1-, PB2-, NP- und M-Proteine dieses hochvirulenten H5N1 Virus aus Guangdong sehr ähnlich zu den NPAI-Sequenzen von Subtypen H3N8 und H7N1 aus Nanchang, die im Jahr 1992 in der Volksrepublik China isoliert waren. Bemerkenswert war, dass das NS-Gen eine enge Verwandtschaft zum Isolat Ty/Eng/50-92/91 (H5N1) und zum gleichen H3N8-Subtyp aus Nanchang (1992) zeigte. Infolgedessen wurde angenommen, dass das Virus A/Gs/Gd/1/96 ein Reassortant der oben genannten vier Influenzaviren ist (MUKHTAR et al. 2007). Außerdem zeigen phylogenetische Untersuchungen, dass der Ursprung des Virus A/Gs/Gd/1/96 auf NPAIV-H5 aus Wildvögeln zurückzuführen ist und dass sich dieses Virus nach multiplen Reassortmentgeschehnissen mit anderen Wildvogel-Viren seit den 70er Jahren in Eurasien etabliert hat (DUAN et al. 2007). Die Befunde in kürzlich veröffentlichten Studien stellten dar, dass sich NPAI H5N3-Viren mit HPAI H5N1-Viren gruppieren (FUJIMOTO et al. 2010) und dass ein niedrig pathogenes H5N1-Virus aus Südkorea eine große Ähnlichkeit mit ostasiatischen und europäischen NPAI-Viren besaß (KIM et al. 2011). Dies stützt auch die These über einen kontinuierlich stattfindenden Genomaustausch innerhalb der NPAI und HPAI-Viren, welcher zur Entwicklung neuer genetischer Linien oder mehrerer Linien hoch oder niedrig pathogener Influenzaviren führen kann.

Bei der molekularen Analyse der HA-Segmente der bayerischen HPAI H5N1 ergaben sich hohe Identitäten bei Viren innerhalb der Genotypen Bavaria 1, 2, 3 und 4, aber gleichfalls zwischen den Genotypen 1-2 und 3-4 (Tab. 2, Abschnitt 5 (S. 67)).

Die Analyse der Aminosäuresequenz des Hämagglutinins zeigte, dass die H5N1-Viren der Genotypen Bavaria 1, 2 und 3 (Tab. 3, Publikation II (S. 69)) identische Aminosäuren an den AIV-Positionen 113, 124, 142, 154, 228, 233 und 337-345 (Nummerierung ab dem ersten Methionin) besaßen, also an Positionen, für die ein kausaler Zusammenhang mit hoher Virulenz bewiesen ist (HULSE et al. 2004). Die H0-Spaltstelle der Genotypen Bavaria 1, 2 und 3 unterschied sich von der von Bavaria 4 in einer Aminosäureposition (339) =PQGERRRKKR*GLF bzw. =PQEERRRKKR*GLF (Tab. 3, (S. 69)). Diese Reihenfolge und das Vorkommen basischer Aminosäuren sind in beiden Fällen charakteristisch für HPAI-Viren des Subtyps H5N1. Die Bedeutung der Mutation von Glutaminsäure E an Position 3 nach dem initialen Prolin (P) des Genotyps 4 ist bis zum heutigen Zeitpunkt unbekannt. Sie wurde bisher lediglich für drei bayerische Viren in der NCBI-Gendatenbank (GU046774, GU046776 und GU046780) veröffentlicht. Es ist durchaus denkbar, dass dieser einzige Aminosäureunterschied zur Veränderung von Influenzavirus-Pathogenitätsfaktoren führen könnte. Weitgehend unverstanden ist bisher, wie eine solche Diversität an der Schnittstelle des HA-Gens der Influenzaviren entstehen kann. Desweiteren wird ebenso diskutiert, dass Rekombinationen zwischen HA und anderen Genen vorkommen können, die zu einer Insertion von Nukleotiden in dieses Gen führen (SUAREZ et al. 2004).

In dieser Studie wurden nicht nur die HA-Gene der H5N1-Influenzaviren aus Bayern analysiert, sondern auch die Neuraminidasegene einbezogen. Die NA-Gene der bayerischen HPAI H5N1-Viren aus den Jahren 2006 und 2007 ließen sich ebenfalls zur eurasischen Linie und nicht zur AI-Gruppe aus Amerika zuordnen (Abb. 6 (S. 99)). Die Analyse der N1-Sequenzen der bayerischen H5N1-Stämme präsentierte ebenso die Existenz von jeweils zwei unterschiedlichen Genotypen in beiden Untersuchungsjahren (Abb. 1B (S. 65)). Darüber hinaus ist ersichtlich, dass die bayerischen H5N1-Viren in den beiden Jahren keine Genomsegmente mit anderen Viren ausgetauscht haben, da phylogenetische Analysen dieser Viren sowohl basierend auf dem HA-Gen als auch auf dem NA-Gen größtenteils enge Verwandtschaftsbeziehungen zu denselben Viren aus Europa und Asien darstellte (Abb. 1B). Auf eine hohe Homologie der bayerischen H5N1-Viren von 2006 mit AIV des gleichen Jahres aus der Schweiz wiesen ebenso die Studienergebnisse von HOFFMANN et al. (2008) hin.

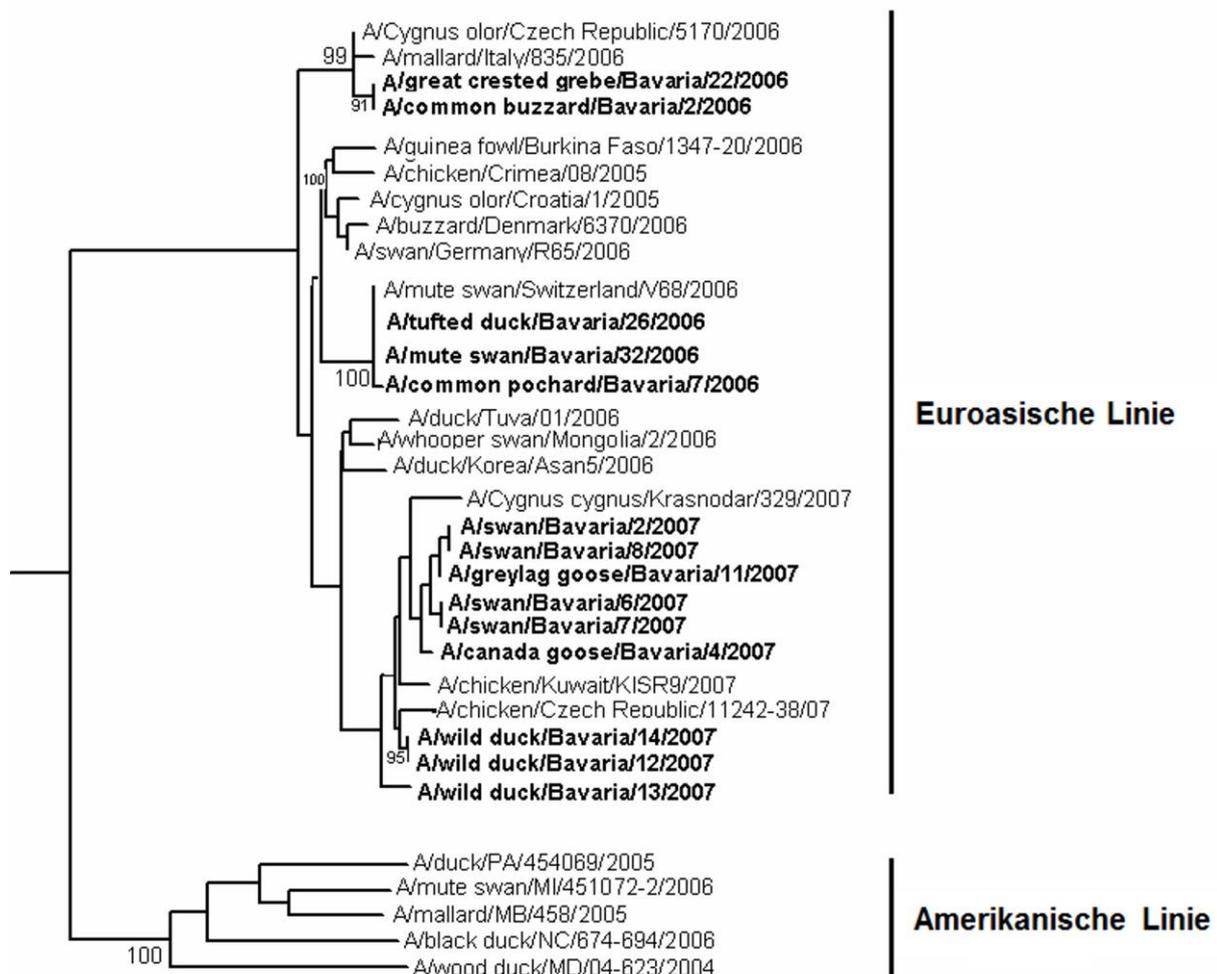


Abb. 6: Phylogenetischer Baum des NA-Gens der HPAI H5N1-Viren aus Europa, Asien und der NPAI H5N1-Viren aus Amerika

Nukleotidpositionen der NA-Sequenzen von 48 bis 1373 wurden einbezogen. Die Bootstrap-Werte sind in Prozent für die Hauptknotenpunkte angegeben. Die bayerischen Stämme sind fett gedruckt. NA=Neuraminidase, HPAI=Hoch pathogene aviäre Influenza, NPAI=Niedrig pathogene aviäre Influenza

Zur Ermittlung der Herkunft der HPAI H5N1 aus Bayern wurden also PA- und NP-Gene in die phylogenetischen Untersuchungen einbezogen und diese Gene bei ausgewählten bayerischen HPAI H5N1-Viren aus den Jahren 2006 und 2007 sequenziert (Abb. 7 und 8 (S. 100 bzw. 101)): *A/tufted duck/Bavaria/26/06* (Genotyp 1), *A/great crested grebe/Bavaria/22/06* (Genotyps 2), *A/swan/Bavaria/2/07* (Genotyp 3) und *A/wild duck/Bavaria/13/07* (Genotyp 4).

Die PA-Sequenzen dieser H5N1-Viren aus beiden Jahren gruppierten sich in einem phylogenetischen Baum mit *A/duck/Hong Kong/821/02* (H5N1) (Abb. 7). Demzufolge sind die Influenzaviren von 2006 und 2007 aus Bayern dem Genotyp Z der asiatischen H5N1-Linie nach LI et al. (2004) zuzuordnen.

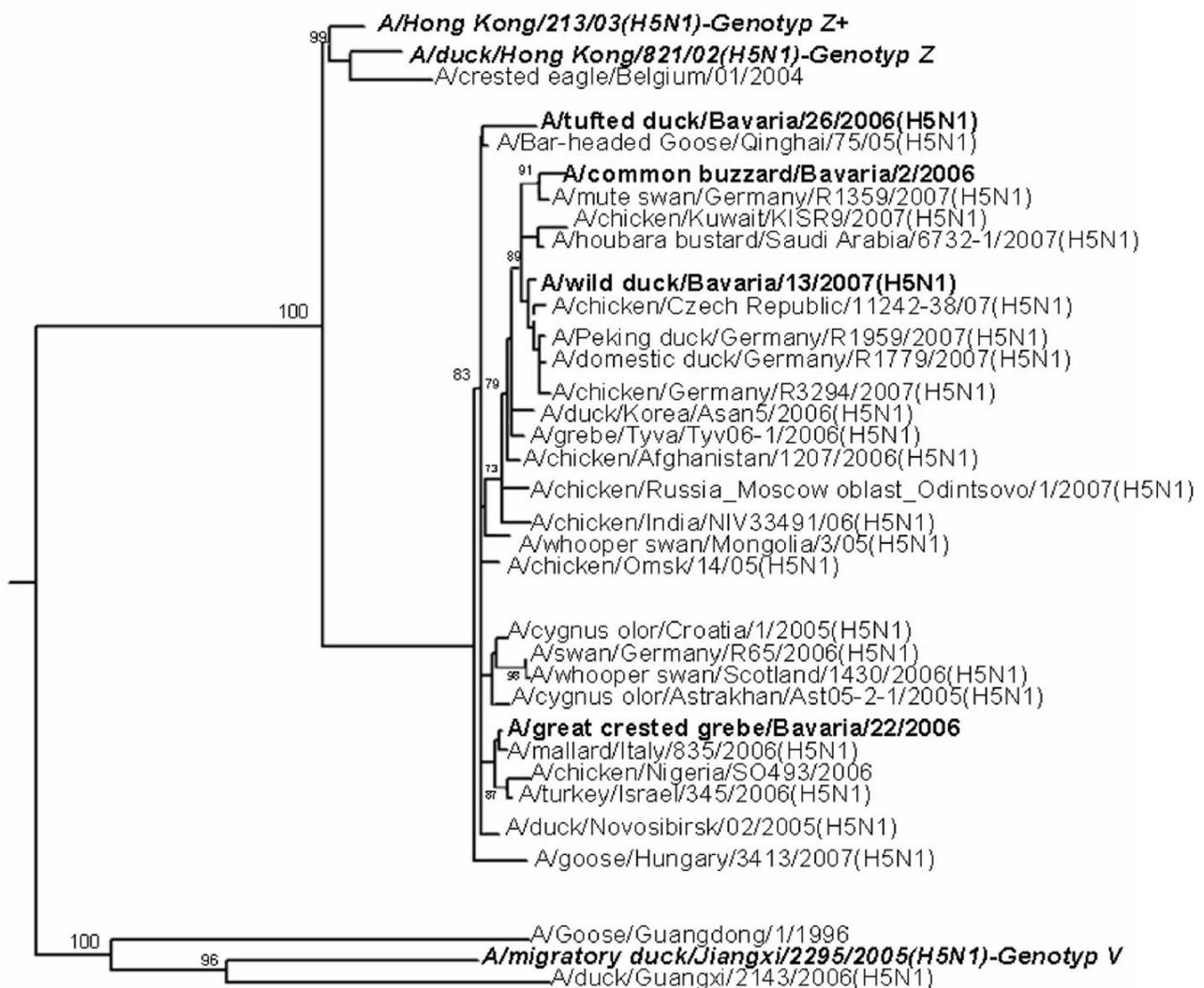


Abb. 7: Phylogenetische Untersuchungen des PA-Gens der bayerischen HPAI H5N1-Viren (2006-2007)

Nukleotidpositionen der PA-Sequenzen sind 25-2176.

Die bayerischen Stämme und die Genotype Z, Z+, V sind fett bzw. fett und kursiv gedruckt.

Die Bootstrap-Werte sind in Prozent für die Hauptknotenpunkte angegeben. PA=Polymerase acid Protein, HPAI=Hoch pathogene aviäre Influenza

Interessanterweise stellten sich nur die PA- und NP-Gene des Influenzavirus des Genotyps 1 (A/tufted duck/Bavaria/26/06) in enger Verwandtschaft zu Sequenzen aus der Volksrepublik China dar (Abb. 7 und 8).

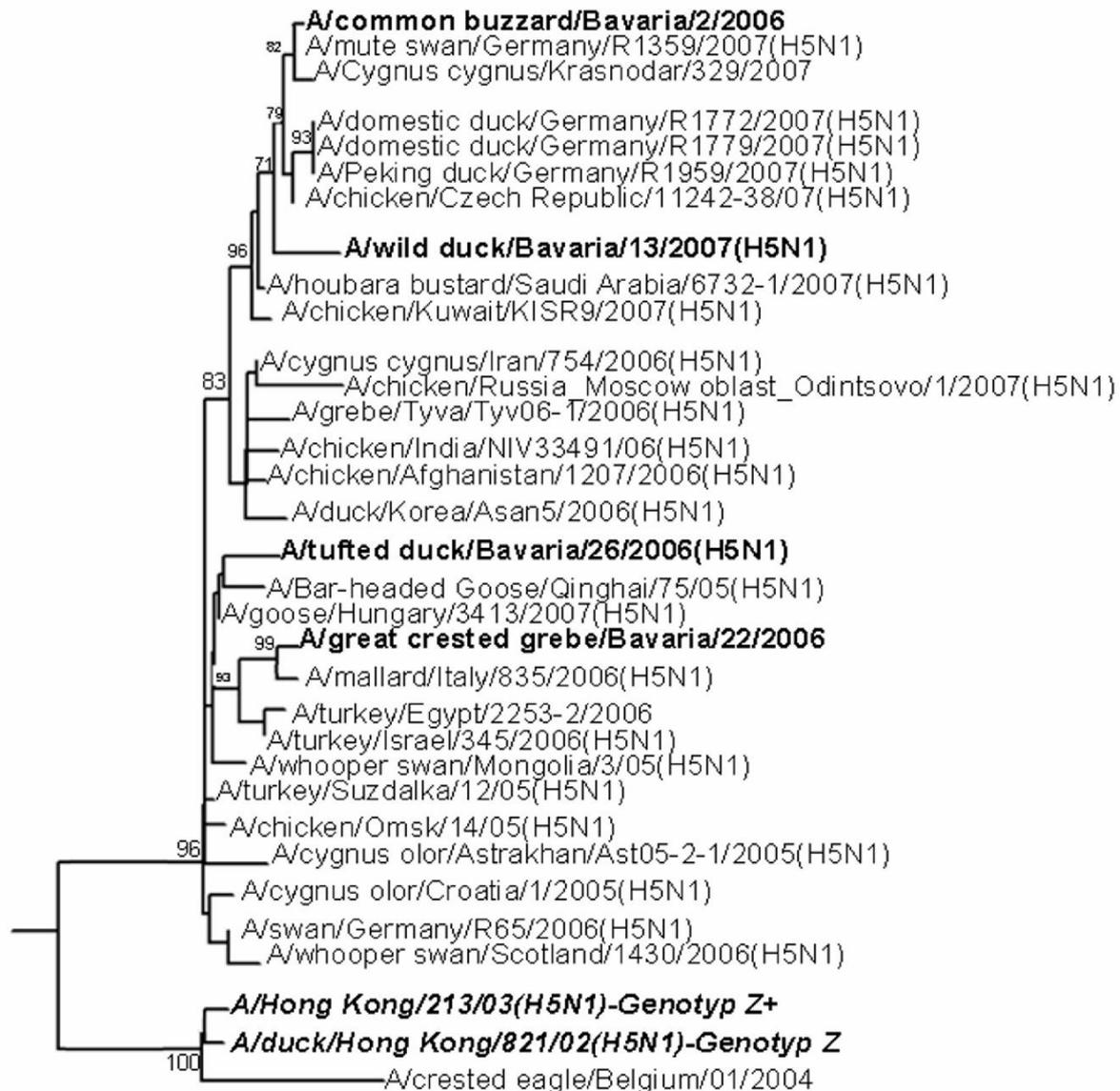


Abb. 8: Phylogenetischer Baum des NP-Gens der HPAI H5N1-Viren aus Bayern (2006-2007)

Nukleotidpositionen der NP-Sequenzen von 46 bis 1527 wurden einbezogen. Die bayerischen Stämme und die Genotype Z, Z+ sind fett bzw. fett und kursiv gedruckt.

Die Bootstrap-Werte sind in Prozent für die Hauptknotenpunkte angegeben. NP=Nukleoprotein, HPAI=Hoch pathogene aviäre Influenza

Basierend auf den phylogenetischen Untersuchungen kann zudem spekuliert werden, dass das Virus Bavaria/26/2006 (Genotyp 1) aufgrund unterschiedlicher Herkünfte der HA-, NA-, PA- und NP-Gene ein Reassortant ist (Abb. 1A (S. 63), 1B (S. 65), 7 und 8 (S. 100 bzw. 101)) und dass dieses Virus möglicherweise aus der Volksrepublik China stammt. Um diese Annahme zu überprüfen, sind jedoch weitere Untersuchungen notwendig.

Ein zeitlicher und ursächlicher Zusammenhang wird zwischen dem Wildvogelzug und der AI-Übertragungen durch Wildvögel von Asien nach Europa vermutet (GAUTHIER-CLERC et al. 2007). Es werden drei Hauptzüge der Wildvögel in Eurasien unterschieden (WANG et al. 2008): (i) die Ostasiatische-Australische (durch asiatische Länder (z. B. die Volksrepublik China, die Mongolei, Japan) in die Russische Föderation), (ii) die Zentraasiatische (der Vogelzug erfolgt zwischen Russland, Kasachstan, Afghanistan und Pakistan), (iii) die Schwarzmeer-Mittelmeer-Route (von Russland in die Türkei, nach Europa und Afrika). Bei diesen drei Zugflugrouten treffen sich Vögel aus verschiedenen Zügen in Russland (Novosibirsk) und ziehen dann in die Winterquartiere (ein Hauptaufenthaltort zwischen Weg- und Heimzug) weiter (WANG et al. 2008). Möglicherweise verbreiten Zugvögel durch ihren Flug HPAI H5N1-Viren aus Südostasien über Russland und Kasachstan nach Europa und Afrika (GAUTHIER-CLERC et al. 2007).

Da sowohl während der Zugzeiten als auch in den Rastzeiten eine Ansammlung von Wildvögeln verschiedener Arten auf engem Raum stattfindet, besteht die Möglichkeit, dass wild lebende Vögel sich mit diversen Influenza-Subtypen (HPAI und NPAI) anstecken und folglich virussubtypspezifische Immunitäten entwickeln und während des Vogelzugs als Langzeitvektor für die Ausbreitung des Subtyps HPAI H5N1 aus Südostasien nach Europa in Frage kommen können (GILBERT et al. 2006b, KEAWCHAROEN et al. 2008). Ergebnisse von Studien mit Satelliten-Telemetrie stützen diese These, indem festgestellt wurde, dass HPAI-H5N1-Viren von Wildvögeln während der Zugzeiten vom Qinghai See in die Mongolei (PROSSER et al. 2009) und von Japan nach Russland (Khabarovsk) eingeschleppt haben könnten (YAMAGUCHI et al. 2010). Dennoch ist die Hypothese der HPAI H5N1-Verbreitung durch Wildvögel derzeit noch nicht zweifelsfrei bestätigt. So konnte klinisch inapparente Infektionen von Wildvögeln mit Influenzaviren während der langen

Zugzeiten bisher noch nicht nachgewiesen werden (WEBER und STILIANAKIS 2007). Das bringt uns wieder auf die Frage, ob hoch virulente Viren stabil in der Wildvogelpopulation zirkulieren, welche überdies derzeit weitgehend unklar ist. Dessen ungeachtet postulierte KILPATRICK et al. (2006) eine bedeutende Rolle der Wildvögel bei der Verschleppung der Influenzaviren (auch HPAI H5N1) während der Zugzeiten innerhalb der verschiedenen asiatischen Ländern, nach Europa und Afrika.

Möglicherweise kann, wie Arbeiten von MUZAFFAR et al. (2006) und WERNER (2006) zeigen, auch Wirtschaftsgeflügel in Auslaufhaltung für eine aviäre Influenza-Übertragung bzw. HPAI H5N1-Weiterverbreitung auf Wildvögel verantwortlich sein. Molekular-epidemiologische Analysen des HA-Gens von H7-Subtypen (n=414) stellten eine unabhängige Entwicklung aviärer Viren sowohl bei Wildvögeln als auch beim Hausgeflügel dar (LEBARBENCHON und STALLKNECHT 2011). Auf ein interessantes Phänomen wiesen SMITH et al. (2011) hin, nämlich dass bei einem in Hong Kong im Jahr 2007 tot aufgefundenen Wildvogel ein Vertreter der beim kommerziellen Geflügel im südasiatischen Raum etablierten Subclade 2.3.4 (von 2005 bis 2007) nachweisbar war. Dennoch bleiben die Fragestellungen bezüglich der AIV-Übertragung vom Geflügel auf Wildvögel offen.

Eine weitere wichtige Frage, die sich immer wieder im Bereich aviärer Influenzavirus-Evolution stellt, ist, ob aviäre Influenza sich an den Wirt anpassen kann und nach der Virus-Adaptation eine sogenannte evolutionäre Stasis vorliegt, oder ob sie sich fortlaufend weiterentwickelt. Rekombination ist die Grundlage für die Entstehung genetischer Vielfalt und eine Basis des positiven Selektionsdrucks der Virusevolution (SHIH et al. 2007). Dies bedeutet, dass Influenzaviren sich durch genetische Zufallsdrift ständig verändern und sich mit geänderten Eigenschaften (Virulenz, Pathogenität) bestmöglich an ihre Wirte anpassen. Dagegen passen sich bei sogenanntem negativem Selektionsdruck die Viren optimal an Vögel an und verändern sich infolge eines evolutionären „Druckes“ auf Konserviertheit in dem Wirtspool nicht kontinuierlich (WEBSTER et al. 1992). Die Ergebnisse unserer Studie stützen die These einer kontinuierlichen Influenza-A-Virus-Genomveränderung, da die multiplen belegten Genotypen Bavaria 1 - 4, die innerhalb der Jahre 2006 und 2007 nachgewiesen wurden, eine stetige Veränderung der Viren anzeigen. Ferner

bestätigen auch Studienergebnisse von LVOV et al. (2008) und SHARSHOV et al. (2010) diese Annahme, da die in Russland in dem Jahr en 2006 identifizierten HPAI H5N1-Viren zum Subclade 2.2 gehörten, während Viren aus dem Jahr 2008 sich in den Subclade 2.3.2 gruppierten. Außerdem zeigten USUI et al. (2009) eine große Sequenzähnlichkeit aus dem Jahr 2008 von einem Singschwan isoliertes japanischen HPAI H5N1-Stämmes mit einem russischen Isolat vom Hausgeflügel vom April 2008 und mit Isolaten von Wildvögeln aus Hong-Kong 2007 / 2008, die sich in den Subcladen 2.3.2 und 2.3.4 einordnen ließen. Interessanterweise wiesen HU et al. (2011) darauf hin, dass von Wildvögeln isolierten HPAI H5N1-Viren (Subclade 2.3.2) nah verwandt mit den H5N1-Viren von der Nähe des Qinghai See stammenden schwarzlippigen Pfeifhasen (*Ochotona curzoniae*) waren. Ungeachtet dieses H5N1-Vorkommens bekräftigen diese Autoren die These des AIV-Genomaustauschs innerhalb des eurasischen Kontinents.

Es wird angenommen, dass aviäre Influenza ursprünglich eine Viruskrankheit der Vögel war (WEBSTER et al. 1993). Erst im Laufe der Evolution fand eine Übertragung bestimmter Subtypen (z. B. H1N1, H2N2 und H3N2) auf andere Spezies statt. Die Annahme des kontinuierlichen Influenza-A-Virus-Genomaustausches führt zu der wichtigen Frage, ob die hoch pathogenen Viren auf Menschen übertragbar sind. In der Tat ließen sich erste humane Infektionen mit HPAI H5N1 in Hong-Kong 1997 nachweisen (WEBSTER 1998). Seit Mitte 2003 bis zum 19.08.2011 konnten weltweit 565 bestätigte Fälle von menschlicher H5N1-Infektion registriert werden (WHO 2011c). Dabei handelt es sich nach bisherigem Wissensstand um eine sehr seltene menschliche Infektion, allerdings ist der Verlauf mit einer relativ hohen Letalitätsrate von 58 % (331 von 565) schwerwiegend, wobei als ein signifikanter Risikofaktor für die Infektion der direkte Kontakt mit infiziertem Geflügel und dessen Ausscheidungen (Kot, Sekrete) aufgeführt werden kann (WHO 2011d). Die Studienergebnisse von SUAREZ et al. (1998) bestätigen diese Auffassung, da eine Übereinstimmung der Sequenzen von HPAI H5N1-Isolaten aus Mensch (HK/156) und Geflügel (Hühner (CK/HK/220)) von mehr als 99 % in Hong-Kong im Jahre 1997 feststellbar waren.

Theoretisch könnte im Zuge der Mutationen ein neues H5N1- oder H7N1-Virus entstehen, das sich schnell an menschliche Populationen anpasst und effektiv

weltweit verbreitet wird. Interessant dagegen ist die Tatsache, dass bis zum heutigen Tage nur sehr vereinzelt, wenn überhaupt, Übertragungen von Mensch zu Mensch beobachtet wurden. SCHMOLKE et al. (2011) vermuten, dass diese schlechte Übertragbarkeit von Mensch zu Mensch besonders durch Eigenschaften des Gens PB1-F2 bedingt ist. Möglicherweise steigt jedoch auf Grund zunehmender Infektionen beim Menschen die Wahrscheinlichkeit einer direkten Ansteckung von Mensch zu Mensch mit H5N1-Viren und des damit zusammenhängenden Pandemie-Risikos bei gleichbleibend hoher Letalität.

6.3 NPAI H5-Subkomponente (N1 negativ)

In der vorliegenden Surveillance-Studie waren ebenso NPAIV mit der Subkomponente H5 einbezogen, da diesem Subtyp wegen der internationalen Meldepflicht des Vorkommens bei Wirtschaftsgeflügel besondere Bedeutung zukommt. Die Annahme, dass sich NPAIV H5, wie auch H7, nach Einschleppung in Wirtschaftsgeflügelbestände in HPAIV umwandeln können, ist allgemein anerkannt. In dieser Arbeit durchgeführte molekular-epidemiologische Analysen basierend auf den HA-Genen zeigten, dass die bayerischen NPAI H5-Viren sich zur eurasischen Linie zuordnen ließen, und nicht zur amerikanischen Linie, die Influenzaviren aus Nord- und Südamerika enthält (Abb. 9 (S. 106)). Umfassende Ergebnisse mehrerer Studien bestätigen diese verschiedenen phylogenetischen Linien (RÖHM et al. 1995, DUAN et al. 2007).

Im Mittelpunkt unserer Arbeit stand zudem die Fragestellung, ob ein NPAI-Reservoir der H5-Viren in Bayern vorhanden ist. Die vorliegenden Untersuchungsergebnisse der bayerischen NPAI H5-Viren weisen auf eine stark ausgeprägte Heterogenität hin, also auf einen verschiedenartigen Ursprung und die Existenz von drei getrennten NPAI-H5-Linien in diesem Bundesland.

Bei der phylogenetischen Analyse der bayerischen Viren aus den Jahren 2006 und 2007 konnten drei NPAI-H5-Linien belegt werden. Die erste genetische Linie bildeten NPAI-H5-Viren (N?- , N2- und N3-Subkomponenten) mit hoher Similarität zu H5-Sequenzen aus Europa (Abb. 2 A, Abschnitt 5 (S. 70)). Die enge Verwandtschaft des Virus A/mallard/Bavaria/1/2005 (H5N2) zu H5-Sequenzen von Wildvögeln aus

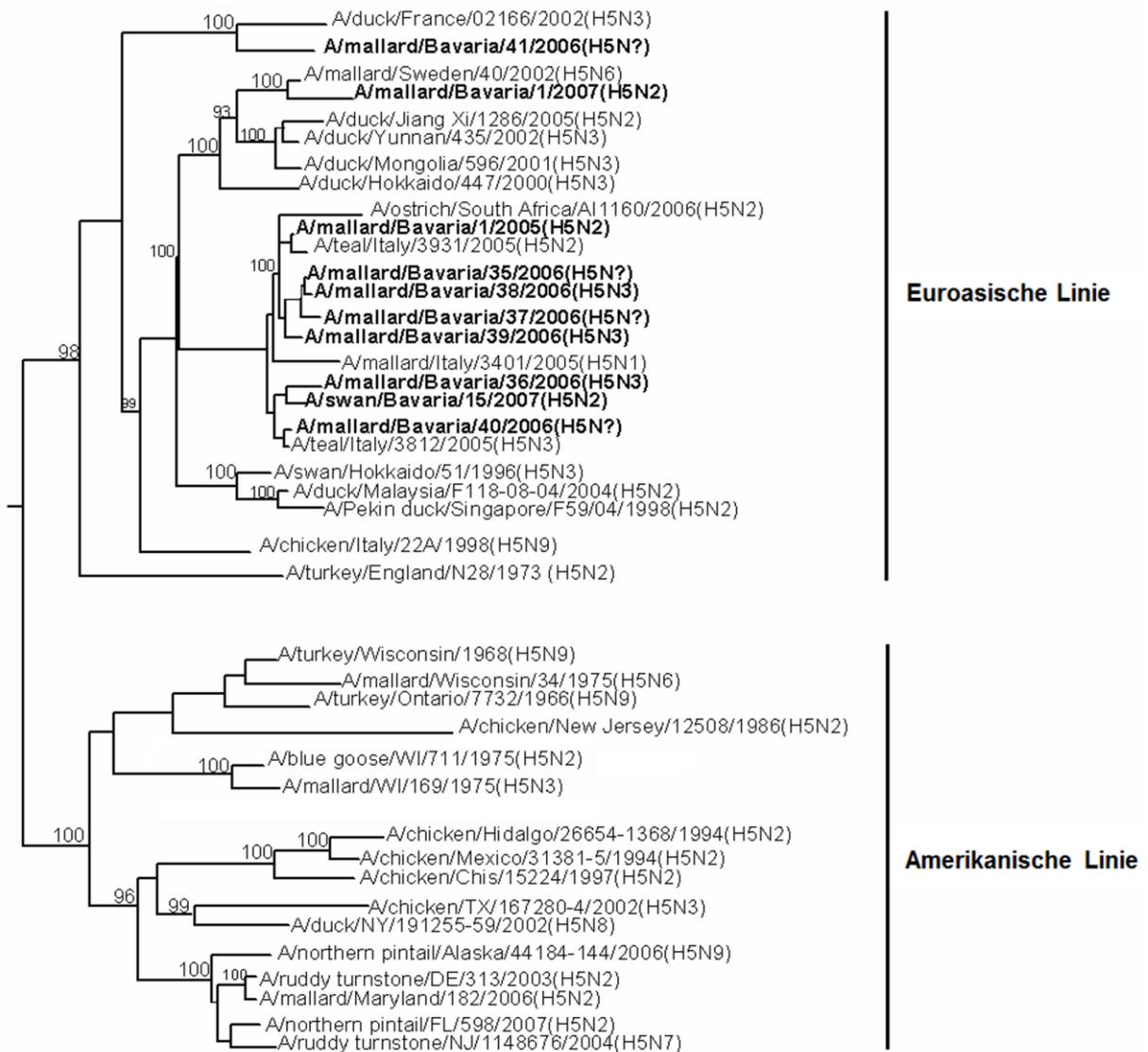


Abb. 9: Phylogenetische Analyse des H5-Gens der NPAI-Viren aus Euroasien, Nord- und Südamerika

Nukleotidpositionen der H5-Sequenzen von 93 bis 1677 waren einbezogen. Die Bootstrap-Werte sind in Prozent für die Hauptknotenpunkte angegeben. Die bayerischen Stämme sind fett gedruckt. H5=Hämagglutinin-Subtyp 5, NPAI=Niedrig pathogene aviäre Influenza

Italien wurde gleichfalls in anderen Studien dargestellt (TERREGINO et al. 2007, GAIDET et al. 2008). Zur zweiten genetischen NPAI-H5-Linie gehörte das Influenzavirus A/mallard/Bavaria/1/2007 (H5N2) (Abb. 2A (S. 70)), welches eine große Ähnlichkeit sowohl zur H5-Sequenz eines Virus aus Schweden von 2002 als auch zu Isolaten aus Frankreich, Italien, Japan, Malaysia, der Mongolei, der Volksrepublik China und Russland besaß. Der dritten genetischen NPAI-H5-Linie ließ sich ein H5-Virus mit unbestimmtem NA-Subtyp zuordnen, das eng verwandt war mit A/duck/France/02166/2002 (H5N3). Ebenfalls gruppierte sich diese genetische Linie mit Viren aus europäischen Ländern (Abb. 2A, Publikation II).

Basierend auf der molekular-epidemiologischen Analyse ließen sich die bayerischen NPAI-H5-Viren zu unterschiedlichen H5-Linien nach DUAN et al. (2007) zuordnen (ausführlich beschrieben im Abschnitt 2.3.2 (S. 42 f.)). Die erste genetische NPAI-H5-Linie dieser Arbeit gruppierte sich in die Gruppe 2 nach DUAN et al. (2007), die einen westeuropäischen Genpool repräsentiert. Folglich könnte ein AIV-Genomaustausch innerhalb dieses Pools während der Vogelzugzeiten über kurze Distanzen innerhalb von Europa in den Jahren 2006 und 2007 oder früher stattgefunden haben. Das repräsentative Influenzavirus der zweiten genetischen NPAI-H5-Linie A/mallard/Bavaria/1/2007 (H5N2) ließ sich in die Gruppe 1, der sogenannten „contemporary“ H5-Linie nach DUAN et al. (2007) einordnen. Diese Daten zeigen deutlich einen Genomaustausch zwischen Viren innerhalb Europas und Asiens, welcher vermutlich auf ziehende Wildvogelarten aus Asien zurückzuführen ist. Ein interessantes Ergebnis bezüglich des Virus A/mallard/Bavaria/41/2006, der dritten in dieser Arbeit beschriebenen genetischen NPAI-H5-Linie ist, dass dieses Virus zur „early“ Linie nach DUAN et al. (2007) gehörte. Daraus könnte man die Schlussfolgerung ziehen, dass diese Linie unter Umständen seit mehreren Jahren als ein NPAI-H5-Pool in Bayern existiert und zur genetischen Vielfalt der H5-Viren beiträgt.

Die Untersuchungen der Aminosäuresequenzen des Hämagglutinins der bayerischen NPAI-H5-Viren ergaben mehrere Unterschiede. So grenzten sich die Stämme aus den Jahren 2006 und 2007 A/mallard/Bavaria/36 (H5N3), A/mallard/Bavaria/41(H5N?) bzw. A/mallard/Bavaria/16 (H5N2) in drei Aminosäuren von den restlichen niedrig virulenten H5-Viren ab (Tab. 3 (S. 69)). Es ist bemerkenswert, dass die Aminosäuren der Viren A/mallard/Bavaria/36/2006 und A/mallard/Bavaria/1/2007

in zwei Positionen (113, 228) bzw. in einer Position (113) identisch mit den bayerischen HPAI H5N1-Inflenzaviren waren (Tab. 3, Abschnitt 5). Diese Aminosäurepositionen der HPAI-Viren (113, 228) wurden in der Arbeit von HULSE et al. (2004) bei den NPAI-H5-Viren nicht beobachtet oder beurteilt. Ob diese Positionen eine bestimmte Rolle bei der Virulenz der NPAI-Viren spielen könnten, ist unklar.

Die Analyse der Spaltstellen der NPAI-H5-Viren aus Bayern ergab eine geringe Heterogenität der Aminosäuresequenz, da überwiegend die Schnittstelle =PQRETR*GLF und nur bei einem Virus =PKRETR*GLF festzustellen war (Tab. 3 (S. 69)). Ob dieser einzige Aminosäureunterschied Lysin (K) an Position 2 nach dem initialen Prolin (P) eine bestimmte Funktion bei der Virulenz ausüben könnte, ist noch nicht bekannt. Um die Auswirkung dieser Punktmutation auf die Virusvirulenz identifizieren zu können, sind weitere Untersuchungen notwendig.

Wie in der Abbildung 2A deutlich zu sehen ist (s. Abschnitt 5 (S. 70)), bildeten die NPAI-H5-Viren unterschiedliche Cluster, und waren weit entfernt von HPAI H5N1-Viren. Überdies unterstreicht dies eindeutig die Vermutung, dass in Bayern in den Jahren 2006 und 2007 kein Reassortment zwischen NPAI- und HPAI-Viren stattfand. Eine große Vielfalt der NPAI-H5-Viren wurde auch in der Surveillance-Studie von BRIAND et al. (2010) für Frankreich festgestellt, indem zehn untersuchte H5-Stämme mit den Subkomponenten N1, N2 und N3 (2002-2008) ein Reassortmentereignis zeigten und sich aber auch zur eurasischen Linie gruppieren. Die Herkunft dieses Reassortments der in Frankreich isolierten Inflenzaviren (mindestens zwei unterschiedliche H5-Linien) ist dennoch bislang unklar (BRIAND et al. 2010).

Zusammenfassend stellen die drei bayerischen NPAI-H5-Linien die genetische Diversität der eurasisch-afrikanischen Inflenzaviren dar. Die nachgewiesenen deutlichen Unterschiede nicht nur auf Nukleotidebene, sondern auch auf Aminosäureebene von H5-Viren bei Wildvögeln stützen nicht das Konzept einer evolutionären Stasis der niedrig pathogenen Influenza A Viren. In dieser Arbeit erhobene Daten und vorgeschlagene Hypothese verleihen der Annahmen weiteres Gewicht, dass aviäre Inflenzaviren sich kontinuierlich verändern und weiterentwickeln. Gegen die Existenz einer evolutionären Stasis sprechen ebenfalls Nachweise von ausgeprägten H5-Sequenzvariationen der Inflenzaviren bei nordamerikanischen Wasservögeln (GARCIA et al. 1997).

6.4 NPAI N1-Viren (H5 negativ)

Die NA-Gene der bayerischen NPAI-N1-Sequenzen bildeten eine Gruppe mit den Viren aus Eurasien und grenzten sich bei phylogenetischen Analysen von der amerikanischen Linie ab (Abb. 10).

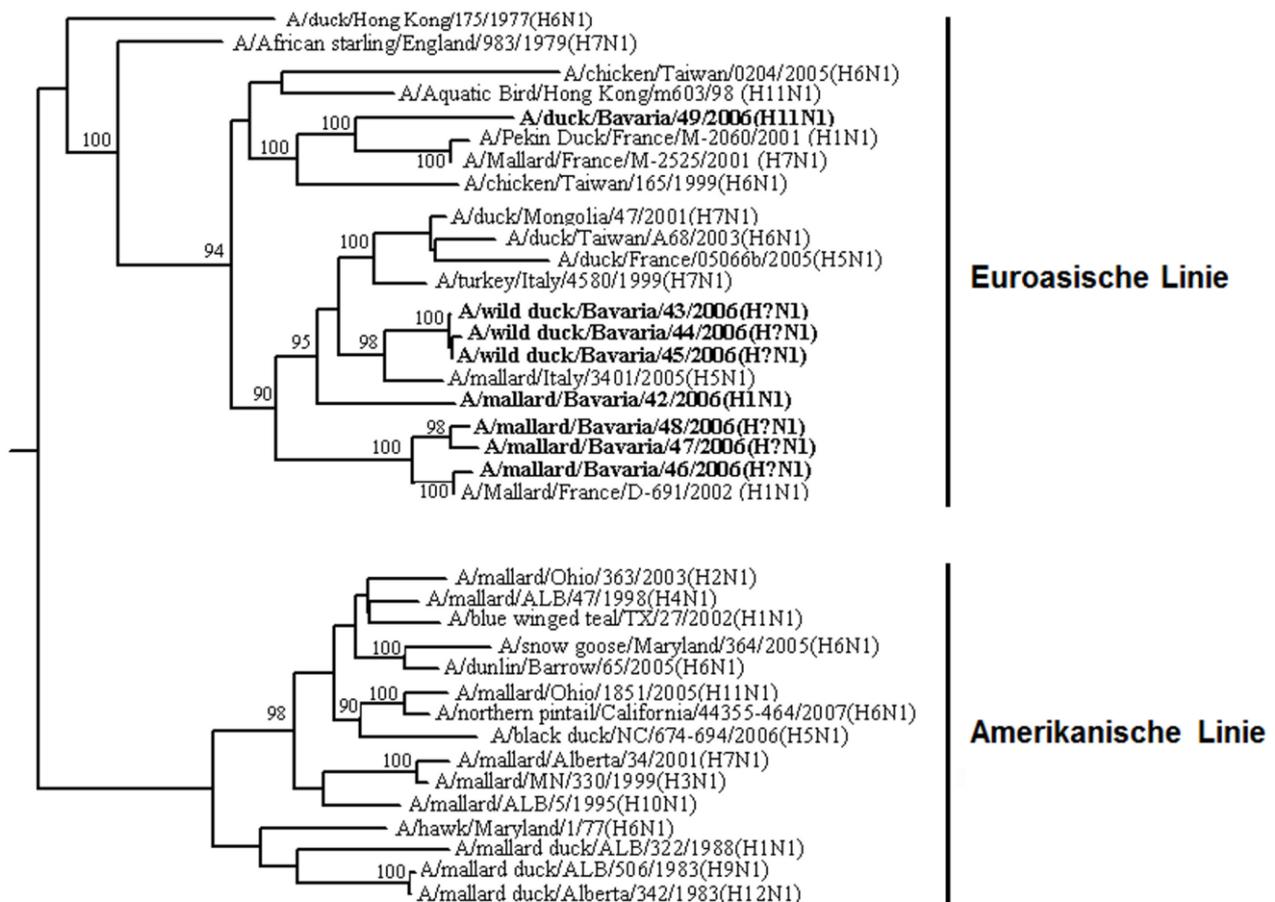


Abb. 10: Phylogenie des N1-Genoms der NPAI-Viren aus Europa, Asien, Nordamerika

Nukleotidpositionen der N1-Gens sind 57-1448.

Die Bootstrap-Werte sind in Prozent für die Hauptknotenpunkte angegeben.

Die bayerischen Stämme sind fett gedruckt.

N1=Neuraminidase-Subtyp 1, NPAI=Niedrig pathogene aviäre Influenza

Ein weiterer Schwerpunkt unserer Studie war zu erforschen, ob ein NPAI N1-Reservoir bei Wildvögeln in Bayern existiert und ob bei NPAIV auch N1 aus den HPAIV H5N1 vorkommt. Molekular-epidemiologische Untersuchungen von Wildvögeln aus dem Jahr 2006 wiesen auf einen heterogenen Ursprung der N1-Gene und die Existenz mehrerer genetischer Linien in Bayern hin.

Drei Influenzaviren der Subtypen H1N1 und ein Virus mit unbestimmten HA-Gen (H?) aber mit identifizierten N1-Subtyp bildeten die erste genetische NPAI-N1-Linie, die eine Verwandtschaft zu Sequenzen aus Italien, Frankreich, Taiwan und der Mongolei zeigte (Abb. 2B, Abschnitt 5 (S. 72)). Die zweite genetische Linie mit dem Virus Bavaria/42 (H1N1) positionierte sich in einem Stammbaum nahe der ersten Linie, war aber die eindeutig unterschiedlich von diesem Cluster (Abb. 2B). Drei NPAI-N1-Influenzaviren mit unbestimmten HA-Subtyp ließen sich in die dritte genetische Linie mit Verwandtschaft zu Sequenzen aus Frankreich einordnen (Abb. 2B (S. 72)). Weitere phylogenetische Analysen des bayerischen N1-Gens des Subtyps H1N1, der aus Hausenten isoliert wurde, ergaben nur eine entfernte Verwandtschaft mit den N1-Sequenzen der Wildvögel aus Frankreich und aus Taiwan (Abb. 2B, s. Publikation II). Wie in dieser Abbildung offensichtlich zu sehen ist, gruppieren sich die Sequenzen der NPAI-N1-Subtypen in unterschiedlichen Clustern, deutlich abgegrenzt vom N1-Gen der HPAI H5N1. Dies weist darauf hin, dass in den Jahren 2006 und 2007 kein Genomaustausch zwischen bayerischen niedrig und hoch virulenten aviären Influenzaviren stattfand. Zusätzlich zeigten die NPAI-N1-Viren (H5 negativ) keine Deletion in der NA-Stammregion, die für die aktuellen asiatischen HPAI-H5N1 charakteristisch ist.

Erklärungsansätze für diese Ergebnisse finden sich in der Tatsache, dass ein NPAI N1-Reservoir bei Wildvögeln in Bayern existiert. Außerdem bekräftigen multiple genetische NPAI-N1-Linien eine fortlaufende Entwicklung aviärer Influenzaviren bei wild lebenden Wasservögeln in diesem Bundesland. Die Befunde der vorliegenden Arbeit heben die Wichtigkeit der Durchführung der Influenza-A-Virus-Überwachungsstudien bei Wildvögeln in Bayern hervor, da nur so neue Erkenntnisse über die Übertragungswege und Weiterverbreitung der aviären Influenza gewonnen werden können.

7 AUSBLICK

Die erhobenen Daten und vorgeschlagenen Hypothesen unserer Studie sowie die Ergebnisse mehrerer molekular-epidemiologischer Arbeiten, die weltweit durchgeführt wurden, stützen die Annahme eines positiven Selektionsdrucks bei Influenza-A-Viren und eines kontinuierlichen Genomaustausches aviärer Influenzaviren innerhalb des eurasischen Kontinents.

Im Hinblick auf das Influenza-A-Vorkommen bei Wildvögeln konnten Hinweise auf die Herkunft des AI-Virus gewonnen werden, die die Vermutung erlauben, dass eine HPAI-H5N1-Virus-Verbreitung in den Jahren 2006 und 2007 über den Vogelzug vermutlich aus Südostasien nach West Afrika, die europäischen Länder, in die Schweiz, die Tschechische Republik und das Königreich Saudi-Arabien sowie auch nach Bayern stattfand (DUCATEZ et al. 2006 und 2007, RINDER et al. 2007, SALZBERG et al. 2007, LE GALL-RECUÉ et al. 2008, KISS et al. 2008, MONNE et al. 2008, STARICK et al. 2008, NAGY et al. 2009, SZELECZKY et al. 2009, FINK et al. 2010, FUSARO et al. 2010, SMIETANKA et al. 2010).

Im Gegensatz zur Situation bei HPAI-H5N1-Viren belegten phylogenetische Analysen von Genabschnitten niedrig virulenter Influenzaviren die Existenz eines Reservoirs von Viren mit H5- und N1-Subkomponenten (in Kombination mit anderen NA- bzw. HA-Komponenten) in Bayern. Die oben genannten Daten heben die Wichtigkeit der Durchführung von Influenza-A-Virus-Surveillance bei Wildvögeln und beim Wirtschaftsgeflügel hervor, auf deren Basis neue Erkenntnisse über die weltweiten Übertragungswege der aviären Influenzaviren gewonnen und durch präventive Maßnahmen die Influenza-A-Virus-Weiterverbreitung verhindert werden können.

Wie die Befunde von O.I.E., WHO und FLI präsentieren, perpetuieren hoch pathogene Viren des Subtyps H5N1 desgleichen bei anscheinend gesunden Wasservögeln (O.I.E. 2008a, FLI 2009, Savić et al. 2010). Damit könnten die Wildvögel als subklinisch infizierte Carrier und somit als Langzeitvektoren bei der aviären Influenzavirus-Ausbreitung über kurze oder weite Distanzen in Fragen kommen. Um diese Mechanismen der Virus-Ausbreitung über Wildvögel zu erforschen, ist eine kontinuierliche Durchführung der Wildvogelüberwachungsstudien

(Lebend- und Totfundmonitoring) von großer Bedeutung. Dessen ungeachtet sollten in diesen Studien gleichfalls bisher seltener untersuchte Vogelarten einbezogen werden, da die Prävalenz bei diesen Tieren unbekannt ist und möglicherweise unterschätzt wird.

Ein Überwachungsprogramm von kommerziell gehaltenem Geflügel zielt darauf ab, durch regelmäßige Untersuchungen frühzeitig das Auftreten nicht nur von HPAIV, sondern auch von NPNAIV-H5-H7-Subtypen zu erkennen und zu bekämpfen, da diese das Potenzial der Entstehung von novo-Mutanten der hochvirulenten Viren in sich bergen. Darüber hinaus wäre die Durchführung experimenteller Studien von großer Relevanz, in denen diverse Virusübertragungswege (von Wildvögeln auf das Hausgeflügel und vom Geflügel auf Wildvögel) unter feldähnlichen Bedingungen (z. B. unter Beteiligung von verschiedenen Varianten von Sekundärinfektionen) oder im Feld untersucht werden.

Neben der Ein- und Verschleppung aviärer Influenzaviren durch infizierte Wildvögel ist ebenfalls über die Infektionsausbreitung durch den Handel zu diskutieren. In diesem Fall stellt das infizierte Geflügel selbst das Mittel der Virusweiterverbreitung dar, insbesondere wenn sich HPAI-Virus infizierte Vögel in der Inkubationsphase befinden oder wenn die entsprechend gehandelten Tiere mit NPNAIV infiziert sind und keine offensichtlichen Krankheitssymptome vorweisen (beispielsweise Entenarten). Die Influenzavirusinfektion kann auf diese Weise effizient durch den legalen oder illegalen Import lebenden Federviehs oder dessen Produkte in andere Länder verbreitet werden (HARDER et al. 2009).

8 ZUSAMMENFASSUNG

Seit 2002 wird die aktuelle HPAI H5N1-Epizootie in Asien, Europa und Afrika beobachtet. Das Ziel dieser Arbeit war, durch repräsentative Stichproben von verschiedenen Wildvogelarten einen umfassenden Überblick zur Prävalenz und zum Ursprung von Influenzaviren der Subtypen H5, H7 und N1 in Bayern in den Jahren 2006 und 2007 zu gewinnen. Ferner stand die Frage nach der Existenz sowohl eines HPAI H5N1-Pools als auch eines NPAI-Reservoirs der H5- und N1-Subkomponente (nie in Kombination miteinander) in Bayern im Mittelpunkt dieser Studie.

12.930 Rachen- und Kloakentupfer sowie Gewebeprobe von verschiedenen Wasservogelarten wurden zwischen Januar 2006 und Dezember 2007 in Bayern analysiert. Im dargestellten Zeitraum erfolgte die Detektion vom Matrixproteingen des Influenza A Virus mittels RT-rPCR in 291 (2,3 %) Proben. Weiterhin waren die kodierenden Regionen für die Hämagglutinin-Komponente H5 und die N1-Subkomponente in 35 (0,3 %) gesunden Vögeln identifizierbar, während HPAI H5N1 Virusgenome (0,7 % (n = 93)) lediglich von toten Wildvögeln aus diesem Bundesland stammten. Aviäre Influenzaviren konnten in beiden Jahren bei mindestens 16 Wildvogelarten festgestellt werden. Überraschenderweise ergaben sich keine H7-Subtyp-Nachweise bei wild lebenden Vögeln in diesen beiden Jahren in Bayern. Trotz dieses Befundes kann man jedoch das Vorkommen des Subtyps H7 nicht ausschließen, da dieser in Bayern sporadisch vorhanden sein könnte, bzw. jederzeit eingeschleppt werden kann.

In dieser Studie wurden in den Jahren 2006 und 2007 multiple Einträge von HPAI H5N1 anhand der nachgewiesenen Genotypen Bavaria 1, 2, 3 und 4 belegt. Diese Befunde sprechen gegen die Existenz eines H5N1-Reservoirs bei Wildvögeln in Bayern. Im Gegensatz hierzu zeigten phylogenetische Analysen die besondere Vielfalt und die Existenz multipler genetischer Linien von H5- und N1-NPAI-Viren (nie in Kombination miteinander) auf. Dies deutet auf die Präsenz verschiedener NPAI-H5- und N1-Genpools hin, die sich von bayerischen HPAI H5N1 abgrenzen. Des Weiteren wiesen HA-Aminosäureunterschiede der H5-NPAI-Viren (N1 negativ) der westeuropäischen genetischen Linie auf eine fortlaufende Entwicklung der NPAI-Viren bei Wildvögeln in Bayern hin.

Zusammenfassend wiesen die erhobenen Daten und Annahmen der vorliegenden Arbeit auf ein Vorkommen von H5- und N1-Subkomponenten von hoch- und niedrig pathogenen Influenza-A-Viren mit potentieller veterinärmedizinischer Bedeutung bei Wildvögeln hin. Diese Erkenntnisse belegen explizit die Wichtigkeit und die Notwendigkeit eines kontinuierlichen, flächendeckenden Überwachungsprogramms der aviären Influenzaviren (HPAI- und NPAI) bei Wildvögeln und beim Wirtschaftsgeflügel (insbesondere Wasservögel).

9 SUMMARY

Since 2002, ongoing epizootic diseases caused by HPAI H5N1 viruses have been observed in Asia, Europe and Africa. The aim of this work was to obtain a comprehensive overview of the prevalence and the origin of influenza A viruses based on the samples isolated from different wild bird species in Bavaria during 2006 and 2007. Further, the central question of this study was to analyze the presence of a HPAI H5N1 pool as well as of a LPAI reservoir of the sub-components H5 and N1 (never in combination with each other).

12930 tracheal, cloacal swabs and tissue samples from wildlive birds belonging to distinct water fowl species were screened between January 2006 and December 2007 in Bavaria. 291 (2.3%) influenza A virus positive samples based on matrix protein RTr-PCR were detected in this time frame. Furthermore, solitary H5 hemagglutinin or N1 neuraminidase encoding genes were identified in 35 (0.3%) apparently healthy birds; whereas HPAI H5N1 virus genomes were only diagnosed in dead wild birds ($n = 93$; 0.7%) found across Bavaria. At least 16 different bird species were affected with avian influenza viruses during both years. Interestingly, the subtype H7 was not observed in wild fowls in either year. However, the occurrence of the subtype H7 can not be excluded in Bavaria because it might be sporadically present in this federal state.

In this study, multiple import events for H5N1 viruses were confirmed on the basis of proven genotypes Bavaria 1, 2, 3 and 4 during the years 2006 and 2007. Additionally, our findings argue against an existing HPAI H5N1 reservoir in aquatic birds in Bavaria. In contrast, phylogenetic analyses of LPAI H5 and N1 sequences (never in combination with each other) revealed a marked diversity and multiple genetic lineages. This indicates the existence of different LPAI gene pools which also separated from the Bavarian HPAI H5N1. Moreover, the hemagglutinin amino acid differences between LPAI H5 viruses of a western European genotypic lineage observed in wild birds suggest a continuous evolution of LPAI viruses in Bavaria.

Taken together, the outcome and the hypothesis of the present work revealed the potential role of the high and low pathogenic sub-components H5 and N1 in veterinary medical field. These results emphasize explicitly the importance and the necessity of an active surveillance program of avian influenza viruses (HPAI and LPAI) in wild bird and domestic poultry.

10 LITERATURVERZEICHNIS

1. **Abolnik C. (2007):** Molecular characterization of H5N2 Avian Influenza Viruses isolated from South African Ostriches in 2006. *Avian Dis.* 51, 873-879
2. **Abolnik C., G.H. Gerdes, M. Sinclair, B.W. Ganzevoort, J.P. Kitching, C.E. Burger, M. Romito, M. Dreyer, S. Swanepoel, G.S. Cumming, A. Olivier (2010):** Phylogenetic analysis of influenza A viruses (H6N8, H1N8, H4N2, H9N2, H10N7) isolated from wild birds, ducks, and ostriches in South Africa from 2007 to 2009. *Avian Dis.* 54, 313-322
3. **Alexander, D.J. (2000):** A review of avian influenza in different bird species. *Vet. Microbiol.* 74, 3-13
4. **Anon (1980):** A revision of the system of nomenclature for influenza viruses: A WHO Memorandum. *Bulletin of the World Health Organization* 58, 585-591
5. **Anonym (1968):** New pandemic of Influenza. *JAMA*, 206, 2533
6. **Bankowski, R. A. (1982):** Introduction and objectives of the symposium. In: *Proc. 1st Int. Symp. Avian Influenza 1981, Richmond USA, Carter Comp. Corp., VII-XII*
7. **Bancroft, C.T. und T.G. Parslow (2002):** Evidence for segment-nonspecific packaging of the influenza a virus genome. *J. Virol.* 76, 7133-7139
8. **Becker, W.B. (1966):** The isolation and classification of tern virus: Influenza virus A/Tern/South Africa/1961. *J. Hyg. Camb.* 64, 309-320
9. **Becker, W.B. (1967):** Experimental infection of common terns with Tern virus: influenza virus A-Tern-South Africa-1961. *J. Hyg. Camb.* 65, 61-65
10. **Bender, A., M. Albert, A. Reddy, M. Feldman, B. Sauter, G. Kaplan, W. Hellman, N. Bhardwaj (1998):** The distinctive features of influenza virus infection of dendritic cells. *Immunobiol.* 198, 552-567

- 11. Berliner Medizinische Gesellschaft (1958):** Verhandlungsbericht der Berliner Medizinischer Gesellschaft vom 11. Dezember 1957. Deut. Med. Wochenschr. 83, 1375-1376
- 12. Blaas, D., E. Patzelt und E. Kuechler (1982):** Identification of the cap binding protein of influenza virus. Nucleic Acids Res. 10, 4803–4812
- 13. Bowes, V.A., S.J. Ritchie, S. Byrne, K. Sojonky, J.J. Bidulka, J. H. Robinson. (2004):** Virus characterization, clinical presentation, and pathology associated with H7N3 avian influenza in British Columbia Broiler Breeder Chickens in 2004. Avian Dis. 48, 928-934
- 14. Bragstad K., P.H. Jørgensen, K. Handberg, A.S. Hammer, S. Kabell, A. Fomsgaard (2007):** First introduction of highly pathogenic H5N1 avian influenza A viruses in wild and domestic birds in Denmark, Northern Europe. Virol. J. 11, 43
- 15. Breed, A.C., K. Harris, U. Hesterberg, G. Gould, B.Z. Londt, I.H. Brown, A.J.C. Cook (2010):** Surveillance for avian influenza in wild birds in the European Union in 2007. Avian Dis. 54, 399-404
- 16. Briand, F.X., G. Le Gall-Reculé, C. Guillou-Cloarec, K. Ogor, V. Jestin (2010):** Phylogeny and genotyping of recent avian low pathogenic H5 subtype influenza viruses from French ducks. J. Gen. Virol. 91, 960-970
- 17. Brown, J.D., D.E. Swayne, R.J. Cooper, R.E. Burns, D.E. Stallknecht (2007):** Persistence of H5 and H7 avian influenza viruses in water. Avian Dis. 51, 285-289
- 18. Brown, J.D., D.E. Stallknecht, D.E. Swayne (2008):** Experimental infection of swans and geese with highly pathogenic avian influenza virus (H5N1) of Asian lineage. Emerg. Infect. Dis. 14, 136-142
- 19. Brown, I.H. (2010):** Summary of avian influenza activity in Europe, Asia, and Africa, 2006-2009. Avian Dis. 54, 187-193

- 20. Büttner, M., K. Hoppenheidt, S. Sedlmaier (2008):** Aviäres Influenzavirus im Vogelkot und Feinstaub - Aerogene Übertragungsmöglichkeit? Schriftenreihe Umwelt Spezial des Bayerischen Landesamtes für Umwelt, ISBN 978-3-936385-36
- 21. Capua, I., F. Mutinelli, M.D. Pozza, I. Donatelli, S. Puzelli, F.M. Cancellotti (2002):** The 1999-2000 avian influenza (H7N1) epidemic in Italy: Veterinary and human health implication. *Acta Tropica* 83, 7-11
- 22. Cattoli, G., C. Terregino, V. Guberti, R. de Nardi, A. Drago, A. Salviato, S. Fassina, I. Capua (2007):** Influenza virus surveillance in wild birds in Italy: results of laboratory investigation in 2003-2005. *Avian Dis.* 51, 414-416
- 23. CDC (2009a):** Update novel influenza A (H1N1) virus infection – Mexico, March-May, 2009. *MMWR* 58, 585-589
Zugänglich unter (letzter Zugriff am 07.10.2011):
<http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5821a2.htm>
- 24. CDC (2009b):** Swine Influenza A (H1N1) infection in two children-Southern California, March-April 2009. *MMWR* 58, 400-402
Zugänglich unter (letzter Zugriff am 07.10.2011):
<http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm58d0421a1.htm>
- 25. CDC (2009c):** Outbreak of Swine-Origin Influenza A (H1N1) Virus Infection-Mexico, March-April 2009. *MMWR*, 58, 1-3
Zugänglich unter (letzter Zugriff am 07.10.2011):
<http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm58d0430a2.htm>
- 26. Cecchinato, M., C. Ceolin, L. Busani, M. Dalla Pozza, C. Terregino, A. Moreno, L. Bonfanti, S. Marangon (2010):** Low pathogenicity avian influenza in Italy during 2007 and 2008: epidemiology and control. *Avian Dis.* 54, 323-328

27. **Chen, W., P.A. Calvo, D. Malide, J. Gibbs, U. Schubert, I. Bacik, S. Basta, R. O'Neill, J. Schickli, P. Palese, P. Henklein, J.R. Bennink und J.W. Yewdell (2001):** A novel influenza A virus mitochondrial protein that induces cell death. *Nat. Med.* 7, 1306–1312
28. **Chen, H., G.J. Smith, S.Y. Zhang, K. Qin, J. Wang, K.S. Li, R.G. Webster, J.S.M. Peiris, Y. Guan (2005):** Avian flu: H5N1 virus outbreak in migratory waterfowl. *Nature* 436, 191-192
29. **Chen, H., Y. Li, Z. Li, J. Shi, K. Shinya, G. Deng, Q. Qi, G. Tian, S. Fan, H. Zhao, Y. Sun, Y. Kawaoka (2006a):** Properties and dissemination of H5N1 viruses isolated during an influenza outbreak in migratory waterfowl in western China. *J. Virol.* 80, 5976-5983
30. **Chen, H., G.J.D. Smith, K.S. Li, J. Wang, X.H. Fan, J.M. Rayner, D. Vijaykrishna, J.X. Zhang, L.J. Zhang, C.T. Guo, C.L. Cheung, K.M. Xu, L. Duan, K. Huang, K. Qin, Y.H.C. Leung, W.L. Wu, H.R. Lu, Y. Chen, N.S. Xia, T.S.P. Naipospos, K. Y. Yuen, S.S. Hassan, S. Bahri, T.D. Nguyen, R.G. Webster, J.S.M. Peiris, Y. Guan (2006b):** Establishment of multiple sublineages of H5N1 influenza virus in Asia: Implications for pandemic control. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 2845-2850
31. **Chen, H., R.A. Bright, K. Subbaro, C. Smith, N.J. Cox, J.M. Katz, Y. Matsuoka (2007):** Polygenetic virulence factors involved in pathogenesis of 1997 Hong Kong H5N1 influenza viruses in mice. *Virus Res.* 128, 159-163
32. **Cheng, M.C., M. S. Lee, Y. H. Ho, W. L. Chyi, C.H. Wang (2010):** Avian influenza monitoring in migrating birds in Taiwan during 1998-2007. *Avian Dis.* 54, 109-114
33. **Connor, R.J., Y. Kawaoka, R.G. Webster, J.C. Paulson (1994):** Receptor specificity in human, avian, and equine H2 and H3 influenza virus isolates. *Virol.* 205, 17-23

- 34. Defra (2009):** Low pathogenic avian influenza H5N1 in France.
Zugänglich unter (letzter Zugriff am 07.10.2011):
<http://www.defra.gov.uk/foodfarm/farmanimal/diseases/monitoring/documents/hpa-france.pdf>
- 35. De Marco, M. A., L. Campitelli, E. Foni, E. Raffini, G. Barigazzi, M. Delogu, V. Guberti, L. Di Trani, M. Tollis, 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. Microb.* 98, 197-208
- 36. De Marco, M.A., E. Foni, L. Campitelli, M. Delogu, E. Raffini, C. Chapponi, G. Barigazzi, P. Cordioli, L. Di Trani, I. Donatelli (2005):** Influenza virus circulation in wild aquatic birds in Italy during H5N2 and H7N1 poultry epidemic periods (1998 to 2000). *Avian Pathol.* 34, 480-485
- 37. Dembo, A., S. Karlin, O. Zeitouni (1994):** Limit distribution of maximal non-aligned two-sequence segmental score. *Ann. Prob.* 22, 2022-2039
- 38. Deliberto, T.J., S.R. Swafford, D.L. Nolte, K. Pedersen, M.W. Lutman, B. B. Schmit, J.A. Baroch, D.J. Kohler, A. Franklin (2009):** Surveillance for highly pathogenic avian influenza in wild birds in the USA. *Intergrative Zoology* 4, 426-439
- 39. Desvaux, S., S. Sorn, D. Holl, D. Chavernac, F. Goutard, J. Thonnat, V. Porphyre, C. Menard, E. Cardinale, F. Roger (2006):** HPAI surveillance programme in Cambodia: results and perspectives. *Dev. Biol.* 124, 211-224
- 40. Downie, J.C. und W.G. Laver (1973):** Isolation of type A influenza virus from an Australian pelagic birds. *Virology* 51, 259-269
- 41. Drake, J.W. (1993):** Rates of spontaneous mutation among RNA viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 4171-4175

42. Duan, L., L. Campitelli, X.H. Fan, Y.H. Leung, D. Vijaykrishna, J.X. Zhang, I. Donatelli, M. Delogu, K.S. Li, E. Foni, C. Chiapponi, W.L. Wu, H. Kai, R.G. Webster, K.F. Shortridge, J.S. Peiris, G.J. Smith, H. Chen, Y. Guan (2007): Characterization of low-pathogenic H5 subtype influenza viruses from Eurasia: implications for the origin of highly pathogenic H5N1 viruses. *J. Virol.* 81, 7529-7539
43. Ducatez, M.F., C.M. Olinger, A.A. Owoade, S. De Landtsheer, W. Ammerlaan, H.G. Niester, A.D. Osterhaus, R.A. Fouchier, C.P. Muller (2006): Avian flu: multiple introductions of H5N1 in Nigeria. *Nature* 442, 37
44. Ducatez, M.F., C.M. Olinger, A.A. Owoade, Z. Tarnagda, M.C. Tahita, A. Sow, S. de Landtsheer, W. Ammerlaan, A.D. Osterhaus, R.A. Fouchier, C.P. Muller (2007): Molecular and antigenic evolution and geographical spread of H5N1 highly pathogenic avian influenza viruses in western Africa. *J. Gen. Virol.* 88, 2297-2306
45. Dugan, V.G., R. Chen, D.J. Spiro, N. Sengamalay, J. Zaborsky, E. Ghedin, J. Nolting, D.E. Swayne, J.A. Runstadler, G.M. Happ, D.A. Senne, R. Wang, R.D. Slemons, E.C. Holmes, J.K. Taubenberger (2008): The evolutionary genetics and emergence of avian influenza viruses in wild birds. *PLoS Pathog.* 4, e1000076
46. Dusek R.J., J.B. Bortner, T.J. DeLiberto, J. Hoskins, J.C. Franson, B. D. Bales D. Yparraguirre, S.R. Swafford, H.S. Ip (2009): Surveillance for high pathogenicity avian influenza virus in wild birds in the Pacific Flyway of the United States, 2006-2007. *Avian Dis.* 53, 222-230
47. Easterday, B.C., D.O. Traniner, B. Tumova, H.G. Pereira (1968): Evidence of infection with influenza viruses in migratory waterfowl. *Nature* 219, 523-524
48. Eckert A. (1979): Charakterisierung eines Hämagglutinierenden Agens aus einem Erlenzeisig (*Carduelis Spinus*) – Beitrag zur Ätiologie einer Erkrankung von Sperlingsvögeln (*Passeriformes*). Dissertation, Veterinärschule, Hannover, Deutschland

- 49.Elbers, A.R., B. Kamps, G. Koch (2004):** Performance of gross lesions at postmortem for the detection of outbreaks during the avian influenza A virus(H7N7) epidemic in The Netherlands in 2003. Avian Pathol. 33, 418-422
- 50.Elly, S.S. (2007):** HPAI in Indonesia Presentation to Technical Workshop on highly pathogenic avian influenza and H5N1 human influenza Rome, June, 2007
Zugänglich unter (letzter Zugriff am 07.10.2010):
http://www.fao.org/avianflu/en/conferences/june2007/documents/Day_1/3-1-a_Indonesia_Dr_Elly_Sawitri.ppt
- 51.EC (2002):** Commission Decision 2002/649/EC of 5 August 2002 on the implemetation of surveys for avian influenza in poultry and wild birds in the Member States. OJEU L213, 2038
- 52.EC (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. Abl. EG 2006 Nr. L.10, 16
- 53.Fechter, P., L. Mingay, J. Sharps, A.Chambers, E. Fodor, G.G. Brownlee (2003):** Two aromatic residues in the PB2 subunit of influenza A RNA polymerase are crucial for cap binding. J. Biol. Chem. 278, 20381-20318
- 54.Fink, M., S.R. Fernandes, H. Schobesberger, J. Koefer (2010):** Geographical spread of hinghly pathogenic Avian Influenza Virus (HPAIV) H5N1 during the 2006 in Austria. J. Virol. 84, 5815-5823
- 55.FLI (2007):** Jahresbericht 2006. S. 34, 36.
Zugänglich unter (letzter Zugriff am 07.10.2011):
http://www.fli.bund.de/fileadmin/dam_uploads/Jahresberichte/2006/de/FLI-Jahresbericht_2006.pdf
- 56.FLI (2008a):** Jahresbericht 2007. S. 121.
Zugänglich unter (letzter Zugriff am 07.10.2011):
http://www.fli.bund.de/fileadmin/dam_uploads/Jahresberichte/2007/de/FLI-Jahresbericht_2006.pdf

- 57.FLI (2008b):** Epidemiologisches Bulletin. Nr. 4/2008. Lagebericht zur Aviären Influenza (Stand 22.10.08)
Zugänglich unter letzter Zugriff am 07.10.2011):
http://www.aufstallpflicht.de/081022_lb_influenza.pdf
- 58.FLI (2009):** Zur aviären Influenza. 11.03.2009: H5N1 bei einer Ente in Bayern (Stand am 11.03.2009)
Zugänglich unter (letzter Zugriff am 07.10.2011):
http://www.aufstallpflicht.de/090311_H5N1_Ente_Bayern.pdf
- 59.Flint, S.J., L. W. Ebquist, R.M. Krug, V.R. Racaniello, A.M. Skalka (2000):** Principles of Virology: Molecular Biology, Pathogenesis, & Control. Appendix: structure, genomic organization, & infectious cycles of selected animal viruses, American Society for Microbiology, Washington, DC. ASM Press, S. 759-761
- 60.Fouchier, R.A., B. Olsen, T.M. Bestebroer, S. Herfst, L., van der Kemp, G.F. Rimmelzwaan, A.D. Osterhaus (2003):** Influenza A virus surveillance in wild birds in Northern Europe in 1999 and 2000. Avian Dis. 47, 857-860
- 61.Fouchier, R. A., P. M. Schneeberger, F. W. Rozendaal, J. M. Broekman, S. A. Kemink, V. Munster, T. Kuiken, G. F. Rimmelzwaan, M. Schutten, G. J. van Doornum, G. Koch, A. Bosman, M. Koopmans, 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. USA 101, 1356-1361
- 62.Fouchier, R.A.M., V. Munster, A. Wallenstein, T.M. Bestebroer, S. Herfst, D. Smith, G.F. Rimmelzwaan, B. Olsen, A.D. Osterhaus (2005):** Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls. J. Virol. 79, 2814-2822
- 63.Fujimoto, Y., H. Ito, S. Shivatoki, J. Nakamori, R. Tsunekuni, K.Otsuki, T. Ito (2010):** Avian influenza virus and paramyxovirus isolation from migratory waterfowl and shorebirds in San-In district of Western Japan from 2001 and 2008. J. Vet. Med. Sci. 72, 963-967

- 64. Fusaro, A., M.I. Nelson, T. Joannis, L. Bertolotti, I. Monne, A. Salviato, O. Olaleye, I. Shittu, L. Sulaiman, L.H. Lombin, I. Capua, E.C. Holmes, G. Cattoli (2010):** Evolutionary Dynamics of multiple sublinages of H5N1 influenza viruses in Nigeria from 2006 to 2008. *J. Virol.* 84, 3239-3247
- 65. Gabriel, G., M. Abram, B. Keiner, R. Wagner, H.D. Klenk, J. Stech (2007):** Differential polymerase activity in avian and mammalian cells determines host range of influenza. *J. Virol.* 81, 9601-9604
- 66. Gabriel, G., A. Herwig, H. D. Klenk (2008):** Interaction of polymerase subunits PB2 and NP with importin alpha1 is a determinant of host range of influenza A virus. *PLoS Pathog* 4, e11
- 67. Gaidet, N., G. Cattoli, S. Hammoumi, S.H. Newman, W. Hagemeijer, J.Y. Takekawa, J. Cappelle, T. Dodman, T. Joannis, P. Gil, I. Monne, A. Fusaro, I. Capua, S. Manu, P. Micheloni, U. Ottosson, J.H. Mshelbwala, J. Lubroth, J. Domenech, F. Monicat (2008):** Evidence of infection by H5N2 highly pathogenic avian influenza viruses in healthy wild waterfowl. *PLoS Pathog.* 15, e1000127
- 68. Gambaryan, A.S., Yamnikova, D. Lvov, A. Tuzikov, A. Chinarev, G. Pazy-nina, R.G. Webster, M. Mastrovovich, N. Bovin (2005):** Receptor specificity of influenza viruses from birds and mammals: new data on involvement of the inner fragments of the carbohydrate chain. *Virol.* 334, 276-283
- 69. Gao, Q., E.W. Brydon, P. Palese (2008):** A seven-segmented influenza A virus expressing the influenza C virus glycoprotein HEF. *J. Virol.* 82, 6419-6426
- 70. Garamszegi, L.Z., A.P. Moller (2007):** Prevalence of avian influenza and host ecology. *Proc. Biol. Sci.* 274, 2003-2012
- 71. Garcia, M., J.M. Crawford, J.W. Latimer, M.V.Z.E. Rivera-Cruz, M.L. Perdue (1996):** Heterogeneity in the hemagglutinin gene and emergence of the highly pathogenic phenotype among recent H5N2 avian influenza viruses from Mexico. *J. Gen. Virol.* 77, 1493-1504

- 72. Garcia, M., D.L. Suarez, J.M. Crawford, J.W. Latimer, R.D. Slemons, D.E. Swayne, M.L. Perdue (1997):** Evolution of H5 subtype avian influenza A viruses in North America. *Virus Res.* 51, 115-124
- 73. Garten, R.J., C. T. Davis, C. A. Russell, B. Shu, S. Lindstrom, A. Balish, W.M. Sessions, X. Xu, E. Skepner, V. Deyde, M. Okomo-Adhiambo, L. Gubareva, J. Barnes, C.B. Smith, S.L. Emery, M.J. Hillman, P. Rivaller, J. Smagala, M. de Graaf, D.F. Burke, R.A.M. Fouchier, C. Pappas, C.M. Alpuche-Aranda, H. López-Gatell, H. Olivera, I. López, C.A. Myers, D. Faix, P.J. Blair, C. Yu, K.M. Keene, P.D. Dotson, Jr. D. Boxrud, A.R. Sambol, S.H. Abid, K.St. George, T. Bannerman, A.L. Moore, D.J. Stringer, P. Blevins, G.J. Demmler-Harrison, M. Ginsberg, P. Kriner, S. Waterman, S., Smole, H.F. Guevara, E.A. Belongia, P.A. Clark, S.T. Beatrice, R. Donis, J. Katz, L. Finelli, C.B. Bridges, M. Shaw, D.B. Jernigan, T.M. Uyeki, D.J. Smith, A.I. Klimov, N.J. Cox (2009):** Antigenic and genetic characteristics of swine-origin 2009 A (H1N1) influenza viruses circulating in humans. *Science* 325, 197-201
- 74. Gauthier-Clerc, M., C. Lebarbenchon, F. Thomas (2007):** Recent expansion of highly pathogenic avian influenza H5N1: a critical review. *IBIS* 149, 202-214
- 75. Gilbert, M., P. Chaitaweesub, T. Parakamawongsa, S. Premashthira, T. Tiensin, W. Kalpravidh, H. Wagner, J. Slingenbergh (2006a):** Free-grazing ducks and highly pathogenic avian influenza, Thailand. *Emerg. Infect. Dis.* 12, 227-234
- 76. Gilbert, M., X. Xiao, J. Domenech, J. Lubroth, V. Martin, J. Slingenbergh (2006b):** Anatidae migration in the western Palearctic and spread of highly pathogenic avian influenza H5N1 virus. *Emerg. Infect. Dis.* 12, 1650-1656
- 77. Globig, A., E. Starick, O. Werner (2004):** Untersuchungen von Wildvögeln auf aviäre Influenza- und Paramyxoviren. Referatesammlung 67. Fachgespräch der Fachgruppe Geflügelkrankheiten, 18/19 November, Hannover, S. 73-82

- 78. Globig, A., E. Starick, O. Werner (2006):** Influenza virus infections in migrating waterfowl: results of a two year study in Germany. Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr. 119, 132-139
- 79. Globig, A. (2007):** Untersuchungen zum Vorkommen von aviären Influenza- und aviären Paromyxoviren bei Wildvögeln in Deutschland. Dissertation, Tierärztliche Hochschule Hannover, S. 71, 76
- 80. Globig, A., C. Staubach, M. Beer, U. Köppen, W. Fiedler, M. Nieburg, H. Wilking, E. Starick, J. P. Teifke, O. Werner, F. Unger, C. Grund, C. Wolf, H. Roost, F. Feldhusen, F. J. Conraths, T. C. Mettenleiter, T. C. Harder (2009a):** 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
- 81. Globig, A., A. Baumer, S. Revilla-Fernandez, M. Beer, E. Wodak, M. Fink, N. Greber, T.C. Harder, H. Wilking, I. Brunhart, D. Matthes, U. Kraatz, P. Strunk, W. Fiedler, S.R. Fereidouni, C. Staubach, F.J. Conraths, C. Griot, T.C. Mettenleiter, K.D.C. Stark (2009b):** Ducks as sentinels for Avian Influenza in wild birds. Emerg. Infect. Dis. 15, 1633-1636
- 82. Gorman, O. T., W.J. Bean, Y. Kawaoka, , I. Donatelli, , Y. Guo, , 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
- 83. Goujgoulova, G., A.M. Petkova, G. Georgiev (2010):** Avian influenza viruses isolated from mallards in Bulgaria. Avian Dis. 54, 450-452
- 84. Hansbro, P.M., S. Warner, J.P. Tracey, K.E. Arzey, P. Selleck, K. O'Riley, E.L. Beckett, C. Bunn, P.D. Kirkland, D. Vijaykrishna, B. Olsen, A. C. Hurt (2010):** Surveillance and analysis of avian influenza viruses, Australia. Emerg. Infect. Dis. 16, 1896-1904

- 85. Hanson, B.A., D.E. Stallknecht, D.E. Swayne, L.A. Lewis, D.A. Senne (2003):** Avian influenza viruses in Minnesota ducks during 1998-2000. *Avian Dis.* 47, 867-871
- 86. Harder, T., C. Grund, M. Beer, C. Staubach, C. Schoene, H. Wilking, F.J. Conraths, BL-Monitorgruppe (2009):** Vogelpopulationen – Brutstätten pandemischer Influenzaviren? *Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr.* 122, 440-445
- 87. Hatchette, T.F., D. Walker, C. Johnson, A. Baker, S. P. Pryor, R.G. Webster (2004):** Influenza A viruses in feral Canadian ducks: extensive reassortment in nature. *J. Gen. Virol.* 85, 2327-2337
- 88. Hatta, M., Y. Hatta, J.H. Kim, S. Watanabe, K. Shinya, T. Nguyen, P.S. Lien, Q.M. Le, Y. Kawaoka (2007):** Growth of H5N1 influenza A viruses in the upper respiratory tracts of mice. *PLoS Pathog.* 3, 1374-1379
- 89. Hesterberg U., K. Harris, D. Stroud, V. Guberti, L. Busani, M. Pittman, V. Piazza, A. Cook, I. Brown (2009):** Avian influenza surveillance in wild birds in the European Union in 2006. *Influenza Other Respi. Viruses* 3, 1-14
- 90. Hill, N.J., J.Y. Takekawa, C.J. Cardona, J.T. Ackerman, A.K. Schultz, K.A. Spragens, W.M. Boyce (2010):** Waterfowl ecology and avian influenza in California: do host traits us about viral occurrence? *Avian Dis.* 54, 426-432
- 91. Hinshaw, V.S., R.G. Webster, B. Turner (1980a):** The perpetuation of orthomyxoviruses and paramyxoviruses in Canadian waterfowl. *Can. J. Microbiol.* 26, 622-629
- 92. Hinshaw, V.S., R.G. Webster, W.J. Bean, G. Sriram (1980b):** The ecology of influenza viruses in ducks and analysis of influenza viruses with monoclonal antibodies. *Comp Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 3, 155-164
- 93. Hinshaw, V.S. und R.G. Webster (1982):** The natural history of influenza A viruses. In: *Basic and applied influenza research.* A.S. Beare (Ed). CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, S. 79-104

- 94. Hinshaw, V.S., J.M. Wood, R.G. Webster, R. Diebel, B. Turner (1985):** Circulation of influenza viruses and paramyxoviruses in waterfowl originating from two different areas of North America. *Bull. WHO* 63, 711-719
- 95. Hlinak, A., R.U. Mühle, O. Werner, A. Globig, E. Starick, H. Schirrmeier, B. Hoffmann, A. Engelhardt, D. Hübner, F.J. Conraths, D. Wallschläger, H. Kruckenberf, T. Müller (2006):** A virological survey in migrating waders and other waterfowl in one of the most important resting sites of Germany. *Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public. Health* 53, 105-110
- 96. Hoffmann, M.A., S. Renzullo, A. Baumer (2008):** Phylogenetic characterization of H5N1 highly pathogenic avian influenza viruses isolated in Switzerland in 2006. *Virus Genes*. 37, 407-413
- 97. Horimoto, T. und Y. Kawaoka (2005):** Influenza: lessons from past pandemics, warnings from current incidents. *Nat. Rev. Microbiol.* 3, 591-600
- 98. Hu, X., D. Liu, M. Wang, L. Yang, M. Wang, Q. Zhu, L. Li, G.F. Gao (2011):** Clade 2.3.2 avian influenza virus (H5N1), Qinghai Lake region, China, 2009-2010. *Emerg. Inf. Dis.* 17, 560-562
- 99. Hulse, D.J., D.R. Perez, R.G. Webster (2004):** Molecular determinants of the pathogenicity of H5N1 influenza viruses in chickens. *Inter. Congr. Ser.* 1263, 114-117
- 100. Hurt, A.C., P.M. Hansbro, P. Selleck, B. Olsen, C. Minton, A.W. Hampson, I.G. Barr (2006):** Isolation of avian influenza viruses from two different transhemispheric migratory shorebird species in Australia. *Ach. of Virol.* 151, 2301-2309
- 101. ICTV, Orthomyxoviridae (2005):** In "Virus Taxonomy: VIIIth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses". Fauquet, C.M., M.A. Mayo, J. Maniloff, U. Desselberger, L.A. Ball (Eds), Elsevier Academic Press. Ebenfalls in ICTV 8th Report, Columbia University, New York, USA
Zugänglich unter (letzter Zugriff am 07.10.2011):
<http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?version=2009&bhcp=1>

102. **Ip, H.S., P.L. Flint, J.C. Franson, R.J. Dusek, D.V. Derksen, R.E. Jr Gill, C.R. Ely, J.M. Pearce, R.B. Lanctot, S.M. Matsuoka, D.B. Irons, J.B. Fischer, R.M. Oates, M.R. Petersen, T.F. Fondell, D.A. Rocque, J.C. Peder- sen, T.C. Rothe (2008):** Prevalence of Influenza A viruses in wild migratory birds in Alaska: patterns of variation in detection at a crossroads of intercontinental flyways. *Virol. J.* 5, 71
103. **Ito, T., K. Okazaki, Y. Kawaoka, A. Takada, R.G. Webster, H. Kida (1995):** Perpetuation of influenza A viruses in Alaska an waterfowl reservoirs. *Arch. Virol.* 140, 1163-1172
104. **Iverson, S.A., J. Takekawa, S. Schwarzbach, C.J. Cardona, N. Warnock, M.A. Bishop, G.A. Schirato, S. Paroulek, J.T. Ackerman, H. Ip, W.M. Boyse (2008):** Low prevalence of avian influenza viruses in shorebirds of the Pacific Coast in North America. *Waterbirds* 31, 602-610
105. **Jindal, N., A. de Martha, A.E. Primus, S. Raju, Y. Chander, P.T. Reding, S.M. Goyal (2010):** Comparison of cloacal and oropharyngeal samples for the detection of avian influenza virus in wild birds. *Avian Dis.* 54, 115-119
106. **Kaleta, E.F., G. Hergarten, A. Yilmaz (2005a):** Avian influenza viruses in birds an ecological, ornithological and virological view. *Dtsch. Tierärztl. Wochenschr.* 112, 448-456
107. **Kaleta, E.F. und A. Hönicke (2005b):** A retrospective description of a highly pathogenic avian influenza A virus (H7N1/Carduelis/Germany/72) in a free-living siskin (*Carduelis spinus* Linnaeus, 1758) and its accidental transmission to yellow canaries (*Serinus canaria* Linnaeus, 1758). *Dtsch. Tierärztl. Wochenschr.* 112, 17-19
108. **Kalthoff, D., A. Breithaupt, J.P. Teifke, A. Globig, T. Harder, T.C. Mettenleiter, M. Beer (2008):** Highly pathogenic avian influenza virus (H5N1) in experimentally infected adult mute swans. *Emerg. Infect. Dis.* 14, 1267-1270

109. **Karlin, S. und S.F. Altschul (1990):** Methods for assessing the statistical significance of molecular sequence features by using general scoring schemes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 2264-2268
110. **Keawcharoen, J., D. van Riel, G. van Amerongen, T. Bestebroer, W.E. Beyer, R. van Lavieren, A.D.M.E. Osterhaus, R.A.M. Fouchier, T. Kuiken (2008):** Wild ducks as long-distance vectors of highly pathogenic avian influenza virus (H5N1). *Emerg. Infect. Dis.* 14, 600-607
111. **Khan, O.A., M.A. Shuaib, S.S. Rhman, M.M. Ismail, Y.A. Hammad, M.H. Baky, A. Fusaro, A. Salviato, 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
112. **Kida, H. (1997):** Ecology of influenza viruses in animals and the mechanism of emergence of new pandemic strains. *Nippon Rinsho* 55, 2521-2526
113. **Kida, H., R. Yanagawa, Y. Matsuoka (1980):** Duck influenza lacking evidence of disease signs and immune response. *Infect. Immun.* 30, 547-553
114. **Kilbourne, E.D. (2006):** Influenza pandemics of the 20th century. *Emerg. Infect. Dis.* 12, 9-14
115. **Kilpatrick, A.M., A.A. Chmura, D.W. Gibbons, R.C. Fleischer, P.P. Marra, P. Daszak (2006):** Predicting the global spread of H5N1 avian influenza. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 19368-19373
116. **Kim, B.S., H.M. Kang, J.G. Choi, M.C. Kim, H.R. Kim, M.R. Paek, J.H. Kwon, Y.J. Lee (2011):** Characterization of the low-pathogenic H5N1 avian influenza virus in South Korea. *Poult Sci.* 90, 1449-1461

117. **Kiss, I., P. Gyarmati, S. Zohari, K.W. Ramsay, G. Metreveli, E. Weiss, M. Brytting, M. Stivers, S. Lindström, A. Lundkvist, K. Nemirov, P. Thorén, M. Berg, G. Czifra, S. Belák (2008):** Molecular characterization of highly pathogenic H5N1 avian influenza viruses isolated in Sweden in 2006. *Viol. J.* 6, 113
118. **Klenk, H.D, R. Rott, M. Orlich, J. Blodorn (1975):** Activation of influenza A viruses by trypsin treatment. *Viol.* 68, 426-439
119. **Koehler, A.V., J.M. Pearce, P.L. Flint, J.C. Franson, H.S. Ip (2008):** Genetic evidence of intercontinental movement of avian influenza in a migratory bird: the northern pintail (*Anas acuta*). *Mol. Ecol.* 17, 4754-4762
120. **Kou, Z., F.M. Lei, J. Yu, Z.J. Fan, Z.H. Yin, C.X. Jia, K.J. Xiong, Y.H. Sun, X.W. Zhang, X.M. Wu, X.B. Gao, T.X. Li (2005):** New genotype of avian influenza H5N1 viruses isolated from tree sparrows in China. *J. Virol.* 79, 15460-15466
121. **Krauss, S., D. Walker, S.P. Pryor, L. Niles, L. Chengchong, V.A. Hinshaw, R.G. Webster (2004):** Influenza A viruses in migratory wild aquatic in North America. *Vector Borne and Zoonotic Dis.* 4, 177-189
122. **Krauss, S., C.A. Obert, J. Franks, D. Walker, K. Jones, P. Seiler, L. Niles, S.P. Pryor, J.C. Obenauer, C.W. Naeve, L. Widjaja, R.J. Webby, R.G. Webster (2007):** Influenza in migratory birds and evidence of limited intercontinental virus exchange. *PLoS Pathog.* 3, e167
123. **Lamb, R.A. und P.W. Choppin (1981):** Identification of a second protein (M2) encoded by RNA segment 7 of influenza virus. *Viol.* 112, 729-737
124. **Lang, A.S., A. Kelly, J.A. Runstadler (2008):** Prevalence and diversity of avian influenza viruses in environmental reservoirs. *J. Gen. Virol.* 89, 509-519

125. **Latorre-Margalef, N., G. Gunnarsson, V.J. Munster, R.A. Fouchier, A.D. Osterhaus, J. Elmberg, B. Olsen, A. Wallensten, P.D. Haemig, T. Fransson, L. Brudin, J. Waldenström (2009):** Effects of influenza A virus infection on migrating mallard ducks. *Proc. Biol. Sci.* 276, 1029-1036
126. **Lazarowitz S.G. und P.W. Choppin (1975):** Enhancement of the infectivity of influenza A and B viruses by proteolytic cleavage of the hemagglutinin polypeptide. *Viol.* 68, 440-454
127. **Le Gall-Reculé, G., F.Y. Briand, A. Schmitz, O. Guionie, P. Massin, V. Jestin (2008):** Double introduction of highly pathogenic H5N1 avian influenza virus into France in early 2006. *Avian Pathol.* 37, 15-23
128. **Lebarbenchon, C., C.M. Chang, V. Grandhomme, M. Dietrich, Y. Kayser, E. Elguero, F. Renaud, F. Thomas, S. van der Werf, M. Gauthier-Clerc (2010):** Avian influenza circulation in the Camargue (South of France) during the 2006-07 season. *Avian Dis.* 54, 446-449
129. **Lebarbenchon, C. und D.E. Stallknecht (2011):** Host shifts and molecular evolution of H7 avian influenza virus hemagglutinin. *Viol. J.* 8, 328
130. **Lee, M.S., M.C. Deng, Y.I. Lin, C. Y. Chang, H.K. Shieh, J.Z. Shiau, C.C. Huang (2007):** Characterisation of an H5N1 avian influenza virus from Taiwan. *Vet. Microb.* 124, 193-201
131. **Lefrançois, T., P. Hendriks, N. Ehrhardt, M. Millien, L. Gomez, L. Gouyet, N. Gaidet, G. Gerbier, N. Vachiéry, F. Petitclerc, C. Carasco-Lacombe, V. Pinarello, S. Ahoussou, A. Levesque, H.V. Gongora, M. Trotman (2010):** Surveillance of avian influenza in the Caribbean through the Caribbean Animal Health Network: surveillance tools and epidemiologic studies. *Avian Dis.* 54, 369-373
132. **Leichtenstern, O. (1896):** Influenza und Dengue. In: *Spezielle Pathologie und Therapie*, Bd. 4, 1. Hälfte. Alfred Hölder (Ed), Hermann Nothnagel (Hrsg), Wien

- 133. Leichtenstern, O. (1912):** Influenza. 2 Aufl., Bearbeitet von Prof. Dr. Georg Sticker. Alfred Hölder (Ed), Wien, Leipzig
- 134. LGL (2011):** Geflügelpest: Untersuchungszahlen 2005 - 2011.
(Stand: 2011)
Zugänglich unter (letzter Zugriff am 07.10.2011):
http://www.lgl.bayern.de/tiergesundheit/vogelgrippe/anzeige_jahr.php
- 135. Li, K.S., Y. Guan, J. Wang, G.J. Smith, K.M. Xu, L. Duan, A.P. Rahardjo, P. Puthavathana, C. Buranathai, C. Nguyen, A.T. Estoepangestie, A. Chaisingh, P. Auewarakul, H.T. Long, N.T. Hanh, R.J. Webby, L.L. Poon, H. Chen, K.F. Shortidge, K.Y. Yuen, R.G. Webster, J.S. Peiris (2004):** Genesis of a highly pathogenic and potentially pandemic H5N1 influenza virus in eastern Asia. *Nature* 430, 209-213
- 136. Li, Z., Y. Jiang, P. Jiao, A. Wang, F. Zhao, G. Tian, X. Wang, K. Yu, Z. Bu, H. Chen (2006):** The NS1 gene contributes to the virulence of H5N1 avian influenza viruses. *J. Virol.* 80, 11115-11123
- 137. Long, J.X., D.X. Peng, Y.L. Liu, Y.T. Wu, X.F. Liu (2008):** Virulence of H5N1 avian influenza virus enhanced by a 15-nucleotide deletion in the viral nonstructural gene. *Virus Genes* 36, 471-478
- 138. Lu, H., A.E. Castro, K. Pennick, J. Liu, Q. Yang, P. Dunn, D. Weinstock, D. Henzler (2003):** Survival of avian influenza virus H7N2 in SPF chickens and their environments. *Avian Dis.* 47, 1015-1021
- 139. Ludwig, S., O., Planz, S., Pleschka, T. Wolff (2003):** Influenza-virus-induced signaling cascades: targets for antiviral therapy? *Trends Mol. Med.* 9, 46-52

140. **Lvov, D.K., Mlu Zhchelkanov, N.A. Vlasov, A.G. Prilipov, P.G. Deriabin, I.T. Fediakina, I.V. Galkina, A.D. Zaberezhnyi, O.V. Liapina, O.V. Shliapni-kova, D.E. Kireev, E.E. Fesenko, M.V. Kalmykov, O.N. Vitkova, T.N. Morozova, E.S. Proshina, T.V. Grebennikova, D.S. Akanina, E.I. Samokhvalov, S.V. Al'khovskii, V.A. Volkov, V.I. Semenov, V.V. Gaponov, N.I. Shmakov, A.T. Kushnir, A.S. Kazarian, N.S. Starikov, M.S. Petrenko, A.A. Slavskii, K.E. Litvin, L.O. Shcherbakova, A.V. Frolov, T.B. Manin, O.A. Umanets, V.V. Bandeev, A.M. Khvan, V.G. Dunaev, T.P. Cheledina, S.R. Abgarian, V.M. Mikhaïlovich, A.S. Zasedatelev, E.N. Liubchenko, V.N. Fliagin, I.F. Tikhonova, D.V. Maslov, Vlu Anan'ev, N.I. Baranov, V.N. Gorelikov, S.S. Iakovlev, T.I. Aliper, E.A. Nepoklonov, D. Suarez (2008):** The first break-through of the genotype 2.3.2 of high-virulence influenza A virus A/H5N1, which is new for Russia, in the Far East. *Vopr. Virusol.* 53, 4-8
141. **Ma, W., D. Brenner, Z. Wang, B. Dauber, C. Ehrhardt, K. Högner, S. Herold, S. Ludwig, T. Wolff, K. Yu, J.A. Richt, O. Planz, S. Pleschka (2010):** The NS-segment of an H5N1 highly pathogenic avian influenza virus (HPAIV) is sufficient to alter replication efficiency, cell tropism and host range of an H7N1 HPAIV. *J. Virol.* 84, 2122-2133
142. **Mackenzie, J.S., D. Britten, V.S. Hanshaw, J. I. Wood (1985):** Isolation of avian influenza and paramyxoviruses from wild birds in Western Australia. In: *Veterinary Viral Disease: Their Significance in Southeast Asia and the Western Pacific.* A. Della-Porta (Ed), Academic Press, Sydney, S. 336-339
143. **Marjuki, H., U. Wernery, H.L. Yen, J. Franks, P. Seiler, D. Walker, S. Krauss, R.G. Webster (2009):** Isolation of highly pathogenic avian influenza H5N1 virus from Saker falcons (*Falco cherrug*) in the Middle East. *Adv. Virol.* 1, NIH-PA Author Manuscript 1-14
Zugänglich unter (letzter Zugriff am 07.10.2011):
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2817955/pdf/nihms108361.pdf>

144. **Martin, K. und A. Helenius (1991):** Nuclear transport of influenza virus ribonucleoproteins: the viral matrix protein (M1) promotes export and inhibits import. *Cell* 67, 117–130
145. **Mastrovich, M., N. Zhou, Y. Kawaoka, R.G. Webster (1999):** The surface glycoproteins of H5 influenza viruses isolated from humans, chickens, and wild aquatic birds have distinguishable properties. *J. Virol.* 73, 1146-1155
146. **Mastrovich, M.N., T.Y. Matrosovich, T. Gray, N.A. Roberts, H.D. Klenk (2004):** Neuraminidase is important for the initiation of influenza virus infection in human airway epithelium. *J. Virol.* 78, 12665-12667
147. **Mastrovich, M., J. Stech, H.D. Klenk (2009):** Influenza receptors, polymerase and host range. *Rev. Sci. Tech.* 28, 203-217
148. **Metreveli, G., S. Zohari, A. Ejdersund, M. Berg (2010):** Phylogenetic analysis of the hemagglutinin gene of low pathogenic avian influenza virus H7N7 strains in mallards in Northern Europe. *Avian Dis.* 53, 453-456
149. **Mitchell, C.A., L.F. Guerin, J. Robillard (1968):** Decay of influenza A viruses human and avian origin. *Can. J. Comp. Med.* 32, 544-546
150. **Modrow S., D. Falke, U. Truyen (2003):** *Molekulare Virologie*, 2. Ausgabe. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg Berlin, S. 320, 331
151. **Monne, I., A. Fusaro, M.H. Al-Blawi, M.M. Ismail, O.A. Khan, G. Dauphin, A. Tripodi, A. Salviato, S. Marangon, I. Capua, G. Cattoli (2008):** Co-circulation of two sublineages of HPAI 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
152. **Morales A.T. (2009):** Veracruz: reporta agente municipal extraño brote epidémico que ha cobrado dos vidas. *La Jornada*. April 1, 2009

153. **Mukhtar, M.M., S.T. Rasool, D. Song, C. Zhu, Q. Hao, Y. Zhu, J. Wu (2007):** Origin of highly pathogenic H5N1 avian influenza virus in China and genetic characterization of donor and recipient viruses. *J. Gen. Virol.* 88, 3094-3099
154. **Munster, V.J., C. Baas, P. Lexmond, J. Waldenström, A. Wallensten, T. Fransson, G.F. Rimmelzwan, W.E. Beyer, M. Schutten, B. Olsen, A.D. Osterhaus, R.A. Fouchier (2007):** Spatial, temporal, and species variation in prevalence of influenza A viruses in wild migratory birds. *PLoS Pathog.* 3, 0630-0638
155. **Müller, T., A. Hlinak, C. Freuling, R. U. Mühle, A. Engelhardt, A. Globig, C. Schulze, E. Starick, U. Eggers, B. Sass, D. Wallschläger, J. Teifke, T. Harder, F.J. Conraths (2009):** Virological monitoring of white storks (*Ciconia ciconia*) for avian influenza. *Avian Dis.* 53, 578-584
156. **Muzaffar, S.B., C. R Ydenberg, I.L. Jones (2006): Avian Influenza: An Ecological and Evolutionary Perspective for Waterbird Scientists.** *Waterbirds* 29, 243-257
Zugänglich unter (letzter Zugriff am 07.10.2011):
[http://dx.doi.org/10.1675/1524-4695\(2006\)29\[243:AIAEAE\]2.0.CO;2](http://dx.doi.org/10.1675/1524-4695(2006)29[243:AIAEAE]2.0.CO;2)
157. **Nagy, A., J. Machova, J. Hornjckova, M. Tomci, I. Nagl, B. Horyna, I. Hojko (2007):** Highly pathogenic avian influenza virus subtype H5N1 in mute swans in the Czech Republic. *Vet. Microbiol.* 120, 9-16
158. **Nagy, A., V. Vostinakova, Z. Pindova, J. Hornickova, L. Gernikova, K. Selak, M. Mojzis, Z. Dirbakova, 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

- 159. Nakagawa, Y., K. Oda, S. Nakada (1996):** The PB1 subunit alone can catalyze cRNA synthesis, and the PA subunit in addition to the PB1 subunit is required for viral RNA synthesis in replication of the influenza virus genome. *J. Virol.* 70, 6390-6394
- 160. Neumann, G., G.G. Brownlee, E. Fodor, Y. Kawaoka (2004):** Orthomyxovirus replication, transcription, and polyadenylation. *Curr. Top Microbiol. Immunol.* 283, 121-143
- 161. Ohuchi, M., N. Asaoka, T. Sakai, R. Ohuchi (2006):** Roles of neuraminidase in the initial stage of influenza virus infection. *Microbes and infection* 8, 1287-1293
- 162. O.I.E. (2004):** Update on highly pathogenic avian influenza in animals (type H5 and H7)
Zugänglich unter (letzter Zugriff am 07.10.2011):
<http://www.oie.int/animal-health-in-the-world/update-on-avian-influenza/2004/>
- 163. O.I.E. (2005a):** Update on highly pathogenic avian influenza in animals (type H5 and H7)
Zugänglich unter (letzter Zugriff am 07.10.2011):
<http://www.oie.int/animal-health-in-the-world/update-on-avian-influenza/2005/>
- 164. O.I.E. (2005b):** Highly pathogenic avian Influenza. Immediate notification report. OIE Ref: 4898, Report Date: 30/11/2005, Country: Zimbabwe.
Zugänglich unter (letzter Zugriff am 07.10.2011):
http://web.oie.int/wahis/reports/en_imm_0000004898_20051130_093411.pdf
- 165. O.I.E. (2006a):** Update on highly pathogenic avian influenza in animals (type H5 and H7)
Zugänglich unter (letzter Zugriff am 07.10.2011):
<http://www.oie.int/animal-health-in-the-world/update-on-avian-influenza/2006/>

- 166. O.I.E. (2006b):** Highly pathogenic avian Influenza. Follow-up report No.: 1. OIE Ref: 4899, Report Date: 17/02/2006, Country: Zimbabwe.
Zugänglich unter (letzter Zugriff am 07.10.2011):
http://web.oie.int/wahis/reports/en_fup_0000004899_20060217_175415.pdf
- 167. O.I.E. (2007):** Update on highly pathogenic avian influenza in animals (type H5 and H7)
Zugänglich unter (letzter Zugriff am 07.10.2011):
<http://www.oie.int/animal-health-in-the-world/update-on-avian-influenza/2007/>
- 168. O.I.E. (2008a):** Highly pathogenic avian Influenza. Immediate notification report. Report reference: 6917, Report Date: 31/03/2008, Country: Switzerland.
Zugänglich unter (letzter Zugriff am 07.10.2011):
http://web.oie.int/wahis/reports/en_imm_0000006917_20080331_092338.pdf
- 169. O.I.E. (2008b):** Update on highly pathogenic avian influenza in animals (type H5 and H7) Zugänglich unter (letzter Zugriff am 07.10.2011):
<http://www.oie.int/animal-health-in-the-world/update-on-avian-influenza/2008/>
- 170. O.I.E. (2009a):** Terrestrial Animal Health Code. Section 10, chapter 10.4, volume 2. Avian Influenza
Zugänglich unter (letzter Zugriff am 07.10.2011):
http://web.oie.int/eng/normes/mcode/en_chapitre_1.10.4.htm
- 171. O.I.E. (2009b):** Update on highly pathogenic avian influenza in animals (type H5 and H7)
Zugänglich unter (letzter Zugriff am 07.10.2011):
<http://www.oie.int/animal-health-in-the-world/update-on-avian-influenza/2009/>
- 172. O.I.E. (2010a):** Highly pathogenic avian Influenza. Immediate notification report. Ref OIE: 9047, Report Date: 16/03/2010, Country: Romania.
Zugänglich unter (letzter Zugriff am 07.10.2011):
http://web.oie.int/wahis/reports/en_imm_0000009047_20100316_172244.pdf

- 173. O.I.E. (2010b):** Highly pathogenic avian Influenza. Immediate notification report. Ref OIE: 9103, Report Date: 01/04/2010, Country: Bulgaria. Zugänglich unter (letzter Zugriff am 07.10.2011):
http://web.oie.int/wahis/reports/en_imm_0000009103_20100401_141931.pdf
- 174. O.I.E. (2010c):** Update on highly pathogenic avian influenza in animals (type H5 and H7) Zugänglich unter (letzter Zugriff am 07.10.2011):
<http://www.oie.int/animal-health-in-the-world/update-on-avian-influenza/2010/>
- 175. O.I.E. (2011a):** Update on highly pathogenic avian influenza in animals (type H5 and H7)
Zugänglich unter (letzter Zugriff am 07.10.2011):
<http://www.oie.int/animal-health-in-the-world/update-on-avian-influenza/2011/>
- 176. O.I.E. (2011b):** Highly pathogenic avian Influenza. Follow-up report No.: 7. Report reference: AI_WCP2011, OIE Ref: 10978, Report Date: 22/09/2011, Country: South Africa.
Zugänglich unter (letzter Zugriff am 07.10.2011):
http://web.oie.int/wahis/reports/en_fup_0000010978_20110922_140436.pdf
- 177. Olsen, B., V.J. Munster, A. Wallensten, J. Waldenström, A.D.M.E. Osterhaus, R.A.M. Fouchier (2006):** Global patterns of influenza A virus in wild birds. *Science* 312, 384-388
- 178. O'Neill R.E., J. Talon, P. Palese (1998):** The influenza virus NEP (NS2 protein) mediates the nuclear export of viral ribonucleoproteins. *EMBO J.* 17, 288–296
- 179. Palese, P. und M.L. Shaw (2007):** *Orthomyxoviridae: The Viruses and Their Replication.* Fields Virology. In: D. M. Knipe, P.M. Howley, D.E. Griffin, R.A. Lamb, M.A. Martin, B. Roizman, S.E. Straus (Eds), Volume 2, Fifth edition. Lippincott Williams and Wilkins Publisher, Philadelphia, USA, S. 1647-1740

180. **Palmai N., K. Erdelyi, A. Balint, L. Marton, A. Dan, Z. Deim, K. Ursu, B.Z. Löndt, I.H. Brown, R. Glavits (2007):** Pathobiology of highly pathogenic avian influenza virus (H5N1) infection in mute swans (*Cygnus olor*). *Avian Pathol.* 36, 245-249
181. **Pappas, C., P.V. Aquilar, C.F. Basier, A. Solorzano, H. Zeng, L.A. Perrone, P. Palese, A. Grazia-Sastre, J.M. Katz, T.M. Tumpey (2008):** Single gen reassortants identify a critical role for PB1, HA, and NA in the high virulence of the 1918 pandemic influenza virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105, 3064-3069
182. **Pasick, J., K. Handel, J. Robinson, V. Bowes, Y. Li, T. Leighton, H. Kehler, D. Ridd, C. Cottam-Birt (2007a).** Relationship between H5N2 avian influenza viruses isolated from wild and domestic ducks in British Columbia, Canada. *Avian Dis.* 51, 429-431
183. **Pasick, J., Y. Berhane, C. Embury-Hyatt, J. Copps, H. Kehler, K. Handel, S. Babiuk, K. Hooper-McGrevy, Y. Li, Q. Mai Le, Phuong S. Lien (2007b):** Susceptibility of Canada Geese (*Branta canadensis*) to highly pathogenic avian influenza virus (H5N1). *Emerg. Infect. Dis.* 13, 1821-1827
184. **Pasick J., Y. Berhane, H. Kehler, T. Hisanaga, K. Handel, J. Robinson, D. Ojkic, F. Kibenge, M. Fortin, R. King, A. Hamel, D. Spiro, J. Parmley, C. Soos, E. Jenkins, A. Breault, D. Caswell, C. Davies, J. Rodrigue, K. McAloney, F. Leighton (2010):** Survey of influenza A viruses circulating in wild birds in Canada 2005 to 2007. *Avian Dis.* 54, 440-445
185. **Patterson, K. D. (1986):** Pandemic Influenza 1700-1900: A study in historical epidemiology. Rowman and Littlefield, New Jersey
186. **Patterson-Kane, J.C., J.B. Carrick, J.E. Axon, I. Wilkie, A.P. Begg (2008):** The pathology of bronchointerstitial pneumonia in young foals associated with the first outbreak of equine influenza in Australia. *Equine Vet. J.* 40, 199-203

- 187. Pedersen, K., S.R. Swafford, T.J. DeLiberto (2010):** Low pathogenicity avian influenza subtypes isolated from wild birds in the United States, 2006-2008. *Avian Dis.* 54, 405-410
- 188. Pensaert, M., K. Ottis, J. Vandeputte, M.M. Kaplan, P.A. Bachmann (1981):** Evidence for the natural transmission of influenza A virus from wild ducks to swine and its potential importance for man. *Bull. World Health Organ.* 59, 75-78
- 189. Perdue, M.L., M. Garcia, D. Senne, M. Fraire (1997):** Virulence-associated sequence duplication at the hemagglutinin cleavage site of avian influenza viruses. *Virus Res.* 49, 173-186
- 190. Perdue, M., J. Crawford, M. Garcia, J. Latimer, D. Swayne (1998):** Occurrence and possible mechanisms of cleavage-site insertions in the avian influenza hemagglutinin gene. Swayne, D.E. und R.D. Slemons (Eds), Kennett Square (PA), American Association of Avian Pathologists. *Proceedings of the Fourth International Symposium on Avian Influenza*, S. 182-193
- 191. Perkins, L.E.L. und D.E. Swayne (2003):** Comparative susceptibility of selected avian and mammalian species to a Hong Kong-origin H5N1 high-pathogenicity avian influenza virus. *Avian Dis.* 47, 956-967
- 192. Peroulis, I. und K. O'Riley (2004):** Detection of avian paramyxoviruses and influenza viruses among wild birds population in Victoria. *Australian Vet. J.* 82, 79-82
- 193. Portela, A. und P. Digard (2002):** The influenza virus nucleoprotein: a multifunctional RNA-binding protein pivotal to virus replication. *J. Gen. Virol.* 83, 723-734
- 194. PromedMail: PRO/AH/EDR> Avian influenza (37):** China (Tibet) wild birds, H5N1. Archiv Nummer: 20100613.1983, publiziert am 13.07.2010
Zugänglich unter (letzter Zugriff am 07.10.2011):
http://www.promedmail.org/pls/apex/f?p=2400:1001:1196307680669816::NO::F2400_P1001_BACK_PAGE,F2400_P1001_PUB_MAIL_ID:1000,83207

195. **Prosser, D.J., J.Y. Takekawa, S.H. Newman, B. Yan, D.C. Douglas, Y. Hou, Z. Xing, D. Zhang, T. Li, Y. Li, D. Zhao, W.M. Perry, E.C. Palm (2009):** Satellite-marked waterfowl reveal migratory connection between H5N1 outbreak areas in China und Mongolia. *IBIS* 151, 568-576
196. **Rabl, S., M. Rinder, A. Nuebauer-Juric, K.H. Bogner, R. Korbel, M. Büttner (2009):** Surveillance of wild birds for avian influenza A virus (AIV) in Bavaria in the years 2007 and 2008. *Berl. Münch. Tierarztl. Wochenschr.* 122, 486-493
197. **Rabl, S. (2010):** Wildvogelmonitoring in Bayern: Vorkommen und Verbreitung Wildvogelmonitoring in Bayern: Vorkommen und Verbreitung aviärer Influenzaviren von 2007 bis 2009. Dissertation, LMU München, Tierärztliche Fakultät, S. 67, 68, 75
198. **Rao, P., W. Uan, R.M. Krug (2003):** Crucial role of CA cleavage sites in the cap-snatching mechanism for initialing viral mRNA synthesis. *EMBO J.* 22, 1188-1198
199. **Rinder, M., V. Lang, C. Fuchs, A. Hafner-Marx, K.H. Bogner, A. Neubauer, M. Buettner, 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
200. **RKI (2009):** Epidemiologisches Bulletin. Neue Influenza A/H1N1 in Deutschland. Bewertung des bisherigen Geschehens. 22. Juni 2009/Nr. 25. Zugänglich unter (letzter Zugriff am 07.10.2011): http://www.rki.de/cln_160/nn_1378492/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2009/25__09,templateld=raw,property=publicationFile.pdf/25_09.pdf
201. **Robertson, H.E. (1918):** Influenzal sinus disease and its relation to epidemic influenza. *JAMA* 70, 1533-1535
202. **Rogers, G.N., J.C. Paulson, R.S. Daniels, J.J. Skehel, I.A. Wilson, D.C. Wiley (1983):** Single amino acid substitutions in influenza haemagglutinin change receptor binding specificity. *Nature* 304, 76-78

203. **Rolle, M. und A. Mayr (2007):** Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenmedezin. 8 überarbeitete Auflage, Enke Verlag in Medizinverlage Stuttgart GmbH & Co KG., S. 15
204. **Rott, R., M. Orlich, C. Scholtissek (1979):** Correlation of pathogenicity and gene constellation of influenza A viruses. III. Non-pathogenic recombinants derived from highly pathogenic parent strains. *J. Gen. Virol.* 44, 471-477
205. **Rott, R. (1992):** The pathogenic determinant of influenza virus. *Vet. Microbiol.* 33, 303-310
206. **Röhm, C., T. Horimoto, Y. Kawaoka, J. Süß, R.G. Webster (1995):** Do hemagglutinin genes of highly pathogenic avian influenza viruses constitute unique phylogenetic lineages? *Virology* 209, 664-670
207. **Röhm, C., J. Süß, V. Pohle, R. G. Webster (1996):** Different hemagglutinin cleavage site variants of H7N7 in an influenza outbreak in chickens in Leipzig, Germany. *Virology* 218, 253–257
208. **Salzberg, S.L., C. Kingsford, G. Cattoli, D.J. Spiro, D.A. Janies, M.M. Aly, I.H. Brown, E. Couacy-Hymann, G.M. De Mia, H. do Dung, A. Guercio, T. Joannis, A.S. Ali Maken, A. Osmani, I. Padalino, M.D. Saad, V. Savić, N.A. Sengamalay, S. Yingst, J. Zaborsky, O. Zorman-Rojs, E. Ghedin, I. Capua (2007):** Genome analysis linking recent European and African influenza (H5N1) viruses. *Emerg. Infect. Dis.* 13, 713-718
209. **Savić, V., A. Labrović, T.A. Zelenika, M. Balenović, S. Šeparović, L. Jurinović (2010):** Multiple introduction of Asian H5N1 avian influenza virus in Croatia by wild birds during 2005-2006 and isolation of the virus from apparently healthy black-headed gulls (*Larus ridibundus*). *Vector-Borne and Zoonotic Dis.* 10, 915-920
210. **Schaffer, F.L., M.E. Soergel, D.C. Straube (1976):** Survival of airborne influenza virus: effects of propagating host, relative humidity, an composition of spray fluids. *Arch. Virol.* 51, 263-273

211. **Schmolke, M., B. Manicassamy, L. Pena, T. Sutton, R. Hai, Z.T. Varga, B.G. Hale, J. Steel, D.R. Pérez, A. García-Sastre (2011):** Differential contribution of PB1-F2 to the virulence of highly pathogenic H5N1 influenza A virus in mammalian and avian Species. *PLoS Pathog.* 8, e1002186
212. **Scholtissek, C. (2006):** Influenza pandemic planning. *Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr.* 119, 179-185
213. **Senne, D.A., D.L. Suarez, D.E. Stallknecht, J.C. Pedersen, B. Panigrahy (2006):** Ecology and epidemiology of avian influenza in North and South America. *Dev. Biol. (Basel)* 124, 37-44
214. **Senne, D.A. (2010):** Avian influenza in North and South America, the Caribbean, and Australia 2006-2008. *Avian Dis.* 54, 179-186
215. **Seo, S.H., E. Hoffmann, R.G. Webster (2004):** The NS1 gene of H5N1 influenza viruses circumvents the host anti-viral cytokine responses. *Virus Res.* 103, 107-113
216. **Sharp, G.B., Y. Kawaoka, S.M. Wright, B. Turner, V. Hinshaw, R.G. Webster (1993):** Wild ducks are the reservoir for only a limited number of influenza A subtypes. *Epid. and Inf.* 110, 161-176
217. **Sharshov, K., N. Silko, I. Sousloparov, A. Zaykovskaya, A. Shestopalov, I. Drozdov (2010):** Avian influenza (H5N1) outbreak among wild birds, Russia, 2009. *Emerg. Infec. Dis.* 16, 349-351
218. **Shih, A.C.C., T.C. Hsiao, M.S. Ho, W.H. Li (2007):** Simultaneous amino acid substitutions at antigenic sites drive influenza A hemagglutinin evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104, 6283-6288
219. **Sinnecker, H.R., E. Sinnecker, E. Zilske, D. Köhler (1982a):** Detection of Influenza A viruses and influenza epidemics in wild pelagic birds by sentinels and population studies. *Zentralbl. Bakteriolog. Orig. A* 253, 297-304

220. **Sinnecker, H.R., E. Sinnecker, E. Zilske (1982b):** Detection of influenza A viruses by sentinels domestic ducks in an ecological survey. *Acta Virologica* 26, 102-104
221. **Skehel, J.J. und D.C. Wiley (2000):** Receptor binding and membran fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin. *Annu. Rev. Biochem.* 69, 531-569
222. **Slemons, R.D., D.C. Johnson, J.S. Osborn, F. Hayes (1974):** Type-A influenza viruses isolated from wild free-flying ducks in California. *Avian Dis.* 18, 119-124
223. **Smietanka K., A. Fusaro, K. Domanska-Blicharz, A. Salviato, I. Monne, W.G. Dundon, G. Cattoli, Z. Minta (2010):** Full-length genome sequencing of the Polish HPAI H5N1 viruses suggests separate introductions in 2006 and 2007 *Avian Dis.* 54, 335-339
224. **Smith G.J., T.S. Naipospos, T.D. Nguyen, M.D. de Jong, D. Vijaykrishna, T.B. Usman, S.S. Hassan, T.V. Nguyen, T.V. Dao, N.A. Bui, Y.H. Leung, C.L. Cheung, J.M. Rayner, J.X. Zhang, L.J. Zhang, L.L. Poon, K.S. Li, V.C. Nguyen, T.T. Hien, J. Farrar, R.G. Webster, H. Chen, J.S. Peiris, Y.Guan (2006):** Evolution and adaptation of H5N1 influenza virus in avian and human hosts in Indonesia and Vietnam. *Virol.* 350, 258-268
225. **Smith, G.J., D. Vijaykrishna, T.M. Ellis, K.C. Dyrting, Y.H. Leung, J. Bahl, C.W. Wong, H. Kai, M.K. Chow, L. Duan, A.S. Chan, L.J. Zhang, H. Chen, G.S. Luk, J.S. Peiris, Y. Guan (2011):** Characterization of avian influenza viruses A (H5N1) from wild birds, Hong Kong, 2004-2008. *Emerg. Inf. Dis.* 15, 402-407
226. **Songserm, T., A. Amonsin, R. Jamon, N. Sae-Heng, N. Pariyothorn, S. Payungporn, A. Thaeamboonlers, S. Chutinimitkul, R. Thanawongnuwech, Y. Poovorawan (2006):** Fatal avian influenza in cats. *Emerg. Infec. Dis.* 12, 1744-1747

227. **Spackman E., D.A. Senne, T.J. Myers, L.L. Bulaga, L.P. Garber, M.L. Perdue, K. Lohman, L.T. Daum, D.L. Suarez (2002):** Development of a real-time reverse transcriptase PCR assay for type A influenza virus and the avian H5 and H7 hemagglutinin subtypes. *J. Clin. Microbiol.* 40, 3256-3260
228. **Spackman, E., K.G. McCracken, K. Winkler, D. E. Swayne (2007):** An avian influenza virus from waterfowl in South America contains genes from North American avian and equine lineages. *Avian Dis.* 51, 273-274
229. **Spackman, E., D.E. Swayne, M. Gilbert, D.O. Joly, W.B. Karesh, D.L. Suarez, R. Sodnomdarjaa, P. Dulam, C. Cardona (2009):** Characterization of low pathogenicity avian influenza viruses isolated from wild birds in Mongolia 2005 through 2007. *Virology* 6, 190
230. **Stallknecht, D.E., M.T. Kearney, S.M. Shane, P.J. Zwank (1990a):** Effects of pH, temperature and salinity on persistence of avian influenza viruses in water. *Avian Dis.* 34, 412-418
231. **Stallknecht, D.E., S.M. Shane, M.T. Kearney, P.J. Zwank (1990b):** Persistence of avian influenza viruses in water. *Avian Dis.* 34, 406-411
232. **Starick, E., M. Beer, B. Hoffmann, C. Staubach, O. Werner, A. Globig, G. Strebelow, C. Grund, M. Durban, F.J. Conraths, T. Mettenleiter, 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
233. **Stevens, J., O. Blixt, L.M. Chen, R.O. Donis, J.C. Paulson, I.A. Wilson (2008):** Recent avian H5N1 viruses exhibit increased propensity for acquiring human receptor. *J. Mol. Biol.* 381, 1382-1394
234. **Sturm-Ramirez, K.M., T. Ellis, B. Bousfield, L. Bissett, K. Dyrting, J.E. Rehg, L. Poon, Y. Guan, M. Peiris, R.G. Webster (2004):** Reemerging H5N1 influenza viruses in Hong Kong in 2002 are highly pathogenic to ducks. *J. Virol.* 78, 4892-4901

235. **Suarez, D.L., M.L. Perdue, N. Cox, T. Rowe, C. Bender, J. Huang, D. E. Swayne (1998):** Comparisons of highly virulent H5N1 influenza A viruses isolated from humans and chickens from Hong Kong. *J. Virol.* 72, 6678-6688
236. **Suarez, D.L., D.A. Senne, J. Banks, I.H. Brown, S.C. Essen, C.W. Lee, R.J. Manvell, C. Mathieu-Benson, V. Moreno, J.C. Pedersen, B. Panigrahy, H. Rojas, E. Spackman, D.J. Alexander (2004):** Recombination resulting in virulence shift in avian influenza outbreak, Chile. *Emer. Inf. Dis.* 10, 693-699
237. **Süss, J., J. Schäfer, H. Sinnecker, R.G. Webster (1994):** Influenza virus subtypes in aquatic birds of eastern Germany. *Arch. Virol.* 135, 101-114
238. **Szeleczky, Z., A. Dan, K. Ursu, E. Ivanics, I. Kiss, K. Erdelyi, S. Belak, C.P. Muller, I. H. Brown, A. Balint (2009):** Four different sublinages of highly pathogenic avian influenza H5N1 introduced in Hungary in 2006-2007. *Vet. Microb.* 139, 24-33
239. **Tan, S.L. und M.G. Katze (1998):** Biochemical and genetic evidence for complex formation between the influenza A virus NS1 protein and the interferon-induced PKR protein kinase. *J. Interferon Cytokine Res.* 18, 757-766
240. **Taubenberger, J.K., A.H. Reid, R.M. Lourens, R. Wang, G. Jin, T.G. Fanning (2005):** Characterization of the 1918 influenza virus polymerase genes. *Nature* 437, 889-893
241. **Taubenberger, J.K., J.V. Hultin, D.M. Morens (2007):** Discovery and characterization of the 1918 pandemic influenza virus in historical context. *Antivir. Ther.* 12, 581-591
242. **Teifke, J.P., R. Klopffleisch, A. Globig, E. Starick, B. Hoffmann, P.U. Wolf, M. Beer, T.C. Mettenleiter, 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

- 243. Tellier, R. (2006):** Review of aerosol transmission of influenza A virus. *Emerg. Infect. Dis.* 12, 1657-1662
- 244. Terregino, C., R. de Nardi, V. Guberti, M. Scremin, E. Raffini, A.M. Martin, G. Cattoli, L. Bonfanti, I. Capua (2007):** Active surveillance for avian influenza viruses in wild birds and backyard flocks in Northern Italy during 2004 and 2006. *Avian Pathol.* 36, 337-344
- 245. Tiergesundheitsjahresbericht 2009.** FLI. Bundesforschung für Tiergesundheit, 2010, S. 40-42
Zugänglich unter (letzter Zugriff am 07.10.2011):
http://www.fli.bund.de/fileadmin/dam_uploads/Jahresberichte/TG-JB/TGJB_2009.pdf
- 246. Tiergesundheitsjahresbericht 2010.** FLI. Bundesforschung für Tiergesundheit, 2011, S. 7 und 35-38
Zugänglich unter (letzter Zugriff am 07.10.2011):
http://www.fli.bund.de/fileadmin/dam_uploads/Jahresberichte/TG-JB/TGJB_2010.pdf
- 247. Toyoda, T., M. Kobayashi, S. Nakada, A. Ishihama (1996):** Molecular dissection of influenza virus RNA polymerase: PB1 subunit alone is able to catalyze RNA synthesis. *Virus Genes* 12, 155-163
- 248. Usui, T., T. Yamaguchi, H. Ito, H. Ozaki, T. Murase, T. Ito (2009):** Evolutionary genetics of highly pathogenic H5N1 avian influenza viruses isolated from whooper swans in northern Japan in 2008. *Virus Genes* 39, 319-323
- 249. Van Kerkhove M.D., E. Mumford, A.W. Mounts, J. Bresee, S. Ly, C.B. Bridges, J. Otte (2011):** Highly pathogenic avian influenza (H5N1): pathways of exposure at the animal-human interface, a systematic review. *PLoS One* 24, e14582

250. **Vey, M., M. Orlich, S. Adler, H.D. Klenk, R. Rott, W. Garten (1992):**
Hemagglutinin activation of pathogenic avian influenza viruses of serotype H7 requires the protease recognition motif R-X-K/R-R. *Virology* 188, 408-413
251. **Verordnung zum Schutz gegen die Geflügelpest und die Newcastle-Krankheit (Geflügelpest-Verordnung)** vom 20.12.2005, BAnz. I, S. 3538 . Zugänglich unter (letzter Zugriff am 07.10.2011):
<http://www.bmelv.de/SharedDocs/Rechtsgrundlagen/G/GefluegelpestVO.html>
252. **Verordnung über Untersuchungen auf die Klassische Geflügelpest sowie zum Schutz vor der Verschleppung der Klassischen Geflügelpest (Geflügelpestschutzverordnung).** Eilverordnung vom 01.09.2005, vom Bundesministerium für Verbraucherschutz, Ernährung und Landwirtschaft (BAnz. S. 13345), geändert durch die erste Verordnung zur Änderung der Verordnung über Untersuchungen auf die Klassische Geflügelpest vom 26.09.2005, (BAnz. Nr.187 vom 1.10.2005, S.14639), die zweite Verordnung zur Änderung der Verordnung über Untersuchungen auf die Klassische Geflügelpest vom 19. Oktober 2005 (BAnz. vom 21.10.2005, S. 15401), die dritte Verordnung zur Änderung der Geflügelpestschutzverordnung vom 27. Oktober 2005 (BAnz. vom 29.10.2005, S. 15697), die vierte Verordnung zur Änderung der Geflügelpestschutzverordnung vom 07.12.2005 (BAnz. vom 09.12.2005, S. 16583) und zuletzt geändert durch die fünfte Verordnung zur Änderung der Geflügelpestschutzverordnung vom 10.02.2006 (BGBl.I vom 13.02.2006, Nr.7 S. 328), zuletzt geändert durch die neunte Zuständigkeitsanpassungsverordnung vom 31.10.2006 durch Bundesgesetzblatt Jahrgang 2006 Teil I Nr. 50, S. 2407, Art. 412 vom 07.10.2006.
Zugänglich unter (letzter Zugriff am 07.10.2011):
http://www.vention.de/gesetze/Gesetzestexte/Gef_pest_Schutz_VO.htm?mainPage=1

253. Verordnung zur Aufstallung des Geflügels zum Schutz vor der Klassischen Geflügelpest (Geflügel-Aufstallungsverordnung) vom 09.05.2006 (eBAnz AT28 2006 V1 vom 09.05.2006), geändert durch Art. 1 der Verordnung vom 10.07.2006 Bundesgesetzblatt 2006 Teil I Nr. 31, S. 1452 vom 13.07.2006, geändert durch Art. 2 der Verordnung vom 08.09.2006, eBAnz AT48 2006 V1 vom 08.09.2006 und zuletzt geändert durch Bundesanzeiger Nr. 40, S. 2063 vom 27.02.2007.

Zugänglich unter (letzter Zugriff am 07.10.2011):

http://www.vetion.de/gesetze/Gesetzestexte/Aufstallung_Gefpest_VO.htm?mainPage=1

254. Verordnung über Schutzmaßnahmen beim Auftreten von Geflügelpest bei Nutzgeflügel (Nutzgeflügel-Geflügelpestschutzverordnung) vom 10.08.2006, eBAnz. AT41 2006 V1, geändert durch die Zweite Verordnung zur Änderung von Verordnungen zum Schutz vor Geflügelpest vom 24.11.2006, eBAnz 2006 Teil I, Nr. 54, S. 2663, Art. 1 vom 30.11.2006.

Zugänglich unter (letzter Zugriff am 07.10.2011):

http://www.vetion.de/gesetze/Gesetzestexte/Nutz_Gef_pest_schutz_VO.htm?mainPage=1

255. Verordnung über Schutzmaßnahmen beim Auftreten von Geflügelpest bei wildlebenden Vögeln (Wildvogel-Geflügelpestschutzverordnung) vom 08.09.2006, eBAnz. AT48 2006 V1, geändert durch die Zweite Verordnung zur Änderung von Verordnungen zum Schutz vor Geflügelpest vom 24.11.2006, eBAnz 2006 Teil I, Nr. 54, S. 2663, Art. 2, vom 30.11.2006 – aufgehoben durch Bundesgesetzblatt Jahrgang 2007 Teil I Nr. 51, S. 2348

Zugänglich unter (letzter Zugriff am 07.10.2011):

http://www.vetion.de/gesetze/Gesetzestexte/Wildvogel_Gefp_schutz_VO.htm?mainPage=1

- 256. Verordnung zum Schutz gegen die Geflügelpest (Kurztitel: Geflügelpest-Verordnung) (2007):** In der Fassung vom 18.10.2007, zuletzt geändert durch Zweite Verordnung zur Änderung tierseuchenrechtlicher Verordnungen vom 18.12.2009. Ausgegeben zu Bonn am 22.11.2007. Bundesgesetzblatt, Teil I, G5702, Nr. 51, S. 2348-2378
Zugänglich unter (letzter Zugriff am 07.10.2010):
http://www.rechtliches.de/info_GeflPestV.html
- 257. Vijaykrishna, D., J. Bahl, S. Riley, L. Duan, J.X. Zhang, H. Chen, J.S. Peiris, G.J. Smith, Y. Guan (2008):** Evolutionary dynamics and emergence of panzootic H5N1 influenza viruses. *PLoS Pathog.* 26, e1000161
- 258. Waddell, G.H., Teigland M.B., Sigel M.M (1963):** A new influenza virus associated with equine respiratory disease. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 15, 587-590
- 259. Wagner, R., M. Matrosovich, H.D. Klenk (2002):** Functional balance between haemagglutinin and neuraminidase in influenza virus infections. *Rev. Med. Virol.* 12, 159-166
- 260. Wallensten, A., V.J. Munster, N. Latorre-Margalef, M. Brytting, J. Elmberg, R.A. Fouchier, T. Fransson, P.D. Haemig, M. Karlsson, A. Lundkvist, A.D. Osterhaus, M. Stervander, J. Waldenström, O. Björn (2007):** Surveillance of influenza A virus in migratory waterfowl in northern Europe. *Emerg. Infect. Dis.* 13, 404-411
- 261. Wang, G., D. Zhan, L. Li, F. Lei, B. Liu, D. Liu, H. Xiao, Y. Feng, J. Li, B. Yang, Z. Yin, X. Song, X. Zhu, Y. Cong, J. Pu, J. Wang, J. Liu, G.F. Gao, Q. Zhu (2008):** H5N1 avian influenza re-emergence of Lake Qinghai: phylogenetic and antigenic analyses of the newly isolated viruses and roles of migratory birds in virus circulation. *J. Gen. Virol.* 89, 697-702
- 262. Watanabe, K., H. Handa, K. Mizumoto, K. Nagata (1996):** Mechanism for inhibition of influenza virus RNA polymerase activity by matrix protein. *J. Virol.* 70, 241-247

263. **Watowich, S. J., J.J. Skehel, D.C. Wiley (1994):** Crystal structures of influenza virus hemagglutinin in complex with high affinity receptor analogs. *Structure* 2, 719-731
264. **Weber, T.P. und N.I. Stilianakis (2007):** Ecologic immunology of avian influenza (H5N1) in migratory birds. *Emerg. Infect. Dis.* 13, 1139-1143
265. **Webster, R.G. und W.J. Bean (1978):** Genetics of Influenza Virus. *Ann. Rev. Genet.* 12, 415-431
266. **Webster, R.G., M. Yakhno, V.S. Hinshaw, W.J. Bean, K.G. Murti (1978):** Intestinal influenza: replication and characterization of influenza viruses in ducks. *Virology* 84, 268-278
267. **Webster, R.G., W.J. Bean, O.T. Gorman, T.M. Chambers, Y. Kawaoka (1992):** Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiol. Rev.* 56, 152-178
268. **Webster R.G., S.M. Wright, M.R. Castrucci, W.J. Bean, Y. Kawaoka (1993):** Influenza - a model of an emerging virus disease. *Intervirology* 35, 16-25
269. **Webster, R.G. (1998):** Influenza: An emerging disease. *Emerg. Inf. Dis.* 4, 436-441
270. **Webster, R. G., S. Krauss, D. Hulse-Post, K. Sturm-Ramirez (2007):** Evolution of influenza A viruses in wild birds. *J. Wildl. Dis.* 43, 1-6
271. **Werner, O. und A. Globig (2004):** Zum Vorkommen von aviären Influenzaviren bei Geflügel in verschiedenen Haltungformen in Deutschland. In: Fachgruppe Geflügelkrankheiten, Giessen. DVG, S. 83-91
272. **Werner, O. (2006):** Klassische Geflügelpest - Eine Übersicht. *Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr.* 119, 140-150
273. **WHO (1953):** First report of the expert committee on influenza. World Health Organization Technical Report Series 64, S. 3-32

- 274. WHO (2010):** Pandemic (H1N1) 2009 - update 112. Weekly update. Laboratory confirmed cases of pandemic H1N1 2009 on 6 August 2010. Zugänglich unter (letzter Zugriff am 07.10.2011): http://www.who.int/csr/don/2010_08_06/en/index.html
- 275. WHO (2011a):** Influenza update. Update number 143 from 23 September 2011. Zugänglich unter (letzter Zugriff am 07.10.2011): http://www.who.int/influenza/surveillance_monitoring/updates/latest_update_GIP_surveillance/en/index.html **und/oder** http://www.who.int/influenza/gisrs_laboratory/updates/summaryreport/en/index.html
- 276. WHO (2011b): Evolution of the Asian H5 Hemagglutinin.** Zugänglich unter (letzter Zugriff am 07.10.2011): http://www.who.int/influenza/gisrs_laboratory/201101_h5n1evoconceptualdiagram.pdf
- 277. WHO (2011c):** Cumulative number of confirmed human cases of avian Influenza A/(H5N1) as of August 19, 2011. Zugänglich unter (letzter Zugriff am 07.10.2011): http://www.who.int/influenza/human_animal_interface/EN_GIP_20110819CumulativeNumberH5N1casesN.pdf
- 278. WHO (2011d):** Cumulative number of confirmed human death of avian Influenza A/(H5N1) as of August 19, 2011. Zugänglich unter (letzter Zugriff am 07.10.2011): <http://www.globalhealthfacts.org/data/topic/map.aspx?ind=33>
- 279. Wilking, H., M. Ziller, C. Staubach, A. Globig, T.C. Harder, F.J. Conraths (2009):** Chances and limitation of wild bird monitoring for the Avian Influenza Virus H5N1-detection of pathogens highly mobile in time an space. PLoS ONE 4, e6639

280. **Winkler, K., K.G. McCracken, D.D. Gibson, C.L. Pruet, R. Meier, F. Huettmann, M. Wege, I.V. Kulikova, Y.N. Zhuravlev, M.L. Perdue, E. Spackman, D.L. Suarez, D.E. Swayne (2007):** Movements of birds and avian influenza from Asia into Alaska. *Emerg. Infect. Dis.* 13, 547-552
281. **Xu, X., K. Subbarao, N. J. Cox, Y. Guo (1999):** Genetic characterization of the pathogenic influenza A/goose/Guangdong/1/96 (H5N1) virus: Similarity of its haemagglutinin gene to those of H5N1 viruses from the 1997 outbreaks in Hong Kong. *Virology* 261, 15-19
282. **Yamaguchi, N., J.W. Hupp, H.O. Higuchi, P.L. Flint, J.M. Pearce (2010):** Satellite-tracking of northern pintail *Anas acuta* during outbreaks of the H5N1 virus in Japan: implications for virus spread. *IBIS* 152, 262-271
283. **Zhang, G., D. Shoham, D. Gilichinsky, S. Davydov, J.D. Castello, S.O. Rogers (2006):** Evidence of Influenza A Virus RNA in Siberian Lake Ice. *J. Virol.* 80, 12229-12235
284. **Zhou, H., Z. Yu, Y. Hu, J. Tu, W. Zou, Y. Peng, J. Zhu, Y. Li, A. Zhang, Z. Yu, Z. Ye, H. Chen, M. Jin (2009):** The special neuraminidase stalk-motif responsible for increased virulence and pathogenesis of H5N1 influenza A virus. *PLoS One*. 4, e6277
285. **Zohari, S., P. Gyarmati, P. Thorén, G. Czifra, C. Bröjer, S. Belák, M. Berg (2008):** Genetic characterization of the NS gene indicates co-circulation of two sub-lineages of highly pathogenic avian influenza virus of H5N1 subtype in Northern Europe in 2006. *Virus Genes* 36, 117-125

11 Anhang

11.1 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Struktur des Influenza-A-Virions	14
Abb. 2: Replikation des Influenzavirus-Genoms	18
Abb. 3: Nachweis anzeigepflichtiger aviärer Influenza H5/H7/N1-Subtypen	30
Abb. 4: Geographische Verteilung der Fundorte von H5N1-positiven Wildvögeln in Bayern	90
Abb. 5: Phylogenetische Analyse des HA-Gens der HPAI H5N1-Viren aus Eurasien und der NPAI H5N1-Viren aus Amerika	94
Abb. 6: Phylogenetischer Baum des NA-Gens der HPAI H5N1-Viren aus Europa, Asien und der NPAI H5N1-Viren aus Amerika	99
Abb. 7: Phylogenetische Untersuchungen des PA-Gens der bayerischen HPAI H5N1-Viren (2006-2007)	100
Abb. 8: Phylogenetischer Baum des NP-Gens der HPAI H5N1-Viren aus Bayern (2006-2007)	101
Abb. 9: Phylogenetische Analyse des H5-Gens der NPAI-Viren aus Euroasien, Nord- und Südamerika	106
Abb. 10: Phylogenie des N1-Genoms der NPAI-Viren aus Europa, Asien, Nordamerika	109

In den Veröffentlichungen:

Publikation I (Abschnitt 4):

Fig. 1: Phylogenetic analysis of the H5 hemagglutinin genes	51
--	----

Publikation II (Abschnitt 5):

Fig. 1A. Phylogenetic tree of HPAI H5 sequences from selected wild-bird-origin viruses in Bavaria (2006, 2007)	63
Fig. 1B. Phylogenetic tree of HPAI N1 sequences from selected wild-bird-origin viruses in Bavaria (2006, 2007)	65
Fig. 2A. Phylogenetic tree of H5 sequences with selected LPAI viruses in Bavaria (2006, 2007)	70
Fig. 2B. Phylogenetic tree of N1 sequences with selected LPAI viruses in Bavaria (2006, 2007)	72

11.2 Tabellenverzeichnis

Tab.1: Funktion der durch die RNS-Genomsegmente der aviären Influenzaviren kodierten Proteine (Stamm A/PR/8/34 (H1N1))	16
Tab.2: Prävalenz der Influenza-A-Viren bei Wildvögeln in Surveillance-Studien (Auswahl)	34

Im Anhang (Abschnitt 11.3) befinden sich:

Tab.3: Veröffentlichte Sequenzen der Influenza-A-Viren (2006)	159
Tab.4: Publierte Gensequenzen aviärer Influenzaviren (2007)	161

In den Veröffentlichungen:**Publikation I (Abschnitt 4):**

Table 1. Summary of influenza A/H5N1 screening results	48
---	----

Table 2. Forward (for) and reverse (rev) PCR primers used for amplification and sequencing of the hemagglutinin gene (HA, primers INF-1 to INF-8) and the neuraminidase gene (NA, primers INF-23 to INF-28)	49
--	----

Publikation II (Abschnitt 5):

Table 1. Prevalence of wild-bird-origin Avian Influenza viruses in Bavaria	61
Table 2. Intra-and inter-genotypic sequence identities in HA and NA H5N1 (2006, 2007) based on pairwise sequence comparisons	67
Table 3. Amino acid comparison of H5 gene between HPAI and LPAI viruses	69

11.3 Im Rahmen dieser Arbeit sequenzierte Influenza A Viren

Tab.3: Veröffentlichte Sequenzen der Influenza-A-Viren (2006)

Name und der Subtyp der AIV-Sequenzen	Pathogenität	Gen-Datenbank Zugangsnummer in NCBI ¹			
		HA	NA	NP	PA
A/tufted duck/Bavaria/4/2006 (H5N1)	HPAI	EF165048	EF165571	-	-
A/buzzard/Bavaria/5/2006 (H5N1)	HPAI	EF165049	EF165572	-	-
A/swan/Bavaria/6/2006 (H5N1)	HPAI	EF165050	EF165573	-	-
A/common pochard/Bavaria/7/2006 (H5N1)	HPAI	EF165051	EF165574	-	-
A/tufted duck/Bavaria/8/2006 (H5N1)	HPAI	EF165052	-	-	-
A/tufted duck/Bavaria/9/2006 (H5N1)	HPAI	EF165053	EF165575	-	-
A/eagle owl/Bavaria/10/2006 (H5N1)	HPAI	EF165054	EF165576	-	-
A/common buzzard/Bavaria/11/2006 (H5N1)	HPAI	EF165055	EF165577	-	-
A/mute swan/Bavaria/12/2006 (H5N1)	HPAI	EF165056	EF165578	-	-
A/buzzard/Bavaria/13/2006 (H5N1)	HPAI	EF165057	EF165579	-	-
A/swan/Bavaria/14/2006 (H5N1)	HPAI	EF165058	EF165580	-	-
A/falcon/Bavaria/15/2006 (H5N1)	HPAI	EF165059	EF165581	-	-
A/swan/Bavaria/16/2006 (H5N1)	HPAI	EF165060	EF165582	-	-
A/swan/Bavaria/17/2006 (H5N1)	HPAI	EF165061	EF165583	-	-
A/goosander/Bavaria/18/2006 (H5N1)	HPAI	EF165062	EF165584	-	-
A/goldeneye duck/Bavaria/19/2006 (H5N1)	HPAI	EF165063	EF165585	-	-
A/goosander/Bavaria/20/2006 (H5N1)	HPAI	EF165064	EF165586	-	-
A/swan/Bavaria/21/2006 (H5N1)	HPAI	EF165065	EF165587	-	-
A/great crested grebe/Bavaria/22/2006 (H5N1)	HPAI	EF165066	EF165588	GU046732	GU046733
A/swan/Bavaria/23/2006 (H5N1)	HPAI	GU046706	GU046707	-	-
A/swan/Bavaria/24/2006 (H5N1)	HPAI	GU046708	GU046709	-	-
A/swan/Bavaria/25/2006 (H5N1)	HPAI	GU046710	GU046711	-	-

¹National Center for Biotechnology Information, AIV=Aviäre Influenza Virus, HA=Hämagglutinin, NA=Neuraminidase, NP=Nukleoprotein, PA=Polymerase acid Protein, HPAI=Hoch pathogene aviäre Influenza, NPAI=Niedrig pathogene aviäre Influenza, H? und N?=Der HA- bzw. NA-Subtyp ist unbekannt

Tab. 3: Fortsetzung

Name und der Subtyp der AIV-Sequenzen	Pathogenität	Gen-Datenbank Zugangsnummer in NCBI ¹			
		HA	NA	NP	PA
A/tufted duck/Bavaria/26/2006 (H5N1)	HPAI	GU046712	GU046713	GU046714	GU046715
A/tufted duck/Bavaria/27/2006 (H5N1)	HPAI	GU046716	GU046717	-	-
A/mute swan/Bavaria/28/2006 (H5N1)	HPAI	GU046718	GU046719	-	-
A/swan/Bavaria/29/2006 (H5N1)	HPAI	GU046720	GU046721	-	-
A/common pochard/Bavaria/30/2006 (H5N1)	HPAI	GU046722	GU046723	-	-
A/great crested grebe/Bavaria/31/2006 (H5N1)	HPAI	GU046724	GU046725	-	-
A/swan/Bavaria/32/2006 (H5N1)	HPAI	GU046726	GU046727	-	-
A/swan/Bavaria/33/2006 (H5N1)	HPAI	GU046728	GU046729	-	-
A/goosander/Bavaria/34/2006 (H5N1)	HPAI	GU046730	GU046731	-	-
A/mallard/Bavaria/35/2006 (H5N?)	NPAI	GU046734	-	-	-
A/mallard/Bavaria/36/2006 (H5N3)	NPAI	GU046735	GU046736	-	-
A/mallard/Bavaria/37/2006 (H5N?)	NPAI	GU046737	-	-	-
A/mallard/Bavaria/38/2006 (H5N3)	NPAI	GU046738	GU046739	-	-
A/mallard/Bavaria/39/2006 (H5N3)	NPAI	GU046740	GU046741	-	-
A/mallard/Bavaria/40/2006 (H5N?)	NPAI	GU046742	-	-	-
A/mallard/Bavaria/41/2006 (H5N?)	NPAI	GU046743	-	-	-
A/mallard/Bavaria/42/2006 (H1N1)	NPAI	GU046744	GU046745	-	-
A/wild duck/Bavaria/43/2006 (H1N1)	NPAI	-	GU046746	-	-
A/wild duck/Bavaria/44/2006 (H?N1)	NPAI	-	GU046747	-	-
A/wild duck/Bavaria/45/2006 (H1N1)	NPAI	-	GU046748	-	-
A/mallard/Bavaria/46/2006 (H?N1)	NPAI	-	GU046749	-	-
A/mallard/Bavaria/47/2006 (H?N1)	NPAI	-	GU046750	-	-
A/mallard/Bavaria/48/2006 (H?N1)	NPAI	-	GU046751	-	-
A/duck/Bavaria/49/2006 (H11N1)	NPAI	-	GU046753	-	-

¹National Center for Biotechnology Information, AIV=Aviäre Influenza Virus, HA=Hämagglutinin, NA=Neuraminidase, NP=Nukleoprotein, PA=Polymerase acid Protein, HPAI=Hoch pathogene aviäre Influenza, NPAI=Niedrig pathogene aviäre Influenza, H? und N?=Der HA- bzw. NA-Subtyp ist unbekannt

Tab.4: Publierte Gensequenzen aviärer Influenzaviren (2007)

Name und der Subtyp der AIV-Sequenzen	Pathogenität	Gen-Datenbank Zugangsnummer in NCBI ¹			
		HA	NA	NP	PA
<i>A/swan/Bavaria/2/2007 (H5N1)</i>	HPAI	GU046754	GU046755	GU046756	GU046757
<i>A/mute swan/Bavaria/3/2007 (H5N1)</i>	HPAI	GU046758	GU046759	-	-
<i>A/canada goose/Bavaria/4/2007 (H5N1)</i>	HPAI	GU046760	GU046761	-	-
<i>A/swan/Bavaria/5/2007 (H5N1)</i>	HPAI	GU046762	GU046763	-	-
<i>A/swan/Bavaria/6/2007 (H5N1)</i>	HPAI	GU046764	GU046765	-	-
<i>A/swan/Bavaria/7/2007 (H5N1)</i>	HPAI	GU046766	GU046767	-	-
<i>A/swan/Bavaria/8/2007 (H5N1)</i>	HPAI	GU046768	GU046769	-	-
<i>A/swan/Bavaria/9/2007 (H5N1)</i>	HPAI	GU046770	GU046771	-	-
<i>A/greylag goose /Bavaria/11/2007 (H5N1)</i>	HPAI	GU046772	GU046773	-	-
<i>A/wild duck/Bavaria/12/2007 (H5N1)</i>	HPAI	GU046774	GU046775	-	-
<i>A/wild duck/Bavaria/13/2007 (H5N1)</i>	HPAI	GU046776	GU046777	GU046778	GU046779
<i>A/wild duck /Bavaria/14/2007 (H5N1)</i>	HPAI	GU046780	GU046781	-	-
<i>A/swan/Bavaria/15/2007 (H5N2)</i>	NPAI	GU046782	GU046783	-	-

¹National Center for Biotechnology Information, AIV=Aviäre Influenza Virus, HA=Hämagglutinin, NA=Neuraminidase, NP=Nukleoprotein, PA=Polymerase acid Protein, HPAI=Hoch pathogene aviäre Influenza, NPAI=Niedrig pathogene aviäre Influenza

12 Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die zur Entstehung der vorliegenden Arbeit beigetragen haben.

An erster Stelle möchte ich mich bei meinen Betreuern Herrn Prof. Dr. Dr. Mathias Büttner, Frau PD Dr. Monika Rinder, Frau PD Dr. Antonie Neubauer-Juric und Mr. Dr. Webster, die mir das interessante Projekt zur Verfügung gestellt haben und mich in allen Phasen dieser Arbeit uneingeschränkt unterstützten. Ihre inhaltliche und formale Kritik sowie die ihre Anregungen und Verbesserungsvorschläge trugen maßgeblich zur Entwicklung meiner gesamten Dissertation bei. Ebenfalls bedanke ich mich beim Bayerischen Staatsministerium für Umwelt und Gesundheit für die Förderung des Projektes 05-19.

Zu großem Dank bin ich auch Herrn PD Dr. Heinz Rinder und Herrn Dr. Henju Marjuki für die Einführung in die phylogenetische Analyse bzw. in die Reverse Genetik sowie für viel Verständnis und anregende Diskussionen verpflichtet. PD Dr. Rinder und Dr. Marjuki nahmen sich stets Zeit, um mich bei der Lösung drängender Fragen mit Fachwissen und viel Engagement zu unterstützen.

Zum Gelingen dieser Arbeit haben Frau PD. Dr. Angela Hafner-Marx, Frau Ursula Deen und Frau Annette Rost durch ihre Hilfe bei experimentellen Fragen der histopathologischen Untersuchungen wesentlich beigetragen, ihnen gebührt ebenfalls mein herzlicher Dank.

Für ihre Hilfsbereitschaft und Unterstützung möchte ich meinen sehr herzlichen Dank Frau Dr. Cordula Fuchs, Frau Heike Lang, Frau Franziska Hovarth, Frau Isabella Stöhr, Frau Manuela Nienhaus, Mr. Scott Krauss, Mr. John Franks, Mrs. Heather Forrest und Ms. Kelly Johnson aussprechen.

Nicht zuletzt bedanke ich mich bei meinen Eltern, Großeltern und Geschwistern, die mir meinen Werdegang ermöglicht und mich stets unterstützt haben, sowie meinem Freund Joachim für die Hilfsbereitschaft.