

Untersuchungen zur Filtration von niedrig-pathogenen aviären Inflenzaviren (AIV) durch Dreikantmuscheln (*Dreissena polymorpha*) sowie zum Vorkommen von AIV bei Fischen und Schildkröten und deren Vermehrung in Zellen niederer Vertebraten

PETRA STUMPF



INAUGURAL-DISSERTATION zur Erlangung des Grades eines **Dr. med. vet.**
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2010

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2010

© 2010 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Institut für Virologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen
Betreuer: Prof. Dr. H.-J. Thiel
und
dem Institut für Umwelt- und Tierhygiene
der Universität Hohenheim
Betreuerin: PD Dr. R. E. Marschang

**Untersuchungen zur Filtration von niedrig-
pathogenen aviären Influenzaviren (AIV) durch
Dreikantmuscheln (*Dreissena polymorpha*) sowie
zum Vorkommen von AIV bei Fischen und
Schildkröten und deren Vermehrung in Zellen
niederer Vertebraten**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Petra Stumpf

Tierärztin aus Esslingen a.N.

Gießen 2010

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus- Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. habil. G. Baljer

Gutachter/in:

Prof. Dr. H.-J. Thiel

PD Dr. R. E. Marschang

Tag der Disputation: 16.09.2010

Meinen lieben Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	1
2. LITERATURÜBERSICHT	3
2.1. ORTHOMYXOVIRIDAE.....	3
2.2. GENUS INFLUENZAVIRUS A.....	4
2.2.1. <i>Morphologie der Influenza A Viren</i>	4
2.2.2. <i>Genetische Veränderbarkeit der Influenzaviren</i>	6
2.2.3. <i>Virusreplikation</i>	7
2.2.4. <i>Speziesspezifität</i>	8
2.2.5. <i>Pathogenität</i>	9
2.2.6. <i>Epidemiologie und Übertragung</i>	10
2.2.7. <i>Tenazität von Influenzaviren in Wasser</i>	12
2.2.8. <i>Gegenwärtige epidemiologische Situation</i>	14
2.2.8.1. <i>Hoch-pathogene Influenzaviren</i>	14
2.2.8.2. <i>Nachweis niedrig-pathogener Influenzaviren bei Wildvögeln in Deutschland</i>	15
2.3. ORTHOMYXOVIREN BEI POIKILOTHERMEN	16
2.3.1. <i>Reptilien und Amphibien</i>	16
2.3.2. <i>Fische</i>	17
2.4. FISCHE IM BODENSEE	19
2.5. DREIKANTMUSCHEL (DREISSENA POLYMORPHA (PALLAS, 1771))	22
2.5.1. <i>Systematik und Taxonomie</i>	22
2.5.2. <i>Vorkommen</i>	22
2.5.3. <i>Anatomie und Ernährung</i>	23
2.5.4. <i>Rolle der Dreikantmuschel als Biofilter</i>	24
3. MATERIAL UND METHODEN	27
3.1. ZELLKULTURMEDIEN, PUFFERLÖSUNGEN UND REAGENZIEN	27
3.1.1. <i>Virologische Untersuchungen</i>	27
TABELLE 3.4: ANZUCHTMEDIUM EPC UND RTG.....	28
Patricin	32
3.1.2. <i>Molekularbiologische Untersuchungen</i>	33
3.1.3. <i>Feldproben</i>	36
3.1.4. <i>Muschelversuche</i>	37
3.2. WEITERE MATERIALIEN UND GERÄTE.....	37
3.2.1. <i>Virologische Untersuchungen</i>	37
Zellkulturflaschen	37
3.2.2. <i>Molekularbiologische Untersuchungen</i>	38
3.2.3. <i>Feldproben</i>	39
3.2.4. <i>Muschelversuche</i>	39
3.3. EINGESETZTE ZELLINIEN	39
3.4. VERWENDETE VIRUSISOLATE UND VIRUSVERMEHRUNG SOWIE KONTROLLSEREN	41
3.5. VIRUSTITRATION	42
3.6. HÄMAGGLUTINATIONSTEST	43
3.7. HÄMAGGLUTINATIONS-HEMMUNGSTEST (HAH-TEST).....	43
3.8. ENZYME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA).....	45
3.9. RNA ISOLIERUNG.....	46
3.10. REAL-TIME REVERSE-TRANSCRIPTION-POLYMERASE CHAIN REACTION (RRT-PCR).....	47
3.11. QUANTITATIVE REAL-TIME REVERSE-TRANSCRIPTION-POLYMERASE CHAIN REACTION (QRR-PCR).....	48
3.11.1. <i>Klonierung</i>	49
3.11.2. <i>Sensitivität</i>	49
3.12. SEQUENZIERUNG	49
3.13. UNTERSUCHUNG DER FELDPROBEN VON BODENSEEFISCHEN	52
3.13.1. <i>Spikeversuche mit Fischproben</i>	52
3.13.2. <i>Organisation der Probenentnahme</i>	52
3.13.1. <i>Untersuchungszeitraum</i>	53

3.13.2.	<i>Untersuchungsgebiete</i>	53
3.13.3.	<i>Untersuchungsmaterial</i>	53
3.13.4.	<i>Probennahme und Transport</i>	53
3.13.5.	<i>Aufbereitung und Konservierung des Probenmaterials</i>	55
3.14.	UNTERSUCHUNG VON SCHILDKRÖTENSEREN	55
3.15.	LABORVERSUCHE MIT DREIKANTMUSCHELN	56
3.15.1.	<i>Spikeversuche mit Muschelmaterial</i>	56
3.15.2.	<i>Untersuchungsmaterial und Hälterung unter Laborbedingungen</i>	56
3.15.3.	<i>Eingesetztes Virus</i>	57
3.15.4.	<i>Exposition der Muscheln</i>	57
3.15.5.	<i>Reinwasserversuche</i>	57
3.15.5.1.	Präparation der Muscheln	58
3.15.5.2.	Virusnachweis mittels PCR	59
3.15.5.3.	Virusnachweis mittels Virusanzucht	59
3.15.5.4.	Statistische Auswertung	60
3.16.	ZELLKULTURVERSUCHE	61
3.16.1.	<i>Verwendete Virusisolate</i>	61
3.16.2.	<i>Infektion der Zellen</i>	62
3.16.3.	<i>Virusnachweis</i>	62
4.	ERGEBNISSE	64
4.1.1.	<i>Untersuchung der Feldproben von Bodenseefischen</i>	64
4.1.1.1.	Spikeversuche	64
4.1.1.2.	Untersuchung der Kiemen- und Schuppenproben sowie Rachen- und Kloakentupfer von Bodenseefischen mittels RRT-PCR	66
4.1.1.3.	Untersuchung von Fischseren mittels Hämagglutinations-Hemmungstest (HAH-Test) und Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)	68
4.1.2.	<i>Untersuchung von Schildkrötenseren</i>	70
4.1.2.1.	Untersuchung von Schildkrötenseren mittels Hämagglutinations-Hemmungstest (HAH-Test) und Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)	70
4.1.3.	<i>Laborversuche mit Dreikantmuscheln</i>	72
4.1.3.1.	Spikeversuche	72
4.1.3.2.	Vorversuche mit und ohne Desinfektion der Muscheloberfläche	73
4.1.3.3.	Kontaminationshauptversuche	82
4.1.4.	<i>Zellkulturversuche</i>	100
4.1.4.1.	Reptilienzellen	100
4.1.4.2.	Fischzellen	106
5.	DISKUSSION	112
5.1.	INFLUENZAVIREN BEI WECHSELWARMEN TIEREN	112
5.1.1.	<i>Feldproben</i>	112
5.1.1.1.	Spikeversuch	112
5.1.1.2.	Untersuchung der Kiemen- und Schuppenproben sowie der Rachen- und Kloakentupfer von Bodenseefischen mittels qRRT-PCR	113
5.1.1.3.	Untersuchung der Fisch- und Schildkrötenseren mittels Hämagglutinations-Hemmungstest (HAH-Test) und Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)	114
5.1.2.	<i>Zellkulturversuche</i>	117
5.2.	LABORVERSUCHE MIT DREIKANTMUSCHELN	119
5.2.1.	<i>Spikeversuche</i>	119
5.2.2.	<i>Kontamination von Dreikantmuscheln mit aviären Influenzaviren</i>	120
6.	ZUSAMMENFASSUNG	127
7.	SUMMARY	131
8.	LITERATURVERZEICHNIS	134
9.	ANHANG	156

Abbildungsverzeichnis

Abb. 2.1: Dreikantmuschel (<i>Dreissena polymorpha</i>)	23
Abb. 4.1: Spikeversuch Fischproben: Elution mittels Tufermedium und RNAlater™ RNA Stabilization Reagent Nachweisgrenze in unterschiedlichem Probenmaterial	65
Abb. 4.2: Übersicht Speziesverteilung beprobter Fische aus dem Bodensee.....	66
Abb. 4.3: Langenargen 4, Fisch 1-6, RRT-PCR, Amplification Plot.....	67
Abb. 4.4: Übersicht Speziesverteilung serologisch untersuchter Fische	68
Abb. 4.5: Spikeversuch mit Muschelmaterial: Zahl der nachgewiesenen RTPCRU/ml in Proben mit und ohne Muschelfleisch nach Zugabe von LPAI H5N1 Virus in 10er Verdünnungsschritten.	72
Abb. 4.6: Versuch mit dem H5N1 Virusisolat. Desinfektion der Oberfläche mit 1%iger Virkon®-Lösung: Ergebnisse der Muschel- und Wasserproben bei einer Inkubationstemperatur von 4°C detektiert mittels qRRT-PCR	74
Abb. 4.7: Versuch mit dem H5N1 Virusisolat. Desinfektion der Oberfläche mit VennoVet® 1 super: Ergebnisse der Muschel- und Wasserproben bei einer Inkubationstemperatur von 4°C detektiert mittels qRRT-PCR	76
Abb. 4.8: Versuch mit dem H5N1 Virusisolat ohne Desinfektion der Oberfläche: Ergebnisse der Muschel- und Wasserproben bei einer Inkubationstemperatur von 4°C detektiert mittels qRRT-PCR	77
Abb. 4.9: Versuch mit dem H4N6 Virusisolat. Desinfektion der Oberfläche mit 1%iger Virkon®-Lösung: Ergebnisse der Muschel- und Wasserproben bei einer Inkubationstemperatur von 4°C detektiert mittels qRRT-PCR	78
Abb. 4.10: Versuch mit dem H4N6 Virusisolat. Desinfektion der Oberfläche mit VennoVet® 1 super: Ergebnisse der Muschel- und Wasserproben bei einer Inkubationstemperatur von 4°C detektiert mittels qRRT-PCR	80
Abb. 4.11: Versuch mit dem H4N6 Virusisolat ohne Desinfektion der Oberfläche: Ergebnisse der Muschel- und Wasserproben bei einer Inkubationstemperatur von 4°C detektiert mittels qRRT-PCR	81
Abb. 4.12: Erster Hauptversuch: Kontamination mit H5N1: Ergebnisse der Muschel- und Wasserproben bei einer Inkubationstemperatur von 4°C detektiert mittels qRRT-PCR	83
Abb. 4.13: Erster Hauptversuch: Kontamination mit H5N1: Virusgehalt der Muschel- und Wasserproben bei einer Inkubationstemperatur von 4°C detektiert mittels Titration auf embryonierten Hühnereiern	84
Abb. 4.14: Erster Hauptversuch: Kontamination mit H5N1: Ergebnisse der Muschel- und Wasserproben bei einer Inkubationstemperatur von 19°C detektiert mittels qRRT-PCR	85
Abb. 4.15: Erster Hauptversuch: Kontamination mit H5N1: Virusgehalt der Muschel- und Wasserproben bei einer Inkubationstemperatur von 19°C detektiert mittels Titration auf embryonierten Hühnereiern	86
Abb. 4.16: Zweiter Hauptversuch: Kontamination mit H5N1: Ergebnisse der Muschel- und Wasserproben bei einer Inkubationstemperatur von 4°C detektiert mittels qRRT-PCR	88
Abb. 4.17: Zweiter Hauptversuch: Kontamination mit H5N1: Virusgehalt der Muschel- und Wasserproben bei einer Inkubationstemperatur von 4°C detektiert mittels Titration auf embryonierten Hühnereiern	89
Abb.4.18: Zweiter Hauptversuch: Kontamination mit H5N1: Ergebnisse der Muschel- und Wasserproben bei einer Inkubationstemperatur von 19°C detektiert mittels qRRT-PCR	90

Abb. 4.19: Zweiter Hauptversuch: Kontamination mit H5N1: Virusgehalt der Muschel- und Wasserproben bei einer Inkubationstemperatur von 19°C detektiert mittels Titration auf embryonierten Hühnereiern	91
Abb. 4.20: Dritter Hauptversuch: Kontamination mit H5N1: Ergebnisse der Muschel- und Wasserproben bei einer Inkubationstemperatur von 4°C detektiert mittels qRRT-PCR	93
Abb. 4.21: Dritter Hauptversuch: Kontamination mit H5N1: Virusgehalt der Muschel- und Wasserproben bei einer Inkubationstemperatur von 4°C detektiert mittels Titration auf embryonierten Hühnereiern	94
Abb. 4.22: Dritter Hauptversuch: Kontamination mit H5N1: Ergebnisse der Muschel- und Wasserproben bei einer Inkubationstemperatur von 19°C detektiert mittels qRRT-PCR	95
Abb. 4.23: Dritter Hauptversuch: Kontamination mit H5N1: Virusgehalt der Muschel- und Wasserproben bei einer Inkubationstemperatur von 19°C detektiert mittels Titration auf embryonierten Hühnereiern	96
Abb. 4.24: IgH2 Zellen, Negativkontrolle, 40fache Vergrößerung	101
Abb. 4.25: IgH2 Zellen, H5N1 unverdünnt 4 Tage p.i., 40fache Vergrößerung.....	101
Abb. 4.26: : TH1 Zellen, Negativkontrolle, 40fache Vergrößerung	102
Abb. 4.27: TH1 Zellen, H5N1 unverdünnt 4 Tage p.i., 40fache Vergrößerung.....	102
Abb. 4.28: IgH2 Zellen, Negativkontrolle Abb. 4.29: IgH2 Zellen, H5N1 unverdünnt,.....	103
Abb. 4.30: Ergebnisse der qRRT-PCR vom Zellkulturüberstand. IgH2, VH2 und TH1, 0, 2 und 8 Tage p.i.. Eingesetzt wurde ein LPAI H5N1 Isolat unverdünnt und 1:10 verdünnt. An Tag 0 blieben die Werte der IgH2 und VH2 Zellen unter dem Detektionsniveau der qRRT-PCR	104
Abb. 4.31: Ergebnisse der qRRT-PCR vom Zellkulturüberstand. IgH2, VH2 und TH1, 0, 2 und 8 Tage p.i. Eingesetzt wurde das Humanisolat H3N2 unverdünnt und 1:10 verdünnt. An Tag 0 blieben die Werte der IgH2 und TH1 Zellen unter dem Detektionsniveau der qRRT-PCR	105
Abb. 4.32: Ergebnisse der Eititration vom Zellkulturüberstand. IgH2, VH2 und TH1 Zellen, 0, 2 und 4 Tage p.i. mit einem LPAI H5N1 Isolat.....	106
Abb. 4.33: Ergebnisse der qRRT-PCR vom Zellkulturüberstand der SAF an Tag 0, 2 und 8 p.i. Eingesetzt wurde das LPAI H5N1 Virusisolat, unverdünnt und 1:10 verdünnt. An Tag 0 blieben die Werte unter dem Detektionsniveau der qRRT-PCR.....	108
Abb. 4.34: Ergebnisse der qRRT-PCR vom Zellkulturüberstand der FHM an Tag 0, 2 und 8 p.i. Eingesetzt wurde das LPAI H5N1 Virusisolat, unverdünnt und 1:10 verdünnt.	109
Abb. 4.35: Ergebnisse der qRRT-PCR vom Zellkulturüberstand der SAF an Tag 0, 2 und 8 p.i. Eingesetzt wurde das Humanisolat (H3N2), unverdünnt und 1:10 verdünnt. An Tag 0 blieben die Werte unter dem Detektionsniveau der qRRT-PCR.....	109
Abb. 4.36: Ergebnisse der qRRT-PCR vom Zellkulturüberstand der FHM an Tag 0, 2 und 8 p.i. Eingesetzt wurde das Humanisolat (H3N2), unverdünnt und 1:10 verdünnt. An Tag 0 blieben die Werte unter dem Detektionsniveau der qRRT-PCR.....	110
Abb. 4.37: Ergebnisse der Eititration vom Zellkulturüberstand. FHM, 0, 2 und 4 Tage p.i. mit einem LPAI H5N1 Isolat.....	111

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1: Übersicht Orthomyxoviren.....	4
Tabelle 3.1: Anzuchtmedium VH2, TH-1, SAF-1 und FHM	28
Tabelle 3.2: Anzuchtmedium IgH2.....	28
Tabelle 3.3: Anzuchtmedium MDCK.....	28
Tabelle 3.4: Anzuchtmedium EPC und RTG	28
Tabelle 3.5: Erhaltungsmedium für Reptilienzellen (IgH2, TH-1 und VH2)	29
Tabelle 3.6: Erhaltungsmedium für Fischzellen (SAF-1, FHM, EPC und RTG)	29
Tabelle 3.7: Tupfermedium für Fischproben.....	29
Tabelle 3.8: Erhaltungsmedium für MDCK	30
Tabelle 3.9: Anzuchtmedium für CHSE-214.....	30
Tabelle 3.10: Primer und Sonde für die RRT-PCR zur Detektion einer Influenza A Virus M-Gen-Sequenz nach SPACKMAN et al. (2002), modifiziert nach VOGEL und ALT (2005)....	48
Tabelle 3.11: Ansatz des Primer-Sonden-Mix nach HOFFMANN (2006).....	48
Tabelle 3.12: AI-HA5-Spaltstellensequenzierung nach HARDER (2007).....	50
Tabelle 3.13: Primer-Sequenzen für einen Teil des H-Gen bei H5 Influenzaviren nach HARDER (2007).....	50
Tabelle 4.1: Ergebnisse des HAH-Tests mit H6N8, H5N1 und H4N6 Virusantigen: Fische mit einer Hämagglutinationshemmung von mindestens eines der eingesetzten Viren. Titer > 16 wurden als positiv gewertet. LA (=Langenargen); RE (=Reichenau).....	69
Tabelle 4.2: Ergebnisse des HAH-Tests mit H6N8, H5N1 und H4N6 Virusantigen: Schildkrötenserum aus Großbritannien mit einer Hämagglutinationshemmung.	71
Tabelle 9.1: Fischproben Langenargen	156
Tabelle 9.2: Fischproben Insel Reichenau.....	160

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
AG	Aktiengesellschaft
AI	Aviäre Influenza
ATCC	American Type Culture Collection
BME	Basal Medium Eagle
Bp	Basenpaare
BSc	Bachelor of Science
Buffer RLT	Buffer RLT RNeasy Lysis Buffer (Qiagen GmbH, Hilden)
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CHSE-214	Chinook salmon embryo Zellen
cm ²	Quadratcentimeter
Ct	Threshold Cycle = „Schwellenwert-Zyklus“
CVUA	Chemisches- und Veterinäruntersuchungsamt
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's Minimum Essential Medium
Dr.	Doktor
Dr. sc. agr.	Doctor of Agricultural Sciences
d.h.	das heißt
DVM	Doctor of Veterinary Medicine
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EID ₅₀	mittlere eiinfektiöse Dosis
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EPC	Epithelioma papulosum cyprini Zellen
et al	et alteri oder et alii (und andere)
F	Forward Primer
FHM	Fat head minnow caudal trunk Zellen
FKS	Fötales Kälberserum
FLI	Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit, Insel Riems

g	relative Zentrifugationskraft (entspricht „rcf“)
G	Größe (cm)
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
GW	Gewicht (g)
HA	Hämagglutinin
HAH-Test	Hämagglutinationshemmungs-Test
HI-test	Hemagglutination Inhibition test
HPAI	High pathogenic avian influenza
IgH2	Iguana heart Zellen
Inc.	Incorporated
K	Lysin (basische Aminosäure)
Kb	Kilobasen
KGaA	Kommanditgesellschaft auf Aktien
Ki	Kiemen
KID ₅₀	mittlere kultur-infektiöse Dosis
KT	Kloakentupfer
LA	Langenargen, Bodensee
LB	Luria Bertani
Lg	dekadischer Logarithmus zur Basis 10
LGA	Landesgesundheitsamt, beim Regierungspräsidium Stuttgart
LPAI	Low pathogenic avian influenza
LUBW	Landesanstalt für Umwelt, Messungen und Naturschutz Baden-Württemberg (LUBW)
MDCK	Madin Darby canine kidney Zellen
MEM	Minimum Essential Medium (Eagle) mit Earle's Salzen
M-Gen	Matrix-Gen
mg	Milligramm
min	Minute
Milli-Q®	Millipore® Wasser
ml	Milliliter
mm	Millimeter

MSc	Master of Science
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
NA	Neuraminidase
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NEA	nicht-essentielle Aminosäuren
NK	Negativkontrolle
NP	Nukleoprotein
Nr.	Nummer
No.	Number
NS1	nicht-strukturelles Protein 1
NS2	nicht-strukturelles Protein 2
PA	Polymeraseprotein A
PB1	Polymeraseprotein B1
PB2	Polymeraseprotein B2
PBS	Phosphate-buffered-saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PEG	Polyethylenglykol
pH	Potentia Hydrogenii
p.i.	post infectionem
PK	Porcine Kidney Zellen
ppm	parts per million
qRRT-PCR	quantitative Real-time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
R	Arginin (basische Aminosäure)
rcf	Relative Zentrifugationskraft (entspricht "g")
RE	Insel Reichenau, Bodensee
RNA	Ribonukleinsäure
RNP	Ribonukleoprotein
RRT-PCR	Real-time Reverse Transcription Polymerase Chain Re- action

RT	Reverse Transkriptase
RT	Rachentupfer
RTG2	Rainbow trout gonadal tissue Zellen
Rw	Reverse Primer
S	Sonde
SAF-1	Adult gilt-head seabream fin tissue Zellen
Schu	Schuppen
TCID ₅₀	Mean Tissue Culture Infectious Dose
TH-1	<i>Terrapene</i> heart Zellen
TM	Trademark
TMB	(siehe ELISA)
U	Units
u.a.	und andere
UK	United Kingdom
USA	United States of America
v.a.	vor allem
vgl	vergleiche
VH2	Viper heart Zellen
v/v	Volume to Volume
z.B.	zum Beispiel
ZPE	zytopathischer Effekt

1. EINLEITUNG

Viren des Genus *Influenzavirus A* (Familie: *Orthomyxoviridae*) sind behüllte Viren mit einer einzelsträngigen, segmentierten RNA negativer Polarität. Sie kommen bei verschiedensten Säugetier- und Vogelspezies sowie dem Menschen vor. Die klassische Geflügelpest wird durch hoch-pathogene aviäre Influenzaviren ausgelöst. Sie ist eine weltweit gefürchtete Erkrankung mit zoonotischem Potenzial, welche in regelmäßigen Abständen zu verlustreichen Ausbrüchen führt. Sie ist in Deutschland eine anzeigepflichtige Erkrankung und wird in der Liste der O.I.E. (früher Liste A) geführt. Die Tierseuche scheint mit dem Subtyp H5N1 seit einiger Zeit in Südostasien endemisch zu sein. Aber auch in Europa kam es immer wieder zu Ausbrüchen. Niedrig-pathogene aviäre Influenzaviren kommen – oftmals klinisch inapparent – bei Wirtschafts- und Wildgeflügel vor. Wildvögel gelten als das genetische Reservoir für alle aviären Influenzaviren.

Obwohl Influenzaviren ein sehr breites Wirtsspektrum haben und Orthomyxoviren auch bei Fischen vorkommen (Genus *Isavirus*), gibt es bisher noch keine eindeutigen Nachweise von Influenzaviren bei poikilothermen Tieren. Im Jahre 2006 kam es zum Ausbruch der hoch-pathogenen Form der Aviären Influenza (H5N1) bei Wildvögeln in der Bodenseeregion. Bereits im Vorfeld traten immer wieder Ausbrüche dieser Erkrankung in Gewässernähe auf. Auch wenn Wasservögel für die Einschleppung verantwortlich gemacht wurden, sind die genauen epidemiologischen Zusammenhänge nicht vollständig geklärt. Aquatische Organismen wie Fische und Dreikantmuscheln (*Dreissena polymorpha*) dienen Vögeln als Nahrungsgrundlage. Somit sind beide Tierarten bei der Epidemiologie der Aviären Influenza als potentielle Überträger zu berücksichtigen. Muscheln können verschiedene humanpathogene Viren (wie z.B. das Hepatitis A-Virus) aufnehmen und anreichern. Bei Influenzaviren wäre denkbar, dass Virusmaterial aus dem Kot infizierter Vögel von solchen Invertebraten aufgenommen und angereichert werden kann.

Mit der vorliegenden Arbeit sollte ein Beitrag zur Klärung epidemiologischer Zusammenhänge bei der Verbreitung und Übertragung der Aviären Influenza geleistet werden. Im Rahmen der Untersuchungen wurde in experimentellen Ansätzen die Vermehrung der Influenzaviren in verschiedenen Zellkulturlinien von Fischen und Reptilien unter unterschiedlichen Temperaturbedingungen untersucht. Zusätzlich wurde im Labor geprüft, ob Influenzaviren in Dreikantmuscheln angereichert werden und überleben können. Kiemen- und Schuppenproben sowie Rachen- und Kloakentupfer von Fischen aus dem Bodensee wurden molekularbiologisch untersucht. Weiterhin erfolgten serologische Untersuchungen auf Antikörper gegen aviäre Influenzaviren bei Fischen. Anhand der Untersuchungsergebnisse können Rückschlüsse auf die Verbreitungswege und Vektoren der Viren im Falle eines Ausbruchs von Aviärer Influenza in Wildtierpopulationen gezogen werden.

2. LITERATURÜBERSICHT

2.1. Orthomyxoviridae

In der Familie der *Orthomyxoviridae* [*orthos* (gr.) gerade; *myxa* (gr.) Schleim] wie in Tabelle 2.1 dargestellt, werden behüllte Viren mit einer einzelsträngigen, segmentierten RNA negativer Polarität zusammengefasst. Die Virionen sind sphärisch oder pleomorph mit einem Durchmesser von 80-120 nm (KAWAOKA et al., 2005). Die Zahl der Segmente variiert je nach Genus: Während die Genera *Influenzavirus A*, *B* und *Isavirus* 8 Segmente besitzen, hat das *Influenzavirus C* 7 und das *Thogotovirus* lediglich 6 Segmente. Die Genomgröße variiert zwischen 10,0 bis 14,6 kb (KAWAOKA et al., 2005). Während Influenza A- und B-Viren morphologisch nicht unterschieden werden können, zeichnen sich Influenza C-Viren durch eine annähernd hexagonale Anordnung ihres Glykoproteins aus (MÜLLER, 2006). Die Influenza A-Viren sind von bedeutendem veterinärmedizinischen Interesse, da sie verschiedenste Säugetierspezies (inklusive dem Menschen) sowie Vögel infizieren können. Die Influenzaviren B und C sind vor allem von humanmedizinischem Interesse, wobei auch Schweine mit Influenzavirus C infiziert werden können (WERNER und KALETA, 2005; KAWAOKA et al., 2005; FENNER et al., 1993). Thogotoviren werden durch Zecken übertragen. Im Gegensatz zu Influenzaviren verursachen sie keine respiratorischen Erkrankungen (KAWAOKA et al., 2005). Zum Genus *Isavirus* gehört bisher lediglich das Infectious Salmon Anemia Virus (MODROW, 2003).

Tabelle 2.1: Übersicht Orthomyxoviren

Familie	<i>Orthomyxoviridae</i>
Genus	Influenzavirus A <u>Typspezies</u> Influenza A-Virus (Säugetiere, Vögel)
Genus	Influenzavirus B <u>Typspezies</u> Influenza B-Virus (nur Mensch)
Genus	Influenzavirus C <u>Typspezies</u> Influenza C-Virus (Mensch und Schwein)
Genus	Thogotovirus <u>Typspezies</u> Thogoto-Virus (Mensch, verschiedene Tierarten)
Genus	Isavirus <u>Typspezies</u> Infectious Salmon Anemia-Virus (Fische)

2.2. Genus Influenzavirus A

Viren des Genus *Influenzavirus A* kommen v.a. bei Vögeln vor und verursachen die Aviäre Influenza. Die Erstbeschreibung der Aviären Influenza geht zurück auf das Jahr 1878, als Perroncito in Norditalien eine kontagiöse Erkrankung des Geflügels mit hoher Mortalität beschrieb (LUPIANI und REDDY, 2009). Die erste Isolierung eines Influenza A-Virus von Menschen gelang 1933. SMITH et al. (1933) haben Flüssigkeiten aus Rachenspülungen von erkrankten Menschen auf Frettchen übertragen. Diese waren auch nach Passage durch bakteriendichte Filter noch infektiös. Dennoch dauerte es noch bis 1955, bis die klassische Geflügelpest anhand der typspezifischen Ribonucleoproteine als Typ A Influenzavirus identifiziert werden konnte (LUPIANI und REDDY, 2009).

2.2.1. Morphologie der Influenza A Viren

Influenza A-Viren unterscheiden sich von Influenzaviren Typ B und C anhand ihrer Gruppenantigene, dem Ribonucleoprotein (RNP) und dem Matrixprotein (M1) (WEBSTER et al., 1992). Die rundlich-pleomorphen Virionen sind 75-120 nm groß. Die 8 Genomsegmente haben eine Größe von jeweils 890 bis

2.341 Nukleotiden (GÜRTLER, 2006), die für insgesamt 10 virale Proteine kodieren (WERNER und KALETA, 2005). Sechs der Segmente codieren jeweils für ein einziges Protein und die Segmente 7 und 8 für je zwei (M1, M2 und NS1, NS2) (KAWAOKA et al., 2005). In die Lipidhülle sind drei virale Komponenten eingebaut: die beiden Glykoproteine Hämagglutinin (HA) und Neuraminidase (NA) und das Matrixprotein 2 (M2), das Ionenkanalaktivität hat. Das HA macht einen Großteil der Virusoberfläche aus und ist die Hauptkomponente, gegen die neutralisierende Antikörper induziert werden (SCHOLTISSEK, 2006). Es ist verantwortlich für die Bindung der Virionen an die Wirtszellenrezeptoren und für die Fusion der Virushülle mit der Wirtszelle (WEBSTER et al., 1992). Die NA ist ebenfalls ein integrales Membranglykoprotein und stellt das zweitwichtigste Oberflächenantigen auf dem Virion dar. Die NA spaltet die terminale Sialinsäure von Glykoproteinen oder Glykolipiden ab. Dies ermöglicht die Freisetzung neusynthetisierter Virionen aus der Zelle, in welcher sie produziert wurden und erleichtert somit die Virusverbreitung (WEBSTER et al., 1992).

Basierend auf der Antigenität der Oberflächenglykoproteine ist in Anlehnung an das WHO MEMORANDUM (1980) eine serologische Differenzierung in 16 H-Subtypen und 9 N-Subtypen möglich.

Das größte Protein ist das Matrixprotein (M1), welches aus vielen identischen kleinen Monomeren zusammengesetzt ist. Diese sind mit der inneren Oberfläche der Lipiddoppelschicht der Virushülle assoziiert (FENNER et al., 1993). M1 ist auch mit dem im Inneren des Virions gelegenen helikalen Ribonukleoprotein-Komplex (RNP) assoziiert (MÜLLER, 2006). Das M2-Protein ist als Tetramer in großer Zahl an der Oberfläche infizierter Zellen zu finden. Im Virion ist es in kleiner Zahl vorhanden. Man geht davon aus, dass es als Protonenkanal fungiert um den pH-Wert des Golgi-Apparates während der HA-Synthese zu kontrollieren und um die Ansäuerung im Inneren des Virions während des Uncoating-Prozesses zu ermöglichen (WEBSTER et al., 1992). Das Nukleokapsid (RNP) im Inneren besteht aus den drei Polymeraseproteinen PB1, PB2 und PA, dem Nukleoprotein (NP) und der viralen RNA

(SCHOLTISSEK, 2006). Die nicht-strukturellen Proteine NS1 und NS2 spielen beide bei der Virusreplikation eine Rolle (WEBSTER et al., 1992).

2.2.2. Genetische Veränderbarkeit der Influenzaviren

Influenzaviren haben eine hohe Frequenz von antigenetischen Variationen in ihren Oberflächenproteinen (HA und NA) aufgrund von zwei Phänomenen: Antigen shift und Antigen drift (SWAYNE und HALVORSON, 2008).

Antigen drift

Wie bei allen RNA-Viren werden häufig Punktmutationen beobachtet (MÜLLER, 2006). Die RNA-abhängige RNA-Polymerase der Influenzaviren hat eine hohe Fehlerrate beim Einbau der komplementären Basen beim Replikationsprozess und inkorporiert mit einer Häufigkeit von etwa 10^{-5} falsche Basen in die RNA-Stränge, die statistisch über das ganze Genom verteilt sind (MODROW, 2003). Diese können zu Veränderungen der antigenetischen Eigenschaften des Virus führen, wodurch eine bestehende Immunität unwirksam werden kann (MÜLLER, 2006). Laut WEBSTER et al. (1992) kommt es im HA-Gen zu etwa einer Basensubstitution pro Virusgeneration. Die Nukleotidaustausche führen bei menschlichen Influenza A-Virusstämmen in ca. 50 Prozent der Fälle zu Aminosäure-Austauschen (MÜLLER, 2006). Durch diese Veränderungen im HA kommt es immer wieder in den Wintermonaten zu lokalen Epidemien (beim Menschen) (SCHOLTISSEK, 2006). Solche Austausche werden bei aviären Influenza A-Virusstämmen seltener beobachtet. Auch das HA von Influenza B-Viren scheint sich langsamer zu verändern (MÜLLER, 2006).

Antigen shift

Aufgrund des segmentierten Genoms kann es vor allem bei den Influenza A-Viren bei der Doppel- oder Mehrfachinfektion einer Wirtszelle mit nahe verwandten Viren zum Austausch eines oder mehrerer Segmente (Reassortment) kommen, so dass vermehrungsfähige Nachkommenviren mit Teilen der genetischen Information beider Elternviren entstehen können (Reassor-

tanten). Hierdurch kann ein Organismus mit Viren infiziert werden, die für sein Immunsystem völlig neue Antigenstrukturen enthalten und für die er daher voll empfänglich ist (MÜLLER, 2006). Die Tatsache, dass in den meisten kommerziellen Geflügelhaltungen Influenzaviren nicht endemisch sind, mehrten Zweifel an der Bedeutung des Antigen-shifts bei der Produktion neuer Stämme; jedoch wurde auf Geflügelmärkten ein Antigen-shift bei den HA und/oder NA-Subtypen dokumentiert (SWAYNE und HALVORSON, 2008). Anfang März 2009 trat weltweit ein humanes Influenzavirus (H1N1) auf, das sich als Reassortante von aviären, humanen und porcinen Influenzaviren erwies und das potentielle Risiko von Reassortanten untermauerte (GALLAHER, 2009).

2.2.3. Virusreplikation

Die Influenzaviren binden über ihre HA-Oberflächenproteine an die Sialylsäuren auf der Zelloberfläche. Die Adsorption des Virus an endständige N-Acetyl-Neuraminsäuren (Sialylsäuren), die sich als Modifikation von Membranproteinen oder -lipiden auf der Zelloberfläche befinden, wird durch eine globuläre Domäne im HA-Protein vermittelt (MODROW et al., 2003). Das Eindringen (Penetration) des genetischen Materials in die Wirtszelle wird durch eine Rezeptor-vermittelte Endozytose über Clathrin-beschichtete, Membran-gebundene Vesikel eingeleitet (MÜLLER, 2006). Durch den niedrigen pH-Wert kommt es in den Vesikeln zur Konformationsänderung des HAS mit der Exposition des fusogenen Peptids, wodurch die Fusion der viralen Membran mit der endosomalen Membran erfolgt. Durch die gleichzeitige Ansäuerung des Virusinneren (mit Hilfe des M2) wird die genannte Verbindung zwischen M1 und RNP gelöst und das RNP freigesetzt (uncoating), welches daraufhin in den Kern der Wirtszelle transportiert wird (WEBSTER et al., 1992; MÜLLER, 2006). Hier erfolgen Transkription und Replikation durch den Polymerasen-Komplex wobei die vRNA als „template“ dient (MÜLLER, 2006). Die primären Transkripte werden für die Translation der viralen Proteine verwendet, diese sind in den frühen Infektionsstadien vor allem NP und NS1. Die Translation der wirtseigenen mRNA ist blockiert (WEBSTER et al.,

1992). Der Translation geht der Export der mRNAs in das Zytoplasma voraus (MÜLLER, 2006). In einem späteren Infektionsstadium sind die Proteine M1, HA und NA die hauptsächlichen Translationsprodukte. HA und NA Proteine werden posttranslational (im rauen endoplasmatischen Retikulum und Golgi-Apparat, MÜLLER, 2006) modifiziert und zur Zellmembran transportiert (WEBSTER et al., 1992).

An der Zellmembran findet nach MÜLLER (2006) ein als „Knospung“ (budding) bezeichneter Vorgang statt. Die durch die Einlagerung viraler Glykoproteine veränderte Zellmembran wird von den neuen Viruspartikeln übernommen und es findet - unterstützt durch das Glykoprotein NA - die Freisetzung der Viren von der Oberfläche der Wirtszelle statt. Bei den meisten Influenzaviren findet die Spaltung des HA0-Proteins in HA1 und HA2 extrazellulär mittels wirtseigenen Proteasen statt (WEBSTER et al., 1992). Zu den Proteasen, die an diesem Vorgang beteiligt sind, zählen: Die Furinprotease der Golgi-Vesikel; die subtilisinähnlichen Proteasen, die in den Zellen vieler Gewebetypen vorkommen; das Mini-Plasmin, das speziell in den Epithelzellen der Segmentbronchien aus den Vorläuferprodukten Plasminogen oder Plasmin gebildet wird; und die Protease Clare, die von den so genannten Clara-Zellen der terminalen, respiratorischen Bronchiolen sezerniert wird. Welche der Proteasen für die Prozessierung des HA0-Proteins verwendet wird, bestimmt die Aminosäuresequenz im Bereich der Spaltstelle (MODROW et al., 2003).

2.2.4. Speziesspezifität

Bei der Anheftung (Adsorption) binden Influenzaviren an Sialylsäure-haltige Oberflächenglykoproteine oder -lipide mittels der Rezeptorbindungsstelle am Kopfteil des HA (MÜLLER, 2006). Für die Interaktion ist wichtig, in welcher Weise die endständigen Sialylsäurereste mit dem vorletzten Zuckerrest der Kohlenhydratmodifikationen, einer Galaktose, verbunden sind (MODROW et al., 2003). Menschliche Influenza A Viren binden besonders gut an Sialylsäuren, die in der $\alpha(2,6)$ -Bindung endständig an die Galaktose des Rezeptors

auf der Wirtszelle verknüpft sind (SCHOLTISSEK, 2006). Influenzaviren von Vögeln und Pferden bevorzugen die $\alpha(2,3)$ -Verknüpfung (SCHOLTISSEK, 2006). Somit ist der Übergang aviärer Stämme auf den Menschen eingeschränkt (MÜLLER, 2006). In Schweinen findet man beide Glykosylierungstypen. Sie nehmen gewissermaßen eine Zwischenstellung zwischen Menschen sowie Pferden und Vögeln ein (MODROW et al., 2003).

2.2.5. Pathogenität

Aviäre Influenzaviren werden auf Grundlage ihrer genetischen Eigenschaften und der Schwere der Krankheit bei Geflügel als hoch-pathogene (HPAI) oder als niedrig-pathogene aviäre Influenzaviren (LPAI) klassifiziert. Bisher waren nur Vertreter der H5 und H7 Subtypen hoch-pathogen; Subtypen mit anderen Hämagglutininen waren immer niedrig-pathogen. Es existieren auch LPAI H5 und H7 Viren (ANONYM, 2007a). In Bereichen, in denen Sekundärinfektionen und andere Stressoren die Krankheitsentwicklung beeinflussen, können LPAI Viren allerdings dennoch in manchen Fällen schwerwiegende und ökonomisch wichtige Erkrankungen auslösen (SWAYNE und HALVORSON, 2008). Obwohl das Influenzavirus von Wildvögeln gewöhnlich als niedrig-pathogenes Virus übertragen wird, kann es während der Replikation im Hausgeflügel mutieren und es können hoch-pathogene aviäre Influenzaviren entstehen (WHO, 2007).

Auch unter Laborbedingungen können nach einigen Passagen in Hühnern (Inokulation in Luftsack bzw. Gehirn) durch Mutationen in der HA-Spaltstellensequenz hoch-pathogene Influenzaviren entstehen (ITO, 2001). Zur Abklärung ob es sich bei einem AI Virus um ein hoch- oder niedrig-pathogenes Virus handelt, können nach der U.S. Animal Health Association (USAHA, 1994) sowie der OIE (ALEXANDER, 1996) folgende Kriterien herangezogen werden:

Als hoch-pathogen gilt das Virus, wenn es in der Lage ist, nach intravenöser Infektion 6-8 von acht Hühnern (4-6 Wochen alt) innerhalb von 10 Tagen zu töten. Verwendet werden 0,2 ml einer bakterienfreien Allantoisflüssigkeit

(1:10 verdünnt). Alternativ hierzu wird ein H5 oder H7 Isolat als hochpathogen eingestuft, wenn es eine Aminosäuresequenz an der Hämagglutininspaltstelle aufweist, die mit hochpathogenen Viren identisch ist. Nach HIRST et al. (2004) wird bei allen HPAI-Isolaten die Spaltstelle von mehreren basischen Aminosäuren (R und K) flankiert. Im Gegensatz dazu haben LPAI-Viren 2 basische Aminosäuren an Position -1 bis -4 der Spaltstelle (bzw. -1 und -3 bei H7). Diese Viren sind nach SWAYNE und HALVORSON (2008) auf die Spaltung durch bestimmte gewebespezifische Wirtsproteasen, wie trypsinähnliche Enzyme, angewiesen und daher auf bestimmte Organe des Wirtsorganismus, den Epithelbereich des Respirations- und Gastrointestinaltraktes, beschränkt. Eine Zunahme an basischen Resten in der Nähe der Spaltstelle ermöglicht eine erleichterte proteolytische Spaltbarkeit des HA0-Vorläufermoleküls. Viren, die diese Mutation tragen, haben den Vorteil, dass sie unbeschränkt systemisch replizieren können (WERNER und HARDER, 2006).

2.2.6. Epidemiologie und Übertragung

Wildvögel stellen die natürlichen Wirte für Influenzaviren dar (WHO, 2007). Es konnten bei ihnen alle 16 Hämagglutinin- und 9 Neuraminidase-Subtypen gefunden werden (ALEXANDER, 2007). Die Infektionen sind bei Wasservögeln in der Regel subklinisch (SWAYNE und KING, 2003). Diese Vögel agieren somit als „stille“ Reservoirs für Influenzaviren und halten die Verbreitung auf andere Vögel aufrecht. Domestiziertes Wassergeflügel (z.B. Enten) könnte ein Bindeglied im Übertragungsweg von wildem Wassergeflügel auf domestiziertes Hausgeflügel (z.B. Hühner) darstellen (WHO, 2007). Immer wieder traten Ausbrüche in Gewässernähe auf. Dies führte dazu, dass Wasservögel für die Einschleppung aviärer Influenzaviren verantwortlich gemacht wurden, z.B. gab der OIE-Bericht über Geflügeltodesfälle (Enten und Gänse) in Kasachstan an, dass sich das Geflügel an offenen Becken durch den Kontakt mit Wildgeflügel mit dem Virus infiziert habe (FEARE, 2006).

Überraschenderweise haben sich aviäre Inflenzaviren während der letzten Jahrzehnte nicht wesentlich verändert, im Gegensatz zu denen des Menschen und anderer Säuger (MÜLLER, 2006). Mutationen und Reassortanten treten zwar mit der gleichen Häufigkeit auf, aber Nachkommen mit neutralen Mutationen werden offenbar bevorzugt vermehrt. Dadurch befinden sich Inflenzaviren in Vögeln in einem evolutionären Gleichgewicht, das ihr Fortbestehen sichert. Wildvögel stellen daher ein Reservoir dar, aus dem Inflenzaviren auch auf Säugetiere und Wirtschaftsgeflügel übertragen werden können (MÜLLER, 2006). Vögel scheiden Inflenzaviren sowohl mit dem Kot als auch mit dem Speichel und Nasensekreten aus (WHO, 2007). WEBSTER et al. (1978) konnten zeigen, dass nach experimenteller Infektion einer Ente diese 6,4 g Kotmaterial pro Stunde mit einem Titer von $7,8 \text{ IgEID}_{50}/\text{g}$ ausscheidet. Dies spielt in Flüssen mit hoher Strömungsrate kaum eine Rolle. Aber in kleinen Seen mit Hunderten von Enten würde die Viruskonzentration hoch sein (WEBSTER et al., 1978). Hohe Tierkonzentrationen in Brutkolonien oder an Sammelplätzen begünstigen die Entstehung von Reassortanten, ihre rasche Weitergabe und die Verbreitung durch den Vogelzug (MÜLLER, 2006). In der Humanmedizin gibt es Überlegungen, dass die Inflenzaviren als Zoonose über das Wasser auf den Menschen übertragen werden könnten (SODDEMAN, 2005).

Aktuelle H5N1 Isolate wurden in höheren Quantitäten in Trachealproben als im Fäzes gefunden. Dies deutet darauf hin, dass der fäkal-orale Übertragungsweg nicht länger der primäre Übertragungsweg für einige hochpathogene aviäre Inflenzaviren darstellt (WHO, 2007). Zu bedenken ist, dass das Virus im gesamten Tierkörper zu finden ist. So ist es nach YAMAMOTO et al. (2008) möglich, das Inflenzavirus (H5N1) sogar in Federn von Hausenten zu detektieren. Auch Fliegen könnten als mechanische Vektoren fungieren (WHO, 2007). Bei Schweinen ist bekannt, dass Lungenwürmer das Virus von Schwein zu Schwein übertragen können (SHOPE, 1943; SEN et al., 1961).

Weiterhin wird in der Literatur - z.T. unter Zuhilfenahme stochastischer Modelle - zunehmend auf die Bedeutung der Umwelt bei der Epidemiologie der

Aviären Influenza hingewiesen (BREBAN et al., 2009; ROHANI et al., 2009). Nur auf diesem Weg könne das längerfristige Wiederauftreten von Infektionen auch ohne direkte Übertragungsmöglichkeiten erklärt werden (ROHANI et al., 2009). Wichtig ist hierbei alle potentiellen Virusreservoirs in Betracht zu ziehen. Beispielsweise konnten in Sediment aus Weihern mit großer Wildvogelzahl in über 50 Prozent der Fälle Inflenzaviren molekularbiologisch nachgewiesen werden (LANG et al., 2008).

Die Rolle von Fischfarmen bei der Übertragung der Aviären Influenza

Im Jahre 2005 ereigneten sich Todesfälle bedingt durch HPAI H5N1 Viren bei Höckerschwänen (*Cygnus olor*) in zwei Ausbruchgebieten in Kroatien jeweils bei Fischfarmen (FEARE, 2006). In vielen Teilen Süd-Ost-Asiens bestehen enge Verbindungen zwischen Geflügel- und Schweinehaltung sowie Fischfarmen (SCHOLTISSEK und NAYLOR, 1988). Hoch pathogene aviäre Inflenzaviren werden durch Sekrete der oberen Atemwege und über Fäkalien infizierter Vögel ausgeschieden. Geflügelmist wird in einigen Ländern gerne in der Teichwirtschaft eingesetzt. Er stellt eine billige Nährstoffquelle dar. Durch die Virusausscheidung im Kot stellt die Nutzung von Geflügelmist als Düngemittel oder als Futter in Fischfarmen jedoch ein Risiko anhaltender Viruszirkulation dar. Auch andere Wildtiere könnten sich durch die Nutzung von Teichen infizieren (FEARE, 2006). Fische haben somit eine potentielle Bedeutung in der Übertragungskette der Aviären Influenza: Fischfresser (Piscivores) könnten sich durch das Wasser mit dem Virus angesteckt haben oder durch das Fressen von Fischen, die infiziertes Material in ihren Gedärmen hatten oder die Fische könnten selbst infiziert worden sein (wenn dies möglich ist) (FEARE, 2006; SCHOLTISSEK und NAYLOR, 1988).

2.2.7. Tenazität von Inflenzaviren in Wasser

Aviäre Inflenzaviren können für längere Zeit im Oberflächenwasser persistieren (WHO, 2007). Es gibt bisher aber kaum Tenazitätsstudien, die ausreichend Faktoren wie die Temperatur, die Salzkonzentration oder den Virussubtyp berücksichtigen und vergleichen. In einer Studie von ITO et al.

(1995) wurde in einem See, in dem Enten genistet haben, eine hohe Zahl an Influenza A positiven Wasserproben (23 %) gefunden. Der Anteil positiver Proben blieb im Herbst, nachdem die Enten weggezogen waren, hoch (14 %). Es ist denkbar, dass die Influenzaviren im gefrorenen Eis oder in See- wasser konserviert und die Enten im Frühling reinfiziert werden (WEBSTER et al., 1992). ZHANG et al. (2006) haben Eis und Wasser von sibirischen Seen, die von Zugvögeln besucht wurden, mittels RT-PCR untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass Teile des Virus über lange Zeit im Eis über- dauern kann. Zugvögel, die die Seen während ihrer Wanderung besuchen, könnten Influenzaviren über den Kot in das Wasser oder auf das Eis eintra- gen. Andererseits könnte aufgetautes Virus aus der letzten Saison durch die Vögel aufgenommen werden. Somit kommt den Seen eine Bedeutung als dauerhafte abiotische Quelle für Influenzaviren zu. Die Kältestabilität konnte durch Versuche von HAUMACHER et al. (2008) bestätigt werden: während es in physiologischer Kochsalzlösung bei 30 °C nach 4 Tagen zu einer Re- duktion der KID_{50}/ml um eine Zehnerpotenz kam, dauerte es bei 10 °C etwa 50 Tage und bei -10 °C sogar 6 Monate um dieselbe Reduktion zu erreichen. Die Stabilität der Influenzaviren hängt auch von der Wasserzusammenset- zung ab. Nach BROWN et al. (2008) ist das Virus bei niedrigen Temperaturen (unter 17 °C), einem leicht alkalischen pH-Wert (7,4-8,2) und frischem Was- ser am längsten stabil.

Eine Chlorierung wie sie bei Trinkwasser durchgeführt wird, reicht aus, um Influenzaviren abzutöten (RICE et al., 2007). In offenen Gewässern beein- flussen sehr viele Faktoren eine mögliche Viruskontamination und das Über- leben der Influenzaviren. Wichtig sind Faktoren wie die Zahl der Vögel, die vorbeiziehen oder das Nahrungsangebot für Wasservögel. Aber auch die Jahreszeit, die Temperatur, der pH-Wert und die Salzkonzentration des Ge- wässers sowie die Strömungs- und Umwälzungsrate spielen eine entschei- dende Rolle (WHO, 2007).

2.2.8. Gegenwärtige epidemiologische Situation

2.2.8.1. Hoch-pathogene Influenzaviren

Bis zum Ende der 90er Jahre des 20. Jahrhunderts war die hoch-pathogene Form der Aviären Influenza eine seltene Erkrankung. Seit 1959 hatte es insgesamt nur 24 dokumentierte Ausbrüche gegeben, von denen sich die Mehrzahl in Europa und Nordamerika ereignete (GLOBIG, 2007). Im Anschluss trat die Erkrankung immer häufiger auf. Beispielsweise kam es 1997 zu einem Ausbruch der hoch-pathogenen Influenza des Typs H5N1 bei Hühnern in Hongkong und das Virus wurde direkt auf den Mensch übertragen (HOFFMANN et al., 2000). Während der Entstehung des hoch-pathogenen H5N1 Virus in China scheint es im Rahmen von Reassortment-Phänomenen immer wieder zum Austausch mit anderen Isolaten gekommen zu sein: Die große Homologie der Gene von H9N2, H6N1 und H5N1 Isolaten legt die Vermutung nahe, dass diese Subtypen in der Lage sind, ihre Gene auszutauschen und neue pathogene Influenzaviren entstehen zu lassen (HOFFMANN et al., 2000; GLOBIG, 2007). Seit dem Jahr 2003 ist die Erkrankung in Geflügelbeständen in Asien endemisch (CHEN et al., 2005). Das Virus hat sich während des Jahres 2005 und Anfang 2006 beachtlich über Eurasien nach Europa und Afrika ausgebreitet (FLI, 2006a). Die Ausbrüche von HPAI H5N1 in Rumänien, in der Türkei and Kroatien im Oktober 2005 waren alle in der Nähe von Feuchtgebieten. Das, zusammen mit ihrem zeitlichen Auftreten, führte zur Schlussfolgerung, dass der Vogelzug wilder Wasservögel aus Südsibirien das Virus nach Osteuropa gebracht hat (FEARE, 2006).

Am 14. Februar 2006 trat der erste HPAI H5N1 Fall in Deutschland auf: Das HPAI H5N1 Virus wurde bei einem Schwan nachgewiesen. Noch im selben Monat wurde die erste infizierte Katze auf der Insel Rügen gefunden (WHO, 2008). In Baden-Württemberg kam es im Zeitraum von Februar bis April 2006 zu 19 Funden bei Wildvögeln. Neben dem Bodenseekreis und Konstanz waren auch die Landkreise Mannheim, Sigmaringen und Ulm betroffen (FLI, 2007b). Im April trat in einem Putenbestand der erste Ausbruch bei

Wirtschaftsgeflügel auf (WHO, 2008). Die Serie der Virusnachweise endete 2006 mit der Detektion eines HPAI H5N1 Virus bei einem Schwan aus dem Bestand des Dresdner Zoos (FLI, 2007a). Im Jahr 2007 wurde dann allerdings erneut bei 326 Wildvögeln, bei 2 industriellen Entenhaltungen sowie bei einer Kleinstgeflügelhaltung das HPAI H5N1 Virus nachgewiesen. Im Dezember 2007 folgten 3 Ausbrüche in Hühnerkleinsthaltungen (HARDER, 2008). Seit 26. März 2008 galt die Bundesrepublik Deutschland gemäß Artikel 2.7.12.4. des *OIE Terrestrial Animal Health Codes* als „frei von HPAI“ (FLI, 2008). Dies änderte sich am 10.10.08, als es zu einem Ausbruch in einem Geflügelbestand in Sachsen kam. Ein hoch-pathogenes H5N1 Virus wurde in einem Bestand mit 550 Enten, 800 Gänsen, 24 Puten und 50 Legehennen festgestellt. Sämtliches Geflügel wurde getötet und unschädlich beseitigt sowie ein Sperr- und Beobachtungsbezirk eingerichtet (FLI, 2008).

2.2.8.2. Nachweis niedrig-pathogener Influenzaviren bei Wildvögeln in Deutschland

Niedrig-pathogene Influenzaviren werden regelmäßig bei Wildvögeln nachgewiesen, ohne dass sie eine klinische Bedeutung haben. Einzelne stichprobenartige Untersuchungsprogramme geben ansatzweise einen Überblick über die epidemiologische Situation. Zwischen März 2003 und November 2005 wurden 3.672 Kloakenabstriche von Wildvögeln am FLI, Insel Riems, untersucht. 53 Proben waren AIV positiv. Unter den Isolaten fanden sich die Subtypen H1N1, H2N2, H2N3, H3N2, H3N8, H4N6, H5N2, H5N3, H6N2, H7N1, H7N7, H10N4, H10N7, H11N9 bei Stockenten (*Anas platyrhynchos*), H4N6, H5N1, H5N2, H7N2, H7N7 bei Krickenten (*Anas crecca*), H6N? bei einer Pfeifente (*Anas penelope*), H13N6 bei einer Silbermöwe (*Larus argentatus*) und einer Dohle (*Corvus monedula*) sowie H10N4 bei einer Teichralle (*Gallinula chloropus*) (GLOBIG, 2007). Nach einer Studie von KALETA et al. (2005) konnten bei der gewöhnlichen Ente (*Anas platyrhynchos*) am häufigsten Influenzaviren isoliert werden. Insgesamt stammten 65,9 % aller positiven Proben von Vögeln, die den Subfamilien Anserinae und Anatinae angehörten. Am häufigsten wurden in dieser Studie aviäre Influenzaviren der HA

Subtypen H3, H4, H6 detektiert. Im Zeitraum von 1977 bis 1989 haben SÜSS et al. (1994) Wildvögel in Ostdeutschland auf Aviäre Influenza untersucht. Die Autoren weisen in diesem Zusammenhang auf die Bedeutung von Sentinelanlagen hin. In diesen „Wächtertieranlagen“ wird Wassergeflügel in Gehegen mit regelmäßigem Kontakt zu Wildvögeln gehalten. So können sich die Sentineltiere gegebenenfalls mit den Influenzaviren der Wildtiere anstecken. Regelmäßige serologische Untersuchungen der Tiere geben Hinweise auf die epidemiologische Situation in der Wildpopulation. Durch den Einsatz von Sentinelenten in pelagischen Vogelkolonien konnte der Virusnachweis um das Fünffache gesteigert werden. Weiterhin war es durch die serologische Untersuchung der Sentineltiere möglich, „Influenzasaisonen“ zu erkennen. Unter den nachgewiesenen 40 verschiedenen HA- und NA-Kombinationen war das H6N1 Virus mit 23,6 % am häufigsten, gefolgt von H4N6 mit 11 % (SÜSS et al., 1994). Die Prävalenz von aviären Influenzainfektionen in Entenpopulationen ist stark variabel und hängt von der Spezies, der Saison und dem Alter ab (STALLKNECHT, 1998). Weltweit sind Wildvögel als Reservoir für Aviäre Influenza - sogar bei den näher beleuchteten Gruppen wie den Anseriformes und Charadriiformes - unzureichend untersucht (STALLKNECHT und BROWN, 2007). Deutschlandweit geht der Trend weg von Einzelbeprobung bei Wildvögeln hin zu Sentinelanlagen, wie sie in Radolfzell am Bodensee, auf der Insel Koos in Mecklenburg-Vorpommern und am Felchowsee in Brandenburg bereits installiert sind (GLOBIG et al., 2008). In diesen Anlagen konnte innerhalb eines Jahres ein indirekter Nachweis von AIV der Subtypen H1, H2N5, H3N2 H4N6, H6N8, LP H5, LP H7N3, H12 in der Wildvogelpopulation erfolgen (GLOBIG et al., 2008).

2.3. Orthomyxoviren bei Poikilothermen

2.3.1. Reptilien und Amphibien

Verglichen mit Untersuchungen bei Vögeln und Säugetieren mangelt es an Studien über Virusinfektionen bei Reptilien. Obwohl Influenzaviren ein sehr breites Wirtsspektrum haben, und es Orthomyxoviren auch bei Fischen gibt

(Genus *Isavirus*), gibt es bisher noch keine eindeutigen Nachweise von Orthomyxoviren bei Reptilien oder Amphibien. Laut HUCHZERMEYER (2003) wurde bei Nilkrokodilen in einer Farm in Südafrika ein filamentöses Influenza C Virus elektronenmikroskopisch nachgewiesen. DAVIS und SPACKMAN (2008) konnten zeigen, dass neben den bekannten Säugetier- und Vogel-spezies auch Krokodile als Träger aviärer Influenzaviren in Frage kommen. Von 37 gefangenen Tieren in Florida waren 4 in der real-time RT-PCR positiv. Weiterhin zeigten im Agargel-Immudiffusionstest von 7 Serumproben 3 eine Reaktion auf das aviäre Influenzavirus-Antigen. MANCINI et al. haben bereits im Jahr 2004 postuliert, dass heterotherme Tiere durchaus als Wirte für Influenzaviren in Frage kommen. In ihrer Studie wurden Blutproben von Schlangen, Fröschen und Kröten mittels Hämagglutinationshemmtest auf Antikörper gegen Influenzaviren untersucht. Sowohl bei in Gefangenschaft gehaltenen Schlangen als auch bei Kröten konnten Rezeptoren auf den Erythrozyten sowie Antikörper gegen Influenza A (equiner oder humaner Ursprung) oder aber gegen Influenza B Viren gefunden werden. Beim Großteil der untersuchten Frösche konnten Antikörper gegen einige Influenzastämme detektiert werden. Zum Abklären epidemiologischer Zusammenhänge bei der Verbreitung von Influenzaviren haben SAWICKI und RYKOWSKA bereits 1966 Frösche als Studienobjekt eingesetzt. Das verwendete Virus war allerdings ein Parainfluenzavirusisolat. In der Studie ging es um die Frage, ob sich in poikilothermen Tieren das Virus vermehren kann, und welche Rolle hierbei die Körpertemperatur spielt. Es konnte gezeigt werden, dass Temperaturveränderungen zwischen 20 °C und 37 °C keinen Einfluss auf die Virusvermehrung in den Fröschen hatte. In Tieren, die bei 4 °C gehalten wurden, persistierte das Virus allerdings deutlich länger.

2.3.2. Fische

Im Rahmen der Herstellung einer Vakzine gegen Influenza A Viren gelang es GABLIKS (1988) das Influenzavirus auf primären Goldfischzellen anzuzüchten. Generell ist bisher allerdings fraglich, ob Fische für Influenzaviren empfänglich sind (STAEHEL et al., 1989). In einer gemeinsamen Stellungnahme

des FLI und BfR wird generell auf die potentielle Möglichkeit der Übertragung von Influenzaviren durch Fische hingewiesen: Fische könnten über Kot von Seevögeln und Wasser sowie über ihre Beutetiere (z.B. Muscheln, Schnecken oder Garnelen) kontaminiert werden. Das Virus wurde aber bisher nicht in Meer- oder Süßwasserfischen nachgewiesen (FLI und BfR, 2006b).

Im Rahmen von serologischen Untersuchungen muss berücksichtigt werden, dass die Fähigkeit von Fischen Antikörper zu bilden von vielen Faktoren abhängt. Beispielsweise stiegen die Antikörpertiter im Serum der Fische nach Antigenexposition schneller an, wenn die Wassertemperatur höher war (CUSHING, 1942). Während Säugetiere fünf Klassen von Immunglobulinen besitzen, gibt es bei Knochenfischen nur den Isotyp IgM. Dieser liegt nicht als Pentamer sondern Tetra-, Di- oder z.T. auch als Monomer im Serum der Fische vor (ELLIS, 2001). Dennoch ist bewiesen, dass Antikörper bei Fischen eine wichtige Rolle bei der Neutralisation von Viren (ELLIS, 2001) oder auch bakteriellen Adhäsinen und Toxinen spielen (ELLIS, 1999). Somit wäre es denkbar, dass Fische in der Lage sind, nach Exposition Antikörper gegen Influenzaviren zu bilden. In der Fischdiagnostik werden serologische Untersuchungen relativ selten eingesetzt (KIBENGE et al., 2002). Dennoch war es nach KIBENGE et al. (2002) möglich einen ELISA zur Detektion von Antikörper gegen den Erreger der Infektiösen Anämie der Lachse (Infectious Salmon Anemia) zu entwickeln.

Mit der Infektiösen Lachsanämie ist bewiesen, dass zumindest bestimmte Vertreter der Familie der Orthomyxoviren in der Lage sind, Fische zu infizieren. In der Mitte der 90iger Jahre konnte dieses Virus den Orthomyxoviren zugeordnet werden (BERGMANN und FICHTNER, 2002). Es ist bislang der einzige Vertreter dieses Genus *Isavirus* (KAWAOKA et al., 2005). Isaviren sind in ihrer Morphologie den Influenzaviren ähnlich (KAWAOKA et al., 2005). Das Genom besteht aus acht Segmenten mit einer Größe von 1,0 bis 2,3 kb. Die gesamte Größe liegt bei etwa 14,5 kb (MJAALAND et al., 1997). Die Oberflächenglykoproteine haben sowohl hämagglutinierende als auch rezeptorzerstörende Eigenschaften (KAWAOKA et al., 2005). Es gibt keine antigenetische Verbindung zwischen den Proteinen des Isavirus und denen

der Influenzaviren. Das Virus wird über das Wasser übertragen (KAWAOKA et al., 2005). Lange wurde der Atlantische Lachs (*Salmo salar*) als einzig empfängliche Art beschrieben. Mit dem Nachweis des ISAV beim pazifischen Silberlachs (*Oncorhynchus kisutch*) bei einem Ausbruch 2001 in Chile wurde dies widerlegt. Das ISAV wurde seither aus Salmoniden wie der Bachforelle (*Salmo trutta fario*), der Meerforelle (*Salmo trutta trutta*), der Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*) und dem Seesaibling (*Salvelinus alpinus*) aber auch aus Nicht-Salmoniden wie dem Europäischen Aal (*Anguilla anguilla*) und dem Atlantischen Hering (*Clupea harengus*) isoliert, die alle als Carrier fungieren können (BERGMANN und FICHTNER, 2002). Folge der Infektion ist ein signifikant erniedrigter Hämatokrit-Wert und Hämorrhagien in der Leber (NYLUND et al., 2003). Weiterhin zeigen sich Symptome wie Aszites, Kongestion, Leber- und Milzvergrößerung sowie Petechien im Peritoneum (EVENSEN et al., 1991).

2.4. Fische im Bodensee

Im Bodensee leben rund 35 Fischarten, von denen sich die meisten von Frühling bis Herbst in Ufernähe aufhalten (LfL, 2007). Neben den wirtschaftlich bedeutenden Fischarten Felchen (*Coregonus spp.*), Barsch (*Perca fluviatilis*), Forelle (*Salmo trutta*), Hecht (*Esox lucius*), Aal (*Anguilla anguilla*) und Brachsen (*Abramis brama*) ist der See Lebensraum für viele weitere Fischarten. Etwa 17 Fischarten sind obligate Bewohner der Uferzone, weitere 15 Arten sind zumindest zeitweise an das Litoral gebunden. Damit haben über 95 % aller Fischarten eine direkte Beziehung zum Uferbereich des Bodensees (KRAMER, 2003).

Der **Flussbarsch** (*Perca fluviatilis*) gehört zur Familie der Echten Barsche (*Percidae*). Seine Nahrung ist vielseitig und reicht von Plankton über Wirbellose bis hin zu Fischen. Der Fisch war in der Vergangenheit in ganz Deutschland verbreitet (DUSSLING und BERG, 2001). Besonders in der Angelfischerei ist der Barsch einer der am häufigsten gefangenen Fische im Bodensee (ANONYM, 2007b).

Die **Quappe** (Trüsche) (*Lota lota*) gehört zur Familie der Dorsche (*Gadidae*) und ist der einzige das Süßwasser besiedelnde Vertreter der im Übrigen marinen Familie der Dorsche. Sie hält sich bevorzugt in Grundnähe auf. Die Nahrung besteht vorwiegend aus Wirbellosen, die auf dem Gewässergrund aufgestöbert werden. Mit zunehmender Größe erbeuten Quappen auch Fische. Anders als in Fließgewässern blieb der Quappenbestand im Bodensee über die letzten Jahre stabil. Damit stellt der Bodensee das letzte großräumig besiedelte Verbreitungsareal der Quappe in Baden-Württemberg dar (DUSSLING und BERG, 2001).

Als **Felchen**, Maränen oder Renken (*Coregonus spp.*) wird eine Gruppe von Fischarten mit einer unübersehbaren Vielfalt an Formen und Lebensraumtypen bezeichnet. Die Diskussion über ihre systematische Einteilung wird seit langem kontrovers geführt, gelangte aber nie zu einem abschließenden Ergebnis. Die wesentlichen Felchenvorkommen des Landes befinden sich auch heute im Bodensee, wo vor allem Blaufelchen, nach NÜMANN (1978) als *Coregonus lavaretus wartmanni* bezeichnet, und der Gangfisch (*Coregonus lavaretus macrophthalmus*) hohe Bedeutung in der Berufsfischerei haben. Beide gelten nach DUSSLING und BERG (2001) als „Schwebrenken“. Sie leben beide im Freiwasser und fressen vorwiegend Plankton.

Nach wie vor ist das **Rotauge** (*Rutilus rutilus*) aus der Familie der Karpfenfische (*Cyprinidae*) in Baden-Württemberg weit verbreitet und zählt insbesondere in stehenden Gewässern fast immer zum festen Arteninventar. Das Nahrungsspektrum ist breit gefächert und reicht von Plankton und Algen über Pflanzenteile bis hin zu Wirbellosen (DUSSLING und BERG, 2001).

Als bedeutender Angelfisch zählt die **Schleie** (*Tinca tinca*) zu den durch Besatz besonders stark geförderten Arten, was sich ganz wesentlich auf ihre heutige Verbreitung auswirkt. Zum Nahrungsspektrum der Schleie zählt nahezu alles, was im Lebensraum verfügbar ist und bewältigt werden kann. Neben Wirbellosen sind dies auch Planktonorganismen, Algen, Detritus sowie mit zunehmender Größe Pflanzenteile (DUSSLING und BERG, 2001). Die Schleie gehört genauso wie der Hasel zur Familie der Cyprinidae.

Der **Hasel** (*Leuciscus leuciscus*) ist eine Fischart, die in erster Linie Flüsse und große Bäche mit kiesiger bis sandiger Stromsohle bewohnt. Als Nahrung dienen vorwiegend Wirbellose sowie anfliegende Insekten, denen Hasel im Sommer mitunter dicht unter der Wasseroberfläche auflauern. In Seen und großen Flüssen wird das Nahrungsspektrum durch Plankton ergänzt (DUSSLING und BERG, 2001).

Besonders ist bei der **Barbe** (*Barbus barbus*) vor allem ihre Größe und Gewicht: sie liegt mit weit über 3 kg und 65 cm deutlich über dem Durchschnitt der anderen Probanden. Die Barbe ist ein geselliger, kräftiger Fisch der strömenden Fließgewässerbereiche und hält sich meist in der Nähe der Stromsohle auf. Die Fische ernähren sich von Wirbellosen, die sie unter anderem auch durch das Umdrehen einzelner Steine aufstöbern (DUSSLING und BERG, 2001). Auch sie gehört zu den Karpfenfischen.

Mit seiner unverkennbaren Gestalt zählt der **Hecht** (*Esox lucius*), aus der Familie der Esocidae, zu den bekanntesten einheimischen Fischarten. Als ausgesprochene Räuber fressen bereits Junghechte alles, was sie überwältigen können, nicht selten auch Artgenossen des eigenen Jahrgangs. Die Nahrung wird effektiv in Wachstum umgesetzt, so dass Hechte bei guten Bedingungen bereits im ersten Lebensjahr eine Länge von 30 cm oder mehr erreichen. Mit zunehmender Größe sind sie in der Lage, auch Frösche, junge Wasservögel und kleine Säuger zu erbeuten (DUSSLING und BERG, 2001).

2.5. Dreikantmuschel (*Dreissena polymorpha* (Pallas, 1771))

2.5.1. Systematik und Taxonomie

Die Dreikantmuschel (*Dreissena polymorpha*) ist eine sessile Brack- und Süßwassermuschel, die in den amerikanischen und in vielen europäischen Breiten als klassischer Vertreter der Neozoa bezeichnet wird (SCHRÖTER-BOBSIN, 2005).

Nach NUTTALL (1990) gehören zur Familie der Dreissenidae die Subfamilie Dreisseninae mit den Genera *Dreissena*, *Congeria*, *Mytilopsis* und *Prodreissena*. Die Subfamilie Dreissenomyinae enthält nur das Genus *Dreissenomya*. Zwischen den Genera *Dreissena* und *Congeria* gibt es nur sehr geringe Unterschiede (KINZELBACH, 1992). Die Zahl der *Dreissena*-Spezies ist noch immer umstritten. Die Dreissenidae waren in der Tertiärzeit (vor 65 bis 2 Millionen Jahren) recht artenreich (SCHWAB, 1995). Es gibt über einhundert Unterarten. Allerdings mögen einige davon synonym sein und andere sind nur noch von paläontologischem Interesse (KINZELBACH, 1992). Heute gibt es weltweit nur noch 10 Arten im Brack- und Süßwasser (SCHWAB, 1995). Ungeachtet der Variabilität der Schale („polymorpha“) gehören alle Dreikantmuscheln in Europa nördlich der Balkanhalbinsel zur einer Subspezies, *Dreissena polymorpha* (KINZELBACH, 1992). Ein Grund dafür könnte nach KINZELBACH (1992) die Tatsache sein, dass *Dreissena polymorpha* an niedrige Wintertemperaturen adaptiert ist.

2.5.2. Vorkommen

Dreikantmuscheln zählen im Bodensee zu den Neozoen. Nach dem Jahre 1760 entkam die Muschel dem Auffangbecken des Schwarzen Meeres. Beginnend von verschiedenen Stellen, vor allem Häfen, eroberte die Dreikantmuschel sehr schnell den nördlichen Teil von Zentral- und Westeuropa. Die Expansion steht im Zusammenhang mit der Entwicklung der Kanalsysteme und des Handels. Nach KINZELBACH (1992) kam dieser Prozess mit dem

Beginn des 20. Jahrhunderts zum Erliegen. Isolierte Becken wie z.B. der Plattensee folgten nach einiger Verzögerung. In Nordamerika können die Dreikantmuscheln in den Großen Seen seit 1985 gefunden werden. Im Erie-see erreichten die Dreikantmuscheln eine Populationsdichte von 750.000 Individuen pro Quadratmeter. Wie sie dort hin gelangten, ist unklar. Die wahrscheinlichste Vermutung ist, dass Larven mit dem Ballastwasser eines Schiffes von einem Binnenhafen in Europa zu den Großen Seen verschleppt und beim Ablassen des Wassers freigesetzt wurden (CAMPBELL und REECE, 2003). Bereits um 1965 hat die Massenvermehrung der Zebra- oder Dreikantmuschel am Bodensee für Aufregung gesorgt (REY, 2005). Es ist jedoch unbekannt, wann genau die Art im Bodensee das erste Mal aufgetaucht ist und in welchem Maße sie Mitte der 1960er Jahre die Gewässerbiozöosen des Sees beeinflusst hat. Zeitweise befürchtete man, dass die Muschel Rohre zur Trinkwasserversorgung oder Abwasserentsorgung verstopfen könnte (REY, 2005). Heute haben sich ihre Populationsdichten auf einem hohen Niveau eingeregelt und sie ist eine wichtige Nahrung für Wasservögel (WERNER, 2004). Nach WERNER et al. (2005) hat sich seit der Einwanderung der Dreikantmuscheln in den Bodensee die Zahl der überwinterten Vögel vervierfacht.

2.5.3. Anatomie und Ernährung

Die Schale der Dreikantmuscheln ist – wie der Name schon sagt – hoch variabel in ihrer Form (siehe Abb. 2.1). Das anteriore Ende der Muschel ist reduziert während das posteriore vergrößert ist (MORTON, 1993). Der Fuß der Muscheln ist zilientragend und beinhaltet die Byssusdrüse, die die entsprechenden Byssusfäden zur Anheftung produziert. Der Mund liegt nach MORTON (1993) am anterioren Ende, während die Siphons posterior lokalisiert sind.



Abb. 2.1: Dreikantmuschel (*Dreissena polymorpha*), Skala in cm

Die Larven der Muscheln ernähren sich durch Filtration mittels ihres Velums. Diese Funktion wird später durch die Kiemenfilamente übernommen (ACKERMANN et al., 1994). Bakterien, blau-grüne Algen, kleine grüne Algen und sehr feiner Detritus gehören ins Nahrungsspektrum der Larven (SPRUNG, 1993). Erwachsene Dreikantmuscheln sind relativ tolerant gegenüber Hungersituationen (MCMAHON, 1996). Sie ernähren sich von größerem Mikro- und Mesozooplankton (WONG, 2003). CARACO (1997) berichtet von einem massiven Rückgang an Phytoplankton (85 % in 2 Jahren) nach Einwanderung der Dreikantmuscheln in die Gewässer des Hudson Rivers.

2.5.4. Rolle der Dreikantmuschel als Biofilter

Invertebraten, v.a. Muscheln sind in der Lage eine Vielzahl verschiedener humanpathogener Viren wie beispielsweise Entero-, Hepatitis A-, Noro- und Rotaviren zu akkumulieren (LE GUYADER et al., 1994; LE GUYADER et al., 2000; LEES, 2000). Offensichtlich ist der Einschluss in den Mukus einer der Hauptwege, wie Muscheln Viren aufnehmen und kontaminiert werden können (DI GIROLAMO, 1977). Die epidemiologischen Daten zeigen deutlich,

dass filtrierende Mollusken als effiziente Vehikel bei dem fäkal-oralen Übertragungsweg von enteropathogenen Viren fungieren (LEES, 2000). Der Verzehr von Muscheln war beispielsweise immer eines der Hauptrisiken für Hepatitis A-Virus Infektionen, vor allem wenn diese Produkte roh oder unzureichend gekocht verzehrt wurden (CROCI et al., 2005). Aber es wurden nicht nur humanpathogene Viren aus Muscheln isoliert. Nach einem Bad von Muscheln in einer IPN-Virussuspension und Injektion der Viren in Muschelgewebe wurde der Erreger der Infektiösen Pankreasnekrose (IPNV) (Familie: *Birnaviridae*) aus dem Fäzes und Pseudofäzes von Muscheln (*Pecten maximus*) reisoliert sowie in Garnelen (*Pandalus borealis* und *Palaemon elegans*), die von IPNV-kontaminierten Muscheln abgegrast wurden, detektiert (MORTENSEN, 1993). Untersuchungen mit einem fischpathogenen Orthomyxovirus, dem Erreger der Infektiösen Anämie der Lachse (ISAV) zeigte, dass Miesmuscheln in der Lage sind, die Viren aus dem sie umgebenden Wasser aufzunehmen und zu akkumulieren (SKÅR und MORTENSEN, 2007). Falls das pathogene Agens bei der Darmpassage nicht inaktiviert wurde, können sowohl (Pseudo)fäzes als auch Mukusfragmente niedrige Konzentrationen des Virus enthalten (SKÅR und MORTENSEN, 2007).

In der Literatur wird immer wieder auf die Eignung der Dreikantmuschel als Biofilter hingewiesen. So heißt es bei SCHRÖTER-BOBSIN (2005): „Die effiziente Akkumulation und die Umweltresistenz der Dreikantmuscheln sind hervorragende Eigenschaften, die sie zu einem zuverlässigen Biomonitor mit „Hygienegedächtnis“ und hoher Sensibilität vereinen lassen“. Dreikantmuscheln können Metalle und organische Chlorverbindungen in ihren Geweben um das 100.000fache verglichen mit dem Umgebungswasser anreichern und damit dazu beitragen, dass toxische Kontaminanten zwar aus dem Wasser, aber in die Lebensmittelkette transferiert werden (COHEN und WEINSTEIN, 1998). *Dreissena polymorpha* filtert Partikel im Größenbereich von 0,7 µm - 450 µm (SPRUNG und ROSE, 1988; JORGENSEN et al., 1984). Dies bedeutet, dass zur Filtration von Viruspartikeln die Anheftung an Schwebstoffe notwendig ist. Neben Algen gehören zum Filtrationsspektrum Bakterien, Rotatorien, Crustaceen und Protozoen (SCHRÖTER-BOBSIN, 2005). Eine

Einschätzung einer Virenakkumulation durch die Muschel wurde von SCHRÖTER-BOBSIN (2005) nicht gemacht.

Die Filtrationsrate der Dreikantmuscheln hängt von vielen Faktoren wie z.B. Temperatur, Gehalt an Schwebstoffen und Größe der Muscheln ab. Die Angaben der Filtrationsraten variieren stark in der Literatur (NOORDHUIS et al., 1992). Laboruntersuchungen haben gezeigt, dass die Filtrationsraten der Muscheln exponentiell mit der Schalenlänge zusammenhängen (ANONYM, 1993a). Beispielsweise filtrierte eine Muschel mit einer Schalenlänge von etwa 20 mm etwa 60 ml pro Stunde. Obwohl die Muscheln nicht kontinuierlich filtern, ist es wahrscheinlich, dass eine einzige Zebramuschel 1 Liter Wasser pro Tag filtern kann (ANONYM, 1993a). Die mittlere Filtrationsrate der Dreikantmuscheln für Schwebstoffe im Wasser beträgt nach FANSLOW et al. (1995) 16,2 ml/mg/h (4,0 – 40,7 ml/mg/h). Zusammenfassend wird die Filtrationsrate nach NOORDHUIS et al. (1992) wesentlich bestimmt durch den Gehalt an Schwebstoffen, kaum beeinflusst durch Temperaturen zwischen 5 - 20 °C, und sie zeigt eine sigmoidale Abhängigkeit von der Schalenlänge.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1. Zellkulturmedien, Pufferlösungen und Reagenzien

3.1.1. Virologische Untersuchungen

Wasser, ionenausgetauscht und filtriert

Milli-Q[®] Wasser (Millipore GmbH, Eschborn)

Physiologische Kochsalzlösung

9 g, 136 mM NaCl (Merck KGaA, Darmstadt) wurden in 1 Liter Milli-Q[®] Wasser gelöst, sterilfiltriert und bei Raumtemperatur gelagert.

Iodlösung

Betaisodona[®] Povidon-Iod (Mundipharma GmbH, Limburg)

Erythrozyten (Lohmann Tierzucht, Cuxhaven)

Die Hühner-Erythrozyten wurden als 1 %ige Suspension in physiologischer Kochsalzlösung bezogen und bei 4 °C gelagert. Vor Verwendung wurden die sedimentierten Erythrozyten dreimal in physiologischer Kochsalzlösung gewaschen. Zur Beschleunigung der Sedimentation wurde die Suspension bei jedem Waschschrift 5 min bei 3.000 rpm zentrifugiert.

Meerschweinchenblut (Charles River, Kisslegg)

Bei der Verwendung des humanen Influenzavirus wurde Meerschweinchenblut für die Durchführung des HA-Tests verwendet. Vor Verwendung wurden die Meerschweinchenerythrozyten dreimal in physiologischer Kochsalzlösung gewaschen. Zur Herstellung einer 0,5 %igen Lösung wurden 50 µl der Erythrozyten in 10 ml physiologische Kochsalzlösung überführt.

Zellkulturmedien

Dulbecco`s modified Eagle Medium (DMEM)

13,4 g/l DMEM-Pulvermedium mit 4,5 g/l D-Glucose, mit L-Glutamin, ohne NaHCO₃ und ohne Natrium-Pyruvat (Biochrom AG, Berlin)

Verdünt in Milli-Q[®] Wasser und sterilfiltriert.

Je nach Verwendung wurden folgende weitere Zutaten verwendet:

Tabelle 3.1: Anzuchtmedium VH2, TH-1, SAF-1 und FHM

Menge in ml/l	Zutat	Endkonzentration
100	FKS	10 % (v/v)

Tabelle 3.2: Anzuchtmedium IgH2

Menge in ml/l	Zutat	Endkonzentration
100	FKS	10 % (v/v)
10	NEA	1 % (v/v)

Tabelle 3.3: Anzuchtmedium MDCK

Menge in ml/l	Zutat	Endkonzentration
50	FKS	5 % (v/v)
10	NEA	1 % (v/v)

Tabelle 3.4: Anzuchtmedium EPC und RTG

Menge in ml/l	Zutat	Endkonzentration
100	FKS	10 % (v/v)
1	NEA	1 % (v/v)
2	Penicillin-G-Lösung	200 U/ml
2	Streptomycinsulfat-Lösung	380 U/ml

Tabelle 3.5: Erhaltungsmedium IgH2, TH-1 und VH2

Menge in ml/l	Zutat	Endkonzentration
20	FKS	2 % (v/v)
1	NEA	1 % (v/v)
2	Gentamycinsulfat-Lösung	6,4 U/ml
2	Penicillin-G-Lösung	200 U/ml
2	Streptomycinsulfat-Lösung	380 U/ml
4	Amphotericin B-Lösung	0,5 µg/ml

Tabelle 3.6: Erhaltungsmedium SAF-1, FHM, EPC und RTG

Menge in ml/l	Zutat	Endkonzentration
20	FKS	2 % (v/v)
1	NEA	1 % (v/v)
2	Gentamycinsulfat-Lösung	6,4 U/ml
2	Penicillin-G-Lösung	200 U/ml
2	Streptomycinsulfat-Lösung	380 U/ml
4	Patricin	0,5 µg/ml

Tabelle 3.7: Tupfermedium für Fischproben

Menge in ml/l	Zutat	Endkonzentration
50	FKS	5 % (v/v)
2	Gentamycinsulfat-Lösung	6,4 U/ml
2	Penicillin-G-Lösung	200 U/ml
2	Streptomycinsulfat-Lösung	380 U/ml
10	Patricin	0,5 µg/ml

Basal Medium Eagle (BME) mit Earle´schen Salzen

100 ml/l BME-EARLE 10 x (Biochrom AG, Berlin)

29,3 ml/l NaHCO₃-Lösung (0,89 M)

Verdünnt in Milli-Q[®] Wasser, sterilfiltriert und kühl gelagert.

Je nach Verwendung folgten weitere Zutaten:

Tabelle 3.8: Erhaltungsmedium MDCK

Menge in ml/l	Zutat	Endkonzentration
20	FKS	2 % (v/v)
1	NEA	1 % (v/v)
2	Gentamycinsulfat-Lösung	6,4 U/ml
2	Penicillin-G-Lösung	200 U/ml
2	Streptomycinsulfat-Lösung	380 U/ml
4	Amphotericin B-Lösung	0,5 µg/ml
10	L-Glutamin	2 mM

Minimum Essential Medium (Eagle) + Earle (MEM)

MEM Pulvermedium (Biochrom AG, Berlin)

2,2 g/l Na HCO₃

Folgende Zutaten wurden supplementiert:

Tabelle 3.9: Anzuchtmedium CHSE-214

Menge in ml/l	Zutat	Endkonzentration
100	FKS	10 % (v/v)
1	NEA	1 % (v/v)

Trypsin-Versen 0,05 %

8,00	g/l	136	mM	NaCl (Merck KGaA, Darmstadt)
0,20	g/l	3	mM	KCl (Merck KGaA, Darmstadt)
0,20	g/l	1	mM	KH ₂ PO ₄ (Merck KGaA, Darmstadt)
2,31	g/l	6	mM	Na ₂ HPO ₄ x 12 H ₂ O (Merck KGaA, Darmstadt)
0,10	g/l	0,4	mM	MgSO ₄ x 7 H ₂ O (Merck KGaA, Darmstadt)
0,132	g/l	0,9	mM	CaCl ₂ x 2 H ₂ O (Merck KGaA, Darmstadt)
0,5	g/l			Trypsin-Trockensubstanz (Biochrom AG, Berlin)
1,25	g/l	3	mM	Versen (Titriplex III) (Merck KGaA, Darmstadt)
0,05	g/l	37.900	U/l	Streptomycinsulfat (Biochrom AG, Berlin)
0,06	g/l	100.000	U/l	Penicillin-G (Biochrom AG, Berlin)

Gelöst in Milli-Q[®] Wasser, mit 1 N NaOH auf pH-Wert 7,0 eingestellt, sterilfiltriert und bei -20 °C gelagert. Vor Gebrauch aufgetaut und bei 4 °C gelagert.

Penicillin-G-Lösung

60 mg/ml Penicillin-G (1.664 U/mg) (Biochrom AG, Berlin)

Gelöst in Milli-Q[®] Wasser. Die Stammlösung hatte eine Konzentration von ca. 100.000 U/ml.

Streptomycinsulfat-Lösung

256 mg/ml Streptomycinsulfat (758 U/mg) (Biochrom AG, Berlin)

Gelöst in Milli-Q[®] Wasser. Die Stammlösung hatte eine Konzentration von ca. 190.000 U/ml.

Gentamycinsulfat-Lösung

5 mg/ml Gentamycinsulfat (640 U/mg) (Biochrom AG, Berlin)

Gelöst in Milli-Q[®] Wasser. Die Stammlösung hatte eine Konzentration von 3.200 U/ml.

Amphotericin B

Amphotericin B (Biochrom AG, Berlin) 250 µg/ml lyophilisiert.

In 5 ml Milli-Q[®] Wasser resuspendiert.

Patricin

500 µg/ml (Biochrom AG, Berlin)

Fötale Kälberserum (FKS)

Fötale Bovines Serum (FBS) (Biochrom AG, Berlin)

Nicht-essentielle Aminosäuren (NEA)

(100x)-Konzentrat (Biochrom AG, Berlin)

Phosphate-buffered-saline (PBS)

8,00	g/l	137	mM	NaCl (Merck KGaA, Darmstadt)
0,20	g/l	26	mM	KCl (Merck KGaA, Darmstadt)
0,12	g/l	1,23	mM	KH ₂ PO ₄ (Merck KGaA, Darmstadt)
0,91	g/l	5,1	mM	Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O (Merck KGaA, Darmstadt)

Gelöst in Milli-Q[®] Wasser. Der pH-Wert von 7,5 wurde mit 1 M NaOH-Lösung eingestellt.

Immunperoxidasetest

PBS-Tween:

500 ml PBS + 25 ml Tween[®] 20 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)

Verdünnungspuffer:

PBS-Tween + 2 % Pferdeserum, Donor Horse Serum (Biochrom AG, Berlin)

Primärer Antikörper:

HB65 mAK (mouse) (Friedrich-Loeffler Institut, Insel Riems) 1:20 in Verdünnungspuffer

Sekundärer Antikörper:

POD-Anit-Mouse-IgG (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) 1:1.000 in Verdünnungspuffer

Farbstoff:

AEC Staining Kit (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)

3.1.2. Molekularbiologische Untersuchungen

DEPC-Wasser

Diethylpyrocarbonat (Fluka, Buchs SG, Schweiz)

Als Nuclease-freies Wasser wurde Diethylpyrocarbonat-Wasser verwendet. Zunächst wurde eine 10 %ige DEPC Stocklösung erstellt: 10 ml DEPC wurden in 90 ml absolutem Alkohol gelöst. Die Stocklösung wurde in braunen Flaschen im Dunkeln gelagert. Bei Bedarf wurde hiervon eine 1 % ige Arbeitslösung in sterilem Aqua bidest erstellt und bei 120 °C für 30 Minuten autoklaviert. Die Lösung wurde bei 4 °C gelagert.

Silica Matrix

Silicon dioxide, approx. 99 % (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)

60 g SiO₂ wurden in einem Messzylinder mittels DEPC-Wasser auf ein Endvolumen von 500 ml aufgefüllt. Nach gründlichem Durchmischen wurde die Suspension bei Raumtemperatur 24 Stunden gelagert. 430 ml des Überstandes wurden anschließend verworfen. Um die Silica zu resuspendieren, wurde der Zylinder erneut auf 500 ml mit DEPC-Wasser aufgefüllt. Nach einer weiteren Sedimentationsphase von 5 Stunden wurden 440 ml des Überstandes verworfen. Durch Zugabe von 0,6 ml 25 %iger (6,85 M) HCl-Lösung wurde der pH-Wert auf 2 eingestellt. Zum Resuspendieren wurde die Lösung leicht geschüttelt. Nach Aliquotieren und Abfüllen in 1,5 ml Reaktionsgefäße, wurde das Material 15 Minuten bei 121 °C und 1 bar autoklaviert. Die Silica Matrix wurde vor Licht geschützt bei Zimmertemperatur gelagert.

Guanidinthiocyanat (Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe)

Tris-HCl (Merck KGaA, Darmstadt)

12,1 g Tris-HCl wurden in 800 ml Milli-Q[®] Wasser gelöst. Mit 0,01 M HCl-Lösung wurde der pH-Wert auf 6,4 eingestellt. Anschließend wurde die Lösung auf 1000 ml aufgefüllt und der pH-Wert erneut eingestellt. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C.

EDTA (Merck, Darmstadt)

Zur Erstellung einer 0,2 molaren Ethylendiamintetraessigsäure-Lösung (EDTA) wurden 7,44 g des EDTA-Natrium Salzes in 100 ml DEPC-Wasser gelöst. Der pH-Wert wurde auf 8 mittels 5 N Natronlauge eingestellt. Nach Autoklavieren bei 120 °C, 30 Minuten, wurde die Lösung bei 4 °C gelagert.

Triton X-100 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)

Ethanol 99,8 % (v/v) (Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe)

Wurde in verschiedenen Mischungsverhältnissen mit Milli-Q[®] Wasser verwendet.

Aceton

Rotipuran[®] Gehalt 99,8 % (Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe)

RNase Inhibitor

RiboLock[™] RNase Inhibitor 40 u/μl (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot)

Für Light Cycler 1.5

Super Script[™] III One-Step RT-PCR System with Platinum[®] Taq DNA Polymerase (Invitrogen, GmbH, Karlsruhe)

Für StepOne Real-Time PCR System

TaqMan[®] One-Step RT-PCR Master Mix Reagents Kit, bestehend aus:

- Taq Man[®] 2x Universal PCR Master Mix NoAmp Erase[®] UNG
(= Reactionmix)

- 40x Multi Scribe™ and RNase Inhibitor Mix (= Enzymmix)
(Applied Biosystems Deutschland GmbH, Darmstadt)

Konventionelle PCR

Super Script™ III One-Step RT-PCR System with Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen GmbH, Karlsruhe)

50 x TAE-Puffer für die Agarosegelelektrophorese

242 g/l (0,2 M) Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Merck KGaA, Darmstadt)
57,1 ml/l Eisessig (Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe)
18,612 g/l (0,5 M) EDTA Dinatriumsalz Dihydrat (Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe)

Gelöst in Aqua bidestillata als Stammlösung, bei Raumtemperatur aufbewahrt und zum Gebrauch 1:50 mit Aqua bidestillata verdünnt.

Ethidiumbromidlösung

10 g/l Ethidiumbromid (Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe)

Unter dem Abzug mit Handschuhen gelöst in Aqua bidestillata und in Aliquots von 1,5 ml abgefüllt. Bei -20 °C dunkel gelagert und zum Gebrauch einzeln aufgetaut und bei Raumtemperatur dunkel gelagert.

3,0 % Agarosegel

3,0 g/l NEEO-Ultra-Qualität Roti®Garose für die DNA/RNA Elektrophorese (Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe)

50 µl/l Ethidiumbromid-Lösung

Gelöst in 1xTAE-Puffer, aufgekocht, in flüssigem Zustand gegossen und vor Gebrauch ca. eine halbe Stunde erstarren lassen.

Bromphenolblau

400 g/l (1,17 M) Saccharose (Merck KGaA, Darmstadt)

2,5 g/l (4 mM) Bromphenolblau Natriumsalz (Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe)

Gelöst in Aqua bidestillata.

DNA-Leiter

0,5 µg/µl Fermentas Gene Ruler™ 100 bp DNA Ladder (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot)

Bandengrößen: 1031, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100 und 80 bp

Sequenzierungsreaktion

Big Dye Buffer (5x) (Applied Biosystems Deutschland GmbH, Darmstadt)

Big Dye Terminator (Applied Biosystems Deutschland GmbH, Darmstadt)

Gelextraktion

peqGOLD Gel Extraction Kit (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen)

Präzipitation

Natriumacetat (Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe)

EDTA, 125 mM, pH 8 (Merck KGaA, Darmstadt)

Ethanol 99,8 % (v/v) (Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe)

Sequenzierungselektrophorese

310 Genetic Analyzer Capillary, 47 cm (Applera Deutschland GmbH, Darmstadt)

POP-6™ Polymer für den 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems Deutschland GmbH, Darmstadt)

3.1.3. Feldproben

RNA^{later}™ RNA Stabilization Reagent (Qiagen GmbH, Hilden)

3.1.4. Muschelversuche

Desinfektionsmittel

Virkon Advanced du pont[®] (Du Pont Animal Health Solutions, Suffolk, UK)

10 g werden in 1 Liter Milli-Q[®] Wasser gelöst.

Venno[®] Vet 1 super 1 %ige Lösung in Milli-Q[®] Wasser (Menno Chemie-Vertrieb GmbH, Norderstedt)

3.2. Weitere Materialien und Geräte

3.2.1. Virologische Untersuchungen

96-well Platten

Nunclon[™] 96 Well Platten, Flachboden (Nunc GmbH, Wiesbaden)

BD Microtest Zellkulturplatten BD Falcon[™], flach (BD Biosciences Discovery Labware, Heidelberg)

Nunclon[™] 96 Well Platten, Rundboden (Nunc GmbH, Wiesbaden)

BD Microtest Zellkulturplatten BD Falcon[™], rund (BD Biosciences Discovery Labware, Heidelberg)

Zellkulturflaschen

Nunclon[™] Flaschen mit Filterkappe, gerade (Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden)
(24 cm², 80 cm² und 175 cm²)

Nunclon[™] Flaschen, gerade (Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden)
(24 cm², 80 cm² und 175 cm²)

BD Falcon[™] Zellkulturflaschen (BD Biosciences Discovery Labware, Heidelberg)
mit Gasaustauschkappe (25 cm², 75 cm² und 175 cm²)

Zellkulturschälchen

BD Falcon[™] Zellkulturschälchen (BD Biosciences Discovery Labware, Heidelberg)
35 x 10 mm

ELISA

Avian Influenza Virus Antibody Test Kit, ELISA (Idexx, Laboratories, Inc., Westbrook, USA) (FlockChek AI MultiS-Screen)

Absorbance Microplate Reader

Microplate Reader Model 680 (Bio-Rad Laboratories, GmbH, München)

Microplate Manager Software 5.2.1 (Bio-Rad Laboratories, GmbH, München)

Membranfilter

Filter Whatman[®] (0,45 µl und 7 bar max.) (Schleicher & Schuell Micro Science GmbH, Dassel)

Eierbrutschrank

mit vollautomatischer Wendevorrichtung (Dipl. Ing. W. Ehret GmbH, Emmendingen)

Zellkultur-Brutschränke

CB210 (Binder GmbH, Tuttlingen)

Cytoperm Heraeus (Kendro Laboratory Products, Hanau)

APT.line[™] KB (Binder GmbH, Tuttlingen)

Mikroskope

Inverses Lichtmikroskop Wilovert (Will, Wetzlar)

Lichtmikroskop Epivert (Leitz, Wetzlar)

3.2.2. Molekularbiologische Untersuchungen

LightCycler[®] 1.5 Instrument (Roche Diagnostics GmbH, Roche Applied Science, Mannheim)

StepOne Real-Time PCR System (Applied Biosystems Deutschland GmbH, Darmstadt)

48-well Platte (Applied Biosystems Deutschland GmbH, Darmstadt)

MicroAmp[™] Fast Optical 48-Well Reaction Plate (0,1 ml)

MicroAmp™ 48-Well Optical Adhesive Film

Sequenzierung

Peqlab Primus 25 (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen)

Consort E443 (Keutz, Laborgeräte GbR, Reiskirchen)

Agagel Mini Biometra® (Biometra GmbH, Göttingen)

ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems Deutschland GmbH, Darmstadt)

3.2.3. Feldproben

Ultraschallgerät Sonorex RK 510 (Bandelin electronic, Berlin)

Zentrifuge Eppendorf 5415 R (Eppendorf AG, Hamburg)

Wattestäbchen, Holz, steril (Heiland Vet GmbH, Hamburg)

3.2.4. Muschelversuche

Mettler PC 440 Delta Range® (W. Wolfinger GmbH, Straubenhardt)

Einmal-Mikro-Pistill, autoklavierbar (Th. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen)

QIAShredder™ (Qiagen GmbH, Hilden)

3.3. Eingesetzte Zelllinien

***Terrapene* Heart Zellen (TH-1)**

Bezogen von der American Type Culture Collection (ATCC), CCL 50 (Teddington, Middlesex, UK). Es handelt sich um eine permanente Zelllinie aus epithelialen Herzzellen von der Schildkröte *Terrapene carolina*. Sie wurden bei 28 °C bebrütet.

Viper Heart Zellen (VH2)

Bezogen von der ATCC, CCL 140 (Teddington, Middlesex, UK). VH2 ist eine permanente Zelllinie, die von fibroblastischen Herzzellen der Schlangenspezies *Vipera russelli* stammt. Sie wurden bei 28 °C bebrütet.

Iguana Heart Zellen (IgH-2)

Erworben von der ATCC, CCL 108 (Teddington, Middlesex, UK). Bei den IgH-2 Zellen handelt es sich um eine permanente Zelllinie gewonnen von epithelialen Herzzellen des Leguans (*Iguana iguana*). Sie wurde bei 28 °C bebrütet.

Madin Darby Canine Kidney Zellen (MDCK)

Hierbei handelt es sich um eine permanente Zelllinie, die ursprünglich von der Niere eines normalen erwachsenen Hundes gewonnen wurde. Sie wurden von der Zellbank des Instituts für Infektionsmedizin, FLI, Insel Riems, bezogen und bei 37 °C bebrütet.

Epithelioma papulosum cyprini (EPC)

Bezogen vom CVUA, Stuttgart. Die Zellen stammen vom Karpfen (*Cyprinus carpio*) und wurden im Kaltbrutschrank bei 19-20 °C ohne CO₂-Zufuhr inkubiert.

Rainbow trout gonadal cells (RTG2)

Gewonnen von der Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*).

Wie die EPC Zellen wurden auch die RTG-2 Zelllinie freundlicherweise vom CVUA, Stuttgart, bereit gestellt.

Die Zellen wurden im Kaltbrutschrank bei 19-20 °C ohne CO₂-Zufuhr inkubiert.

Adult gilt-head seabream fin tissues (SAF-1)

Die Zellen stammten ursprünglich von der University of Malaga, Spanien. Es handelt sich um eine permanente Zelllinie, die von fibroblastischen Zellen der Goldbrasse (*Sparus aurata*) gewonnen wurden. Die optimale Bebrütungstemperatur lag bei 25-29 °C mit einer 5 %igen CO₂-Inkubation.

Fat head minnow caudal trunk (FHM)

Es handelt sich um epitheliale Zellen, die von der Elritze (*Phoxinus phoxinus*) primär an der ATCC gewonnen wurden. Die Bebrütung fand bei 28 °C unter 5 % CO₂ statt.

Die SAF-1 und FHM Zellen wurden von der Zellbank des Instituts für Infektionsmedizin, FLI, Insel Riems, bezogen.

3.4. Verwendete Virusisolate und Virusvermehrung sowie Kontrollseren

Insgesamt wurden in den Versuchen drei niedrig-pathogene aviäre Influenzastämme und ein Humanisolat verwendet. Die Stämme A/Teal/Wv632/Germany/05 (H5N1) und A/Mallard/Wv1732-34/03 (H4N6) sowie A/Muteswan/Germany/R2927/07 (H6N8) wurden freundlicherweise von PD Dr. Timm Harder, Friedrich-Loeffler Institut, Insel Riems, zur Verfügung gestellt. Sie wurden anschließend im Hühnerei auf eine Quantität von 400 bzw. 800 ml vermehrt, so dass für alle Versuche dieselbe Passage verwendet werden konnte. Nach Passagierung des LPAI H5N1 Isolates wurde eine Sequenzierung der HA-Spaltstelle zum Nachweis der Niedrigpathogenität durchgeführt.

Das Humanisolat A-Wisconsin/67/05-like (H3N2) konnte vom Landesgesundheitsamt, Stuttgart, bezogen und auf MDCK Zellen vermehrt werden.

Kontrollseren zur Durchführung des Hämagglutinations-Hemmungstest (HAH)

Das Kontrollserum H6N8 wurde von der Firma Lohmann Tierzucht, Cuxhaven, bezogen. Die Seren H5N1 (TV 15/08 S308 A teal/Foehr/wv632/05 Serum vom 22.05.08) und H4N6 (His Ka 84) wurden freundlicherweise vom Friedrich-Loeffler Institut, Insel Riems bereitgestellt.

Virusanzucht in SPF-Hühnereiern

Für die Vermehrung von Influenzaviren eignet sich besonders die Beimpfung der Allantoishöhle. Die embryonierten, spezifisch pathogenfreien Hühnereier wurden von der Firma Lohmann Tierzucht, Cuxhaven, bezogen und 9-11 Tage am Institut bei 37 °C und 50-60 % Luftfeuchte bebrütet. Für die Infektion der Eier wurde die Methode nach SENNE (1989) und HAWKES (1979) verwendet. Nach Desinfektion der Oberfläche wurde ein kleines Loch in die Eischale gestochen und 0,1 ml Virussuspension mittels einer Kanüle injiziert. Das Loch wurde mit Alleskleber verschlossen. Die Eier wurden weiterhin bei 37 °C bebrütet, täglich durchleuchtet und auf Lebenszeichen des Embryos geprüft. Nach Absterben der Embryonen bzw. maximal nach 5 Tagen wurde die Allantoisflüssigkeit mit einer Glaspipette abgesaugt, zentrifugiert, aliquotiert und bei -80 °C eingefroren. Bei Verdacht auf Kontaminationen wurde das Ausgangsmaterial vor Infektion der Eier in Antibiotika-haltiger Flüssigkeit verdünnt und durch einen 0,2 µm großen Membranfilter sterilfiltriert.

3.5. Virustitration

Am Vortag wurde eine 96-Loch-Mikrotiterplatte mit der entsprechenden Zellsuspension vorbereitet. Je nach Konzentration der Ausgangszellsuspension wurden 0,75 – 1 ml Zellsuspension mit 10 ml Zellkulturmedium gemischt und auf der Platte verteilt. Die Bebrütung erfolgte bei der für die Zelllinie erforderlichen Temperatur. Am nächsten Tag wurden 900 µl Erhaltungsmedium in 1,5 ml Reaktionsgefäßen vorgelegt. 100 µl des zu untersuchenden Materials wurden in das erste Gefäß gegeben, gründlich mithilfe eines Schüttelmixgerätes durchmischt und anschließend 100 µl auf das nächste Röhrchen übertragen. Es wurde eine Verdünnungsreihe von 10^0 bis 10^{-8} erstellt. Nach Entfernen des Mediums aus der 96-Loch-Platte wurden in je vier Löcher 100 µl jeder Verdünnungsstufe hinzugegeben und in vier Löcher 100 µl Erhaltungsmedium. Anschließend wurden die Platten wieder bei der entsprechenden Temperatur inkubiert und täglich lichtmikroskopisch auf einen möglichen ZPE beurteilt. Die KID_{50}/ml berechnet sich mit der Formel nach SPEARMAN und KÄRBER (HIERHOLZER und KILLINGTON, 1996). Zur Verifizierung des

zytopathischen Effektes wurde in der Regel zusätzlich ein Hämagglutinationstest durchgeführt.

3.6. Hämagglutinationstest

Der Hämagglutinationstest wurde gemäß einer OIE Richtlinie (OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES, 1996) durchgeführt. Aufgrund viraler Oberflächenantigene, wie sie bei Paramyxo- und Orthomyxoviren zu finden sind, kam es zu einer nachweisbaren Erythrozytenagglutination.

In eine 96-Loch Mikrotiterplatte mit U-förmigen Boden wurden 25 µl physiologische Kochsalzlösung vorgelegt. 25 µl Virussuspension wurden anschließend in die Löcher der ersten Reihe gegeben. In eine Kavität wurde als Positivkontrolle ein hämagglutinierendes Virus vorgelegt. Als Negativkontrolle wurde in ein anderes Well physiologische Kochsalzlösung vorgelegt. Das Material wurde mittels einer Pipette gemischt und in die nächste Reihe übersetzt. Die Prozedur wurde wiederholt, bis in allen Kavitäten Virussuspension in geometrischer Verdünnung vorhanden war. Nach der Zugabe von 50 µl einer 1 %igen Hühnererythrozytensuspension in alle Löcher und einer 30 minütigen Wartezeit bei Zimmertemperatur, konnte das Ergebnis abgelesen werden. Durch Schräghalten der Platte konnte die Art der Sedimentierung beurteilt werden: die Negativkontrolle sowie negatives Probenmaterial war durch eine tropenförmige Strömung der sedimentierten Erythrozyten zu erkennen. Agglutinierte rote Blutkörperchen zeigten dagegen kaum Strömung und sedimentierten teppichartig. Der HA-Titer einer Probe berechnete sich aus dem Kehrwert der höchsten Verdünnung bei der der Test noch ein positives Ergebnis zeigte.

3.7. Hämagglutinations-Hemmungstest (HAH-Test)

Wie der HA-Test wurde auch der Hämagglutinations-Hemmungstest anhand der OIE Richtlinie durchgeführt (OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES, 1996). Die beim HA-Test beschriebene Hämagglutination (HA) kann

durch Zugabe von Antikörpern, die gegen das hämagglutinierende Virus gerichtet sind, gehemmt werden. Der HAH-Test wurde in der β -Methode durchgeführt: die Menge an bekanntem Testvirus bleibt konstant, während das zu testende Serum verdünnt wird.

Zur Durchführung des HAH-Tests wurden 25 μ l physiologische NaCl-Lösung in alle Vertiefungen der 96-Loch Mikrotiterplatte vorgelegt. 25 μ l der zu testenden Seren wurden in jeweils eine Vertiefung der ersten Reihe gegeben. Als Negativkontrolle wurde statt des Serums 25 μ l physiologische Kochsalzlösung in eine Vertiefung gegeben. Als Positivkontrolle wurde 25 μ l von einem Kontrollserum verwendet. Die Flüssigkeiten der ersten Vertiefungen wurden gemischt und 25 μ l in die nächste Reihe übersetzt. Dies wurde bis zur untersten Reihe fortgesetzt. Zum Schluss wurden 25 μ l des verdünnten Serums verworfen. Im Anschluss wurden 25 μ l des Testantigens in alle Vertiefungen zugegeben. In den vorliegenden Untersuchungen kamen folgende Viren, eingestellt auf 4 HA-Einheiten, zum Einsatz: A/Muteswan/Germany/R2927/07 (H6N8), A/Teal/Wv632/ Germany/05 (H5N1) und A/Mallard/Wv1732-34/03 (H4N6) (alle vom FLI, Insel Riems). In eine Vertiefung wurde statt des Testantigens 25 μ l physiologische Kochsalzlösung zupipettiert um spontane Erythrozytenagglutinationen auszuschließen. Die Mikrotiterplatte wurde 30 Minuten bei Zimmertemperatur inkubiert. In der Folge wurden 50 μ l 1 %ige Erythrozytensuspension in alle Vertiefungen zugegeben und erneut 30 Minuten inkubiert. Trat eine Hämagglutination auf, kam es zu keiner Bindung des Antigens durch Antikörper im Serum. Bei einer fehlenden Hämagglutination wurde das Serum als positiv klassifiziert. Der Antikörpertiter wurde als Kehrwert der höchsten Verdünnung, bei der die Agglutination gehemmt wurde, angegeben. In Anlehnung an die OIE Richtlinie wurden Titer über 16 als positiv gewertet (OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES, 1996).

3.8. Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Zur Untersuchung der Fisch- und Schildkrötenseren wurde in Ergänzung zum HAH-Test ein ELISA mit Hilfe eines kommerziellen Kits (FlockChek AI MultiS-Screen) der Firma Idexx Laboratories, Inc. (Westbrook, USA) durchgeführt. Im Rahmen des Tests wird die relative Menge von Antikörpern gegen Vogelgrippeviren bestimmt. Es handelte sich um einen kompetitiven ELISA-Test. Die für die Aviäre Influenza spezifischen Antikörper bilden einen Komplex mit dem in der Beschichtung der Mikrotiterplatte enthaltenen Antigen. Ein Konjugat aus Enzym und monoklonalem Anti-AI-Antikörper kann nur binden, wenn keine Antikörper aus den Probeseren die Bindung an das Antigen blockieren. Nach Zugabe eines Enzym-Substrates ist die photometrisch nachgewiesene Farbentwicklung (650 nm) umgekehrt proportional zur Menge der Anti-AI-Antikörper in der Probe. Der Test wurde in Anlehnung an das dem Kit beigelegte Protokoll durchgeführt (IDEXX, 2007). 15 µl der Proben wurden mit 135 µl Probenverdünnungsmittel verdünnt. 30 ml des 10x Waschkonzentrats wurden mit 270 ml Milli-Q[®] Wasser ebenfalls verdünnt. 100 µl der unverdünnten Negativ- und Positivkontrollen wurden in je 2 Vertiefungen der mit Antigen beschichteten Mikrotiterplatte gegeben. 100 µl der verdünnten Proben wurden in die entsprechenden Vertiefungen pipettiert und anschließend 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde jede Vertiefung gründlich mit 350 µl Waschlösung dreimal gewaschen. 100 µl des Konjugates aus Anti-AI und Meerrettichperoxidase wurden in jede Vertiefung gegeben und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem dreimaligen Waschen wurden 100 µl TMB-Substratlösung in jede Vertiefung gegeben und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurden 100 µl Stopplösung zugegeben um die Reaktion abzustoppen. Die Absorptionen wurden bei 655 nm gemessen. Die Auswertung fand mit Hilfe folgender Software statt: Microplate Manager Software 5.2.1 und Microsoft[®] Office Excel 2003 SP3. Der Test wurde als gültig gewertet wenn die mittlere Absorption der Negativkontrolle größer 0,600 und der Quotient aus mittlerer Absorption der Positivkontrolle und mittlerer Absorption der Negativkontrolle (S/N-Verhältnis) kleiner als 0,50 war. Proben mit einem S/N-Verhältnis $\geq 0,50$

galten als negativ und Proben mit einem S/N-Wert $< 0,50$ wurden als positiv gewertet.

3.9. RNA Isolierung

Die Extraktion der viralen RNA fand nach BOOM et al. (1990) mithilfe einer Silica Matrix statt: Zunächst wurden der Wasch- und Lysispuffer hergestellt. Für den Waschpuffer wurden 48 g Guanidinthiocyanat in ein 250 ml Becherglas eingewogen und mit 40 ml 0,1 M Tris HCl-Lösung (pH 6,4) versetzt. Zur Herstellung des Lysispuffers wurden zusätzlich noch 8,8 ml 0,2 M EDTA (pH 8,0) sowie 1,04 g Triton X-100 hinzupipettiert. Beide Ansätze wurden etwa 15 min bei 56 °C im Wasserbad gelöst und in je zwei 50 ml Zentrifugenröhrchen abgefüllt. 0,3 ml Probenmaterial wurden in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß abgefüllt. 0,9 ml Lysispuffer und 0,04 ml Silica Matrix wurden hinzugefügt. Nach einheitlichem Durchmischen des Materials mittels eines Schüttelmixgerätes erfolgte eine 10 minütige Einwirkungszeit mit wiederholtem Durchmischen im 3-Minuten-Rhythmus. Anschließend wurde das Probenmaterial 0,5 min bei 4 °C und 14.000 rcf (Eppendorf Tischzentrifuge) zentrifugiert und der Überstand abdekantiert. Es erfolgten zwei Waschschriffe mit je 1,0 ml Waschpuffer sowie zwei weitere mit 70 %igem Ethanol. Hierbei wiederholten sich jeweils die Schritte des Durchmischens, Zentrifugierens und anschließendem Abdekantierens. Der finale Waschschriff fand mit Aceton statt. Die Probe wurde 3 min zentrifugiert und danach auf ein Papierhandtuch gestürzt und für 10 min mit geöffnetem Deckel bei 56 °C getrocknet. 75 µl Nuclease-freies Wasser (DEPC-Wasser) und 0,7 µl RNase-Inhibitor wurden zugegeben, durchmischt und 15 min bei nicht mehr als 56 °C inkubiert. Dabei wurde das Material alle 5 min erneut gevortext. Nach einem Zentrifugationsschriff von 3 min bei 4 °C und 14.000 rcf, wurde mit einer Pipette der Überstand (etwa 55 µl) in 0,5 ml Reaktionsgefäße abpipettiert, ohne dabei die sedimentierte Silica Matrix mitzunehmen. Nach erneutem Zentrifugieren für 3 min wurde der Überstand noch einmal abpipettiert.

Die gewonnene RNA wurde bis zur Durchführung der real-time RT-PCR bei -80 °C gelagert.

3.10. Real-time reverse-transcription-polymerase chain reaction (RRT-PCR)

Zum Nachweis der Influenzaviren wurde eine real-time RT-PCR nach SPACKMAN et al. (2002) basierend auf der Detektion des M-Gens (Teilstück von ~ 100 bp im Segment 7) verwendet. Zur Anpassung an das Light Cycler[®] 1.5 Instrument (ROCHE, Mannheim) konnte eine Laboranweisung von Dr. Bernd Hoffmann, FLI, übernommen werden (HOFFMANN, 2006). Im September 2007 erfolgte die Umstellung auf den Cyler StepOne Real-Time PCR System (Applied Biosystems Deutschland, GmbH). Der Großteil der Fischproben und alle Muschelproben wurden mit Hilfe dieses Gerätes untersucht. Das zugehörige PCR Protokoll konnte vom CVUA, Stuttgart, bezogen werden (HOFERER, 2006). Die verwendeten Primersequenzen wurden nach Vorlage eines PCR-Protokolls vom Kantonalen Laboratorium, Basel, intern modifiziert (VOGEL und ALT, 2005). Die Sequenzen der eingesetzten Primerpaare und der Sonde sind der Tabelle 3.10 zu entnehmen.

Der Mastermix wurde in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß für alle Proben gemeinsam angesetzt. Pro Reaktion wurden 5 µl autoklaviertes Milli-Q[®] Wasser, 12,5 µl Reactionmix, 0,5 µl Enzymmix sowie 2 µl Primer-Sonden-Mix (Tabelle 3.11) zu einem Endvolumen von 20 µl gemischt. Es wurde mit einem Sicherheitszuschlag von zwei Proben pro Platte gerechnet. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch auf einer 48 Well Platte verteilt und jeweils 5 µl Probenmaterial hinzupipettiert. Die Platte wurde mit dem Micro Amp[™] 48-Well Optical Adhesive Film verschlossen.

Tabelle 3.10: Primer und Sonde für die RRT-PCR zur Detektion einer Influenza A Virus M-Gen-Sequenz nach SPACKMAN et al. (2002), modifiziert nach VOGEL und ALT (2005)

InfA_2_For (F)	5'-AGATGAGYCTTCTAACMGAGGTC-3'
InfA_2_Rev (Rw)	5'-GCAAIAACATCYTCAAGTYTCTG-3'
InfA_2_FAM (S)	6FAM-TCAGGCCCCCTCAAAGCCGA-BHQ2

Tabelle 3.11: Ansatz des Primer-Sonden-Mix nach HOFFMANN (2006)

<i>Reagenz</i>	<i>Volumen (µl)</i>	<i>Endkonzentration</i>
Primer 1 (InfA_2_For):	20 µl (100 pmol/µl)	10 µM
Primer 2 (InfA_2_Rev):	30 µl (100 pmol/µl)	15 µM
Sonde (InfA_2_FAM):	2,5 µl (100 pmol/µl)	1,25 µM
Milli-Q®-Wasser	147,5 µl	-

Die PCR wurde nach folgendem Temperaturprofil durchgeführt:

1. Reverse Transkription	30 min	50 °C	} 42 Zyklen
2. Inaktivierung / Aktivierung	15 min	95 °C	
3. Denaturierung	30 s	95 °C	
4. Annealing	30 s	57 °C	
5. Elongation	30 s	72 °C	

3.11. Quantitative real-time reverse-transcription-polymerase chain reaction (qRRT-PCR)

Zur genauen Quantifizierung der detektierten viralen RNA wurde eine qRRT-PCR durchgeführt. Eine definierte Menge an DNA diente hierbei als Vergleichsgrundlage. Die klonierte M-Gen Sequenz wurde auf eine Menge von $4,35 \times 10^5$ Kopien/µl eingestellt. Es wurde eine \log_{10} -Verdünnungsreihe bis zu einer Konzentration von $4,35 \times 10^3$ Kopie/µl erstellt, aliquotiert und bei -20°C eingefroren. Bei jeder qRRT-PCR Reaktion wurden in 6 Vertiefungen der 48-Loch Mikrotiterplatte zu den 20 µl Mastermix je 5 µl des Standardklons hinzu pipettiert. Pro Verdünnungsstufe gab es eine Wiederholung. In die übrigen Vertiefungen wurde das Probenmaterial sowie die Negativkontrolle gegeben. Die Durchführung der qRRT-PCR fand in Anlehnung an das

Protokoll der RRT-PCR statt. Die Auswertung der Ergebnisse wurde mit folgender Software durchgeführt: StepOne™ Software Version 2.0 (Applied Biosystems, Deutschland GmbH, Darmstadt).

3.11.1. Klonierung

Die für die Durchführung der quantitativen real-time RT-PCR erforderliche DNA-Sequenz eines Teilstücks des M-Gens wurde mithilfe einer Klonierungsreaktion von Dr. Anthony Ike, MSc, am Institut für Umwelt- und Tierhygiene der Universität Hohenheim, Stuttgart, erstellt.

3.11.2. Sensitivität

Zur Bestimmung der Sensitivität der qRRT-PCR wurde der Standardklon in einer Verdünnungsreihe als Probe verwendet. Pro \log_{10} -Verdünnungsstufe wurden 5 Wiederholungen angesetzt. Es wurde eine qRRT-PCR durchgeführt. Bis zu einer Konzentration von $4,35 \times 10^2$ Kopien/ μl erfolgte eine zuverlässige Quantifizierung der eingesetzten DNA Menge.

3.12. Sequenzierung

Für die AI-HA5-Spaltstellensequenzierung wurde eine Laboranweisung des Friedrich-Loeffler-Instituts verwendet (HARDER, 2007). Ziel war eine Pathotypisierung der im Labor vermehrten H5N1 Viren mittels Identifizierung der Spaltstellensequenz des HA-Gens. Ein etwa 270 bp großes PCR-Fragment wurde amplifiziert und anschließend sequenziert.

Tabelle 3.12: AI-HA5-Spaltstellensequenzierung nach HARDER (2007)

<i>Mastermix-Komponenten</i>	<i>Volumen(μl)</i>	<i>Endkonzentration</i>
Aqua bidestillata	16 μ l	-
2x RT-PCR Master Mix	25 μ l	1x
RT-Mix (SIII)	2 μ l	-
Primer 1 (50 pmol/ μ l) H5-EU-Fw	1,0 μ l	1 mM
Primer 2 (50 pmol/ μ l) H5-EU-Rv	1,0 μ l	1 mM
AIV Eiisolat	5 μ l	-
Gesamtvolumen Reaktionsan- satz	50 μl	

Cycler-Programm

Die PCR wurde nach folgendem Temperaturprofil durchgeführt:

Reverse Transkription	50 °C 30 min	
Inaktivierung RT / Aktivierung Taq	94 °C 2 min	
Denaturierung	94 °C 30 s	} 35 Zyklen
Annealing	50 °C 30 s	
Elongation	68 °C 1 min	
Finale Elongation	68 °C 5 min	

Tabelle 3.13: Primer-Sequenzen für einen Teil des H-Gen bei H5 Inflenzaviren nach HARDER (2007)

H5-EU-F	5'-GAT AAT TTC TAG CAT GCC ATT CC-3'
H5-EU-Rw	5'-TTT TGT CAA TGA TTG AGT TGA CCT TAT TGG-3'

Detektion der Amplifikate und Gelpräparation

Die PCR-Produkte wurden auf einem Agarosegel detektiert. Die Gelextraktion erfolgte nach Angaben des Herstellerprotokolls (peqGOLD Gel Extraction Kit, Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen).

2 μ l des Reaktionsproduktes wurden im Anschluss verwendet, um den Erfolg der Extraktion gelelektrophoretisch zu überprüfen.

Sequenzierung der eluierten PCR-Fragmente

Für den Mastermix wurden folgende Komponenten angesetzt:

Aqua bidestillata (nicht autoklaviert)	6,5 µl
Big Dye Buffer (5x)	1 µl
Big Dye Terminator (1.1)	1 µl

Sowie 0,5 µl des H5-EU-F bzw. H5-EU-Rw Primers (Endkonzentration 0,56 pmol/µl). Es wurde jede Probe je einmal mit dem forward bzw. dem reverse Primer angesetzt.

Cycler-Programm

Die PCR wurde nach folgendem Temperaturprofil durchgeführt:

95°C	5 min	} 30 Zyklen
95°C	30 s	
50°C	10 s	
60°C	4 min	

Präzipitation

Zum PCR-Produkt wurden folgende Reagenzien zugefügt:

40 µl	Aqua bidestillata
5 µl	EDTA-Lösung
5 µl	Natriumacetatlösung
125 µl	Ethanol 100 %

Das Material wurde für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 30 Minuten bei 4 °C und 3.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde mit einer Pipette entfernt. Anschließend wurden 150 µl Ethanol (70 %), zugefügt und erneut für 15 Minuten bei 4 °C und 1.650 g zentrifugiert. Der Überstand wurde mit einer Pipette entfernt. Das Pellet wurde bei Raumtemperatur etwa 30 Minuten getrocknet. Das Material wurde in 25 µl DEPC-Wasser gelöst und 1 Minute bei 65 °C inkubiert.

20 µl dieser Lösung wurden in die passenden Reaktionsgefäße für die Elektrophorese überführt. Die Sequenzierung wurde in einem ABI Prism 310 Kapillarsequenzierer nach dem Protokoll des Herstellers (Applied Biosystems) durchgeführt.

Die Probenauswertung fand mit Unterstützung von Tibor Papp, DVM, MSc, vom Institut für Umwelt- und Tierhygiene der Universität Hohenheim statt. Die Proben wurden mit dem 5.1 DNA Sequencer Data Analysis Programm und dem Staden Program Package Version 1.6.0 (STADEN, 1996) bearbeitet. Nukleotid- und Proteindatenbanken wurden mit BLASTN und BLASTX bei www.ncbi.nih.gov (ALTSCHUL et al., 1990) untersucht und mittels BioEdit Sequence Alignment Editor dargestellt.

3.13. Untersuchung der Feldproben von Bodenseefischen

3.13.1. Spikeversuche mit Fischproben

Um den Einfluss potentieller Hemmstoffe beim molekularbiologischen Nachweis von aviären Influenzaviren in Fischproben zu evaluieren wurden Spikeversuche mit dem niedrig-pathogenen H5N1-Isolat (A/Teal/Wv632/Germany/05, FLI, Insel Riems), Titer auf MDCK Zellen: $10^{6,5}$ KID₅₀/ml, durchgeführt: Die Virussuspension wurde in einer sechsstufigen 10er Verdünnungsreihe gepoolten Fischproben in Tupfermedium sowie RNA-later™ RNA Stabilization Reagent vor der RNA-Präparation zugesetzt und die Nachweisgrenze in der RRT-PCR verglichen.

3.13.2. Organisation der Probenentnahme

Die Fische aus dem Bodensee wurden aufgrund von fischereirechtlichen Regelungen in Zusammenarbeit mit der Fischereiforschungsstelle, Langenargen und der Fischbrutanstalt, Insel Reichenau, am Untersee mittels Netzfischerei entnommen. Am Tag vor der Probennahme wurden die Netze ausgebracht und am Probenahmetag früh morgens (etwa bei Sonnenaufgang) eingeholt. Die Fische waren beim Eintreffen an der Fischereiforschungsstelle

bzw. der Fischbrutanstalt zum Teil noch lebend oder gerade frisch tot. Die Beprobung wurde in den Räumlichkeiten der Institute durchgeführt.

3.13.1. Untersuchungszeitraum

Im April 2007 wurden erstmalig Fische beprobt. Etwa zweimal pro Monat (abwechselnd in Langenargen und auf der Insel Reichenau) erfolgten die routinemäßigen Probenahmen. Da Vogelgrippefälle in der Regel im Zusammenhang mit der Zugvogelwanderung im Frühjahr und Herbst auftreten, wurden in den Sommermonaten (Juli bis September) keine Routineuntersuchungen durchgeführt. Die letzte Probenentnahme erfolgte im November 2007.

3.13.2. Untersuchungsgebiete

Da keine Fälle von Vogelgrippe auftraten, blieben die Untersuchungen auf die Entnahme von Routinekontrollen beschränkt. Aufgrund von praktischen Überlegungen ist die Wahl auf zwei Gebiete gefallen: Zum einen vor Langenargen etwa 200-300 m vom Ufer entfernt und zum anderen im Untersee im Bereich vor der Insel Reichenau.

3.13.3. Untersuchungsmaterial

Grundsätzlich war das Spektrum der untersuchten Fische abhängig von der Verteilung in den Netzen und damit nicht gezielt planbar. Generell wurde aber das Beprobieren möglichst verschiedener Spezies - mit unterschiedlichen Ernährungsgewohnheiten - angestrebt.

3.13.4. Probennahme und Transport

Kiemenproben

Mittels abgeflammter Pinzette und Schere wurde ein maximal 0,5 x 0,5 cm großes Stück aus einem Kiemenblatt eines frisch toten Tieres herausge-

schnitten. Das Material wurde sofort in ein Reaktionsgefäß mit Transportflüssigkeit überführt und kühl gelagert.

Schuppenproben

Mittels einer in 85 %igem Ethanol getränkten und abgeflammt Pinzette wurden mehrere Schuppenblätter von der Fischhaut entfernt und in ein Reaktionsgefäß mit Transportflüssigkeit gegeben und kühl gelagert.

Rachentupfer

Das Maul eines frisch toten Fisches wurde mit leichtem Druck auf das Kiefergelenk geöffnet. Durch mehrmaliges Hin- und Herdrehen eines sterilen Wattetupfers wurde Zellmaterial von der Oberfläche der Rachenschleimhaut gewonnen und in ein Reaktionsgefäß mit Transportflüssigkeit überführt.

Kloakentupfer

Wie bei der Entnahme von Rachentupfern wurde versucht, mittels eines sterilen Wattetupfers durch drehende Bewegungen Zellen im Kloakenbereich aufzunehmen. Der Tupfer wurde anschließend in ein Reaktionsgefäß mit Transportflüssigkeit überführt.

Sämtliche Proben wurden in einer Kühlbox innerhalb von 2-5 Stunden zum Institut transportiert. Hier wurden sie bis zur Aufarbeitung am Folgetag bei 4 °C gelagert.

Blutproben

Generell war bei frisch toten Fischen innerhalb der ersten 10 min post mortem eine Blutentnahme möglich. Die Gewinnung erfolgte entweder an der dorsalen Schwanzvene (BLACK, 2000) oder aber direkt aus dem Herzen. Mit einer in Heparinlösung (1 g Heparin-Natriumsalz in 1 Liter Natriumchloridlösung, sterilfiltriert) gespülten Kanüle wurde das Gefäß von ventral angestochen und in einer 1 ml Tuberkulinspritze aufgefangen. Das Blut wurde gekühlt transportiert und direkt nach dem Eintreffen im Labor zentrifugiert.

giert (3.000 rcf / 5 min). Der Überstand wurde abpipettiert und bei -80 °C gelagert. Zur Durchführung des HAH-Tests wurden die Seren bei Raumtemperatur aufgetaut und 1:4 in physiologischer Kochsalzlösung verdünnt. Anschließend erfolgte eine Hitzeinaktivierung bei 56 °C für 30 min.

3.13.5. Aufbereitung und Konservierung des Probenmaterials

Zu Beginn der Untersuchungen fand die Aufnahme des Probenmaterials in 1 ml Tupfermedium statt. Nach Umstellung vom Light Cycler auf das StepOne real-time PCR Gerät wurde 0,6 ml RNA^{later}TM RNA Stabilization Reagent (Qiagen GmbH, Hilden) verwendet. Die Proben wurden in einem Eiswasser-Ultraschallbad 5 min behandelt und anschließend 10 min bei 3.000 rcf zentrifugiert. Nach Entnahme von 0,3 ml Probenflüssigkeit, erfolgte die RNA-Isolation mittels Silica Matrix. Die isolierte RNA wurde bei -80 °C bis zur Durchführung der real-time RT-PCR gelagert. Die PCR wurde als Presence/Absence Experiment durchgeführt. Als Positivkontrolle wurde ein LPAI H5N1-Isolat verwendet.

3.14. Untersuchung von Schildkrötenseren

Um eine mögliche Infektion von Reptilien mit AIV nachzuweisen, wurden Seren von Landschildkröten auf Antikörper gegen verschiedene AIV getestet. Die Seren stammten vorwiegend von Schildkröten der Arten *Testudo graeca* und *T. hermanni* und kamen aus Italien und Großbritannien. Die Seren wurden im Laufe der Routinediagnostik am Institut für Umwelt- und Tierhygiene, Universität Hohenheim, gesammelt und bei -80 °C gelagert. Alle untersuchten Schildkröten wurden im Freien gehalten und hatten damit möglicherweise Kontakt zu Wildvögeln. Die Seren wurden bei Raumtemperatur aufgetaut und 1:4 in physiologischer Kochsalzlösung verdünnt. Anschließend erfolgte eine Hitzeinaktivierung bei 56 °C für 30 min.

3.15. Laborversuche mit Dreikantmuscheln

3.15.1. Spikeversuche mit Muschelmaterial

Je 20 mg gepooltes Muschelfleisch wurde in ein QIAshredder™ tube gegeben. Die Elution fand mittels PBS statt. Es wurde eine dekadische Verdünnungsreihe der Virussuspension (H5N1 A/Teal/Wv632/Germany/05, FLI, Insel Riems) hergestellt und den QIAshredder™ tubes zugesetzt (je eine Wiederholung pro Verdünnungsstufe). Parallel wurden QIAshredder™ tubes ohne Muschelfleisch mit den gleichen Virusverdünnungen verwendet. Als Negativkontrolle wurde ein Reaktionsgefäß mit Muschelfleisch aber ohne Viruszugabe eingesetzt. Die Aufbereitung und Durchführung der qRRT-PCR fand analog zur Durchführung der Muschelversuche statt. Aus den Ergebnissen derselben Verdünnung wurde der arithmetische Mittelwert errechnet. Anschließend wurde die Zahl der detektierten Kopien in RTPCRU/ml umgerechnet. Von den detektierten Kopienzahlen wurde eine einfaktorielle Kovarianzanalyse zum Vergleich der Mittelwerte mit und ohne Zusatz von Muschelmaterial durch die Arbeitsgruppe Biomathematik und Datenverarbeitung unter der Leitung von Dr. rer. nat. Dipl. Math. Klaus Failing am Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig Universität, Gießen, durchgeführt.

3.15.2. Untersuchungsmaterial und Hälterung unter Laborbedingungen

Die Dreikantmuscheln wurden vom Institut für Seenforschung mittels Dretschfischerei vom Bodenseegrund gesammelt und im Bodensee in Ufernähe gehältert. Zu Versuchsbeginn konnten die Muscheln von dort jederzeit entnommen werden. Die Dreikantmuscheln überlebten unter Laborbedingungen in einer artifizierten Hälterung in Bodenseewasser ohne Zugabe nutritiver Substanzen bei 4 °C über mehrere Wochen. Bis zu 100 Muscheln konnten in einem 2.000 ml Becherglas aufbewahrt werden.

3.15.3. Eingesetztes Virus

Es wurden zwei niedrig pathogene aviäre Influenzastämme verwendet. Das H5N1 Isolat (A/Teal/Wv632/Germany/05, FLI, Insel Riems), welches anhand der HA-Spaltstellensequenz eindeutig als niedrig-pathogen eingestuft werden konnte, wurde in den Vorversuchen zu einer Endkonzentration von $10^{4,5}$ KD_{50}/ml (auf MDCK-Zellen) dem Bodenseewasser zugegeben. In den Hauptversuchen wurde die virushaltige Allantoisflüssigkeit in einer Endkonzentration von 10^5 KD_{50}/ml verwendet. Das H4N6-Isolat (A/Mallard/Wv1732-34/03, FLI, Insel Riems) kam in den Versuchen mit einer Endkonzentration im Wasser von $10^{3,25}$ KD_{50}/ml (auf MDCK-Zellen) zur Verwendung.

3.15.4. Exposition der Muscheln

Die Vorversuche wurden bei 4 °C, die Hauptversuche mit dem H5N1 Virus bei 4 °C und 19 °C durchgeführt. In Bechergläser mit 300 ml Bodenseewasser wurden 25 g Muschelmateriale eingewogen und kurzzeitig bei der entsprechenden Versuchstemperatur vorinkubiert. Drei bzw. 30 ml (Hauptversuche) der virushaltigen Allantoisflüssigkeit wurden zum Wasser dazugegeben. Durch kurzes Rühren wurde das Virus gleichmäßig verteilt.

Nach 48 Stunden wurden fünf Tiere mit einem durchschnittlichen Gesamtgewicht von 2-3 g entnommen. Gleichzeitig wurden 2 x 1 ml Wasserproben aus jedem Becherglas entnommen.

Drei Muscheln pro Versuchsdurchlauf, die lediglich in Bodenseewasser gehalten wurden, dienten als Negativkontrollen.

3.15.5. Reinwasserversuche

Nach 48 Stunden wurde das Restgewicht des verbleibenden Muscheln festgestellt, die Tiere wurden dreimal mit Milli-Q[®] - Wasser (bzw. zusätzlich 1 %iger Virkon[®]-Lösung bzw. 1 %ige Venno[®] Vet 1 super-Lösung in den Vorversuchen) gespült und in 300 ml Reinwasser überführt. Die Inkubation

erfolgte weiterhin bei 4 °C bzw. 19 °C. Nach 1, 3, 5, 8, 14 Tagen in Reinwasser (d.h. am Versuchstag 3, 5, 7, 10 und 16) wurden jeweils fünf Tiere und zwei Wasserproben zu je 1 ml entnommen.

3.15.5.1. Präparation der Muscheln

Die Muscheln einer Entnahmegruppe wurden in einem Erlenmeyerkolben mit autoklaviertem Milli-Q[®] Wasser dreimal gespült. Mittels flüssigen Stickstoffs wurden die Tiere getötet. In den Versuchen mit Desinfektion der Oberfläche wurden die Muscheln zusätzlich in etwa 200 ml Desinfektionsmittel (1 %ige Virkon[®]-Lösung aus der Wirkstoffgruppe der Peroxidverbindungen und organische Säuren bzw. 1 %ige Venno[®] Vet 1 super-Lösung aus der Wirkstoffgruppe der organischen Säuren) 5 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Anschließend wurde der Kolben gründlich geschwenkt und das Desinfektionsmittel abgeschüttet. Dieser Schritt wurde zweimal wiederholt. Anschließend wurden diese Tierkörper ebenfalls mittels Milli-Q[®] Wasser abgespült.

Jede Muschel wurde einzeln mittels Skalpell und Pinzette geöffnet und präpariert: das Fleisch wurde aus der Schale entnommen und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Zur Zerkleinerung des Muschelfleisches wurde ein Mikropistill verwendet. In Anlehnung an ein Protokoll zur Isolation von RNA aus tierischem Gewebe (QIAGEN, 2001) wurden etwa 20 mg des Materials in ein QIAShredder[™] tube überführt. Nach Zugabe von 500 µl Buffer RTL (Versuche mit Desinfektion der Muscheln) bzw. PBS-Lösung (übrige Versuche) wurde das Material 2 min bei 16.000 rcf zentrifugiert. Anschließend wurden erneut 500 µl Buffer RLT oder PBS-Lösung zugegeben und zentrifugiert. Das Eluat wurde bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert.

3.15.5.2. Virusnachweis mittels PCR

Zur Durchführung der RNA Isolierung nach BOOM et al. (1990) wurden 300 µl des Eluates verwendet. Zur Quantifizierung der vorhandenen RNA-Menge wurde eine quantitative real-time RT-PCR (qRRT-PCR) eingesetzt. Anhand der detektierten Menge an Kopien konnten die Virusmengen in den Muscheln mit den Virusmengen im Wasser über die Versuchzeit verglichen werden.

3.15.5.3. Virusnachweis mittels Virusanzucht

In den Hauptversuchen wurde das Muscheleluat und die Wasserproben auf 9-11 Tage alte embryonierte Hühnereier überimpft. Das Material einer jeden Muschel und die Wasserproben wurden in Erhaltungsmedium in einer log₁₀-Verdünnungsreihe bis zu einer Verdünnung von 10⁻⁵ (Versuchstag 2 und 3) bzw. 10⁻³ (restliche Versuchstage) verdünnt. Die Eier wurden täglich durchleuchtet. Abgestorbene Embryonen wurden kalt gestellt. Am 4. Tag wurde nach einer zwölfstündigen Lagerung der Eier bei 4 °C die Allantoisflüssigkeit geerntet. Neben dem Absterben der Embryonen wurde ein Hämagglutinationstest zur Verifizierung einer Virusvermehrung durchgeführt. Als Negativkontrolle wurde das Eluat nicht-kontaminierter Muscheln und reines Boden-seewasser auf Eier titriert.

In den Vorversuchen mit Desinfektion der Muscheloberfläche wurde das Muscheleluat auf MDCK Zellen bis zu einer Verdünnung von 10⁻⁵ (Versuchstag 2 und 3) bzw. 10⁻³ (restliche Versuchstage) titriert. Die Platten wurden täglich lichtmikroskopisch auf einen möglichen ZPE beurteilt. Beim Ausbleiben eines ZPE wurde der Versuch nach 7 Tagen abgebrochen. Zur Verifizierung des zytopathischen Effektes bzw. dessen Ausbleibens wurde zusätzlich ein Hämagglutinationstest durchgeführt.

3.15.5.4. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung wurde von der Arbeitsgruppe Biomathematik und Datenverarbeitung unter der Leitung von Dr. rer. nat. Dipl. Math. Klaus Failing am Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig Universität, Gießen, durchgeführt. Verwendet wurde folgendes Statistikprogramm: BMDP/Dynamic Statistical Software, Release 8.1 (Statistical Solutions Ltd., Cork, Irland) (DIXON, 1993).

Die fünf beprobten Muscheln pro Entnahmezeitpunkt wurden als fünf Versuchswiederholungen betrachtet. Bei rechtsschiefer Verteilung positiver quantitativer Merkmale wurde eine logarithmische Transformation der Daten durchgeführt und die Datenbeschreibung mit Hilfe von geometrischen Mittelwerten und Streufaktoren vorgenommen. Zur statistischen Prüfung des Zeit-, Temperatur- (und Gruppen-) einflusses auf die Signifikanz wurde bei den angenähert normal verteilten Merkmalen eine ein-, zwei- (bzw. dreifaktorielle) Varianzanalyse (mit Messwiederholungen im Faktor 'Zeit') mit dem Programm BMDP7D (bzw. BMDP2V) durchgeführt.

Bei der Bewertung der statistischen Signifikanzen wurde das Signifikanzniveau $\alpha=0,05$ zugrunde gelegt, d.h. Ergebnisse mit $p \leq 0,05$ wurden als statistisch signifikant angesehen. Zusätzlich wurde - wenn möglich - der exakte p-Wert angegeben.

Zur Analyse der Spikeversuche wurde eine einfaktorielle Kovarianzanalyse zum Vergleich der Mittelwerte mit und ohne Zusatz von Muschelmaterial, unter Verwendung des oben genannten Statistikprogrammes, durchgeführt.

Die weitere Auswertung und grafische Darstellung erfolgte eigenständig unter Verwendung von Microsoft[®] Office Excel 2003 SP3.

Zur Berechnung der absoluten Menge an RNA pro Gramm Muschel wurde folgendes Modell verwendet:

Während der RNA-Isolierung wurde nach dem Trocknungsschritt das Material in 0,075 ml DEPC-Wasser und 0,0007 ml RNase Inhibitor gelöst. Hiervon wurden für die qRRT-PCR aber nur 0,005 ml verwendet. Die in den für die

RNA-Präparation verwendeten 0,3 ml vorhandenen Kopien wurden nach POSCHETTO et al. (2007) folgendermaßen berechnet:

$$\text{Log}_{10} \text{ RTPCRU}/0,3 \text{ ml} = (\text{Log}_{10} \text{ Kopien}/0,005 \text{ ml}) + \text{Log}_{10} (0,0757/0,005)$$

$$\text{Log}_{10} \text{ RTPCRU}/0,3 \text{ ml} = (\text{Log}_{10} \text{ Kopien}/0,005 \text{ ml}) + 1,18$$

Insgesamt wurden 20 mg Muschelfleisch in 1 ml Puffersubstanz gelöst. Die Kopienzahl pro Milliliter berechnete sich folgendermaßen:

$$\text{Log}_{10} \text{ RTPCRU}/\text{ml} = (\text{Log}_{10} \text{ Kopien}/0,3 \text{ ml}) + \text{Log}_{10} (1000/300)$$

$$\text{Log}_{10} \text{ RTPCRU}/\text{ml} = (\text{Log}_{10} \text{ Kopien}/0,3 \text{ ml}) + 0,52$$

Um das resultierende Ergebnis auf 1 g zu beziehen, war ein letzter Rechenschritt erforderlich:

$$\text{Log}_{10} \text{ RTPCRU}/\text{g} = (\text{Log}_{10} \text{ Kopien}/\text{ml}) + \text{Log}_{10} (1000/20)$$

$$\text{Log}_{10} \text{ RTPCRU}/\text{g} = (\text{Log}_{10} \text{ Kopien}/\text{ml}) + 1,7$$

Für die Berechnung der RTPCRU/ml in den Wasserproben wurde analog zu den obigen Ausführungen folgende Formel verwendet:

$$\text{Log}_{10} \text{ RTPCRU}/\text{ml} = (\text{Log}_{10} \text{ Kopien}/0,3 \text{ ml}) + 0,52$$

Die Ermittlung der EID₅₀/ml Wasser bzw. EID₅₀/g Muschel erfolgte anhand der Methode nach SPEARMAN und KÄRBER (HIERHOLZER und KILLINGTON, 1996) sowie in Ergänzung mit dieser Formel:

$$\text{Log}_{10} \text{ EID}_{50}/\text{ml Wasserprobe} = 1 + \log_{10} \text{ EID}_{50}/100 \text{ ml}$$

$$\text{Log}_{10} \text{ EID}_{50}/\text{g Muschelfleisch} = (1 + \log_{10} \text{ EID}_{50}/100 \text{ ml}) + 1,7$$

3.16. Zellkulturversuche

3.16.1. Verwendete Virusisolate

In den Zellkulturversuchen kamen folgende aviäre Influenzaviren zum Einsatz: H5N1-Isolat (A/Teal/Wv632/Germany/05, FLI, Insel Riems), 2. Passage, Titer auf MDCK Zellen: $10^{6,5}$ KID₅₀/ml sowie die 3. Passage des Stam-

mes H4N6 (A/Mallard/Wv1732-34/03, FLI, Insel Riems) mit einem Titer von $10^{5,25}$ KID₅₀/ml. Weiterhin wurde ein humanpathogenes Influenzavirus (H3N2) (A-Wisconsin/67/05-like), 10^2 KID₅₀/ml verwendet.

3.16.2. Infektion der Zellen

1 ml Zellsuspension wurde in 10 ml Zellkulturmedium verdünnt. Je 2 ml dieser Suspension wurden in die Zellkulturschälchen eingesäht. Nach einer vierundzwanzigstündigen Bebrütung bei einer der Zelllinie angepassten Temperatur (19 °C, 28 °C bzw. 37 °C) wurde das Medium abgeschüttet. Bei der anschließenden Infektion wurden die Zellen mit 200 µl Virussuspension für zwei Stunden bei der für die Zelllinie entsprechenden Temperatur inkubiert. Nach zweimaligem Waschen wurde Erhaltungsmedium zugegeben und die Zellen bis zum Ablesen des ZPE nach zwei bis maximal sieben Tagen nochmals inkubiert.

3.16.3. Virusnachweis

Der Virusnachweis fand primär mittels mikroskopischer Untersuchung auf einen ZPE statt. Zur Verifizierung wurde ein Hämagglutinationstest durchgeführt. Vom Zellkulturüberstand wurde nach 0, 2 und 4 Tagen eine qRRT-PCR durchgeführt sowie ein immunhistochemischer Nachweis mittels Peroxidasetest durchgeführt. Das entsprechende Protokoll wurde von Prof. Dr. Jens Teifke vom Friedrich-Loeffler-Institut, Insel Riems, bereitgestellt. Durchführung: für die Hitze-fixation wurde das Medium in den Zellkulturschälchen abgesaugt und die Zellen einmalig mit PBS gewaschen und für 2 h bei 80 °C getrocknet. Anschließend wurden die Schälchen mit 1 ml PBS-Tween gewaschen und 400 µl des primären Antikörpers aufgebracht. Es erfolgte ein Inkubationsschritt über 1 h bei Raumtemperatur. Nach Absaugen des Antikörpers wurden die Schälchen erneut mit 1 ml PBS-Tween gewaschen und 400 µl des sekundären Antikörpers aufgetragen und nochmals 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Absaugen des Antikörpers wurden die Proben mit PBS gewaschen und dann für 10 Minuten in PBS bei Raumtemperatur ste-

hen gelassen. Der Überstand wurde abgesaugt und 400 µl der Färbelösung (AEC Chromogen Kit) aufgetragen. Nach 5-10 Minuten wurde der Farbstoff mit Milli-Q[®] Wasser entfernt und die Schälchen unter dem Mikroskop betrachtet.

Weiterhin wurden an den Versuchstagen 0, 2 und 4 die Zellkulturüberstände in Erhaltungsmedium bis zu einer Verdünnung von 10^{-4} bzw. 10^{-5} verdünnt und auf 9-11 Tage alte embryonierte Hühnereier titriert. Die Eier wurden post infectionem täglich durchleuchtet. Am 4. Tag nach der Infektion wurde die Allantoisflüssigkeit geerntet. Der Virusnachweis erfolgte mittels eines Hämagglutinationstests.

4. ERGEBNISSE

4.1.1. Untersuchung der Feldproben von Bodenseefischen

4.1.1.1. Spikeversuche

Das H5N1 Virus wurde in einer Ig-Verdünnungsreihe Kiemen- und Schuppenproben sowie Rachen- und Kloakentupfern von Fischen zugesetzt. Die Ergebnisse der Spikeversuche sind in Abb. 4.1 dargestellt.

Elution mittels Tupfermedium

In den Ansätzen ohne Probenmaterial war eine Detektion bis zu einer Konzentration von $10^{2,2}$ KID₅₀/ml auf MDCK im Ausgangsmaterial möglich (Ct 33,98). Der Ansatz ohne Virus (nur Medium und Probe) war frei von nachweisbarer RNA. In den **Kiemenproben** resultierte aus derselben Viruskonzentration ein schwach positives Signal (Ct 35,5). Eine sichere Detektion war nur bis zu einer Konzentration von $10^{3,2}$ KID₅₀/ml möglich. Die **Schuppen-** und **Rachentupferproben** zeigten fast identische Ergebnisse. In den **Kloakentupferproben** war dagegen bis zu einem Titer von $10^{2,2}$ KID₅₀/ml (Ct 32,21) das Signal deutlich erkennbar.

Bei Elution in Tupfermedium waren lediglich die Kloakentupferproben frei von hemmenden Einflüssen. Kiemen- und Schuppenprobenmaterial von Fischen zeigten dagegen in beiden Ansätzen einen deutlichen inhibitorischen Effekt auf den Nachweis von aviären Influenzaviren in der qRRT-PCR.

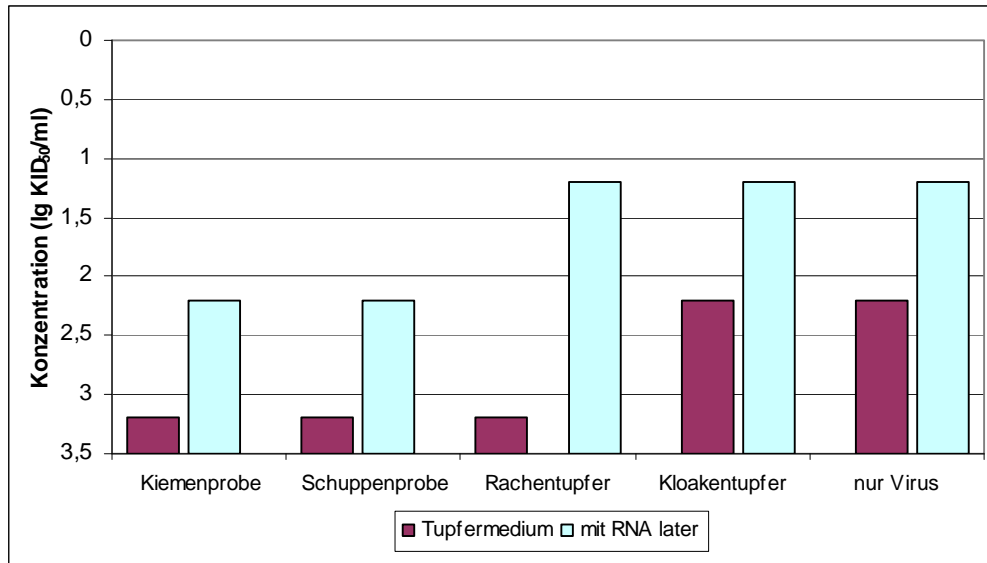


Abb. 4.1: Spikeversuch Fischproben: Elution mittels Tupfermedium und RNA^{later}TM RNA Stabilization Reagent; Nachweisgrenze in unterschiedlichem Probenmaterial

Elution mittels RNA^{later}TM RNA Stabilization Reagent

In den Ansätzen ohne Probenmaterial war eine Detektion bis zu einem Titer von $10^{1,2}$ KID₅₀/ml möglich (Ct 35,83). In den **Kiemenproben** war bis zu einem Titer von $10^{1,2}$ KID₅₀/ml im Ausgangsmaterial ein Signal detektierbar (39,22). Allerdings handelte es sich um ein sehr schwaches Signal und wurde deshalb nicht als positiv gewertet. Die **Schuppenproben** verhielten sich ähnlich ($10^{1,2}$ KID₅₀/ml: Ct-Wert 37,03) und wurden deshalb auch nur bis zu einer Viruskonzentration von $10^{2,2}$ KID₅₀/ml als positiv bewertet. Das Virus war in den **Rachentupferproben** deutlich bis zu einem Titer von $10^{1,2}$ KID₅₀/ml nachweisbar. Die Abstände der Kurven zwischen den einzelnen Konzentrationsstufen betragen etwa 4 Zyklen und waren weitgehend gleichmäßig. Auch in den Ansätzen mit **Kloakentupferproben** war Virus in einer Konzentration von $10^{1,2}$ KID₅₀/ml noch nachweisbar (Ct 35,97).

Es konnte gezeigt werden, dass eine Elution mittels RNA^{later}TM RNA Stabilization Reagent die Nachweisgrenze viraler RNA im Vergleich zu Tupfermedium erhöht. In den Proben mit RNA^{later}TM RNA Stabilization Reagent konnte in den Rachen- und Kloakentupfern kein inhibitorischer Effekt durch das Fischprobenmaterial festgestellt werden.

4.1.1.2. Untersuchung der Kiemen- und Schuppenproben sowie Rachen- und Kloakentupfer von Bodenseefischen mittels RRT-PCR

Im Rahmen von acht Fahrten an den Bodensee wurden Proben von insgesamt 114 Fischen gesammelt. Bei 96,5 % der Fische konnten Kiemen- und Schuppenproben sowie Rachen- und Kloakentupfer genommen werden. Bei 55 Tieren war eine Blutprobenentnahme möglich (48,2 %). Wie in Abb. 4.2 dargestellt, wurden 44 Felchen (*Coregonus spp.*) (39 %), 38 Barsche (*Perca fluviatilis*) (33 %), 6 Rotaugen (*Rutilus rutilus*) (5 %), 6 Trüschen (*Lota lota*) (5 %), 8 Hasel (*Leuciscus leuciscus*) (7 %), 5 Hechte (*Esox lucius*) (4 %), 1 Schleie (*Tinca tinca*) (1 %), 2 Saiblinge (*Salvelinus alpinus*) (2 %), 2 Kaulbarsche (*Gymnocephalus cernuus*) (2 %), 1 Barbe (*Barbus barbus*) (1 %) und 1 Giebel (*Carassius gibelio*) (1 %) untersucht.

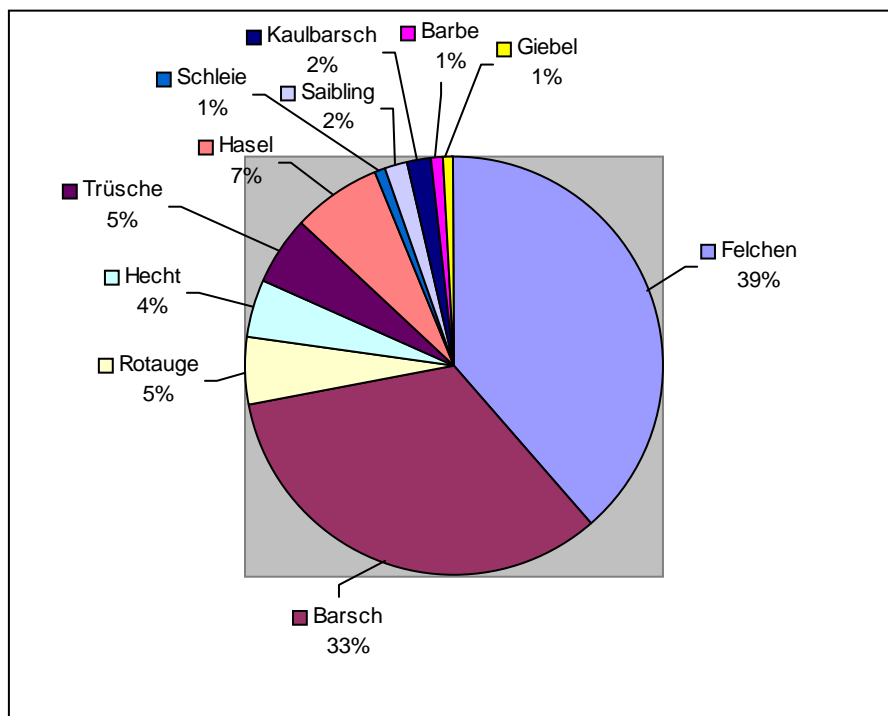


Abb. 4.2: Übersicht Speziesverteilung beprobter Fische aus dem Bodensee

61 (54 %) der untersuchten Tiere stammten aus der Bodenseeregion vor Langenargen. 53 (46 %) Fische wurden im Untersee im Gebiet um die Insel Reichenau gefangen.

Ab dem 09.10.07 wurden die Proben in RNA/ater™ RNA Stabilization Reagent gesammelt. Die insgesamt 440 Proben wurden mittels real-time RT-PCR im Presence/Absence-Plot untersucht. Als Positivkontrolle diente ein H5N1 LPAI Virus-Isolat, das in Eikultur im Labor vermehrt wurde. Milli-Q® Wasser wurde als Negativkontrolle eingesetzt. Die Positiv- und Negativkontrollen verhielten sich erwartungsgemäß. Alle untersuchten Feldproben waren in der real-time RT-PCR negativ.

Anhand der Fischproben 1-6 aus der vierten Probennahme in Langenargen soll exemplarisch, wie in Abb. 4.3 dargestellt, die Auswertung der Proben dargestellt werden: der von der Software vorgegebene Threshold von 0,389 diente als Ausschlusskriterium für positive bzw. negative Proben. Die Positivkontrolle lag mit einer Intensität von 1,215 bzw. einem Threshold Cycle (Ct) von 20 deutlich über dieser Grenze. Die drei Negativkontrollen erzielten einen Durchschnittswert von 0,165 und die 24 Proben einen Wert von etwa 0,14. Somit galten alle untersuchten Tiere als negativ.

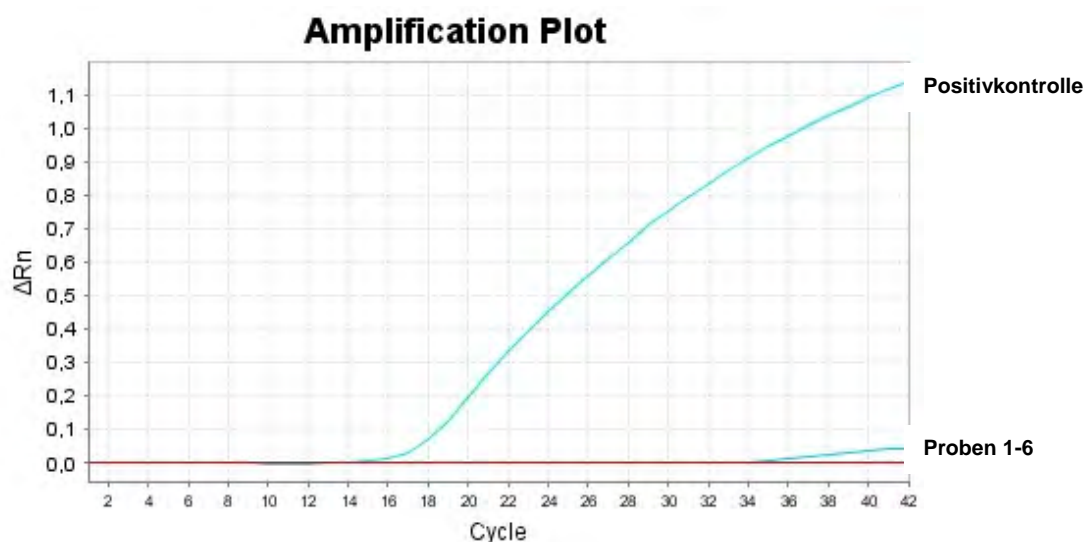


Abb. 4.3: Langenargen 4, Fisch 1-6, RRT-PCR, Amplification Plot

4.1.1.3. Untersuchung von Fischseren mittels Hämagglutinations-Hemmungstest (HAH-Test) und Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Von den insgesamt 55 Blutproben stammten 27 (49,1 %) aus dem Gebiet vor Langenargen und 28 (50,9 %) aus der Bodenseeregion um die Insel Reichenau. Wie in Abb. 4.4 dargestellt, wurden 42 (76,4 %) Felchen, 3 (5,5 %) Hasel, 3 (5,5 %) Hechte, 2 (3,6 %) Barsche, 2 (3,6 %) Saiblinge sowie je eine (1,8 %) Schleie, ein (1,8 %) Rotaugen und eine (1,8 %) Barbe untersucht.

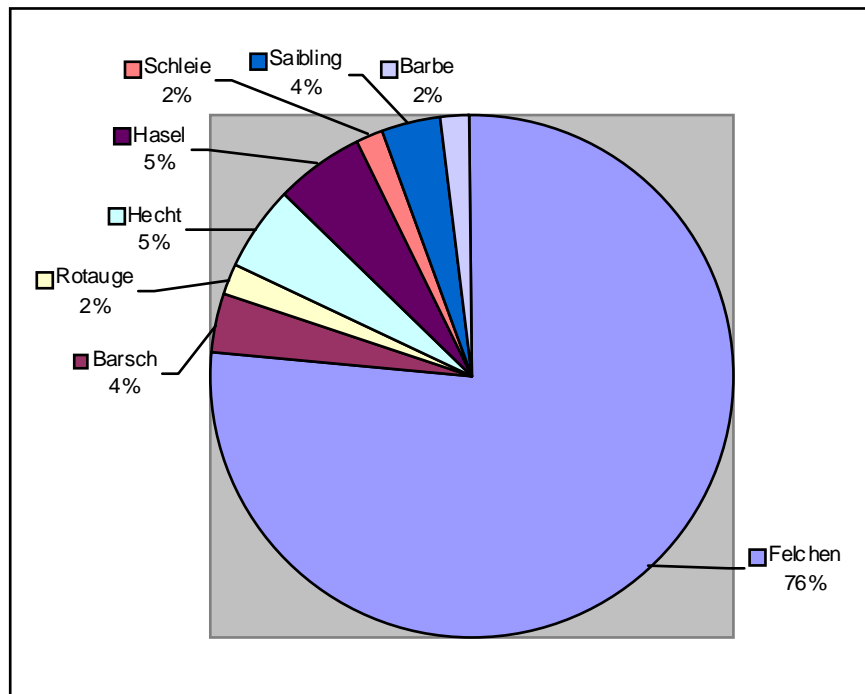


Abb. 4.4: Übersicht Speziesverteilung serologisch untersuchter Fische

Im HAH-Test kam es bei 36 (65,5 %) der Fische zu einer Hämagglutinationshemmung gegen mindestens eines der drei eingesetzten aviären Influenza Viren. Die Ergebnisse der HAH-Tests positiv getesteter Fische sind in Tabelle 4.1 dargestellt. Seren von 69 % der Felchen (29 Tiere), 100 % der Barsche (2 Tiere), 66,7 % der Haseln (2 Tiere), eine (100 %) Barbe, 33,3 % der Hechte (1 Tier) und ein (100 %) Rotaugen waren im HAH-Test positiv. Hierbei waren 12 der Seren (21,8 %) positiv gegenüber dem H6N8-Testantigen sowie

16 der Seren (29,1 %) positiv gegenüber dem H5N1-Antigen und 13 der Tiere (23,6 %) zeigten positive Reaktionen gegenüber dem H4N6-Virusantigen. Während gegenüber dem H5N1-Antigen überwiegend niedrige HAH-Titer erzielt wurden (nur in einem Fall ≥ 256), kamen bei dem H4N6- und H6N8-Virusantigen je achtmal Titer ≥ 256 vor. In 7 Fällen waren Seren gegen alle drei LPAI Viren positiv.

Die Seren wurden im Anschluss mit Hilfe eines Immunassay-Verfahrens (ELISA) auf Antikörper gegen Nucleokapsid- und Matrixantigene von Influenza A-Viren untersucht. Bei allen 55 Fischseren war das S/N-Verhältnis (Quotient aus Absorption der Probe und mittlerer Absorption der Negativkontrolle) $\geq 0,5$ und damit als negativ zu werten. Die Ergebnisse des HAH-Tests konnten somit mit Hilfe des ELISA nicht bestätigt werden.

Tabelle 4.1: Ergebnisse des HAH-Tests mit H6N8-, H5N1- und H4N6-Virusantigen: Fische mit einer Hämagglutinationshemmung von mindestens eines der eingesetzten Viren. Titer > 16 wurden als positiv gewertet, LA (=Langenargen); RE (=Reichenau)

Fischnummer	Fangort	Monat	Spezies	HAH-Ergebnis		
				H6N8	H5N1	H4N6
1	LA	April	Barsch	≥ 256	16	≥ 256
3	LA	April	Felchen	8	16	-
5	LA	April	Felchen	16	16	-
6	LA	April	Felchen	16	16	-
8	LA	April	Barsch	≥ 256	32	≥ 256
24	LA	Mai	Felchen	4	8	-
25	LA	Mai	Felchen	4	32	-
27	LA	Mai	Felchen	-	8	-
28	LA	Mai	Felchen	4	16	-
29	LA	Mai	Felchen	≥ 256	16	≥ 256
35	LA	Oktober	Felchen	-	16	-
42	LA	Oktober	Hasel	-	64	≥ 256
43	LA	Oktober	Felchen	-	8	4
45	LA	Oktober	Felchen	-	8	-
46	LA	Oktober	Felchen	-	8	4
48	LA	November	Felchen	2	8	-
49	LA	November	Felchen	-	8	-

Fisch- nummer	Fangort	Monat	Spezies	HAH-Ergebnis		
				H6N8	H5N1	H4N6
50	LA	November	Felchen	8	32	-
54	LA	November	Hasel	≥ 256	≥ 256	≥ 256
4	RE	April	Felchen	16	8	8
5	RE	April	Felchen	8	4	4
6	RE	April	Felchen	32	-	32
7	RE	April	Rotauge	-	8	32
14	RE	Mai	Felchen	16	8	4
15	RE	Mai	Felchen	≥ 256	64	32
16	RE	Mai	Felchen	-	8	-
19	RE	Mai	Barbe	≥ 256	-	4
20	RE	Mai	Felchen	4	4	2
22	RE	Mai	Hecht	-	-	2
30	RE	Juni	Felchen	-	4	16
33	RE	Juni	Felchen	-	64	≥ 256
35	RE	Juni	Felchen	-	8	32
39	RE	Juni	Felchen	-	4	-
40	RE	Juni	Felchen	-	8	8
43	RE	Oktober	Felchen	≥ 256	32	≥ 256
46	RE	Oktober	Felchen	≥ 256	16	≥ 256

4.1.2. Untersuchung von Schildkrötenseren

4.1.2.1. Untersuchung von Schildkrötenseren mittels Hämagglutinations-Hemmungstest (HAH-Test) und Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Insgesamt wurden 97 Schildkrötenseren mit Hilfe des HAH-Tests untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.2 dargestellt. 59 der Seren stammten aus Großbritannien, 38 aus Italien. Keines der Seren aus Italien war im HAH-Test positiv. 13 (22,0 %) der Seren aus Großbritannien waren positiv. Von den positiven Seren waren 3 (23,1 %) positiv gegenüber dem H5N1-Antigen (alle ≥ 512) und 10 (76,9 %) gegenüber dem H4N6-Antigen (dreimal ≥ 512 , sechsmal ≥ 256 und einmal 128). Keines der Seren reagierte positiv gegen das H6N8-Antigen. In Ergänzung wurden 34 der Seren aus Großbritannien

(incl. der im HAH-Test positiv getesteten Seren) mit Hilfe eines Immunassay-Verfahrens (ELISA) auf Antikörper untersucht. Alle getesteten Seren waren negativ. Die Ergebnisse des HAH-Tests konnten somit mit Hilfe des ELISA nicht bestätigt werden.

Tabelle 4.2: Ergebnisse des HAH-Tests mit H6N8-, H5N1- und H4N6-Virusantigen: Schildkrötenseren aus Großbritannien mit einer Hämagglutinationshemmung.

Serum	Subtyp	HAH-Titer
82/1/03	H4N6	512
100/1/03	H4N6	512
80/1/03	H4N6	128
67/1/03	H4N6	512
174/1/03	H4N6	256
167/1/03	H4N6	≥ 256
81/1/03	H4N6	≥ 256
97//03	H4N6	≥ 256
154/1/03	H4N6	≥ 256
65/1/03	H4N6	≥ 256
63/1/03	H5N1	≥ 512
99/1/03	H5N1	≥ 512
87/1/03	H5N1	≥ 512

4.1.3. Laborversuche mit Dreikantmuscheln

4.1.3.1. Spikeversuche

Aus Abbildung 4.5 geht hervor, dass die Zahl detektierter Kopien bei einer Ausgangskonzentration von $10^{5,5}$ KID₅₀/ml in den Proben mit Muschelmaterial höher war als ohne Zugabe von Muscheln. Die selbe Situation zeigte sich bei der nächsten Verdünnungsstufe. In einer Verdünnung von $10^{3,5}$ KID₅₀/ml sind beide Werte annähernd identisch um in der nächsten Stufe in den Muschelproben über den Wert ohne Muscheln anzusteigen. Ein Virusnachweis mittels qRRT-PCR gelang bis zu einer Ausgangskonzentration von $10^{0,5}$ KID₅₀/ml. Es sind keine signifikanten Unterschiede zwischen den Proben mit und ohne Muschelfleisch zu erkennen ($p = 0,518$).

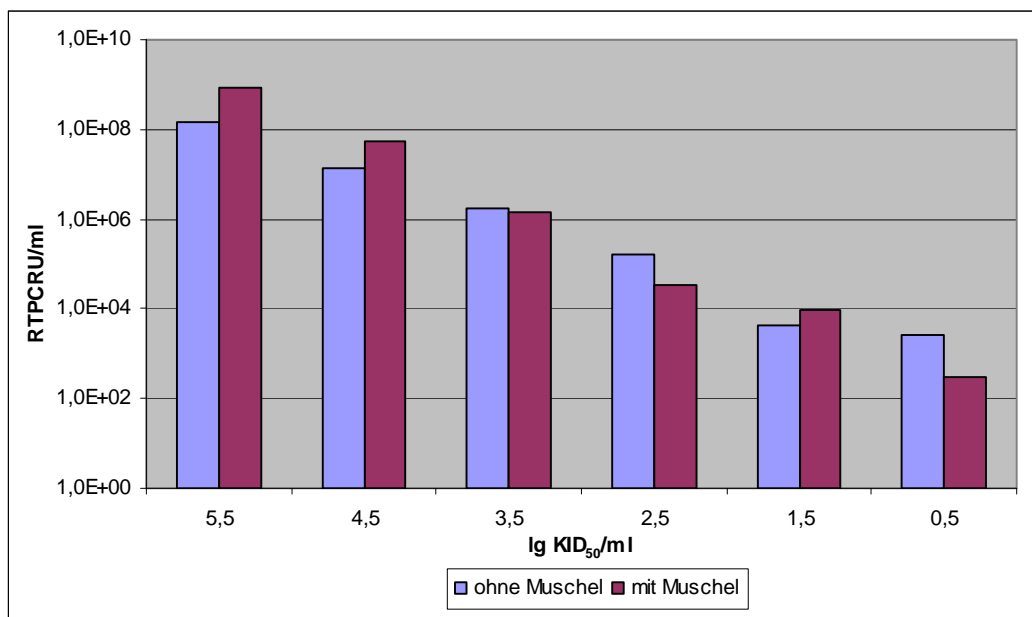


Abb. 4.5: Spikeversuch mit Muschelmaterial:

Zahl der nachgewiesenen qRRT-PCR U/ml in Proben mit und ohne Muschelfleisch nach Zugabe von LPAI H5N1-Virus in 10er Verdünnungsschritten.

4.1.3.2. Vorversuche mit und ohne Desinfektion der Muscheloberfläche

Bei jeder Probenentnahme wurden die Muscheloberflächen mittels Milli-Q[®] Wasser gereinigt und anschließend mit 1 %iger Virkon[®]-Lösung bzw. Venno[®] Vet 1 super desinfiziert. In beiden Ansätzen bei 4 °C wurde sowohl das H5N1 Virusisolat (A/Teal/Wv632/Germany/05, FLI, Insel Riems) als auch das H4N6 Virusisolat (A/Mallard/Wv1732-34/03, FLI, Insel Riems) verwendet. Zum Vergleich wurde mit jedem Virusisolat ein Kontaminationsversuch ohne Desinfektion der Muscheloberfläche durchgeführt.

Versuche mit dem H5N1-Virusisolat

Nach achtundvierzigstündiger Inkubation in virushaltigem Wasser konnte sowohl in den Ansätzen mit Desinfektion der Oberfläche als auch in der Kontrollgruppe ohne Desinfektion virale RNA in den Muscheln nachgewiesen werden. Während in den Negativkontrollen kein Virus nachgewiesen werden konnte, war die Menge viraler RNA in den Muscheln stets höher als im Wasser (außer Tag 10 im Versuch mit Venno[®] Vet 1 super, siehe Abb. 4.7).

Desinfektion der Muscheloberfläche mit 1 %iger Virkon[®]-Lösung

Die Ergebnisse des Versuchs sind in Abb. 4.6 dargestellt. Nach Überführung in Reinwasser an Tag 2 kam es zunächst zu einem Rückgang der detektierten RNA-Menge in den Muscheln. Dieser Abwärtstrend hielt an bis zum Tag 7. An Tag 10 stieg die Zahl allerdings nochmals bis auf den Ausgangswert an. In der Zeit vom 10. bis 16. Tag kam es zu einem deutlichen Rückgang der nachweisbaren RNA. Auch im Wasser ging die Menge viraler RNA an Tag 3 und 5 zurück. An Tag 7 kam es allerdings wieder zu einem Anstieg, welcher sich bis zum Tag 10 fortsetzte und dabei das Niveau von Tag 2

überstieg. Ähnlich wie in den Muschelproben fiel der Wert zum Tag 16 hin deutlich ab. Der Verlauf der Menge viraler RNA im Wasser zeigte Parallelen zu den Werten im Muschelfleisch. In den Muscheln gab es einen statistisch signifikanten Unterschied ($p < 0,05$) zwischen den Werten der einzelnen Versuchstage: der p-Wert (tail probability) lag mit $p < 0,0001$ deutlich unter der Grenze von 0,05. In den Wasserproben gab es jedoch keinen signifikanten Unterschied zwischen den einzelnen Versuchstagen ($p = 0,1335$).

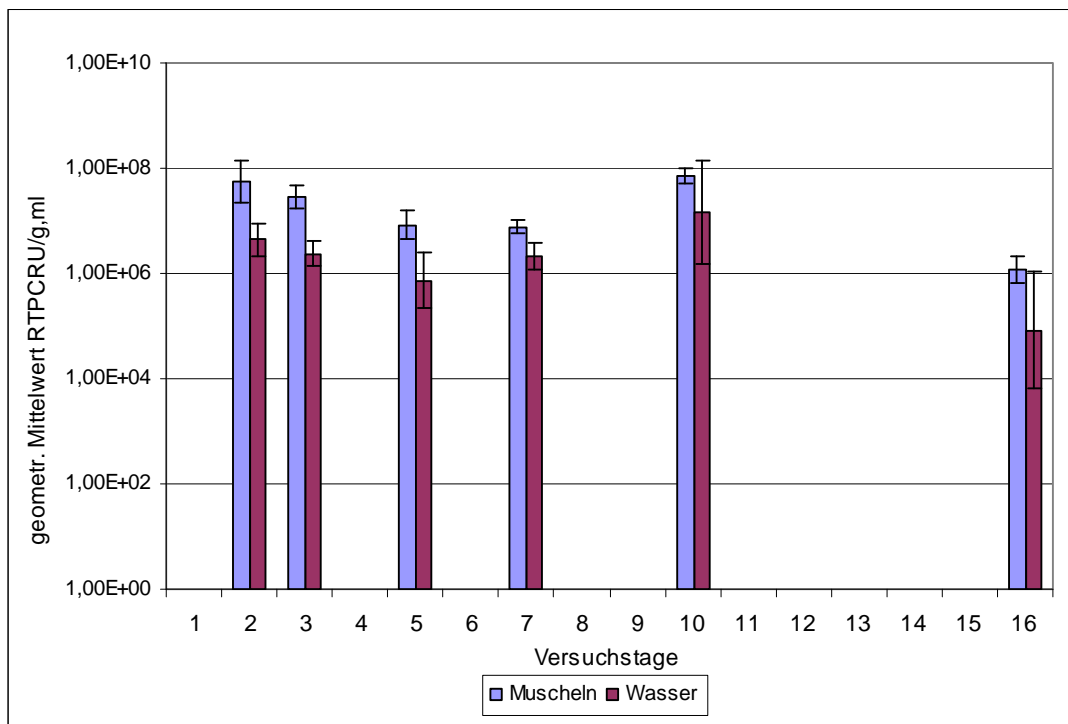


Abb. 4.6: Versuch mit dem H5N1 Virusisolat. Desinfektion der Oberfläche mit 1 %iger Virkon®-Lösung: Ergebnisse der Muschel- und Wasserproben bei einer Inkubationstemperatur von 4 °C, detektiert mittels qRRT-PCR, Ergebnisse in g Dreikantmuschel bzw ml Wasser

Desinfektion der Muscheloberfläche mit Venno® Vet 1 Super

Die Ergebnisse des Versuchs sind in Abb. 4.7 dargestellt. Gleich nach der 48 stündigen Inkubation in virushaltigem Wasser war die Zahl detektierbarer RNA-Kopien in den Muscheln am höchsten. Danach kam es zu einem wellenförmigen Zu- und Abnehmen der Kopienzahlen: Nach einem Tag in Reinwasser begann die Menge viraler RNA zurückzugehen. Dieser Trend setzte

sich zum Tag 5 fort. An Tag 7 kam es aber erneut zu einem Anstieg auf das Niveau von Tag 3 um dann am Tag 10 wiederum abzusinken. Bei Versuchsende an Tag 16 wurden jedoch erneut höhere Werte, etwa im Bereich von Tag 5, erreicht. Der Verlauf der viralen RNA im Wasser war nicht immer parallel mit den Werten der Muscheln. Zunächst nahm die Zahl zum Tag 3 hin ab. Dann allerdings waren an Tag 5 nur noch sehr geringe Mengen an RNA im Wasser nachweisbar. Nach diesem Abfall auf 400 qRRT-PCRU/ml stiegen die Werte zum Tag 7 hin wieder auf das Niveau von Tag 3 mit über einer Million qRRT-PCRU/ml an. An Tag 10 waren die Zahlen im Wasser sogar höher als in den Muscheln. Dies änderte sich zum Tag 16: während die Muschelwerte auf hohem Niveau bleiben, fielen die Wasserwerte auf etwa 20.000 RTPCRU/ml ab. Anhand der einfaktoriellen Varianzanalyse konnte in den Muschel- und Wasserproben ein signifikanter Unterschied bezüglich der einzelnen Versuchstage (Muschelproben: $p = 0,0036$; Wasserproben: $p = 0,0401$) festgestellt werden. Die Reisolierung von lebensfähigem Virus mittels Titration auf MDCK-Zellen war nicht erfolgreich.

Im Rahmen einer einfaktoriellen Varianzanalyse konnte zwischen den beiden Vorversuchen mit verschiedenen Desinfektionsmitteln (1 %ige Virkonlösung bzw. Venno[®] Vet 1 Super) kein statistisch signifikanter Unterschied festgestellt werden ($p = 0,1746$).

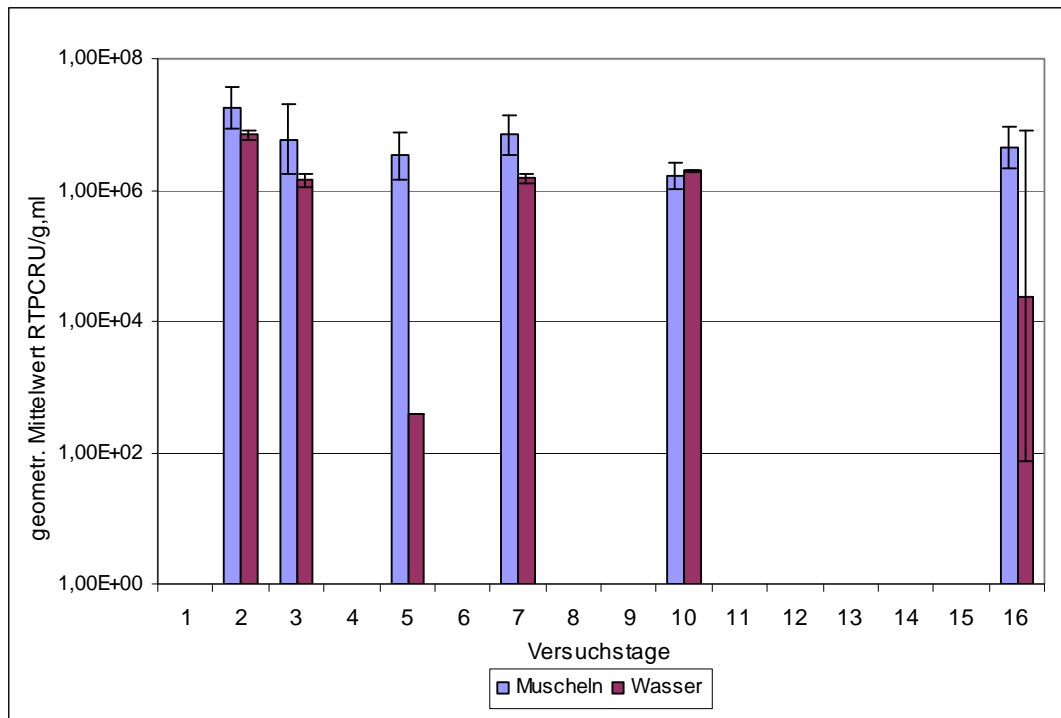


Abb. 4.7: Versuch mit dem H5N1 Virusisolat. Desinfektion der Oberfläche mit Venno-Vet® 1 super: Ergebnisse der Muschel- und Wasserproben bei einer Inkubationstemperatur von 4 °C, detektiert mittels qRRT-PCR

Vorversuch ohne Desinfektion der Muscheloberfläche

Die Ergebnisse des Versuchs sind in Abb. 4.8 dargestellt. Die höchste Zahl an Kopien in den Muscheln wurde an Tag 2 direkt nach Entnahme aus dem virushaltigen Wasser gemessen. Zum Tag 3 hin nahm die Menge viraler RNA um fast zwei Zehnerpotenzen ab. Im Anschluss stieg die Zahl aber wieder. Auffällig war, dass die Werte an Tag 5, 10 und 16 nahezu identisch waren. Lediglich an Tag 7 kam es zu einem geringgradigen Rückgang der Kopienzahl. Die Werte im Wasser lagen an Tag 2 etwa drei Zehnerpotenzen unter denen der Muscheln. Während die Werte an Tag 2 und 3 fast gleich hoch waren, sank im Anschluss die Kopienzahl im Wasser kontinuierlich ab, um an Tag 16 sogar rund vier Zehnerpotenzen niedriger als die Werte der Muscheln zu sein. Die Reisolierung von lebensfähigem Virus mittels Titration auf MDCK-Zellen war trotz Verzicht auf Desinfektionsmittel bei der Muschelpräparation nicht erfolgreich. Anhand der einfaktoriellen Varianzanalyse konnte zwischen den einzelnen Versuchstagen ein deutlicher signifikanter

Unterschied in den Muschelproben ($p < 0,0001$), nicht jedoch in den Wasserproben ($p = 0,1928$) festgestellt werden. Im statistischen Vergleich beider Vorversuche mit Desinfektion der Oberfläche und jenem ohne Verwendung von Desinfektionsmitteln wurden folgende p-Werte erzielt: $p = 0,0962$ (Veno[®] Vet 1 Super) und $p = 0,0239$ (1 %iger Virkonlösung).

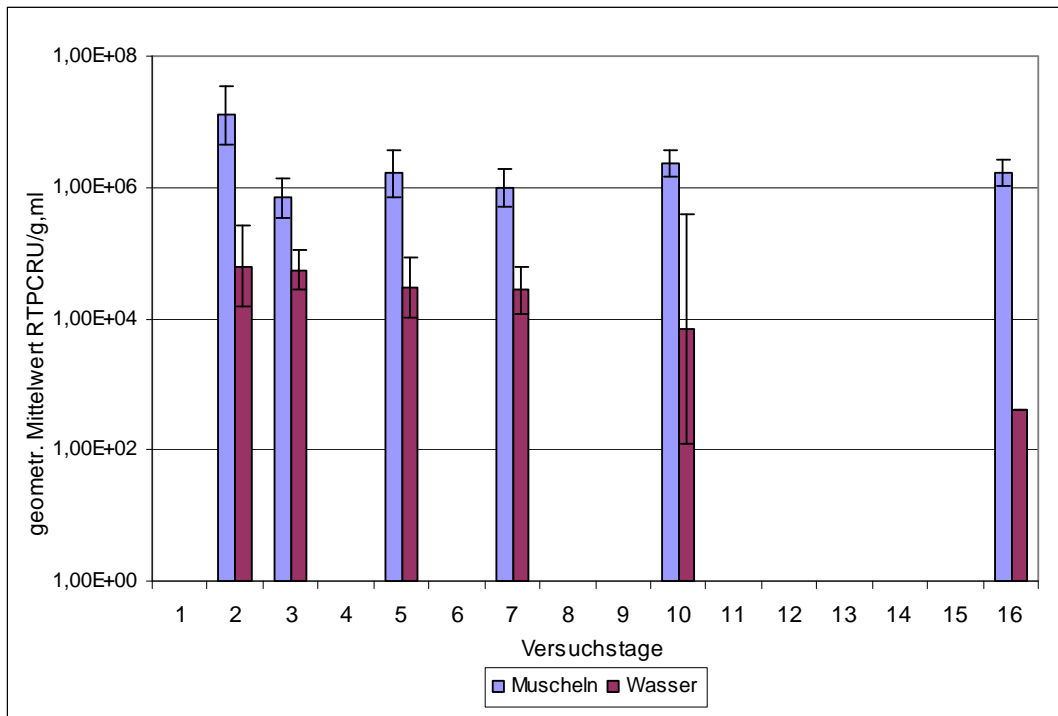


Abb. 4.8: Versuch mit dem H5N1-Virusisolat ohne Desinfektion der Oberfläche: Ergebnisse der Muschel- und Wasserproben bei einer Inkubationstemperatur von 4 °C, detektiert mittels qRRT-PCR

Versuche mit dem H4N6 Virusisolat

Desinfektion der Muscheloberfläche mit 1 %iger Virkon[®] Lösung

Dieser Versuch wurde mit dem H4N6-Virusisolat (A/Mallard/Wv1732-34/03, FLI, Insel Riems) durchgeführt. Die Muscheloberflächen wurden mittels Milli Q[®] Wasser und 1 %iger Virkon[®]-Lösung desinfiziert. Die erste Probenahme erfolgte nach achtundvierzigstündiger Inkubation in virushaltigem Bodenseewasser im Kühlraum bei 4 °C. An Tag 10 musste aufgrund eines vor-

zeitigen Absterbens der Muscheln der Versuch abgebrochen werden. Die Ergebnisse wurden anhand einer einfaktoriellen Varianzanalyse ausgewertet und sind graphisch in Abb. 4.9 dargestellt.

Die Zahl der Kopien in den Muscheln war stets höher als diejenige im Wasser. Das Maximum wurde an Tag 10 erreicht. Nach dem Tag 2 kam es zu einem Rückgang der Kopienzahlen. Die Werte von Tag 3, 5 und 7 waren annähernd identisch. An Tag 10 kam es zu einem deutlichen Anstieg über das Niveau von Tag 2. Die Kopienzahlen im Wasser zeigten einen ähnlichen Verlauf wie die Muschelwerte. Auch hier kam es an Tag 3 zu einem Rückgang und die Zahlen blieben weitgehend auf diesem Niveau bis zum Tag 7. An Tag 10 wurde ein Anstieg verzeichnet. Anhand der einfaktoriellen Varianzanalyse konnte sowohl in den Muschel- als auch in den Wasserproben ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Versuchstagen ermittelt werden ($p < 0,0001$ in beiden Fällen).

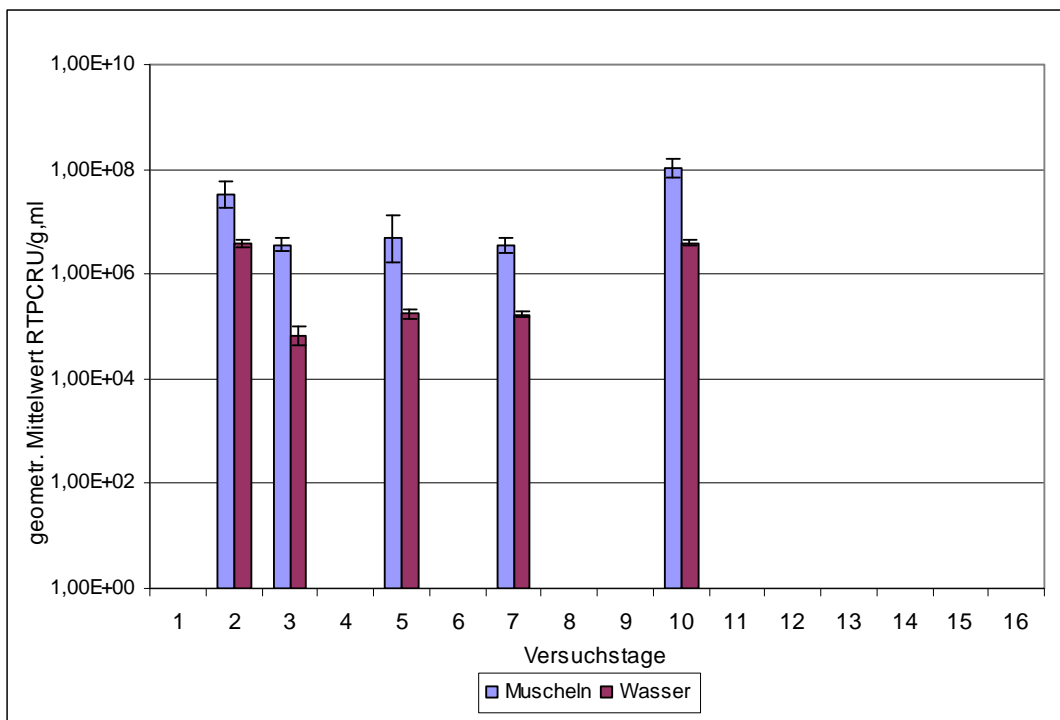


Abb. 4.9: Versuch mit dem H4N6-Virusisolat. Desinfektion der Oberfläche mit 1 %iger Virkon[®]-Lösung: Ergebnisse der Muschel- und Wasserproben bei einer Inkubationstemperatur von 4 °C detektiert, mittels qRRT-PCR

Desinfektion der Muscheloberfläche mit Venno[®] Vet 1 Super

Dieser Versuch wurde ebenfalls mit dem H4N6 Virusisolat (A/Mallard/Wv1732-34/03, FLI, Insel Riems) durchgeführt. Die Muscheloberflächen wurden mittels Milli-Q[®] Wasser und Venno[®] Vet 1 Super desinfiziert. Die erste Probennahme erfolgte nach achtundvierzigstündiger Inkubation in virushaltigem Bodenseewasser. Die Reisolierung von lebensfähigem Virus mittels Titration auf MDCK-Zellen war nicht erfolgreich. Die Ergebnisse sind in Abb. 4.10 dargestellt.

Betrachtet man die Kopienzahlen in den Muschelproben, so fällt ein nahezu wellenförmiger Verlauf auf. Das Maximum wurde an Tag 2 erreicht. Danach kam es bis zum Tag 5 zu einem Rückgang der Werte. An Tag 7 jedoch stiegen die Zahlen über das Niveau von Tag 3. An Tag 10 kam es erneut zu einem geringgradigen Rückgang. Dieses Ergebnis blieb stabil bis zum Tag 16. Die Zahl der detektierten RNA Kopien war in den Wasserproben stets niedriger als den Muscheln. Sie beschrieben einen ähnlichen Verlauf wie die Kopienzahlen der Muscheln: Das Maximum wurde ebenfalls an Tag 2 erreicht. In diesem Fall kam es zu einem Rückgang der Werte bis zum Tag 7. Danach stiegen die Kopienzahlen wieder auf das Niveau von Tag 3 an und blieben etwa auf diesem Wert bis zum Tag 16.

Anhand der einfaktoriellen Varianzanalyse konnte sowohl in den Muschel- als auch in den Wasserproben ein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Versuchstagen festgestellt werden (Muscheln: $p < 0,0001$; Wasser: $p = 0,0400$). Vergleicht man die beiden Vorversuche mit verschiedenen Desinfektionsmitteln (1 %ige Virkonlösung bzw. Venno[®] Vet 1 Super) untereinander, so konnte kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Ergebnissen der beiden Versuche festgestellt werden ($p = 0,6777$).

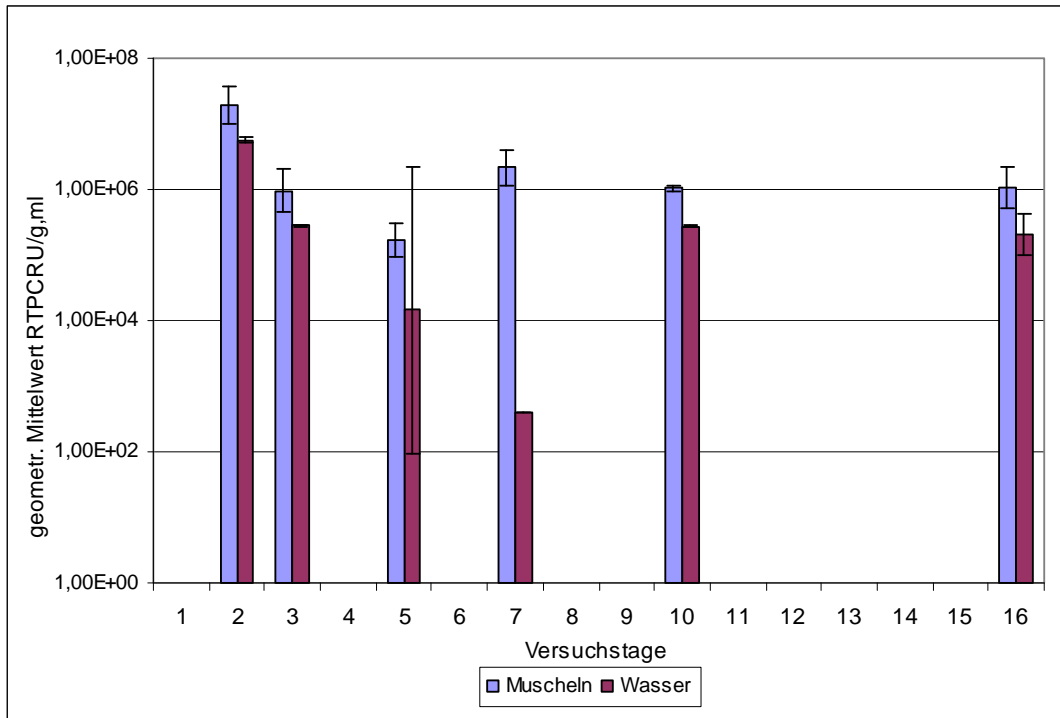


Abb. 4.10: Versuch mit dem H4N6-Virusisolat. Desinfektion der Oberfläche mit Venno-Vet® 1 super: Ergebnisse der Muschel- und Wasserproben bei einer Inkubationstemperatur von 4 °C, detektiert mittels qRRT-PCR

Vorversuch ohne Desinfektion der Muscheloberfläche

Die Muscheloberflächen wurden lediglich mittels Milli-Q® Wasser gereinigt. Die erste Probennahme erfolgte nach achtundvierzigstündiger Inkubation in virushaltigem Bodenseewasser im Kühlraum bei 4 °C. Die Reisolierung von lebensfähigem Virus mittels Titration auf MDCK-Zellen war trotz Verzicht auf Desinfektionsmittel bei der Muschelpräparation nicht erfolgreich.

Betrachtet man die in den Muscheln gemessenen RNA-Mengen in Abb. 4.11, so fällt ein relativ konstanter Verlauf der Werte auf. Nach dem Tag 2 kam es nur zu einem geringgradigen Rückgang der Kopienzahlen. An Tag 5 stiegen die Werte leicht über das Niveau von Tag 2 an. An Tag 7 kam es erneut zu einem leichten Rückgang und an Tag 10 wieder zu einem Anstieg etwa auf die Höhe der Werte von Tag 5. Auch an Tag 16 lagen die Kopienzahlen nur etwas niedriger, etwa vergleichbar mit Tag 7. Das Wasser zeigte hingegen deutliche Veränderungen in der Zahl viraler RNA: Das Maximum war hier an Tag 2. Die Werte lagen stets unter denen der Muscheln. An Tag 3 war ein

deutlicher Rückgang zu verzeichnen, dieser setzte sich an Tag 5 fort. Erst an Tag 7 stiegen die Werte über das Niveau von Tag 3 an. An Tag 10 wurden die zweithöchsten Ergebnisse (nach Tag 2) erreicht. Zum Tag 16 nahmen die Werte wieder deutlich ab (unter die Zahlen von Tag 7). Anhand der einfaktoriellen Varianzanalyse konnten die Unterschiede in den Muschelproben an den verschiedenen Tagen als statistisch signifikant eingestuft werden ($p = 0,0483$), nicht jedoch die Werte des Wassers ($p = 0,1315$). Vergleicht man die Ergebnisse dieses Versuches mit den Vorversuchen, die eine Desinfektion der Muscheloberfläche beinhalteten, so ist kein statistisch signifikanter Unterschied der Ergebnisse erkennbar (Versuch mit 1 %iger Virkon[®] Lösung versus Versuch ohne Desinfektion der Oberfläche: $p = 0,5602$; mit Venno[®] Vet 1 Super versus ohne Desinfektion: $p = 0,7449$).

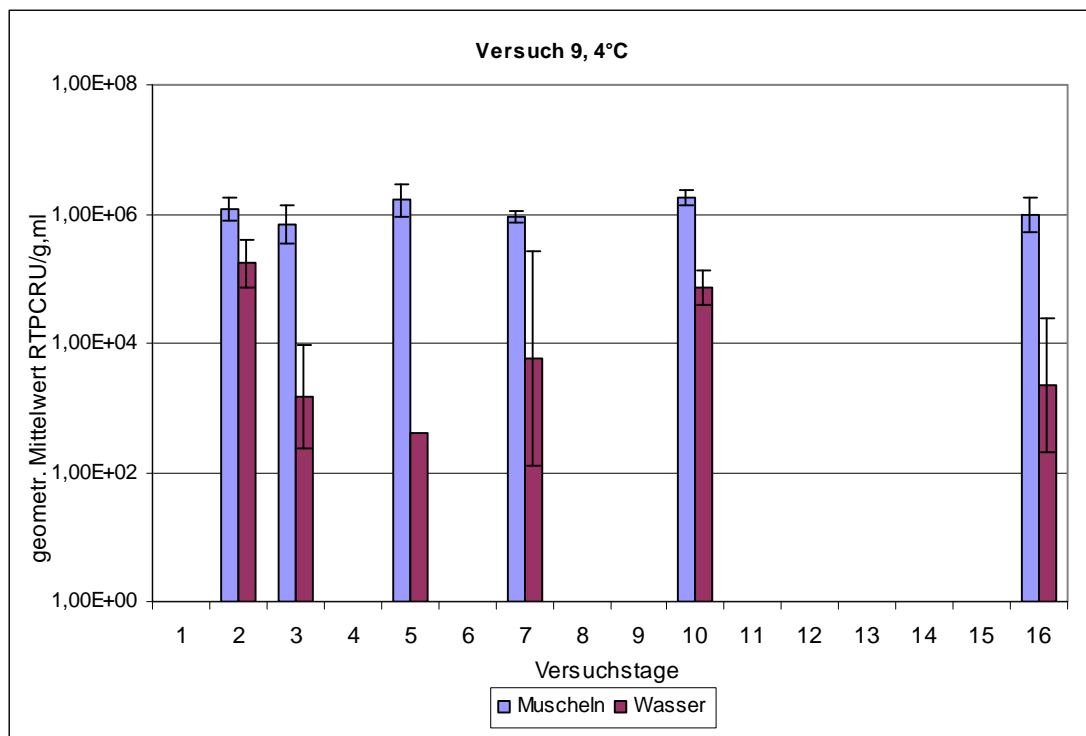


Abb. 4.11: Versuch mit dem H4N6-Virusisolat ohne Desinfektion der Oberfläche: Ergebnisse der Muschel- und Wasserproben bei einer Inkubationstemperatur von 4 °C, detektiert mittels qRRT-PCR

4.1.3.3. Kontaminationshauptversuche

Es wurden drei Hauptversuche mit dem H5N1-Virusisolat (A/Teal/Wv632/Germany/05, FLI, Insel Riems) durchgeführt. Allerdings wurde das Virus in einer zehnfach höheren Konzentration (10^5 /ml (KID₅₀ auf MDCK-Zellen bzw. 10^7 EID₅₀/ml)) als in den Vorversuchen eingesetzt. Die Inkubation erfolgte bei zwei verschiedenen Temperaturen (4 °C und 19 °C). Die Muscheloberflächen wurden nach 48 Stunden in virushaltigem Wasser lediglich mittels Milli Q[®] Wasser gereinigt. Die erste Probennahme erfolgte nach achtundvierzigstündiger Inkubation (Tag 2) in virushaltigem Bodenseewasser im Kühlraum bei 4 °C bzw. im Brutschrank bei 19 °C. Neben der molekularbiologischen Untersuchung mittels qRRT-PCR wurden die Wasser- und Muschelproben auf 10 Tage alten embryonierten Hühnereiern titriert, um lebensfähiges Virus nachweisen zu können.

Bis zum Versuchstag 5 erfolgte die statistische Auswertung aller drei Versuche in Form einer dreifaktoriellen Varianzanalyse. Der erste Hauptversuch musste bei 19 °C aufgrund vorzeitigen Absterbens der Muscheln zu diesem Zeitpunkt abgebrochen werden. Bis zum Versuchstag 7 erfolgte eine zweifaktorielle Varianzanalyse für den zweiten und dritten Hauptversuch. Schließlich wurden Tag 10 und 16, aufgrund fehlender Ergebnisse bei 19 °C, lediglich einfaktoriell ausgewertet.

Erster Hauptversuch

Die Ergebnisse des Versuches sind in Abb. 4.12 dargestellt. Betrachtet man die Resultate der qRRT-PCR im ersten Versuchsdurchlauf, so fällt auf, dass die Zahl der Kopien im Vergleich zu den vorausgegangenen Versuchen deutlich höher war, jedoch der Verlauf der Werte an den verschiedenen Probenentnahmetagen den bisherigen Ergebnissen ähnelt: An Tag 2 nach Entnahme der Muscheln aus dem virushaltigen Wasser wurden die höchsten Werte erzielt. Im Anschluss fielen die Zahlen zum Tag 10 hin kontinuierlich ab, um

jedoch zum Tag 16 etwa auf den Wert von Tag 7 anzusteigen. Die Werte des Wassers waren bei allen Messungen niedriger als die der Muscheln. Auch hier wies das viruskontaminierte Wasser an Tag 2 die höchsten Werte auf. An Tag 3 kam es zu einem deutlichen Rückgang der viralen RNA im Wasser. Jedoch stieg die Zahl zum Tag 5 wieder an und blieb bis zum Tag 16 weitgehend konstant. Bezüglich der einzelnen Versuchstage gab es einen deutlich signifikanten Unterschied in den Muschelproben ($p = 0,0009$), nicht jedoch in den Wasserproben ($p = 0,1421$).

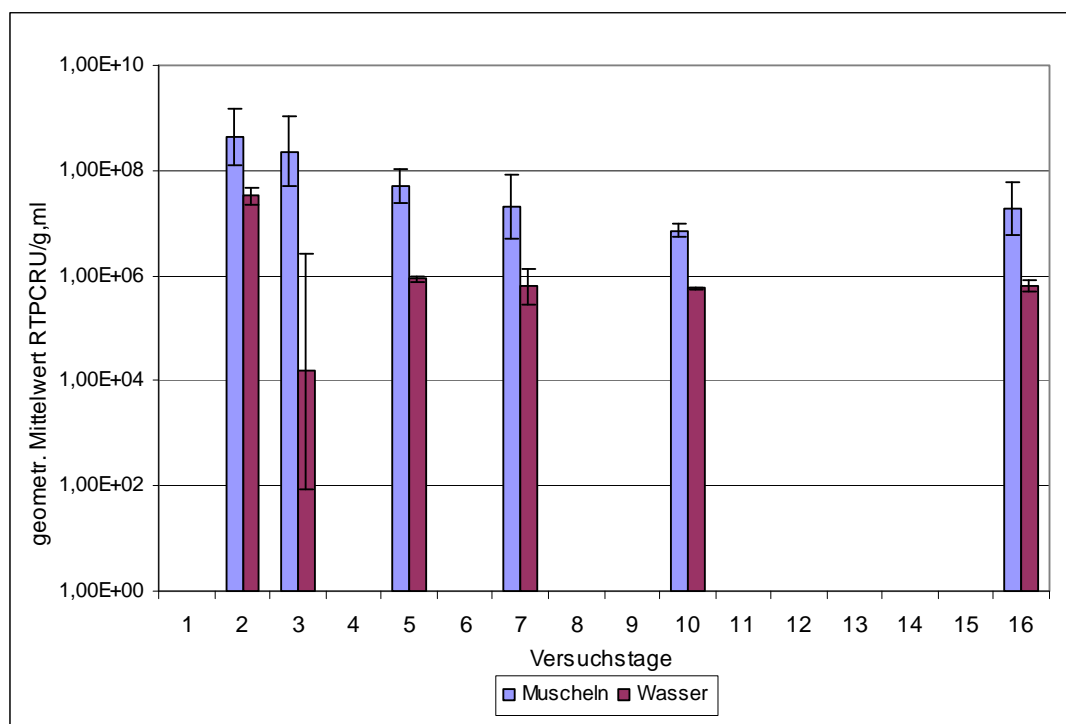


Abb. 4.12: Erster Hauptversuch: Kontamination mit H5N1-Virusisolat: Ergebnisse der Muschel- und Wasserproben bei einer Inkubationstemperatur von 4 °C, detektiert mittels qRRT-PCR

Anhand der Ergebnisse der Eititration – wie in Abb. 4.13 dargestellt - war erkennbar, dass auch hier der Virustiter in den Muscheln stets höher war als im Wasser. An Tag 2 konnten die höchsten Mengen an Virus reisoliert werden, jedoch sank diese Zahl zum Tag 3 hin nur geringgradig ab. Erst an Tag 5, kam es zu einer Reduktion um eine Zehnerpotenz. Während an Tag 7 der Titer etwas höher war als an Tag 5 sank er danach nochmals um fast eine Zehnerpotenz ab und blieb bis zum Tag 16 auf diesem Niveau stabil. Somit

konnte auch nach 14 Tagen in Reinwasser noch lebensfähiges Virus aus den Muscheln reisoliert werden. Die Titer im Wasser verliefen annähernd parallel zu denen in den Muscheln, allerdings waren sie insgesamt etwa eine Zehnerpotenz niedriger. Auffällig war, dass der Titer an Tag 3 nur geringgradig niedriger war als an Tag 2. Dies widersprach den Resultaten der qRRT-PCR, welche einen deutlichen Rückgang der viralen RNA zum Tag 3 zeigten. Im Rahmen der statistischen Analyse der Muschelproben konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Versuchstagen festgestellt werden ($p = 0,0140$). In den Wasserproben war jedoch die Grenze von 0,05 mit einem p-Wert von $p = 0,0513$ knapp überschritten und somit nicht als statistisch signifikant zu erachten.

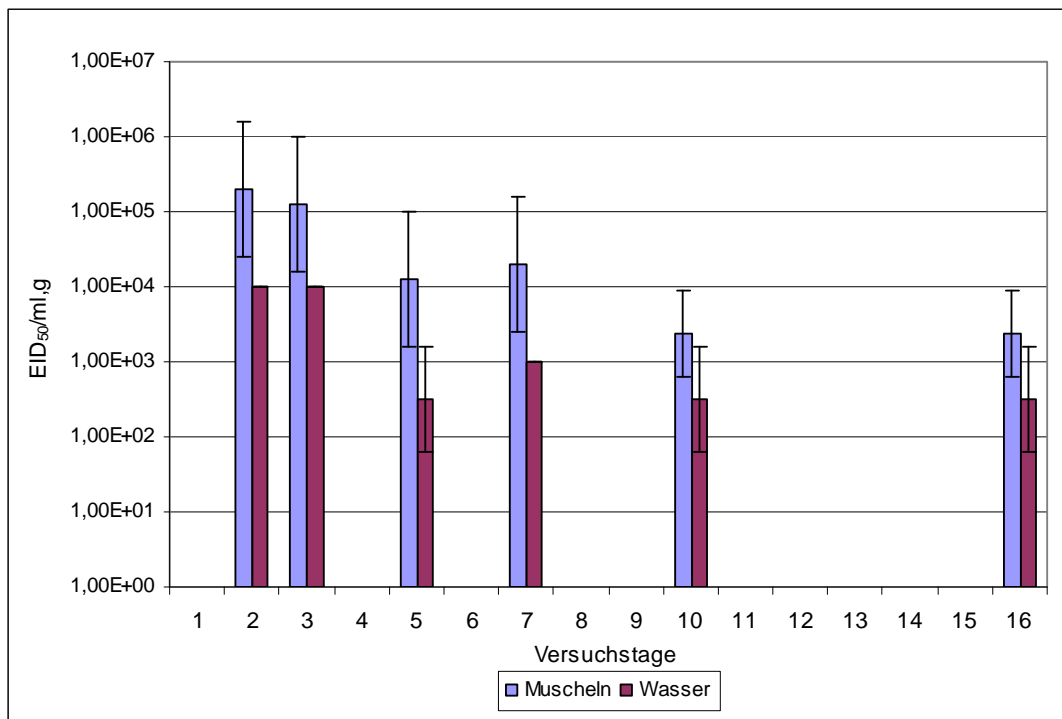


Abb. 4.13: Erster Hauptversuch: Kontamination mit dem H5N1-Virusisolat: Virusgehalt der Muschel- und Wasserproben bei einer Inkubationstemperatur von 4 °C, detektiert mittels Titration auf embryonierten Hühnereiern

Die Ergebnisse der qRRT-PCR bei 19 °C sind in Abb. 4.14 dargestellt. Sie zeigten einen ähnlichen Verlauf wie bei 4 °C: die meiste RNA wurde an Tag 2 nachgewiesen. Im Anschluss kam es zwar zu einem Rückgang der Kopienzahl an Tag 3, jedoch blieben die Werte bis zum Tag 5 stabil auf diesem

Niveau. Aufgrund vorzeitigen Absterbens der Muscheln musste der Versuch zu diesem Zeitpunkt abgebrochen werden. Die Werte des Wassers waren stets niedriger als in den Muscheln. Es kam an Tag 3 zu einem deutlichen Rückgang der Kopienzahl verglichen zum Ausgangswert an Tag 2. An Tag 5 stiegen die Werte jedoch geringgradig an. Im Rahmen der zweifaktoriellen Varianzanalyse konnte in den Muschel- und Wasserproben in Bezug auf die Temperatur kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (Muscheln: $p = 0,9087$; Wasser: $p = 0,2583$). Im Vergleich der einzelnen Versuchstage gab es jedoch durchaus einen signifikanten Unterschied (Muscheln $p = 0,0004$; Wasser: $p = 0,0158$).

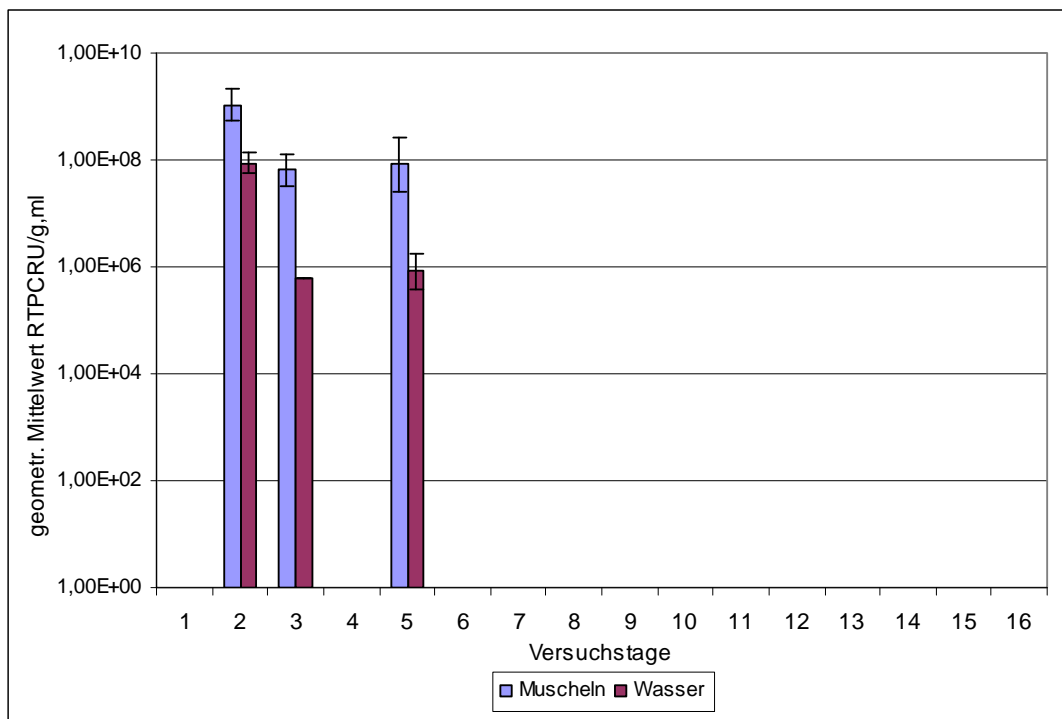


Abb. 4.14: Erster Hauptversuch: Kontamination mit dem H5N1-Virusisolat: Ergebnisse der Muschel- und Wasserproben bei einer Inkubationstemperatur von 19 °C, detektiert mittels qRRT-PCR

Die Ergebnisse der Eititration sind in Abb. 4.15 dargestellt. Die Werte gingen hierbei von Tag 2 zu Tag 5 kontinuierlich um insgesamt mehr als zwei Zehnerpotenzen zurück. Auch im Wasser war zwischen Tag 2 und 3 ein deutlicher Rückgang zu verzeichnen. An Tag 5 war in der Wasserprobe kein lebensfähiges Virus mehr reisolierbar. Vergleicht man die Titrationsergebnisse

bei 4 °C und 19 °C anhand einer zweifaktoriellen Varianzanalyse so ergab sich in den Muschelproben kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Temperaturen ($p = 0,1490$), jedoch durchaus zwischen den Versuchstagen ($p = 0,0008$). In Bezug auf die Wasserproben verhielt sich die Situation jedoch unterschiedlich: hier zeigte sich ein signifikanter Unterschied sowohl in Bezug auf die Temperatur ($p = 0,0054$) als auch in Bezug auf die einzelnen Versuchstage ($p = 0,0007$).

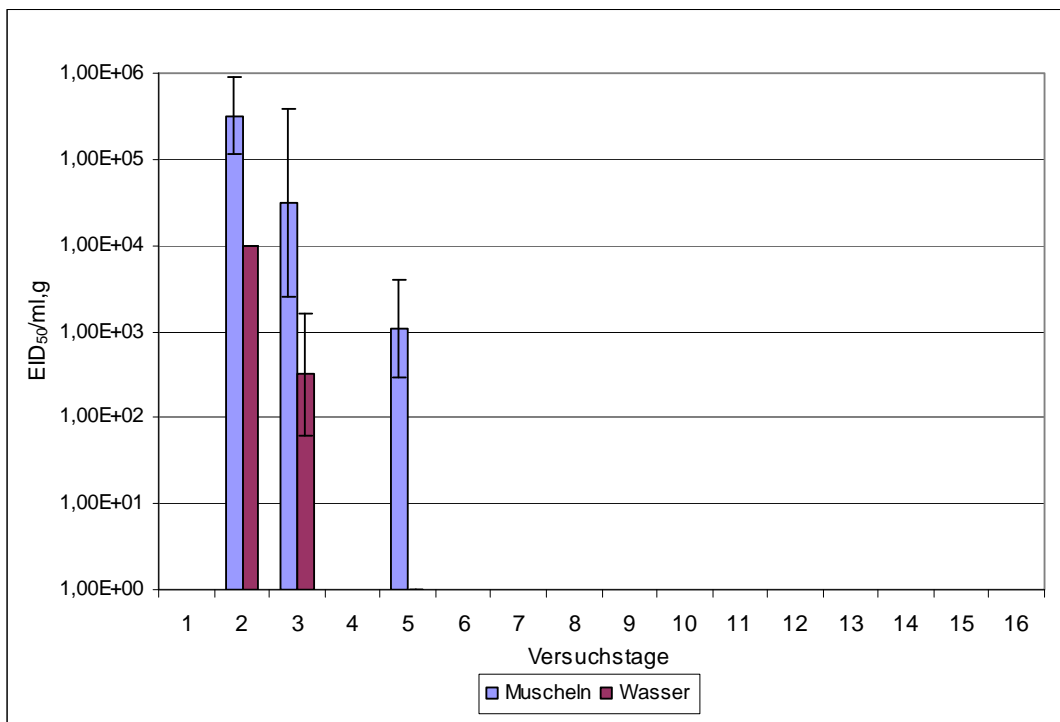


Abb. 4.15: Erster Hauptversuch: Kontamination mit H5N1-Virusisolat: Virusgehalt der Muschel- und Wasserproben bei einer Inkubationstemperatur von 19 °C, detektiert mittels Titration auf embryonierten Hühnereiern

Der Abwärtstrend der Werte in den Muscheln von Tag 2 bis Tag 5 zeigte sich in der Eititration deutlicher als in der qRRT-PCR. Die beiden Wassertiter ähnelten in ihrem Verlauf den qRRT-PCR-Ergebnissen. Während jedoch in der qRRT-PCR an Tag 5 noch genauso viele Kopien wie an Tag 3 detektierbar waren, konnte in der Eikultur bereits kein lebensfähiges Virus mehr nachgewiesen werden.

Zweiter Hauptversuch

Im zweiten Hauptversuch ergab sich ein verändertes Bild. Während im ersten Hauptversuch die Werte der Muscheln stets über denen des Wassers lagen, lagen im zweiten Hauptversuch an Tag 2 und Tag 10 die Kopienzahlen im Wasser über denen der Muscheln. Die Ergebnisse sind in Abb. 4.16 dargestellt. Die Menge viraler RNA in den Muscheln war an allen Probennahmetagen sehr ähnlich. Dementsprechend gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen den einzelnen Versuchstagen ($p = 0,4857$). An Tag 2 waren die Zahlen niedriger als an Tag 3. An Tag 5 kam es zu einem geringgradigen Rückgang der Werte. Dieses Niveau blieb dann aber bis Tag 16 weitgehend stabil. Im Wasser kam es nach dem Maximum an Tag 2 zu einem Rückgang der Werte an Tag 3 von etwa drei Zehnerpotenzen. Die Menge viraler RNA stieg bis Tag 10 kontinuierlich wieder an, war aber dennoch etwa eine Zehnerpotenz niedriger als an Tag 2. Zum Tag 16 fielen die Wasserwerte circa auf das Niveau von Tag 5 ab. In den Wasserproben gab es bezüglich der Versuchstage einen signifikanten Unterschied ($p = 0,0001$).

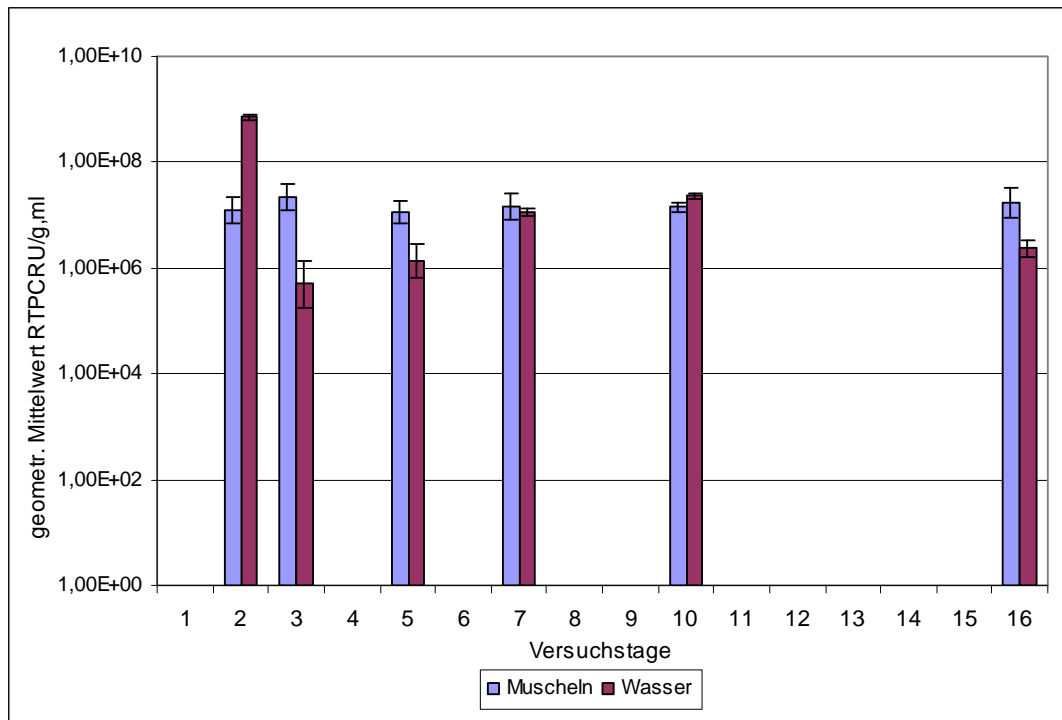


Abb. 4.16: Zweiter Hauptversuch: Kontamination mit H5N1-Virusisolat: Ergebnisse der Muschel- und Wasserproben bei einer Inkubationstemperatur von 4 °C, detektiert mittels qRRT-PCR

Vergleicht man die Ergebnisse der qRRT-PCR mit denen der Eititration (Abb. 4.17), so fällt auf, dass auch hier an Tag 2 die Werte im Wasser deutlich höher lagen als in den Muscheln. Der Titer in den Muscheln war an Tag 2 am höchsten. An Tag 3 war keine Reisolierung von lebensfähigem Virus aus dem Muschelfleisch möglich. Die Werte an den Tagen 5 und 7 waren etwa identisch und lagen rund eine Zehnerpotenz unter den Zahlen von Tag 2. An Tag 10 stieg die Virusmenge nochmals an. Zum Versuchsende an Tag 16 war jedoch keine Virusvermehrung mehr in den embryonierten Hühnereiern, die mit Muschel- und Wasserproben inokuliert wurden, erkennbar. Die Unterschiede der verschiedenen Muscheltiter waren als statistisch signifikant zu erachten ($p = 0,0354$). Das selbe galt für die Wasserproben ($p = 0,0023$).

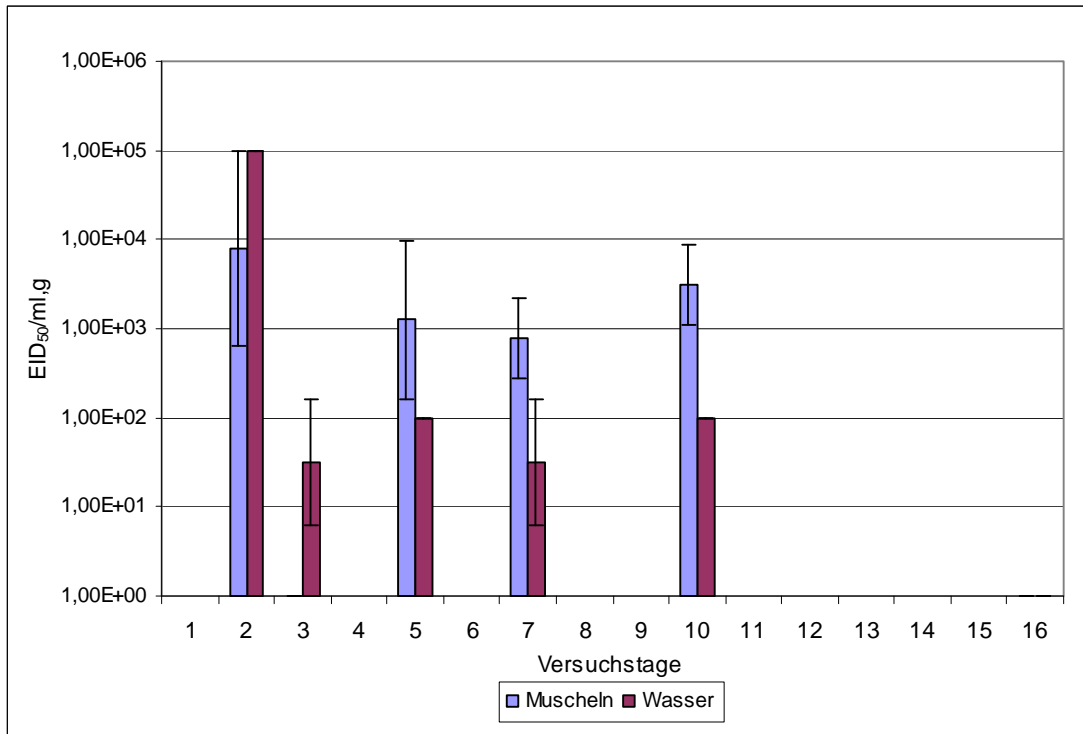


Abb. 4.17: Zweiter Hauptversuch: Kontamination mit H5N1-Virusisolat: Virusgehalt der Muschel- und Wasserproben bei einer Inkubationstemperatur von 4 °C, detektiert mittels Titration auf embryonierten Hühnereiern

Auch im Ansatz bei 19 °C, wie in Abb. 4.18 dargestellt, fällt auf, dass die Kopienzahl in den Wasserproben an Tag 2 höher war als in den Muschelproben. Während die Werte in den Muscheln bis zum Tag 7 weitgehend konstant blieben, ging die Menge an viraler RNA im Wasser kontinuierlich zurück. Bereits an Tag 3 waren die Zahlen im Wasser rund eine Zehnerpotenz niedriger als in den Muscheln. An Tag 7 waren schließlich die Ergebnisse in den Wasserproben etwa zwei Zehnerpotenzen niedriger als in den Muscheln. Der Versuch konnte aufgrund frühzeitigen Absterbens der Muscheln an Tag 7 nicht weitergeführt werden. Anhand der zweifaktoriellen Varianzanalyse konnte gezeigt werden, dass es in den Muschelproben sowohl bezüglich der Temperatur ($p = 0,0661$) als auch bezüglich der Versuchstage ($p = 0,2558$) keinen signifikanten Unterschied gab. In den Wasserproben dagegen waren sowohl die Werte in Bezug auf die Temperatur ($p = 0,0084$) als auch in Bezug auf die Versuchstage ($p < 0,0001$) statistisch signifikant.

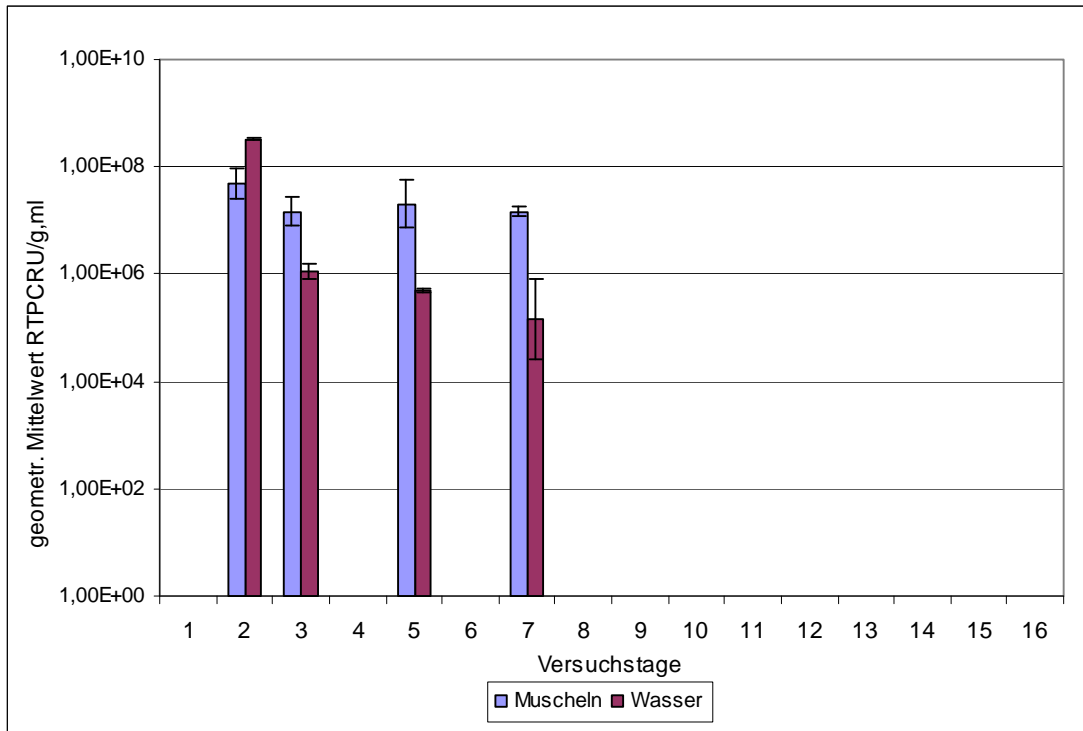


Abb.4.18: Zweiter Hauptversuch: Kontamination mit H5N1-Virusisolat: Ergebnisse der Muschel- und Wasserproben bei einer Inkubationstemperatur von 19 °C detektiert mittels qRRT-PCR

Die Reisolierung von Influenzaviren in der Eitritration aus den Muschelproben gelang bei diesem Versuchsansatz nur an Tag 5 (siehe Abb. 4.19). Der Virustiter in den Muscheln lag zu diesem Zeitpunkt höher als der im Wasser. Die größte Virusmenge konnte an Tag 3 aus den Wasserproben reisoliert werden. Ähnlich wie bei den Ergebnissen der qRRT-PCR kam es im Anschluss zum Tag 7 hin zu einem deutlichen Rückgang der Titer um über zwei Zehnerpotenzen (verglichen zu Tag 3).

Insgesamt konnte in diesem Versuch deutlich weniger Virus als im ersten Hauptversuch in den embryonierten Hühnereiern reisoliert werden. Anhand der zweifaktoriellen Varianzanalyse konnte gezeigt werden, dass in den Muschelproben ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Temperaturen ($p = 0,0275$), nicht jedoch zwischen den verschiedenen Versuchstagen bestand ($p = 0,0926$). In den Wasserproben konnte dagegen weder in Bezug auf die Temperatur ($p = 0,5927$) noch bezüglich der einzelnen Versuchstage ein signifikanter Unterschied ($p = 0,0966$) ermittelt werden.

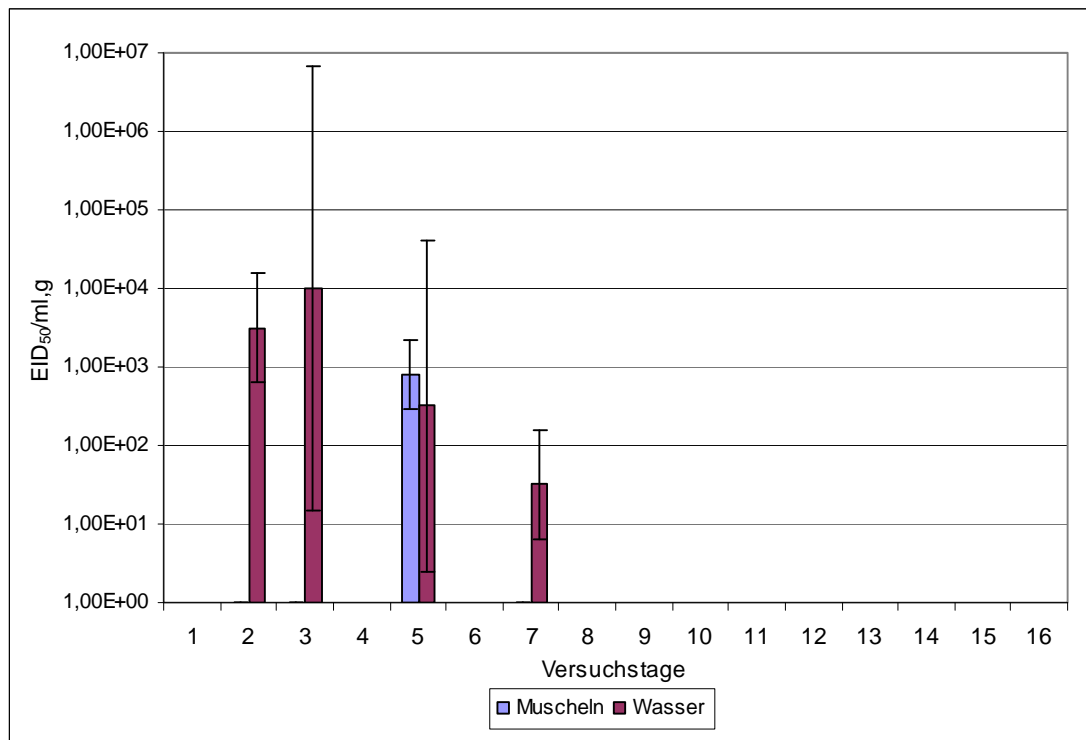


Abb. 4.19: Zweiter Hauptversuch: Kontamination mit H5N1-Virusisolat: Virusgehalt der Muschel- und Wasserproben bei einer Inkubationstemperatur von 19 °C, detektiert mittels Titration auf embryonierten Hühnereiern

Dritter Hauptversuch

Ähnlich wie im vorausgegangenen Experiment war auch in diesem Versuch die Kopienzahl viraler RNA in den Wasserproben an Tag 2 höher als in den Muschelproben (Abb. 4.20). Dies änderte sich allerdings nach Überführung der Muscheln in Reinwasser: während an den Tagen 3, 5 und 7 die Muschelwerte höher waren, stiegen zum Versuchsende die Kopienzahlen im Wasser an und überschritten die Zahlen in den Muscheln. Die Werte in den Muscheln waren an Tag 2 am höchsten. Bis zum Tag 7 fielen die Werte kontinuierlich ab. An Tag 10 kam es wieder zu einem geringgradigen Anstieg, um dann an Tag 16 zum Versuchsende hin wieder leicht zurück zu gehen. Im Wasser kam es nach dem Abfall an Tag 3 wieder zu einem Anstieg der Werte an Tag 5. An Tag 7 wurde allerdings wieder das Niveau von Tag 3 erreicht. An Tag 10 stiegen die Zahlen erneut an. Die gemessenen Kopienzahlen an Tag 10 und 16 waren nahezu identisch. Die Werte im Wasser beschrieben einen nahezu wellenförmigen Verlauf. Die Unterschiede der einzelnen Werte in den Muschel- und Wasserproben waren statistisch signifikant (Muschel: $p < 0,0001$; Wasser: $p = 0,0020$).

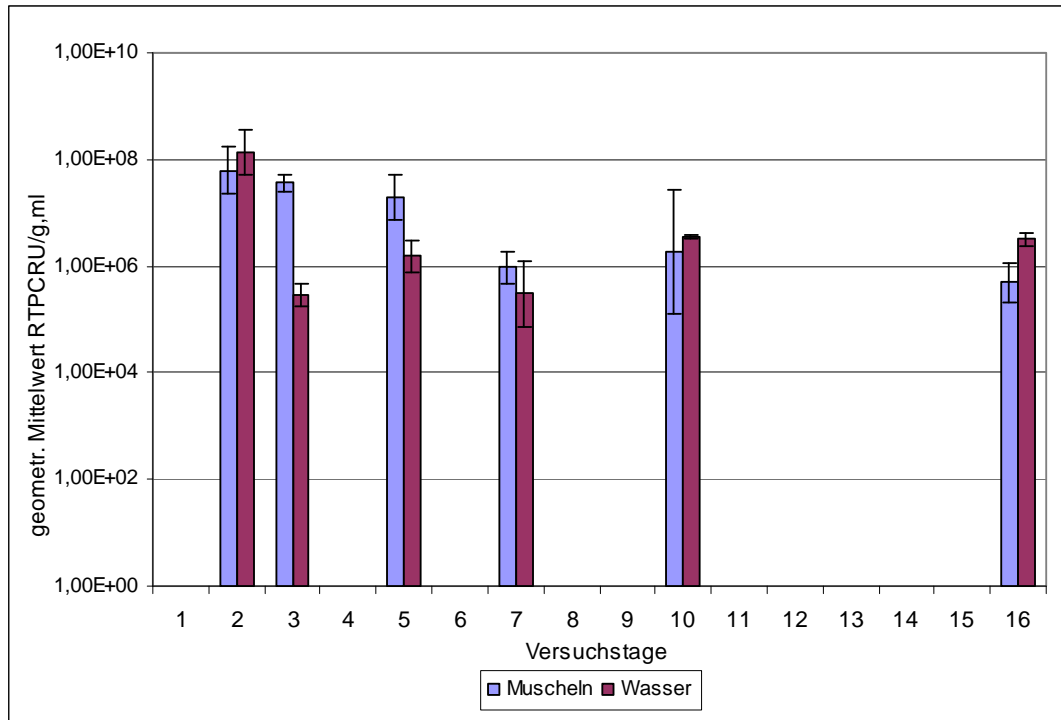


Abb. 4.20: Dritter Hauptversuch: Kontamination mit H5N1-Virusisolat: Ergebnisse der Muschel- und Wasserproben bei einer Inkubationstemperatur von 4 °C, detektiert mittels qRRT-PCR

Betrachtet man die Ergebnisse der Eititration in Abb. 4.21, so fällt auf, dass die Virustiter in den Wasserproben an den Tagen 2 und 5 höher waren als die Titer in den Muscheln. Der höchste Titer wurde in den Muscheln an Tag 3 erreicht. Danach kam es zu einem deutlichen Rückgang. Die Titer an den Tagen 5 und 7 waren nahezu identisch. An Tag 10 stiegen die Titer in der Muschel wieder um etwa eine Zehnerpotenz an. An Tag 16 war keine Reisolation von lebensfähigem Virus aus Muscheln in den Eiern mehr möglich. Die Werte in den Wasserproben hatten an Tag 2 ihr Maximum. Der Titer an Tag 3 lag etwa zwei Zehnerpotenzen niedriger. An Tag 5 kam es nochmals zu einem Anstieg um schließlich an Tag 7 und 10 gleichermaßen unter den Wert von Tag 3 zu fallen. An Tag 16 war keine Reisolation möglich. In der einfaktoriellen Varianzanalyse konnte zwischen den einzelnen Versuchstagen ein signifikanter Unterschied sowohl in den Muschelproben ($p = 0,0177$) als auch im Wasser ($p = 0,0252$) ermittelt werden.

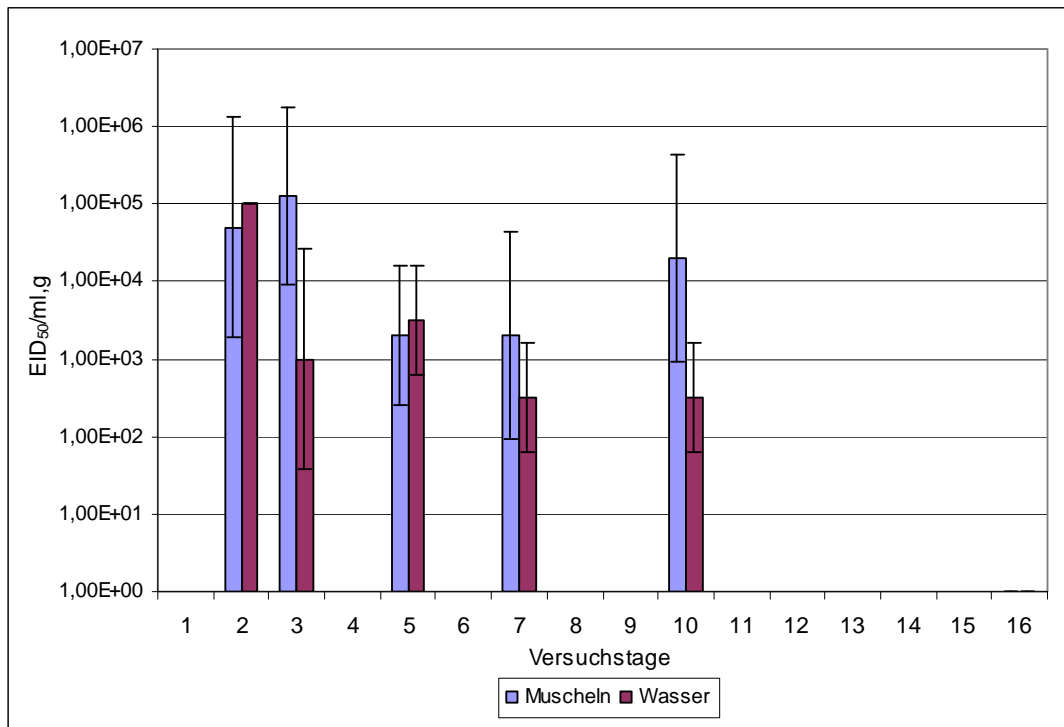


Abb. 4.21: Dritter Hauptversuch: Kontamination mit H5N1-Virusisolat: Virusgehalt der Muschel- und Wasserproben bei einer Inkubationstemperatur von 4 °C, detektiert mittels Titration auf embryonierten Hühnereiern

Sowohl in den Muschel- als auch in den Wasserproben zeigten sich Ähnlichkeiten in den Ergebnissen der qRRT-PCR und der Eititration. Der Abwärtstrend in den Muschelproben von Tag 3 bis 7 war mit beiden Methoden nachweisbar. Allerdings wurde der Rückgang in der Eititration schon an Tag 5 und in der qRRT-PCR erst an Tag 7 deutlich. Auch in den Wasserproben waren die Ergebnisse im Rahmen beider Nachweismethoden mit viraler RNA und lebensfähigen Viren ähnlich. Lediglich der erneute Anstieg der Kopienzahl an Tag 10 konnte in der Eititration nicht bestätigt werden.

Wie im Ansatz bei 4 °C, so waren auch bei 19 °C die Kopienzahlen im Wasser an Tag 2 höher als die Kopienzahlen in den Muscheln. Anhand der Ergebnisse der Muscheln in Abb. 4.22 ist erkennbar, dass auch hier zwischen Tag 2 und 3 nur ein sehr kleiner Unterschied feststellbar war. Zum Tag 7 hin fielen die Werte allerdings um rund zwei Zehnerpotenzen. Auch diese Ergebnisse waren mit denen aus dem 4 °C Ansatz vergleichbar. Der Versuch musste zu diesem Zeitpunkt abgebrochen werden, da eine zu große Zahl an

Muscheln bereits abgestorben war. Nach dem Maximum an Tag 2 fielen die Werte im Wasser ebenfalls kontinuierlich ab. Insgesamt war zwischen Tag 2 und 7 ein Rückgang von etwa drei Zehnerpotenzen feststellbar.

In der zweifaktoriellen Varianzanalyse waren die Werte zwar in den Muschelproben bezüglich der Versuchstage statistisch signifikant ($p < 0,0001$), nicht aber in Bezug auf die Temperatur ($p = 0,0614$). In den Wasserproben war die Situation ähnlich: Der p-Wert für die Versuchstage betrug $p = 0,0001$ und war damit statistisch signifikant. Der Wert in Bezug auf die Temperatur dagegen betrug $0,4508$ und wies damit auf keinen statistisch signifikanten Unterschied hin.

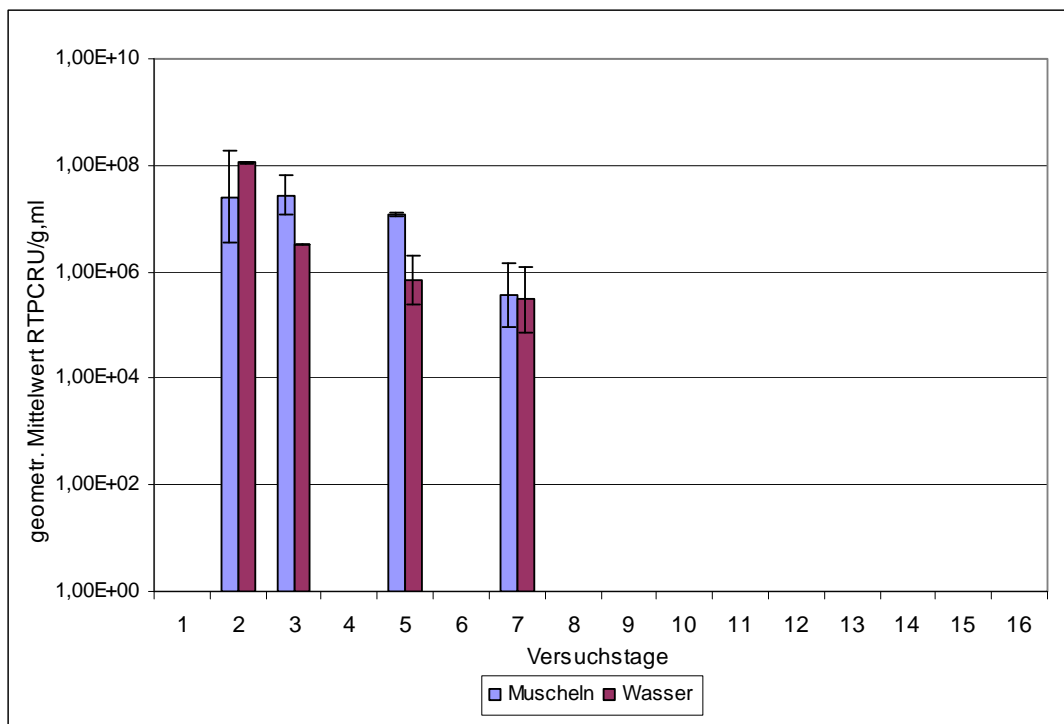


Abb. 4.22: Dritter Hauptversuch: Kontamination mit H5N1-Virusisolat: Ergebnisse der Muschel- und Wasserproben bei einer Inkubationstemperatur von 19 °C, detektiert mittels qRRT-PCR

Vergleicht man diese Ergebnisse mit der Eititration, welche in Abb. 4.23 dargestellt ist, so verhielten sich von Tag 2 bis Tag 5 die Titer in Muschel- und Wasserproben ähnlich wie die Kopienzahlen in der qRRT-PCR. An Tag 7 zeigte sich jedoch ein deutlicher Unterschied: während sich in der qRRT-PCR der Abwärtstrend fortsetzte, stiegen die Titer von Wasser und Muscheln

wieder an. Dabei waren die Zahlen im Wasser höher als in den Muscheln. Anhand der zweifaktoriellen Varianzanalyse konnte in den Muschelproben in Bezug auf den Versuchstag ein signifikanter Unterschied ($p = 0,0170$) nicht jedoch in Bezug auf die Temperatur ($p = 0,1281$) errechnet werden. In den Wasserproben zeigte sich ein ähnliches Bild: der p-Wert bezüglich der Versuchstage betrug $p = 0,0151$ und für die Temperatur $p = 0,5796$.

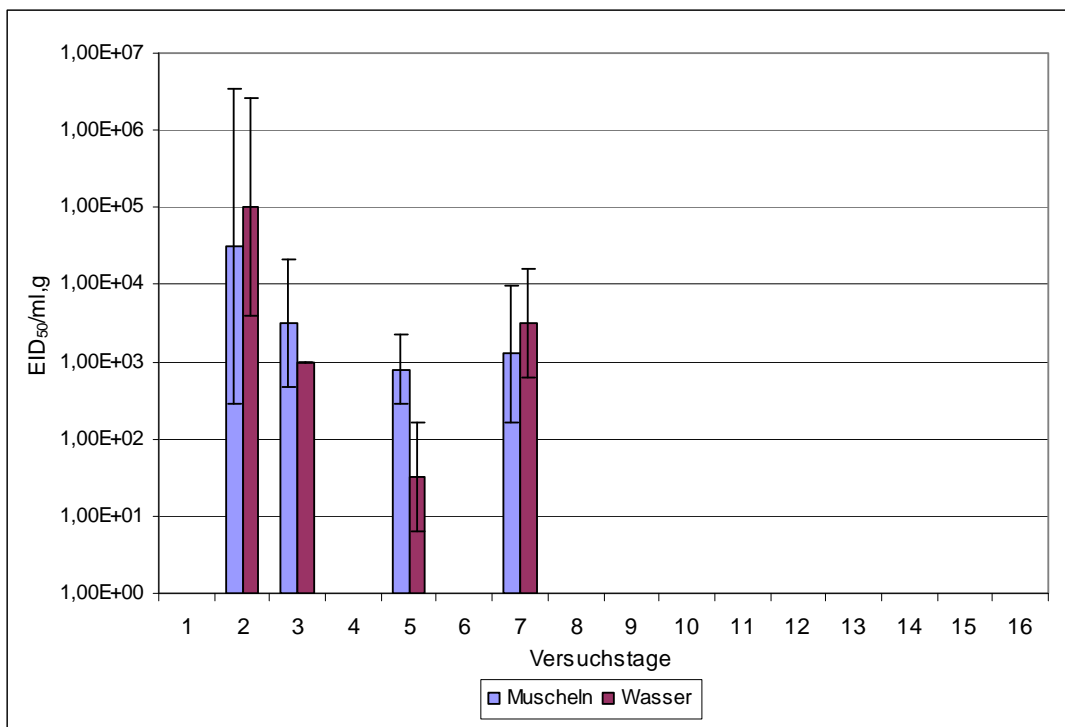


Abb. 4.23: Dritter Hauptversuch: Kontamination mit H5N1-Virusisolat: Virusgehalt der Muschel- und Wasserproben bei einer Inkubationstemperatur von 19 °C, detektiert mittels Titration auf embryonierten Hühnereiern

Vergleich der drei Hauptversuche

Vergleicht man die Ergebnisse der qRRT-PCR in Bezug auf die Muschelproben in allen drei Versuchsansätzen, so fällt auf, dass im ersten Hauptversuch die Werte von Tag 2 bis Tag 10 kontinuierlich absanken, um im Anschluss an Tag 16 nochmals geringgradig anzusteigen. Stets waren die Zahlen höher als in den Wasserproben. Im zweiten Hauptversuch dagegen änderten sich die Kopienzahlen während des gesamten Versuches kaum. Sie blieben vielmehr stabil auf hohem Niveau, waren aber an Tag 2 und 10 niedriger als die

Wasserproben. Der dritte Hauptversuch hingegen war in Bezug auf die Kopienzahlen in den Muscheln dem ersten Versuch ähnlich: auch hier kam es nach Tag 2 zu einem kontinuierlichen Abfall der Werte. Im Gegensatz zum ersten Versuch kam es allerdings bereits an Tag 10 zu einem kleinen Anstieg der Zahlen und an Tag 16 wieder zu einem Rückgang. Wie im zweiten Hauptversuch waren die Werte im Wasser an Tag 2 und 10 höher als die Kopienzahlen in den Muschelproben.

In allen drei Versuchen waren die Werte im Wasser an Tag 2 am höchsten. Nach Überführung in reines Bodenseewasser waren die Zahlen nach 24 Stunden (Tag 3) deutlich niedriger. Jedoch kam es in allen Ansätzen in den Folgeproben erneut zu einem Anstieg der Kopienzahlen. Das Maximum wurde im ersten Versuch schon an Tag 5 erreicht und die Werte blieben stabil auf hohem Niveau. Im zweiten Versuch wurde das Maximum an den Tagen 7 und 10 erreicht. Danach kam es zu einem geringgradigen Rückgang. Die Ergebnisse der Wasserproben im dritten Hauptversuch zeigten dagegen einen wellenförmigeren Verlauf.

Anhand der Ergebnisse der drei Versuche bei 19 °C wird erkennbar, dass die Kopienzahl ausgehend von Tag 2 in allen Versuchen kontinuierlich zurückging. Eine Versuchsdurchführung war jedoch nur bis Tag 5 (erster Hauptversuch) bzw. Tag 7 (zweiter und dritter Hauptversuch) möglich. Während sich die Zahlen in den ersten beiden Versuchen nur geringgradig zwischen den einzelnen Tagen unterschieden, war im dritten Hauptversuch der Rückgang besonders an Tag 7 sehr deutlich ausgeprägt. Im zweiten und dritten Versuch waren die Kopienzahlen an Tag 2 im Wasser höher als in den Muscheln. Auch in den Wasserproben ließ sich zum Tag 7 hin in allen drei Versuchen ein Rückgang der Kopienzahlen erkennen. Insgesamt waren die Werte der Versuche eins und drei ähnlicher zueinander als zu den Ergebnissen des zweiten Versuchs.

Im Rahmen der dreifaktoriellen Varianzanalyse konnte in den Muschelproben zwischen den drei Versuchen und auch zwischen den einzelnen Versuchstagen ein statistisch signifikanter Unterschied festgestellt werden ($p < 0,0001$ bzw. $p = 0,0001$). In Bezug auf die Temperatur konnte allerdings zwischen

den Ansätzen bei 4 °C und 19 °C in allen drei Versuchen kein signifikanter Unterschied ermittelt werden ($p = 0,9148$). In den Wasserproben zeigte sich ein ähnliches Bild: Es gab zwischen den beiden Temperaturen keinen statistisch signifikanten Unterschied ($p = 0,1998$). In Bezug auf die verschiedenen Versuchsansätze betrug der p-Wert $p = 0,0349$. Es gab somit einen signifikanten Unterschied zwischen den Ergebnissen aller drei Versuche und auch in Bezug auf die verschiedenen Versuchstage innerhalb der Versuchsansätze ($p < 0,0001$).

Die Eititration bei 4 °C war im ersten Versuch bis zum Tag 16 erfolgreich. In den anderen beiden Ansätzen war dagegen nur bis Tag 10 vermehrungsfähiges Virus detektierbar. In den ersten beiden Versuchen waren die Ergebnisse der Eititration insgesamt mit denen der qRRT-PCR vergleichbar. Im dritten Versuch lagen in der Eititration im Gegensatz zur qRRT-PCR die Titer im Wasser an Tag 5 höher als in den Muscheln. In den letzten beiden Versuchen waren im Gegensatz zum ersten Versuch die Titer im Wasser an Tag 2 im Rahmen der qRRT-PCR höher als in den Muscheln. Im Vergleich ließ sich jedoch zwischen den drei Versuchen kein eindeutiger Trend festlegen.

Bei 19 °C waren die Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchen noch größer: aus den Muschelproben ließ sich im ersten und dritten Versuch bis zum Versuchsende Virus reisolieren. In beiden Versuchen nahm der Titer kontinuierlich ab. Lediglich an Tag 7 (dritter Hauptversuch) ließ sich noch einmal ein geringgradiger Anstieg verzeichnen. Im zweiten Hauptversuch dagegen war nur an Tag 5 eine Reisolierung aus Muscheln erfolgreich. Aus den Wasserproben konnte in den Versuchen zwei und drei bis zum Ende, in Versuch eins nur an den Tagen 2 und 3 lebensfähiges Virus nachgewiesen werden. Tendenziell war auch in diesen Proben ein Abwärtstrend zum Tag 7 erkennbar. Im dritten Hauptversuch stieg der Titer allerdings an Tag 7 parallel zu dem Muscheltiter noch einmal an und überstieg die Werte der Muscheln. Die Unterschiede zwischen den Ergebnissen aller drei Versuche wurden durch die statistische Auswertung bestätigt: in der dreifaktoriellen Varianzanalyse gab es in den Muschelproben einen signifikanten Unter-

schied zwischen den einzelnen Versuchen $p < 0,0001$; nicht jedoch in den Wasserproben ($p = 0,5083$). Aber auch bezüglich der Temperatur ($p = 0,0137$) und der Versuchstage ($p = 0,0001$) waren die Unterschiede in den Muscheln signifikant. In den Wasserproben gab es zwar in Bezug auf die Temperatur keinen signifikanten Unterschied ($p = 0,3041$), jedoch bezüglich der Versuchstage durchaus ($p = 0,0001$).

4.1.4. Zellkulturversuche

4.1.4.1. Reptilienzellen

In verschiedenen Versuchsansätzen wurden die drei Reptilienzelllinien viper heart Zellen (VH2), iguana heart Zellen (IgH-2) und *terrapene* heart Zellen (TH-1) mit niedrig-pathogenen Influenzaviren infiziert. Der Nachweis einer potentiellen Infektion der verschiedenen Zelllinien erfolgte mittels eines lichtmikroskopischen Nachweises (ZPE) sowie mittels Immunperoxidasefärbung, qRRT-PCR und Titration auf embryonierten Hühnereiern.

Lichtmikroskopischer Nachweis eines zytopathischen Effektes (ZPE)

In einem ersten Ansatz wurden jeweils sechs Schälchen mit den Reptilienzellen eingesät: ein Schälchen als Negativkontrolle, ein Schälchen mit Allantoisflüssigkeit ohne Virus, je ein Schälchen mit dem H5N1-Isolat (A/Teal/Wv632/Germany/05, FLI, Insel Riems) mit einem Titer auf MDCK Zellen: $10^{6,5}$ KID₅₀/ml unverdünnt, sowie in einer 1:10 Verdünnung und letztlich je ein Schälchen mit dem H4N6-Isolat (A/Mallard/Wv1732-34/03, FLI, Insel Riems), Titer: $10^{5,25}$ KID₅₀/ml, unverdünnt sowie in einer Verdünnung von 1:10. Die Bebrütung fand bei 28 °C statt. Der Zellrasen wurde täglich mikroskopisch im Hinblick auf einen zytopathischen Effekt (ZPE) kontrolliert und nach 7-10 Tagen final beurteilt. Die Negativkontrolle sowie die Schälchen mit Allantoisflüssigkeit ohne Virus zeigten einen einheitlichen Zellrasen. In den virushaltigen Ansätzen war bei beiden Viren ein ZPE in Form von Vakuolenbildung, Plaques und/oder Ablösung der Zellen erkennbar (IgH2 und TH1 auch in der 1:10 Verdünnung mit LPAI H5N1) (Abb. 4.24 bis 4.27). Im Hämagglutinationstest war nur der Zellkulturüberstand von unverdünnt infizierten Zellen aller drei Zelllinien positiv. In einem weiteren Versuchsansatz wurde das Experiment mit dem LPAI H5N1-Isolat wiederholt sowie in Ergänzung mit dem humanen Influenzavirus (H3N2) (A-Wisconsin/67/05-like) mit einer KID₅₀ von 10^2 /ml durchgeführt. Ein ZPE konnte erneut nach Infektion

mit dem LPAI H5N1-Virusisolat, nicht aber bei den Zellkulturschälchen mit dem humanen Virusisolat erkannt werden.



Abb. 4.24: IgH2 Zellen, 40fache Vergrößerung

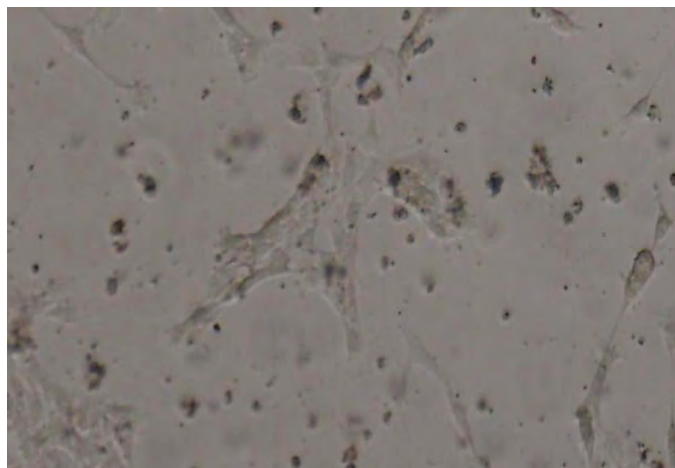


Abb. 4.25: IgH2 Zellen, infiziert mit einer unverdünnten H5N1-Virussuspension, 4 Tage p.i., 40fache Vergrößerung

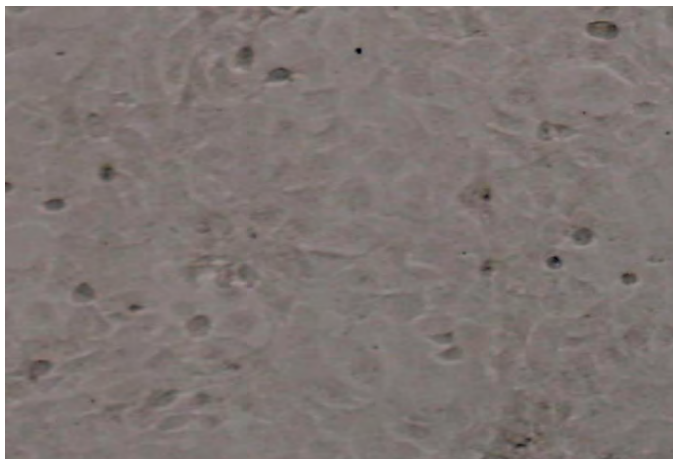


Abb. 4.26: : TH1 Zellen, 40fache Vergrößerung

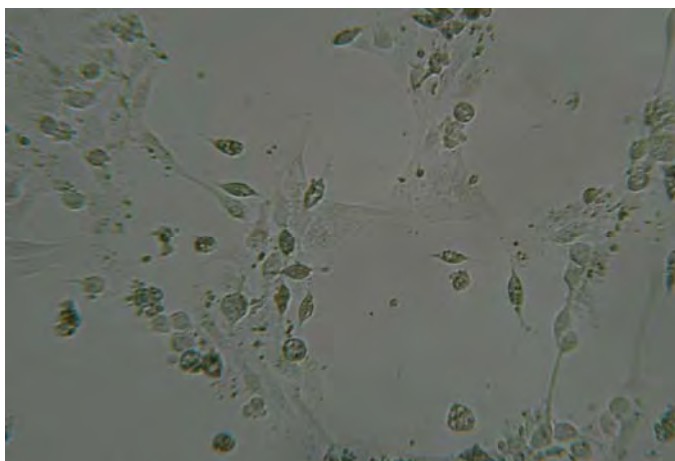


Abb. 4.27: TH1 Zellen, infiziert mit einer unverdünnten H5N1-Virussuspension, 4 Tage p.i., 40fache Vergrößerung

Immunperoxidasefärbung

Die Schälchen aller drei Reptilienzelllinien, die mit LPAI H5N1-Virus infiziert wurden und einen deutlichen ZPE zeigten sowie die dazugehörigen Negativkontrollen wurden mittels Immunperoxidasefärbung angefärbt. Das Ergebnis wurde sofort nach Anfärbung lichtmikroskopisch beurteilt. In allen Negativkontrollen war keinerlei Anfärbung der Zellen erkennbar. Während die Ergebnisse der VH2- und TH1-Zellen nicht eindeutig waren, konnten bei den IgH2-Zellen deutliche Braunfärbungen einzelner Zellen, welche auf eine potentielle Virusvermehrung hindeuten, erkannt werden.



Abb. 4.28: IgH2 Zellen, nach Peroxidasefärbung, 40fache Vergrößerung

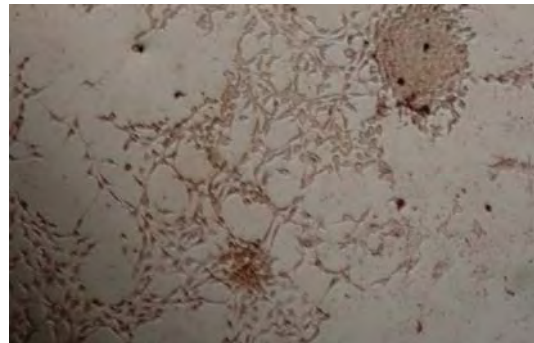


Abb. 4.29: IgH2 Peroxidasefärbung, Vergrößerung Zellen, infiziert mit einer unverdünnten H5N1-Virussuspension unverdünnt, Peroxidasefärbung, 40fache Vergrößerung

qRRT-PCR

Vom Zellkulturüberstand von Schälchen, die mit HPAI H5N1-Virus bzw. dem Humanisolat (H3N2) infiziert wurden, wurde eine qRRT-PCR durchgeführt. Hierfür wurden nach 0, 2 und 8 Tagen post infectionem 300 µl Zellkulturüberstand entnommen und eine RNA-Extraktion sowie eine qRRT-PCR durchgeführt.

Betrachtet man die Zahl der Kopien nach Infektion mit dem H5N1 Virusisolat, so fällt auf, dass bei den IgH2 und VH2 Zellen deutliche Unterschiede zwischen den Ergebnissen des Tages 0 und 2 vorlagen: Während an Tag 0 keine virale RNA in der qRRT-PCR detektiert werden konnte, stiegen die Zahlen

an Tag 2 um über fünf Zehnerpotenzen an. Bei der TH1-Zelllinie war dieser Unterschied weniger deutlich, aber auch hier kam es im Verlaufe der acht Versuchstage zu einem Anstieg viraler RNA in den Schälchen. In den 1:10 verdünnten Schälchen fiel die Kopienzahl der viralen RNA zum Tag 8 hin stets ab. In den unverdünnten Proben stieg sie in den IgH2 und TH1-Zelllinien weiter an. Lediglich in den VH2-Zellen kam es zu einem Rückgang. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.30 dargestellt.

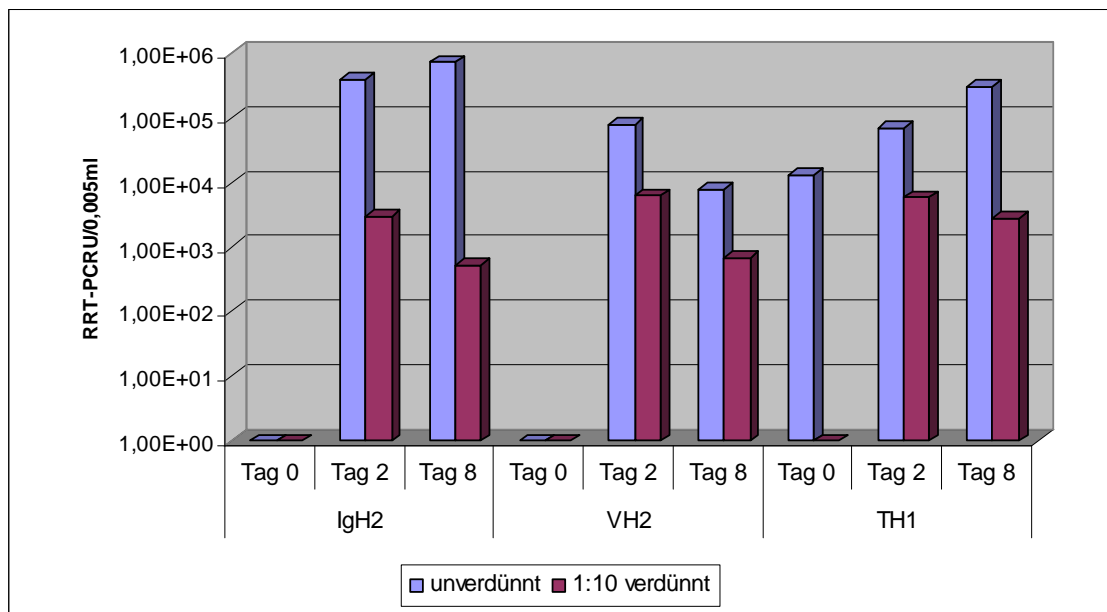


Abb. 4.30: Ergebnisse der qRRT-PCR vom Zellkulturüberstand. IgH2, VH2 und TH1, 0, 2 und 8 Tage p.i.. Eingesetzt wurde ein LPAI H5N1-Isolat unverdünnt und 1:10 verdünnt. An Tag 0 blieben die Werte der IgH2- und VH2-Zellen unter dem Detektionsniveau der qRRT-PCR

Auch in den Schälchen, die mit dem Humanisolat infiziert wurden, konnte ein deutlicher Anstieg viraler RNA zwischen Tag 0 und Tag 2 beobachtet werden (siehe Abb. 4.31). Lediglich in den VH2-Zellen waren bei Verwendung des unverdünnten Virusisolates die Kopienzahl an Tag 0 am höchsten. In allen Ansätzen kam es zum Tag 8 hin zu einem deutlichen Abfall der Menge an viraler RNA.

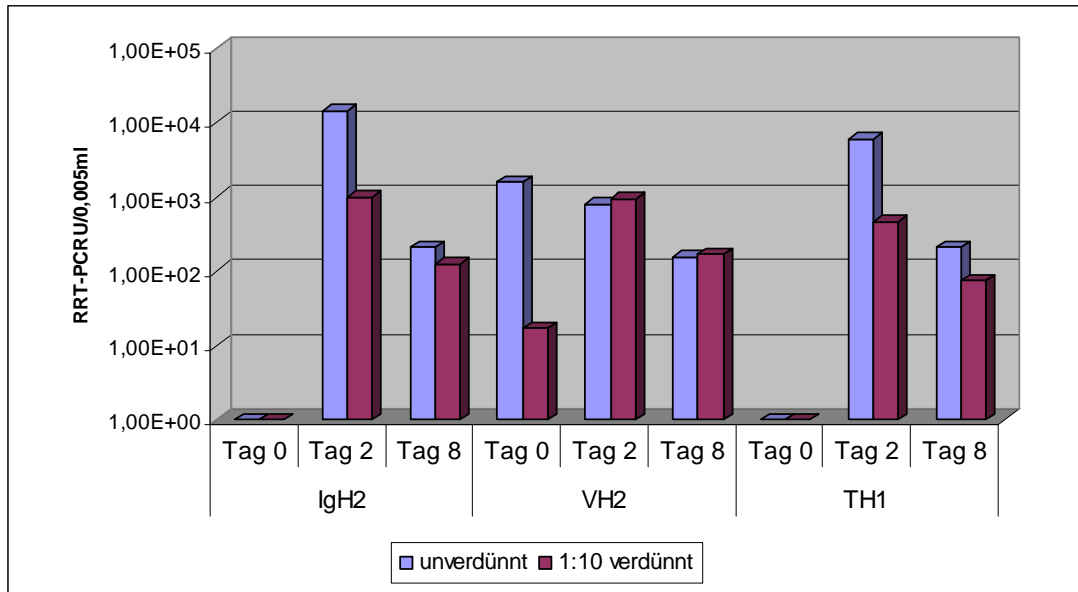


Abb. 4.31: Ergebnisse der qRRT-PCR vom Zellkulturüberstand. IgH2, VH2 und TH1, 0, 2 und 8 Tage p.i. Eingesetzt wurde das Humanisolat H3N2 unverdünnt und 1:10 verdünnt. An Tag 0 blieben die Werte der IgH2- und TH1-Zellen unter dem Detektionsniveau der qRRT-PCR

Titration auf embryonierten Hühnereiern

Der Versuch wurde mit den Zelllinien TH1, IgH2 und VH2 durchgeführt. Am Vortag eingesäte Zellkulturschälchen wurden mit LPAI H5N1-Virus infiziert ($10^{6,5}$ KID₅₀/ml auf MDCK-Zellen) und anschließend an Tag 0, 2 und 4 beprobt. Der Zellkulturüberstand wurde in einer 10er Verdünnungsreihe auf 9-11 Tage alte embryonierte Hühnereier bis zu einer Verdünnung von 10^{-4} bzw. 10^{-5} mit je einer Wiederholung pro Verdünnungsstufe (außer Tag 4 bei den VH2 Zellen hier wegen fehlender embryonierter Hühnereier ohne Wiederholung) titriert. Die Eier wurden bei 37 °C inkubiert, täglich durchleuchtet und an Tag 4 post infectionem kalt gestellt. Nach Ernte der Allantoisflüssigkeit wurde zum Nachweis einer potentiellen Virusvermehrung ein Hämagglutinationstest durchgeführt. Zellkulturüberstand ohne Viruskontakt wurde als Negativkontrolle ebenfalls auf embryonierten Hühnereiern titriert.

An allen 3 Probenentnahmetagen verhielten sich die Negativkontrollen aller Zelllinien erwartungsgemäß: keiner der Embryonen war vorzeitig abgestorben oder im Hämagglutinationstest positiv. Betrachtet man nun die Ergebnisse der einzelnen Zelllinien in Abb. 4.32, so fällt auf, dass die Titer lediglich

bei den VH2-Zellen anstiegen. Während die Titer aus dem Zellkulturüberstand der IgH2-Zellen im Verlauf des gesamten Versuches konstant blieben, fielen die Werte der TH1-Zellen um über eine Zehnerpotenz ab. Insgesamt konnte im Rahmen der Eititration kein eindeutiger Beweis für eine Virusvermehrung in den Zellkulturen erbracht werden.

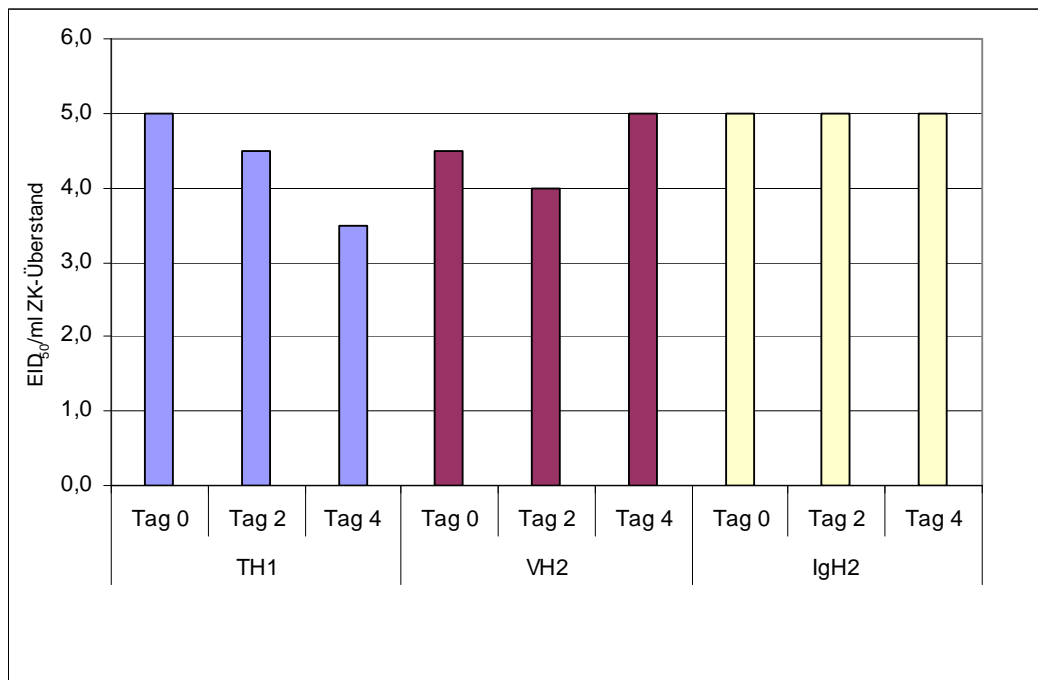


Abb. 4.32: Ergebnisse der Eititration vom Zellkulturüberstand. IgH2-, VH2- und TH1-Zellen, 0, 2 und 4 Tage p.i. mit einem LPAI H5N1-Isolat

4.1.4.2. Fischzellen

Bei Versuchen mit den Fischzelllinien Epithelioma papulosum cyprini (EPC) und Rainbow trout gonadal tissue (RTG2) und dem LPAI H5N1 Virusisolat (A/Teal/Wv632/Germany/05, FLI, Insel Riems) mit einem Titer auf MDCK-Zellen: $10^{6,5}$ KID₅₀/ml gab es bei einer Inkubationstemperatur von 19 °C keine Hinweise auf eine Virusvermehrung. Bei 28 °C zeigten auch die Negativkontrollen Veränderungen, die auf einen ZPE hindeuten könnten. Weitere Versuche wurden deshalb mit den Zelllinien Adult gilt-head seabream fin tissues (SAF-1) und Fat head minnow caudal trunk (FHM) durchgeführt. Diese sind physiologischerweise bei 28 °C inkubierbar.

Lichtmikroskopischer Nachweis eines zytopathischen Effektes (ZPE)

Es wurden wie bei den Reptilienzellen jeweils sechs Schälchen mit FHM und SAF eingesät: ein Schälchen als Negativkontrolle, ein Schälchen mit Allantoisflüssigkeit ohne Virus, je ein Schälchen mit dem H5N1 Isolat unverdünnt, sowie in einer 1:10 Verdünnung und letztlich je ein Schälchen mit einem H4N6-Isolat unverdünnt sowie in einer Konzentration von 1:10. Die Bebrütung fand bei 28 °C statt. Der Zellrasen wurde täglich mikroskopisch im Hinblick auf einen zytopathischen Effekt (ZPE) kontrolliert und nach 7-10 Tagen final beurteilt. Die Negativkontrolle sowie die Schälchen mit Allantoisflüssigkeit ohne Virus zeigten einen einheitlichen Zellrasen. In den virushaltigen Ansätzen war bei beiden Viren ein ZPE in Form von Vakuolenbildung, Plaques und/oder Ablösung der Zellen erkennbar (FHM auch in der 1:10 Verdünnung mit LPAI H5N1). In einem weiteren Versuchsansatz wurde das Experiment mit dem LPAI H5N1-Isolat wiederholt sowie in Ergänzung mit dem humanen Influenzavirus (H3N2) durchgeführt. Ein ZPE konnte erneut nach Infektion mit dem LPAI H5N1-Virus, nicht aber bei den Zellkulturschälchen mit dem humanen Influenzavirus erkannt werden.

Immunperoxidasetest

Von den Schälchen der FHM und SAF, die mit LPAI H5N1-Virus infiziert wurden und einen deutlichen ZPE zeigten sowie von den dazugehörigen Negativkontrollen wurde ein Immunperoxidasetest durchgeführt. Das Ergebnis wurde sofort nach Anfärbung lichtmikroskopisch beurteilt. In allen Negativkontrollen war keinerlei Anfärbung der Zellen erkennbar. Allerdings waren auch die Ergebnisse der infizierten Zellen nicht als eindeutig positiv einzustufen.

qRRT-PCR

Vom Zellkulturüberstand von Schälchen, die mit HPAI H5N1 Virus bzw. dem Humanisolat (H3N2) infiziert wurden, wurde eine qRRT-PCR durchgeführt. Hierfür wurden nach 0, 2 und 8 Tagen post infectionem 300 µl Zellkulturüberstand entnommen und eine RNA-Extraktion sowie eine qRRT-PCR durchgeführt.

Nach Infektion mit dem H5N1 Virusisolat kam es in beiden Ansätzen (unverdünnt und 1:10 verdünnt) zu einem Anstieg der Kopienzahlen von Tag 0 zu Tag 2. Allerdings war dieser Anstieg bei den SAF-Zellen deutlicher als bei den FHM-Zellen, bei welchen auch schon am Tag 0 virale RNA in den Überständen detektiert wurde. In den Proben mit verdünnter Virussuspension stiegen die Zahlen zum Tag 8 hin weiter an. In den unverdünnten Proben hingegen kam es sowohl bei den SAF- als auch bei den FHM-Zellen zu einer Abnahme, die jedoch deutlich über den Werten von Tag 0 lag.

Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 4.33 und 4.34 dargestellt.

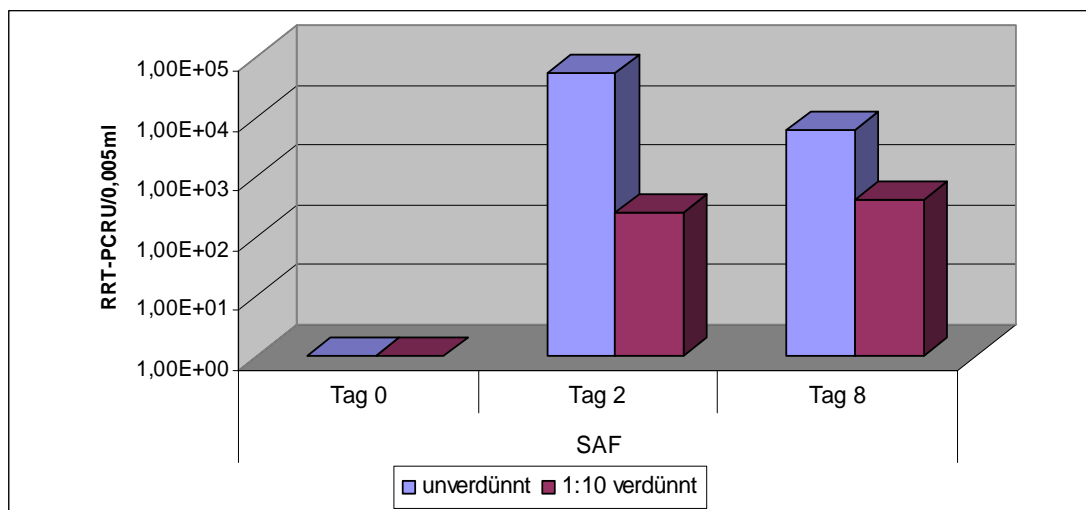


Abb. 4.33: Konzentrationen von Influenza Virus RNA im Zellkulturüberstand der SAF-Zellen an den Tagen 0, 2 und 8 nach Infektion mit dem LPAI H5N1-Virusisolat, unverdünnt und 1:10 verdünnt.

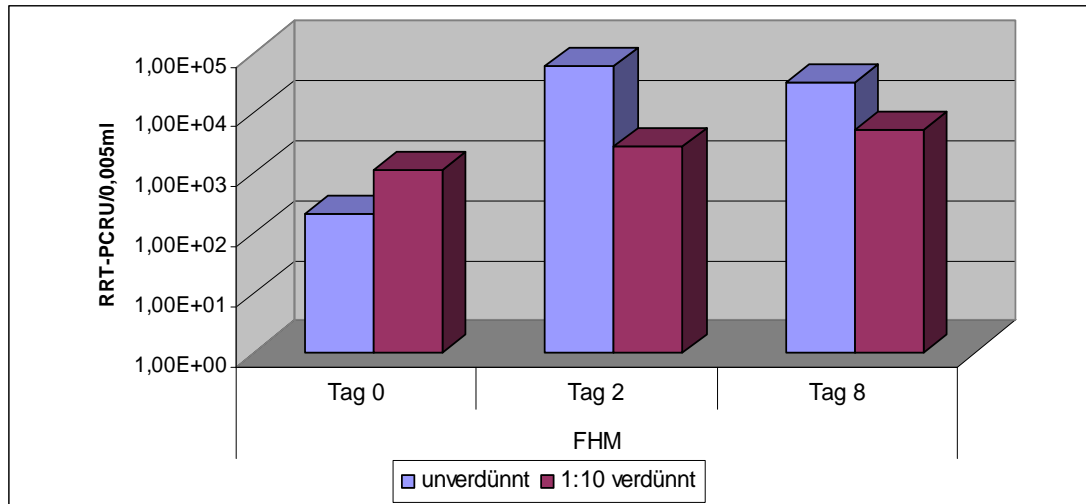


Abb. 4.34: Konzentrationen von Influenza Virus RNA im Zellkulturüberstand der FHM-Zellen an den Tagen 0, 2 und 8 nach Infektion mit dem LPAI H5N1-Virusisolat, unverdünnt und 1:10 verdünnt.

Auch in den Schälchen, die mit dem Humanisolat (H3N2) infiziert wurden, konnte ein deutlicher Anstieg viraler RNA zwischen Tag 0 und Tag 2 beobachtet werden (vgl. Abb. 4.35 und Abb. 4.36). In beiden Zellkulturen stieg die Kopienzahl in dem unverdünnten Ansatz um drei Zehnerpotenzen an. In den 1:10 Verdünnungen war diese Zunahme weniger stark, aber auch hier nahmen die Kopienzahlen um etwa eine Zehnerpotenz zu. Zum Tag 8 hin fielen die Werte in allen Proben um rund eine Zehnerpotenz ab.

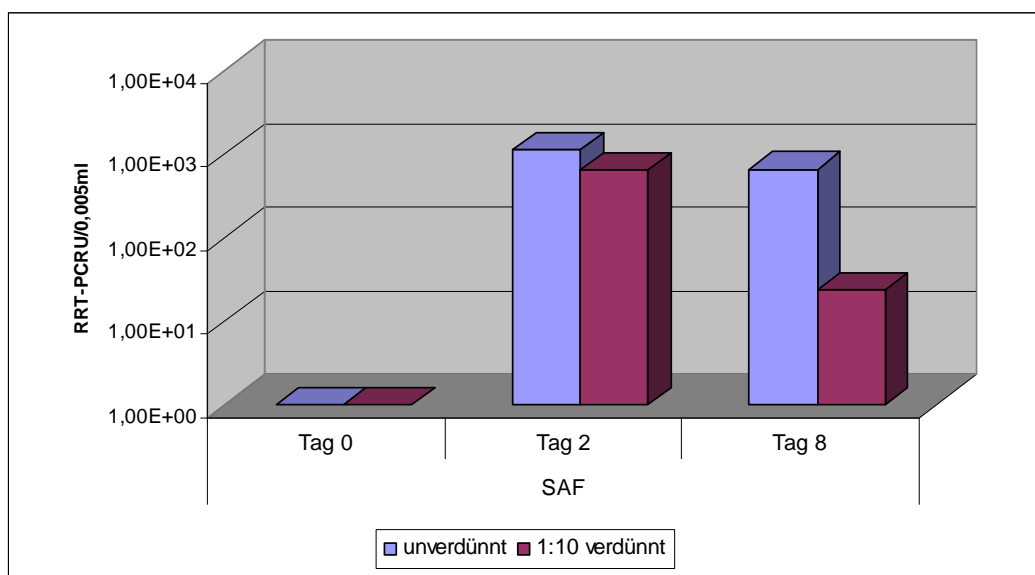


Abb. 4.35: Konzentrationen viraler Influenza-RNA im Zellkulturüberstand der SAF-Zellen an den Tagen 0, 2 und 8 nach Infektion mit dem humanen H3N2-Virusisolat, unverdünnt und 1:10 verdünnt.

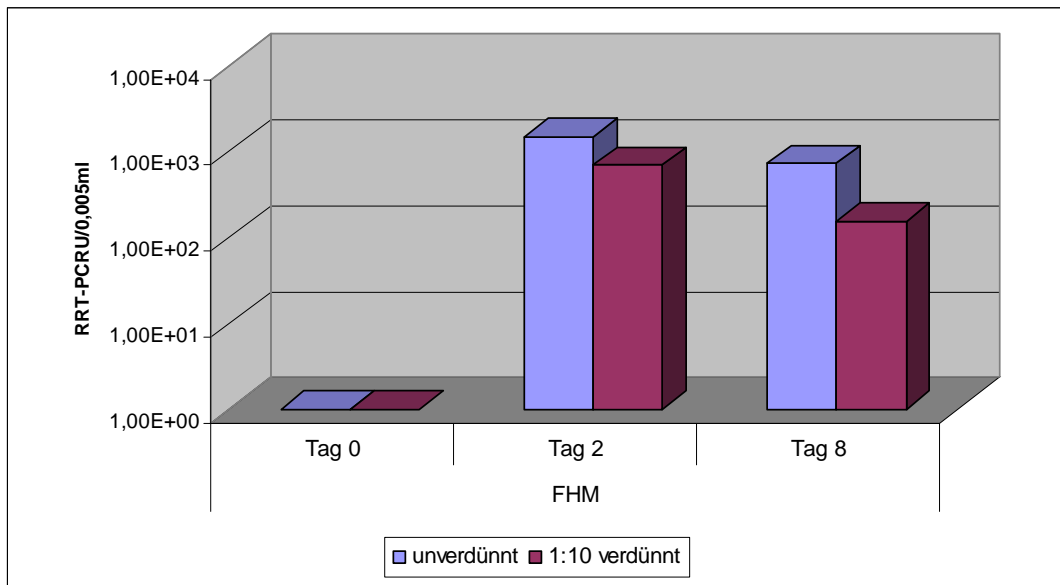


Abb. 4.36: Konzentrationen von Influenza Virus RNA im Zellkulturüberstand der FHM-Zellen an den Tagen 0, 2 und 8 nach Infektion mit dem humanen H3N2-Virusisolat, unverdünnt und 1:10 verdünnt.

Titration auf embryonierten Hühnereiern

Dieser Versuch wurde lediglich mit den FHM-Zellen durchgeführt. Am Vortag eingesäte Zellkulturschälchen wurden mit LPAI H5N1-Virus (Titer auf MDCK-Zellen: $10^{6,5}$ KID₅₀/ml) infiziert und anschließend an Tag 0, 2 und 4 beprobt. Der Zellkulturüberstand wurde in einer 10er Verdünnungsreihe auf 9-11 Tage alte embryonierte Hühnereier bis zu einer Verdünnung von 10^{-5} mit je einer Wiederholung pro Verdünnungsstufe (außer Tag 4 aufgrund mangelnder embryonierter Hühnereier) titriert. Die Eier wurden bei 37 °C inkubiert, täglich durchleuchtet und an Tag 4 post infectionem kalt gestellt. Nach Ernte der Allantoisflüssigkeit wurde zum Nachweis einer potentiellen Virusvermehrung ein Hämagglutinationstest durchgeführt. Zellkulturüberstand ohne Viruskontakt wurde als Negativkontrolle ebenfalls auf embryonierten Hühnereiern titriert.

An allen 3 Probenentnahmetagen verhielten sich die Negativkontrollen erwartungsgemäß: keiner der Embryonen war vorzeitig abgestorben oder im Hämagglutinationstest positiv. Anhand der Ergebnisse der FHM-Zellen (Abb. 4.37) ist erkennbar, dass die Titer an den drei Versuchstagen nur um maximal eine Zehnerpotenz anstiegen. An Tag 2 kam es zu einer geringgradigen

Zunahme über das Niveau von Tag 0. An Tag 4 jedoch fiel der Titer unter den von Tag 2 ab. Insgesamt konnte im Rahmen der Eititration kein eindeutiger Beweis für eine Virusvermehrung in den Zellkulturen erbracht werden.

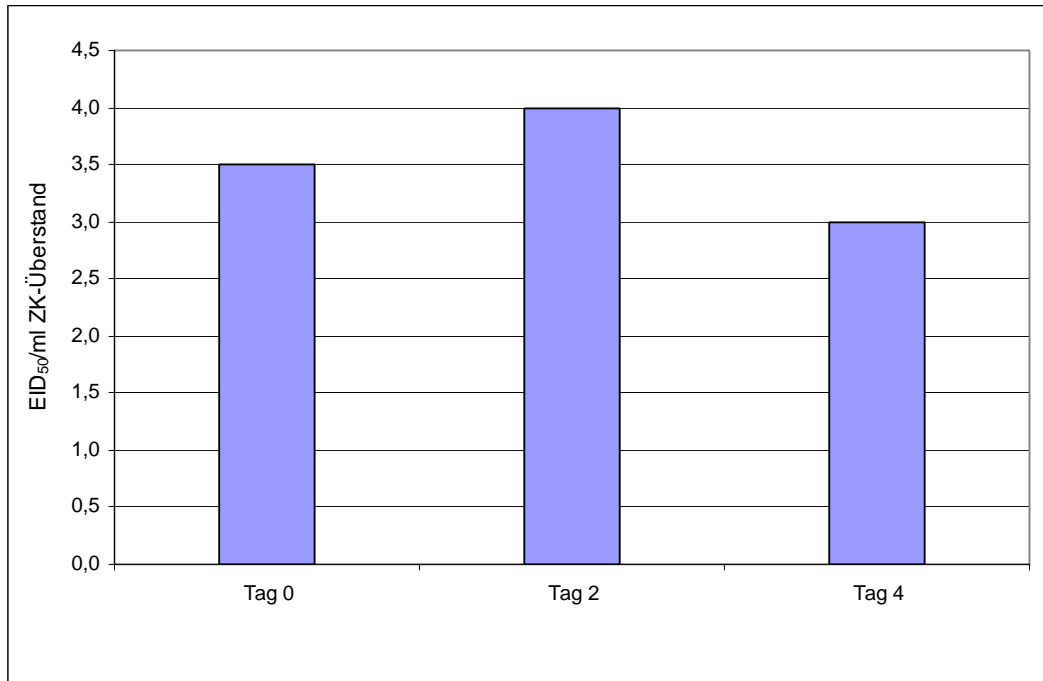


Abb. 4.37: Ergebnisse der Eititration vom Zellkulturüberstand der FHM-Zellen, 0, 2 und 4 Tage p.i. mit einem LPAI H5N1-Virusisolat

5. DISKUSSION

5.1. Influenzaviren bei wechselwarmen Tieren

5.1.1. Feldproben

5.1.1.1. Spikeversuch

Die Frage, ob inhibitorische Substanzen in den Fischproben den Nachweis von Virusmaterial beeinträchtigen und damit zu falsch-negativen Ergebnissen führen wurde mit Hilfe der Spikeversuche geklärt. Da bei Elution in Tupfermedium eine höhere Viruskonzentration für eine erfolgreiche Detektion erforderlich war, wurde im Rahmen der Untersuchungen das Probenmedium auf *RNAlater*TM RNA Stabilization Reagent umgestellt. Es konnte gezeigt werden, dass maximal mit einer 10er Potenz Nachweisverlust im Vergleich zu Ansätzen ohne Fischmaterial zu rechnen ist. Von Bedeutung ist außerdem, dass in den Kiemen- und Schuppenproben bei Elution mittels *RNAlater*TM RNA Stabilization Reagent eine größere Virusmenge im Probenmaterial erforderlich war als in den Tupferproben, um in der RRT-PCR als positiv gewertet werden zu können. Generell können Verunreinigungen in biologischen Proben wie Polysaccharide oder polyphenolische Substanzen die Sensitivität und Spezifität der PCR reduzieren oder inhibieren (MONTEIRO et al., 1997). Dennoch kann ein Spikeversuch nicht mit Originalproben gleichgesetzt werden: das Virus wurde vor der RNA-Isolation der Flüssigkeit zugegeben. Der Isolationsschritt mittels Ultraschall aus dem Gewebe bzw. den Tupfern entfällt und konnte somit nicht evaluiert werden. Dennoch ist davon auszugehen, dass bei einer ausreichend hohen Virusbelastung ein Nachweis viraler RNA in den Fischen möglich gewesen wäre.

5.1.1.2. Untersuchung der Kiemen- und Schuppenproben sowie der Rachen- und Kloakentupfer von Bodenseefischen mittels qRRT-PCR

Das Wirtsspektrum der Influenzaviren ist sehr breit und in vielen Fällen noch nicht vollständig bekannt. Die Übertragung aviärer Influenzaviren steht häufig im Zusammenhang mit Oberflächengewässern (LIU, 2005). Wasservögel gelten als die natürlichen Reservoirs der Viren. Es wäre denkbar, dass die Viren über den Vogelkot oder über Tierkadaver ins Wasser gelangen und dort von Fischen direkt oder über Futtertiere aufgenommen werden (FLI und BfR, 2006b). Einige der virustragenden Vögel, die im Laufe des Jahres 2006 in Mecklenburg-Vorpommern gefunden wurden, waren Fischfresser, wie Möwenvögel (FLI, 2006a). Bis heute liegen keine Quellen über Infektionsversuche von Fischen mit Influenzaviren vor. Es ist allerdings schon lange bekannt, dass Influenzaviren im Labor an eine Vermehrung bei kälteren Temperaturen (cold adapted, ca) angepasst werden können (MAASAB, 1967) und damit theoretisch auch eine Vermehrung in wechselwarmen Tieren denkbar wäre.

Bei den innerhalb des Jahres 2007 gesammelten 440 Proben von 114 Fischen aus dem Bodensee konnten molekularbiologisch keine Influenzaviren nachgewiesen werden. Der letzte Fund von HPAI-positiven Wildtieren in Baden-Württemberg fand nach Angaben des FLI am 04.04.2006 statt (FLI, 2007a). Da mit der Beprobung der Fische erst ein Jahr später begonnen wurde, ist denkbar, dass die Belastung des Wassers und somit auch die der Fische mit hoch-pathogenem Virusmaterial als extrem gering einzustufen ist. Dennoch gab es sporadische Funde von niedrig-pathogenen Influenzaviren am Bodensee. In der Sentinelanlage in Möggingen kam es zwischen Juli und August 2007 zu einem deutlichen Anstieg virusausscheidender Sentineltiere. Weitere Peaks folgten im Oktober und November desselben Jahres (GLOBIG et al., 2008). Dennoch konnte in den eigenen Proben der Monate Oktober und November (Langenargen: 09.10. und 06.11.07 sowie Insel Reichenau 23.10.07) kein Influenzavirus nachgewiesen werden. Da bisher unbe-

kannt ist, ob und wie das Virus in Fischen angereichert wird, erfolgte die Wahl der untersuchten Organe im Rahmen der vorliegenden Arbeit in Anlehnung an die Diagnostik der Aviären Influenza bei Wildvögeln (OIE, 2005). Es wurden neben Rachen- und Kloakentupfern Kiemen- und Schuppenproben als Untersuchungsmaterial gewählt, um eine minimal invasive Probenentnahme, die theoretisch auch am lebenden Tier möglich wäre, zu garantieren. Dennoch muss davon ausgegangen werden, dass eine potentielle Virusanreicherung nicht bei jeder Tierart in gleichem Maße in den analogen Organen stattfindet. Die Beprobung weiterer Organe war unter den gegebenen Voraussetzungen nicht möglich und bleibt anderen Untersuchungen vorbehalten. Um die epidemiologische Bedeutung von Fischen als wichtige Nahrungsgrundlage für Vögel und deren Rolle bei der Verbreitung der Aviären Influenza endgültig klären zu können, müssen Untersuchungen in Gebieten mit hoher AIV-Kontamination oder gar im Rahmen eines Tierversuches unter Laborbedingungen durchgeführt werden. Die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Methoden könnten gegebenenfalls Verwendung finden.

5.1.1.3. Untersuchung der Fisch- und Schildkrötenseren mittels Hämagglutinations-Hemmungstest (HAH-Test) und Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Die Untersuchung auf Antikörper gegen Influenzaviren bei wechselwarmen Tieren wurde bereits von MANCINI et al. mit Schlangen- und Froschseren durchgeführt. Manche dieser Seren erwiesen sich im HAH-Test als positiv (MANCINI et al., 2004). Da eine phylogenetisch engere Beziehung zwischen Reptilien und Vögeln als beispielsweise zwischen Vögeln und Säugetieren besteht (HEDGES, 1994), ist die Untersuchung von Schildkrötenseren im Rahmen der vorliegenden Arbeit als eine Ergänzung zur Beprobung des Fischblutes anzusehen. Obwohl 65,5 % der Fischseren und 22 % der Schildkrötenseren aus Großbritannien im HAH-Test positiv waren, konnten in keinem Fall die Ergebnisse mit Hilfe des ELISA-Tests verifiziert werden.

Obwohl der HAH-Test eine zeit- und arbeitsintensive Untersuchungsmethode ist (VAN ZYL, 2006), hat er nach wie vor eine große Bedeutung in der serologischen Diagnostik. Der Test hat den Vorteil, dass eine Unterscheidung zwischen verschiedenen Subtypen möglich ist und die Sensitivität zudem höher ist als bei einigen anderen serologischen Methoden wie der Komplementfixation oder dem ELISA (JULKUNEN et al., 1985; ZARKOV, 2006). Andererseits besteht aufgrund der Vielfalt an Subtypen das Risiko in der Routinediagnostik nicht alle Infektionen als solche erfassen zu können und damit falsch negative Ergebnisse zu erzielen (OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES, 1996).

Neben der Diagnostik im Vogel- und Säugetierbereich kommt der HAH-Test auch bei poikilothermen Spezies zum Einsatz. Es gibt Berichte über den serologischen Nachweis von Antikörpern gegen Paramyxoviren bei Schlangen (JACOBSON und ORIGGI, 2002; MARSCHANG et al., 2002) oder Orthomyxoviren (Infectious Salmon Anemia) bei Fischen (KIBENGE et al., 2002). Obwohl inzwischen in der Reptiliendiagnostik auch ELISA eingesetzt werden (JACOBSON und ORIGGI, 2002), gilt der HAH-Test nach wie vor als Methode der Wahl zum Nachweis von Antikörpern gegen hämagglutinierende Viren bei wechselwarmen Tieren (JACOBSON et al., 1981).

Parallel zum HAH-Test wurde in der vorliegenden Arbeit ein Subtyp-unabhängiger ELISA, der für verschiedene Vogelspezies wie Hühner, Truthühner, Enten, Gänse und Sträüße validiert wurde, durchgeführt (IDEXX, 2008). Er funktioniert unabhängig von der Struktur der zu testenden Antikörper. Dennoch gibt es bisher keine Untersuchungen zur Testverwendung mit Seren wechselwarmer Tiere. Blutproben von Fischen und Schildkröten - auch solche, die im HAH-Test ein als positiv anzunehmendes Ergebnis erzielten - wurden im ELISA negativ getestet.

Obwohl es evolutionsgeschichtliche Unterschiede im Immunsystem von Fischen, Sauropsiden und Säugern gibt, sind Strukturhomologien deutlich erkennbar: Das Immunglobulin M (IgM) ist das entwicklungsgeschichtlich älteste Immunglobulin und wird sowohl bei Knochen- als auch bei Knorpelfischen gefunden. Fisch-Antikörper zeigen eine effektive Agglutination. Nicht alle An-

tigene sind jedoch wirksame Immunogene in Fischen. Während gelöste Proteine kaum immunogen wirksam sind, rufen Bakterienantigene oder Fremderythrozyten eine starke Immunantwort hervor (TIZARD, 2008). Bei Reptilien kommen die Immunglobulinklassen IgM und IgY vor. IgM von Schildkröten sind mit denen von Säugetieren in Größe und Struktur vergleichbar. Die Immunantwort bei poikilothermen Tieren ist temperaturabhängig (AMBROSIUS, 1976); so wird die Antikörperproduktion bei niedrigen Temperaturen inhibiert (AVTALION et al., 1976).

Im Hühnerserum ist IgY das vorherrschende Immunglobulin. Obwohl dieses dem Säugetier IgG ähnlich ist, gibt es deutliche molekulare Unterschiede zwischen beiden Molekülen, die eine andere Bezeichnung rechtfertigen (TIZARD, 2008).

Durch die Agglutination von Fisch-Antikörpern mit dem eingesetzten Hühnerblut könnte es theoretisch zu falsch negativen Ergebnissen im HAH-Test kommen. Andererseits ist aus Untersuchungen von Humanseren mit Anti-Rubellavirus-Antikörpern bekannt, dass unspezifische Inhibitoren wie z.B. bakterielle Agglutinine oder Ionen (z.B. Chloride) in der Lage sind, niedrige falsch positive Titer im HAH-Test zu produzieren (CAMPBELL et al., 1976; BUDZKO et al., 1981). Trotz der Hitzebehandlung der Seren im Rahmen des Inaktivierungsschrittes können solche unspezifisch agglutinierenden Substanzen in der vorliegenden Arbeit nicht völlig ausgeschlossen werden.

In dem in dieser Arbeit beschriebenen Versuchsansatz stellt sich die Problematik, dass keine Seren von sicher positiven bzw. negativen Fischen bzw. Reptilien zur Verfügung standen. Die Frage, ob Fische und/oder Schildkröten in der Lage sind, Antikörper gegen aviäre Inflenzaviren zu bilden, konnte nicht abschließend geklärt werden. Poikilotherme Tiere können und dürfen bei der Untersuchung der Übertragungswege der Aviären Influenza nicht vollständig ausgeschlossen werden. Für weitere Untersuchungen wäre es auch hier wünschenswert im Rahmen gezielter Infektion wechselwarmer Tiere Positiv- und Negativkontrollen zu gewinnen sowie weitere Proben von Tieren aus Regionen mit hoher Viruslast zu untersuchen.

5.1.2. Zellkulturversuche

Im Rahmen der Zellkulturversuche sollte in Ergänzung zu den serologischen Untersuchungen die potentielle Vermehrungsfähigkeit von Influenzaviren in Gewebe von Fischen und Reptilien untersucht werden. Bisher gibt es kaum Berichte über die Anzucht von Influenzaviren auf Zellen poikilothermer Tiere. Im Jahre 1988 gelang es GABLIKS Influenzaviren auf Goldfischzellen anzuzüchten (GABLIKS, 1988). Damals wurde der Beweis einer potentiellen Virusvermehrung mittels eines ZPEs und eines Hämagglutinationstests erbracht. Im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass bei zwei verschiedenen Fisch- und drei verschiedenen Reptilienzelllinien nach Infektion mit LPAI Viren lichtmikroskopisch ein ZPE zu erkennen war. Durch die Virusinfektion in den Zellen kommt es zu degenerativen Prozessen wie Anschwellen oder Schrumpfen, Abrunden der Zellen, Synzytienbildung oder komplette Ablösung des Monolayers (LELAND und GINOCCHIO, 2007). Die Gesamtheit dieser Veränderungen wird als zytopathischer Effekt (ZPE) des Virus bezeichnet. Das Problem ist, dass weniger dramatische Veränderungen im Zellrasen nur schwer als ZPE erkennbar sind (LELAND und GINOCCHIO, 2007), und dass zum anderen die Veränderung und Zerstörung von Zellen durch verschiedenste Kontaminanten und toxische Substanzen ausgelöst werden kann. Somit ist ein Nachweis potentieller Virusvermehrung in Zellen nicht ausschließlich auf Basis eines ZPE möglich. Allgemein können Zellkulturen mit physikalischen, chemischen und/oder biologischen Komponenten aus der Umwelt kontaminiert werden (LINCOLN und GABRIDGE, 1998). Vor allem toxische Kontaminationen können lichtmikroskopisch ein ähnliches Bild hervorrufen. Zur Infektion der Zellen wurde virus-haltige Allantoisflüssigkeit mit den Hauptbestandteilen Harnstoff, Ammoniak und Harnsäure (BAGOTT, 2001) auf den Monolayer gegeben. Parallelansätze mit reiner Allantoisflüssigkeit ohne Virus verursachten jedoch in der vorliegenden Arbeit keine Veränderungen des Zellrasens. Durch die Kombination mit weiteren Untersuchungsmethoden wie qRRT-PCR oder Hühnereitritration wurden die Ergebnisse der lichtmikroskopischen Untersuchungen untermauert. Es konnte in den Überständen aller Zelllinien ein deutlicher An-

stieg der Kopienzahl viraler RNA (etwa zwei bis drei Zehnerpotenzen) im Laufe des Versuches nachgewiesen werden. Dies deutet auf eine Virusvermehrung in der Zellkultur hin. Allerdings war im Rahmen der Eititration keine Passagierung des Virus möglich. Das heißt, es fand zwar eine Zunahme des Virusmaterials in den Zellen wechselwarmer Tiere statt, eine weitere Übertragung auf embryonierte Hühnereier war jedoch nicht möglich. Insgesamt sind Influenzaviren schwer *in vitro* anzuzüchten: die Viren sind beispielsweise nicht in der Lage, sich in Fibroblasten der Lunge, des Herzens, der Skelettmuskulatur oder des Korneagewebes zu vermehren – außer es handelt sich um primäre Zellkulturen von Lunge und Kornea (STUHLBERG und SCHAPIRA, 1953). Laut STUHLBERG und SCHAPIRA (1953) haben die Zellen möglicherweise ihre Fähigkeit zur Virusvermehrung durch die Kultivierung verloren. Auch sind verschiedene Gewebetypen im Körper unterschiedlich empfänglich für die Viren. Nach GAMBARYAN et al. (1999) unterscheiden sich alle an Eikultur adaptierte Varianten humaner Influenzaviren von nicht-adaptierten Stämmen in ihrer verbesserten Fähigkeit die Plasmamembran und die Ganglioside der Chorioallantoiszellen zu binden. Durch Passagierung in verschiedenen Zelllinien können sich die Fähigkeiten zur Bindung an verschiedene Membranen verändern. Zu bedenken gilt es auch, dass nicht bei allen an der Zelloberfläche angelagerten Viren es zur Penetration in die Zellen kommt. Im Gegensatz zum pH-Wert spielt die Temperatur für die Anlagerung keine entscheidende Rolle (für die spätere Penetration allerdings schon) (HAHON, 1972).

Insgesamt gaben die Zellkulturversuche erste Hinweise auf eine mögliche Vermehrung von Influenzaviren in Zellen wechselwarmer Tiere. Inwieweit eine Vermehrung aviärer Influenzaviren in lebenden Reptilien und Fischen möglich ist, müsste auch in diesem Fall in einem Tierversuch geklärt werden.

5.2. Laborversuche mit Dreikantmuscheln

5.2.1. Spikeversuche

Allgemein gilt es als schwierig, gute Nachweis- und Extraktionsmethoden für Viren aus Muschelmaterial zu finden (SHIEH et al., 1999; SELLWOOD, 2008). In der Literatur wird oft darauf hingewiesen, dass Muscheln viele Substanzen enthalten, die zur Inhibition der PCR führen können (SCHRÖTER-BOBSIN, 2005). Die Untersuchung von Feldproben unterscheidet sich deutlich von den in dieser Arbeit beschriebenen Kontaminationsversuchen: Die meisten der publizierten Extraktionsmethoden sind für eine andere Zielsetzung konzipiert. Teilweise sind die Protokolle auf ein größeres Muschelgewicht oder einen anderen Muschelaufbau ausgelegt. Bei lebensmittelhygienischen Untersuchungen der Muscheln werden meist einige Tierkörper gepoolt. Teilweise geht auch ein Präparationsschritt voraus, um nur z.B. bestimmte Teile des Verdauungstrakts zu untersuchen. In den vorliegenden Experimenten stand die Einzeltieruntersuchung im Vordergrund. Aufgrund der geringen Größe der Dreikantmuscheln war keine Präparation einzelner Körperteile möglich. Die verwendeten QIAshredder™ tubes sind auf Untersuchung kleinster Mengen tierischen Gewebes ausgelegt. Gerätschaften zur Zerkleinerung von Gewebe werden mittels Zentrifugation des Probenmaterials durch eine spezielle Membran in den QIAshredder™ tubes ersetzt.

Die Sensitivität der entwickelten Methode zum Nachweis von Inflenzaviren in Muscheln wurde im Rahmen von Spikeversuchen getestet und evaluiert. Es konnte gezeigt werden, dass Substanzen aus dem Muschelfleisch die Detektion mittels qRRT-PCR kaum beeinträchtigten. In den Kontaminationsversuchen konnten allerdings vereinzelt Inhibitionen der qRRT-PCR festgestellt werden. Bei einem negativen Ergebnis wurde deshalb die qRRT-PCR mit einer 1:10 Verdünnung des Probenmaterials wiederholt und die ermittelten Kopienzahlen entsprechend umgerechnet.

5.2.2. Kontamination von Dreikantmuscheln mit aviären Influenzaviren

Obwohl Muscheln schon oft als Träger verschiedener humanpathogener Viren fungiert haben, ist unbekannt, inwiefern Dreikantmuscheln (*Dreissena polymorpha*) Orthomyxoviren akkumulieren können. Ziel dieser Arbeit war es, einen Beitrag zur Epidemiologie der Influenzaviren – insbesondere im aquatischen Ökosystem des Bodensees – zu leisten. Dreikantmuscheln dienen einer großen Zahl an Vögeln als Nahrungsgrundlage. Nach Auskunft von Herrn Dr. Wolfgang Fiedler, Max-Planck-Institut für Ornithologie, Vogelwarte Radolfzell (mündliche Mitteilung) ernährt sich am Bodensee hauptsächlich das Blässhuhn (*Fulica atra*), die Reiherente (*Aythya fuligula*) und die Tafelente (*Aythya ferina*) von Dreikantmuscheln. Um mindestens den Faktor 10 geringer in der Bedeutung sind Möwen (Weißkopf- (*Larus cachinnans*) und Sturmmöwe (*Larus canus*)), die als Kleptoparasiten tätig werden und etwa zehn weitere Wasservogelarten, die entweder in nur sehr geringer Zahl am Bodensee vorkommen (Samtente (*Melanitta fusca*), Trauerente (*Melanitta nigra*), Eiderente (*Somateria mollissima*)) oder bei denen die Dreikantmuschel nur einen kleinen Anteil im Nahrungsspektrum ausmacht (z.B. Stockente (*Anas platyrhynchos*)). Völlig unklar ist die Bedeutung des Verzehrs von Jungmuscheln an Pflanzen durch Pflanzenfresser wie die Kolbenente (*Netta rufina*). Im Rahmen des Ausbruchs der Aviären Influenza (Subtyp H5N1) am Bodensee im Jahre 2006 waren auch Reiher- und Tafelenten in Deutschland sowie ein Blässhuhn in der Schweiz unter den betroffenen Tierarten (FLI, 2006c; BVET, 2006). Betrachtet man die niedrig-pathogenen Influenzaviren, so konnten bei den Entenartigen nicht nur am häufigsten Influenzaviren isoliert werden, sie wiesen in den Proben auch das größte Spektrum an Subtypen auf (KALETA et al., 2005; SÜSS et al., 1994). Dreikantmuscheln gehören somit in das Nahrungsspektrum empfänglicher Vogelarten. Durch den Prädationsdruck - vor allem der überwinternden Wasservögel - wird der Bestand der Dreikantmuscheln stark beeinflusst (WERNER, 2004). Umgekehrt bedeutet dies, dass dort, wo ausreichend Dreikantmuscheln vorhanden sind,

auch ein Anziehungspunkt für (potenziell Virus tragende) Vögel geschaffen wird.

Um die Rolle der Dreikantmuscheln bei der Übertragung der Aviären Influenza näher zu beleuchten, wurden insgesamt sechs Vorversuche mit zwei verschiedenen Virusisolaten sowie drei Kontaminationshauptversuche durchgeführt. Bis auf wenige Ausnahmen war die Zahl viraler RNA-Kopien pro g in den Dreikantmuscheln stets höher als die Menge an Kopien pro ml im Umgebungswasser. Die Ergebnisse der Versuche deuten darauf hin, dass Dreikantmuscheln durchaus in der Lage sind, das Virus aufzunehmen und auch längere Zeit in sich zu tragen bzw. nach Kontamination an das umgebende Wasser wieder abzugeben. Dennoch nahm die Menge an Virus in den Dreikantmuscheln während der Versuche nicht zu. Vermutlich kam es zu keiner Virusreplikation. Muscheln akkumulieren Viren passiv (partikelgebunden) (MUNIAIN-MUJIKA et al., 2002). Aus Studien mit Enteroviren weiß man, dass die Virusaufnahme in Muscheln reversibel erfolgt (DI GIROLAMO, 1977). Die Bindung der Viren an den Mukus ist vergleichbar mit dem ersten Infektionsschritt im Körper: es kommt auch dort zuerst nur zu einer reversiblen Anlagerung der Viren mittels Ionenbindung an die Membran der Wirtszelle (DI GIROLAMO, 1977). Andererseits hängt auch die Ausscheidung von akkumuliertem Material von der Viruspezies ab: zum Beispiel eliminieren Miesmuscheln Hepatitisviren schneller als Coliphagen (Lee et al., 2003).

In den meisten Versuchen (außer im zweiten Hauptversuch) gab es im Rahmen der einfaktoriellen Varianzanalyse einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den Muschelwerten der einzelnen Versuchstage. An Tag 2 nach direkter Entnahme aus dem virushaltigen Wasser waren die Zahlen in der Regel am höchsten. Zum Tag 16 hin gingen die Werte deutlich zurück. Interessanter Weise zeigten die Zahlen an den Tagen dazwischen meist einen wellenförmigen Verlauf. Das heißt, es kam immer wieder zu einer Aufnahme und einer Abgabe des Virus an das Wasser. Dementsprechend nahmen die Kopienzahlen im Reinwasser nach Überführung der Muscheln schnell zu. Dennoch waren die Werte in den Muscheln in der Regel höher als

im Wasser. Aus Untersuchungen von NAZIR et al. (2009) ist bekannt, dass das LPAI H5N1-Virus ($10^{4,5}$ TCID₅₀/ml), welches auch in den hier beschriebenen Versuchen Verwendung fand, bei 20 °C sechs Tage, bei 10 °C 21 Tage und bei 0 °C 112 Tage in Bodenseewasser überleben kann (NAZIR et al., 2009).

Aus Versuchen mit anderen Muschelspezies weiß man, dass ein Großteil der aufgenommenen Viren im Verdauungstrakt lokalisiert sind. Nach zunehmender Expositionszeit kommt es zur Verteilung der Viren in Gewebe außerhalb des Verdauungsapparates (LEE et al., 2003). Nach Kontamination wird unter günstigen Bedingungen im frischen Wasser während des normalen Filtrations- und Ausscheidungsprozesses der Großteil der Mikroorganismen wieder ausgeschieden. Wenn allerdings die Viren bereits in andere Gewebe verteilt sind, sind sie vom Filtrationsprozess nicht beeinflusst und bleiben über längere Zeit im Gewebe akkumuliert (LEE et al., 2003). Dies wäre eine mögliche Erklärung dafür, dass bei 4 °C bis zum Tag 16 Virusmaterial in den Muscheln nachgewiesen werden konnte. Weiterhin gilt es zu bedenken, dass Dreikantmuscheln in ihrer Eigenschaft als Filtrierer eine hohe Rate an Wasser aufnehmen und auch wieder an das Umgebungswasser abgeben. Legt man eine mittlere Filtrationsrate von 16,2 ml/mg/h (FANSLOW et al., 1995) zugrunde, bedeutet dies, dass die Muscheln in den Kontaminationsversuchen in 2,4 Sekunden die gesamten 300 ml filtrieren können. Es ist denkbar, dass parallel dazu ein Gleichgewicht zwischen Virusaufnahme und -abgabe entsteht. Aus den Studien von FAUST et al. (2009) weiß man, dass auch andere Muschelspezies (*Corbicula fluminea*) in der Lage sind, Influenzaviren aus dem Umgebungswasser - sogar bis zur vollständigen Elimination - zu akkumulieren (FAUST et al., 2009). Fraglich bleibt allerdings, ob es sich hierbei um einen reinen Anlagerung an die Zellen oder aber um eine tatsächliche Infektion handelt. Hierfür bedarf es weiterer Untersuchungen, insbesondere unter Zuhilfenahme immunhistochemischer Methoden.

Die Temperatur scheint bei der Akkumulation von Influenzaviren in Dreikantmuscheln nur eine untergeordnete Rolle zu spielen. Im Rahmen der Ver-

suche konnte kein statistisch signifikanter Unterschied in Bezug auf die Temperatur festgestellt werden. Aus Versuchen mit Austern weiß man, dass die Abgabe von Mikroorganismen nach Kontamination bei höheren Temperaturen schneller verläuft (POMMEPUY et al., 2002). Die Aufnahme von Viren durch Muscheln hängt neben der Muschelspezies vom jeweiligen Virus, aber auch von Umweltbedingungen wie pH-Wert, Salzgehalt, Wassertrübung und Temperatur ab. Die Wassertemperatur spielt nach LEE et al. (2003) eine wichtige Rolle bei der Virusaufnahme durch Muscheln, da sie wesentlich die metabolische Aktivität der Tiere bestimmt; so ist bei Austern die Virusaufnahme unter 7 °C reduziert. Dies konnte allerdings in den vorliegenden Versuchen mit Dreikantmuscheln nicht bestätigt werden. Nach NOORDHUIS et al. (1992) wird die Filtrationsrate der Dreikantmuscheln kaum beeinflusst von Temperaturen zwischen 5 - 20 °C. Im Gegensatz dazu beeinflussen hohe Temperaturen die Überlebensrate der Muscheln. Die Muscheln wurden für jeden Versuch frisch aus dem Bodensee entnommen. Der zweite Hauptversuch wurde in den Sommermonaten durchgeführt. Die Qualität und Lebensfähigkeit der Muscheln war bereits zu Versuchsbeginn eingeschränkt. Obwohl ein Großteil der Tiere bei 4 °C augenscheinlich bis Tag 16 überlebten, kam es schon früh zu vereinzelt Todesfällen während der Inkubationsphase. Eine Erklärung für den mangelnden Nachweis in embryonierten Hühneriern im zweiten Hauptversuch könnte die Tatsache sein, dass toxische Stoffwechselprodukte, die durch das Absterben der Muscheln entstanden waren, die Vermehrung der Viren im Ei hemmten. Andererseits werden in der Literatur aber auch Zusammenhänge zwischen der Mukusproduktion und der Virusakkumulation in Muscheln beschrieben: Viruspartikel binden an Sulfatradikale der Mukopolysaccharide durch Ionenbindung und werden im Anschluss durch die Muscheln aufgenommen (DI GIROLAMO, 1977). Die Menge der Mukusproduktion ist vom Glykogengehalt des Bindegewebes abhängig (BURKHARDT und CALCI, 2000). Der Glykogengehalt ist z.B. bei Austern zwischen November und März am höchsten, so dass in diesem Zeitraum seitens der Muscheln von einer höheren Virenaufnahme ausgegangen werden kann (SCHRÖTER-BOBSIN, 2005). Auf den zweiten Hauptversuch

übertragen würde dies bedeuten, dass bei im Sommer aus dem Bodensee entnommenen Tieren die Mukusproduktion und deshalb die Virusaufnahme niedriger ist. Die nur kurze Adaptionsphase an die Temperaturen während der Kontaminationsversuche reichte möglicherweise nicht aus um die Mukusproduktion ausreichend zu erhöhen. Allgemein ist die Thermoadaptation der Muscheln abhängig von der ursprünglichen Hälterungstemperatur. So werden ausgehend von Temperaturen unter 20 °C nur bis zu 38 °C als Temperaturmaximum von den Muscheln toleriert; bei 30 °C ist jedoch eine Akzeptanz von bis zu 43 °C möglich (MCMAHON und USSERY, 1995). Die Akklimatisation der Dreikantmuscheln an warme Temperaturen erfolgt deutlich schneller als die an kalte Bedingungen (ANONYM, 1993b). Der Sauerstoffverbrauch der Muscheln ist bei höheren Temperaturen niedriger als in einer kalten Umgebung. Die Muscheln brauchen bei einer Überführung von 18 °C in eine Wassertemperatur von 8 °C 21 Tage um ihre Respirationsrate entsprechend zu erhöhen (ANONYM, 1993b). Das heißt, erst zu diesem Zeitpunkt kann von einer vollständigen Anpassung ausgegangen werden.

Nachdem in den Vorversuchen die Virustitration von Probenmaterial auf MDCK-Zellen nicht erfolgreich war, wurden in den Hauptversuchen die Wasser- und Muschelproben auf embryonierten Hühnereiern titriert. Die Sensitivität von embryonierten Hühnereiern gegenüber den verwendeten LPAI Stämmen ist deutlich höher als die der MDCK-Zelltitration (SUGIMURA et al., 2000). Auch aus Experimenten von TRAN (2008) ist bekannt, dass beim Nachweis von LPAI Viren embryonierte Hühnereier sogar noch sensitiver als eine qRRT-PCR oder die MDCK-Zelltitration sind.

Bei Überführung der Muscheln in Reinwasser und vor jeder Beprobung wurden die Tierkörper in Milli-Q® Wasser gespült. In den Vorversuchen wurde zusätzlich in Anlehnung an die Versuche von SKÅR und MORTENSEN (2007) ein Desinfektionsmittel eingesetzt. Im Rahmen von Desinfektionsmittelprüfungen zeigte die Virkon®-Lösung jedoch keine befriedigende Viruzidie (persönliche Mitteilung, BÖHM, 2008). Deshalb wurde zusätzlich das Desinfektionsmittel Venno® Vet 1 Super in den Vorversuchen eingesetzt. Es konn-

te kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Vorversuchen mit und ohne Desinfektionsmittel festgestellt werden (Ausnahme LPAI H5N1 mit 1 %iger Virkonlösung). Um im Rahmen der Virustitration auf Eikultur eine toxische Kontamination durch Desinfektionsmittelrückstände zu verhindern, wurde in den Hauptversuchen auf eine Desinfektion der Muscheloberfläche verzichtet.

Neben der direkten fäkal-oralen Übertragung von Tier zu Tier können Vögel durch Virionen, die lange in der Umwelt persistierten, infiziert werden (BREBAN et al., 2009). Vor allem dem Wasser kommt hierbei eine tragende Rolle zu. Es ist das Bindeglied zwischen Wassergeflügel und Umwelt (BROWN et al., 2007). Das Wasser agiert hierbei als Übertragungs-, Transport- und Verdünnungsmedium. Den Dreikantmuscheln als limnologische Spezies kommt eine bedeutende Rolle im aquatischen Ökosystem zu. Im Rahmen der Nahrungskette könnte das Virus aus dem Wasser in den Muscheln akkumuliert und dort über längere Zeit gespeichert werden. Ob die Dreikantmuscheln hierbei als Virusträger oder lediglich als mechanische Vektoren agieren, kann anhand der vorliegenden Arbeit nicht vollständig geklärt werden und muss mit weiterführenden Methoden (z.B. Immunhistochemie) untersucht werden. Wasservögel, die sich von Muscheln ernähren, könnten lange nach der Kontamination des Wassers noch infiziert werden. Die Untersuchungen deuten darauf hin, dass Dreikantmuscheln in der Lage sind, aviäre Inflenzaviren aus dem Wasser zu filtrieren. Dies steht im Einklang mit der Literatur über einschlägige Untersuchungen anderer Muschelspezies. So nehmen Körbchenmuscheln (*Corbicula fluminea*) LPAI Viren aus dem Wasser auf; allerdings ohne im angeschlossenen Tierversuch selbst infektiös zu sein. Sie agieren vielmehr als „Neutralisator“ und reduzieren die Viruslast im Wasser (FAUST et al., 2009). Ob ein solches Phänomen bei Dreikantmuscheln möglich ist, muss in einem ähnlich gelagerten Tierversuch überprüft werden. Die Tatsache, dass das Muschelmaterial - im Gegensatz zu den Versuchen von FAUST et al. (2009) - nach Kontamination in der Virustitration auf Hühnereiern ähnlich hohe Ergebnisse wie in der qRRT-PCR erzielte, spricht gegen diese Hypothese. Vielmehr muss - solange weiterführende Untersuchungen

fehlen - aus epidemiologischer Sicht anhand der Versuchsergebnisse davon ausgegangen werden, dass Dreikantmuscheln eine Rolle bei der Verbreitung von aviären Inflenzaviren in der Umwelt spielen können.

Poikilotherme Tiere und Muscheln können und dürfen bei der Untersuchung der Übertragungswege der Aviären Influenza nicht vollständig ausgeschlossen werden. Weitere Versuche, insbesondere die gezielte Infektion von wechselwarmen Tieren unter Laborbedingungen, wären notwendig, um deren genaue epidemiologische Bedeutung zu evaluieren.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, einen Beitrag zur Abklärung epidemiologischer Zusammenhänge der Aviären Influenza zu leisten. Hierfür wurden Fische und Dreikantmuscheln (*Dreissena polymorpha*) aus dem Bodensee molekularbiologisch auf das Vorkommen aviärer Influenzaviren untersucht sowie Dreikantmuscheln gezielt unter Laborbedingungen mit niedrig-pathogenen aviären Influenzaviren kontaminiert. Fisch- und Schildkrötenserum wurden auf das Vorhandensein von Antikörpern gegen Influenzaviren hin überprüft und Zellkulturen von Fischen und Reptilien mit verschiedenen niedrig-pathogenen Influenzaviren infiziert.

In der Zeit von April bis November 2007 wurden 440 Proben von insgesamt 114 Fischen verschiedener Spezies aus dem Bodensee gesammelt. Bei 96,5 % der Fische konnten Kiemen- und Schuppenproben sowie Rachen- und Kloakentupfer genommen und molekularbiologisch (RRT-PCR) untersucht werden. Bei 55 (48,2%) Tieren war eine Blutprobenentnahme möglich. Zusätzlich wurden 97 Seren von Landschildkröten untersucht. Diese stammten vorwiegend von Schildkröten der Arten *Testudo graeca* und *T. hermanni* und kamen aus Italien (59 Seren) und Großbritannien (38). Zur Untersuchung der Seren auf Antikörper gegen aviäre Influenzaviren wurde ein Hämagglutinations-Hemmungstest durchgeführt. Folgende Viren kamen hierbei zum Einsatz: A/Muteswan/Germany/R2927/07 (H6N8), A/Teal/Wv632/ Germany/05 (H5N1) und A/Mallard/Wv1732-34/03 (H4N6). In Ergänzung wurde ein ELISA für den Nachweis von anti-Influenzavirus A-Antikörpern mit Hilfe eines kommerziellen Kits durchgeführt.

Dreikantmuscheln dienen Vögeln als Nahrungsgrundlage und sind immer wieder als Bioakkumulator in Erscheinung getreten. Im Rahmen der Kontaminationsversuche wurden Muscheln aus dem Bodensee gesammelt und in Virus-kontaminiertem Wasser (ein H5N1-Isolat, und ein H4N6-Isolat (s.o.)) bei 4 °C und 19 °C gehältert. Anschließend wurden die Tiere in Reinwasser überführt. Beprobungen fanden sofort bzw. nach 1, 3, 5, 8, 14 Tagen in

Reinwasser (d.h. am Versuchstag 3, 5, 7, 10 und 16) statt. Nach Präparation des Fleisches einzelner Muscheln wurde dieses sowie gleichzeitig entnommene Wasserproben mit Hilfe einer qRRT-PCR und einer Titration auf embryonierten Hühnereiern untersucht und statistisch ausgewertet.

Neben den Versuchen mit Fischproben und Muscheln wurden Versuche zur Vermehrung von Influenzaviren auf Zellkulturen verschiedener Tiere durchgeführt. Hierfür wurden drei Reptilienzelllinien (viper heart Zellen (VH2), iguana heart Zellen (IgH-2) und *Terrapene* heart Zellen (TH-1)) sowie die Fischzelllinien adult gilt-head seabream fin tissues (SAF-1), fat head minnow caudal trunk (FHM), epithelioma papulosum cyprini (EPC) und rainbow trout gonadal tissue (RTG2) mit niedrig-pathogenen aviären Influenzaviren (H5N1 und H4N6) sowie einem humanpathogenen Influenzavirus (H3N2-Isolat (A-Wisconsin/67/05-like)) infiziert. Der Nachweis einer potentiellen Infektion der verschiedenen Zelllinien erfolgte mittels eines lichtmikroskopischen Nachweises (ZPE) sowie mittels Immunperoxidasefärbung, qRRT-PCR und Titration auf embryonierten Hühnereiern.

Keine der Tupfer- und Gewebeproben von Bodenseefischen zeigte im Rahmen der molekularbiologischen Untersuchungen (RRT-PCR) ein positives Ergebnis. Im HAH-Test kam es bei 36 von 55 (65,5 %) der Fischseren zu einer Hämagglutinationshemmung gegen mindestens eines der drei eingesetzten aviären Influenza Viren. Eine Untersuchung der Seren im ELISA war aber bei allen Proben negativ; somit konnten mit dieser Methode keine Antikörper gegen Influenzaviren nachgewiesen werden. Keines der 59 Schildkrötserseren aus Italien war im HAH-Test positiv. 13 der 38 (22,0 %) Schildkrötserseren aus Großbritannien waren positiv. In Ergänzung wurden 34 der Seren aus Großbritannien (inkl. der im HAH-Test positiv getesteten Seren) mit Hilfe eines ELISA auf Antikörper gegen aviäre Influenzaviren untersucht. Alle getesteten Seren waren negativ.

Im Rahmen von Kontaminationsversuchen mit zwei verschiedenen Influenzavirusstämmen mit Dreikantmuscheln konnte gezeigt werden, dass die Mu-

scheln in der Lage sind aviäre Influenzaviren aufzunehmen und auch längere Zeit in sich zu tragen: Anhand der dreifaktoriellen Varianzanalyse konnte in den Muschelproben zwischen den Versuchen und auch zwischen den einzelnen Versuchstagen ein statistisch signifikanter Unterschied festgestellt werden ($p < 0,0001$ bzw. $p = 0,0001$). Dabei war die Menge an viraler RNA pro g in den Muscheln meist höher als diejenige gemessen pro ml im Umgebungswasser. An Tag 2 nach direkter Entnahme aus dem virushaltigen Wasser waren die Zahlen in der Regel am höchsten. Zum Tag 16 hin gingen die Werte deutlich zurück. An den Tagen dazwischen kam es immer wieder zu einer Zu- bzw. Abnahme viraler RNA in den Muscheln. Mittels Titration auf embryonierten Hühnereiern konnte aus den Muschelproben in den meisten Fällen vermehrungsfähiges Virus reisoliert werden. Die Temperatur scheint bei der Akkumulation von Influenzaviren in Dreikantmuscheln nur eine untergeordnete Rolle zu spielen. In Bezug auf die Temperatur konnte zwischen den Ansätzen bei 4 °C und 19 °C in allen Versuchen kein signifikanter Unterschied ermittelt werden ($p = 0,9148$).

Bei Versuchen mit den Fischzelllinien EPC und RTG2 und dem LPAI H5N1 Virusisolat gab es bei einer Inkubationstemperatur von 19 °C keine Hinweise auf eine Virusvermehrung. Bei 28 °C zeigten auch die Negativkontrollen Veränderungen, die auf einen ZPE hindeuten könnten. Weitere Versuche wurden deshalb mit den Fischzelllinien SAF und FHM durchgeführt. Diese sind physiologischerweise bei 28 °C inkubierbar. Im Rahmen der Zellkulturversuche war in den Fisch- und Reptilienzelllinien (VH2, IgH-2, TH-1 sowie SAF und FHM bei 28°C) in den virushaltigen Ansätzen (LPAI H5N1 und LPAI H4N6) ein ZPE in Form von Vakuolenbildung, Plaques und/oder Ablösung der Zellen lichtmikroskopisch erkennbar. Die Negativkontrolle sowie die Schälchen mit Allantoisflüssigkeit ohne Virus zeigten einen einheitlichen Zellrasen. Während die Ergebnisse der VH2-, TH1-, SAF- und FHM-Zellen im Immunperoxidasetest nicht eindeutig waren, konnten bei den IgH-2-Zellen deutliche Braunfärbungen einzelner Zellen, welche auf eine potentielle Virusvermehrung hindeuten, erkannt werden. Mit Hilfe der qRRT-PCR konnte ein deutlicher Anstieg viraler RNA im Zellkulturüberstand von Tag 0 zu Tag 2

festgestellt werden. Mittels Titration auf embryonierten Hühnereiern konnte kein eindeutiger Beweis für eine Virusvermehrung in den Zellkulturen erbracht werden. Insgesamt gaben die Zellkulturversuche erste Hinweise auf eine mögliche Vermehrung von Influenzaviren in Zellen wechselwarmer Tiere.

Poikilotherme Tiere und Muscheln können und dürfen bei der Untersuchung der Übertragungswege der Aviären Influenza nicht vollständig ausgeschlossen werden. Weitere Versuche, insbesondere die gezielte Infektion von wechselwarmen Tieren unter Laborbedingungen, wären notwendig, um deren genaue epidemiologische Bedeutung zu evaluieren.

7. SUMMARY

The aim of the present study was to address several questions pertaining to the epidemiology of avian influenza. For this purpose, fish and zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) from Lake Constance were tested for the presence of avian influenza viruses by molecular methods and zebra mussels were contaminated with low-pathogenic avian influenza viruses under laboratory conditions. Sera from fish and tortoises were tested for the prevalence of antibodies against influenza viruses and of fish and reptilian cell lines were infected with different low-pathogenic influenza viruses.

During April and November, 2007, 440 samples from 114 fish of different species were collected from Lake Constance. Gill and scale samples as well as throat and cloacal swabs were collected from 96.5 % of the fish and tested by RRT-PCR. Blood samples were collected from 55 (48.2 %) animals. In addition, sera from 97 tortoises were tested. Most of these originated from tortoises of the species *Testudo graeca* and *T. hermanni* and came from Italy (59 sera) and Great Britain (38). A hemagglutination inhibition test was performed to detect antibodies against avian influenza viruses in the sera. The following viruses were used: A/Muteswan/Germany/R2927/07 (H6N8), A/Teal/Wv632/ Germany/05 (H5N1), and A/Mallard/Wv1732-34/03 (H4N6). In addition, an ELISA for the detection of anti-influenzavirus A antibodies was performed using a commercial kit.

Zebra mussels are an important food resource for birds as well as being important bio-accumulators. In contamination trials, zebra mussels from Lake Constance were collected and kept in virus contaminated water (one H5N1 isolate and one H4N6 isolate (see above)) at 4 °C and 19 °C. Afterwards, the animals were transferred into fresh water. Samples were taken immediately and after 1, 3, 5, 8, 14 days in fresh water (on day 3, 5, 7, 10 and 16 of the trial), respectively. After preparing the meat from different mussels this, as well as the water samples, was tested by means of a qRRT-PCR and titration on embryonated chicken eggs and statistically evaluated.

In addition to the trials with fish samples and zebra mussels, the propagation of influenza viruses in cell lines from different animals was studied. For these

studies, three reptilian cell lines (viper heart cells (VH2), iguana heart cells (IgH-2) und terrapene heart cells (TH-1)) as well as the fish cell lines adult gilt-head seabream fin tissues (SAF-1), fat head minnow caudal trunk (FHM), epithelioma papulosum cyprini (EPC) and rainbow trout gonadal tissue (RTG2) were infected with low-pathogenic avian influenza viruses (H5N1 and H4N6) as well as one human pathogenic influenza virus (H3N2 isolate (A-Wisconsin/67/05-like)). The detection of virus propagation in the different cell lines was performed by light microscopy (CPE) as well as by immunoperoxidase test, qRRT-PCR and titration on embryonated chicken eggs.

None of the swab- and tissue samples from fish from Lake Constance showed a positive result during the molecular biological testing (RRT-PCR). 36 (65.5 %) of the fish sera showed hemagglutination inhibition against at least one of the three avian influenza viruses used in the test. The ELISA was negative for all of the samples, no antibodies against influenza viruses could be detected using this method. None of the tortoise sera from Italy was positive in the HI-test. 13 (22.0%) of the tortoise sera from Great Britain were positive in the HI-test. In addition, 34 sera from Great Britain (incl. the ones which were positive in the HI-test) were tested by means of an ELISA for the detection of antibodies against avian influenza viruses. All sera tested were negative.

During the contamination trials with two different influenza virus isolates with zebra mussels, it could be shown that mussels are able to filter avian influenza viruses and that the viruses remain in the mussels for an extended period of time: according to a three-way ANOVA with repeated measures a statistically significant difference was found between the different trials and between the different days of sampling ($p < 0,0001$ bzw. $p = 0,0001$). The amount of viral RNA per g in the mussels was generally higher than that measured per ml in the surrounding water. The highest numbers were generally found on day 2, directly after the removal of the mussels from the virus contaminated water. The numbers decreased distinctly until day 16. During the days in between, The amount of viral RNA in the mussels fluctuated con-

tinuously. In most cases, live virus was also re-isolated from the mussel samples by titration on embryonated chicken eggs. The temperature seems to play a marginal role for the accumulation of influenza viruses in zebra mussels. Regarding the temperature, no significant difference was detected between the trials at 4 °C and 19°C ($p = 0,9148$).

No virus growth was detected during the trials with the fish cell lines EPC and RTG2 and the LPAI H5N1 virus isolate at 19 °C. In the trails at 28 °C with these cell lines, even the negative controls showed a CPE-like alteration. Therefore, further trials were performed with the fish cell lines SAF and FHM. These can physiologically be incubated at 28 °C. During the cell culture trials with fish- and reptilian cell lines (VH2, IgH-2, and TH-1, as well as SAF and FHM at 28 °C) a CPE was detectable in the infected cells by light microscopy as vacuole formation, plaque formation and cell lysis (LPAI H5N1 and LPAI H4N6). The negative controls as well as the dishes inoculated with allantoic fluid without virus showed a uniform monolayer. While the results of the immunoperoxidase test with VH2-, TH1-, SAF and FHM- cells were not clear, a clear brown colorization of individual cells was detectable in IgH-2 cells. This is a sign of virus propagation. QRRT-PCR showed a clear increase in the amount of viral RNA in the cell culture supernatant from day 0 to day 2. Clear proof of virus propagation in the cell lines was not found using titration on embryonated chicken eggs. All in all the cell culture trials indicated that influenza viruses may be able to propagate in poikilothermic animals.

Poikilothermic animals and mussels may play a role in the epidemiology of avian influenza. Further trials, the selective infection of poikilothermic animals under laboratory conditions in particular, are necessary to evaluate their actual importance for these viruses.

8. LITERATURVERZEICHNIS

ACKERMANN, J. D.; B. SIM; S. J. NICHOLS; R. CLAUDI (1994): A review of the early life history of zebra mussels (*Dreissena polymorpha*): comparison with marine bivalves. *Canadian Journal of Zoology* **72**, 1169-1179

ALEXANDER, D. J. (1996): Highly pathogenic avian influenza (fowl plague). In: OIE Manual of standards for diagnostic tests and vaccines. List A and B diseases of mammals, birds and bees, 3rd ed. Office International des Epizooties: Paris, 155-160 zitiert in: SWAYNE D. E., D. A. HALVORSON (2003): Influenza, SAIF, Y. M. (editor in chief): Diseases of Poultry. Iowa State University Press, Iowa, USA, 11th ed., 135-160

ALEXANDER, D. J. (2007): An overview of the epidemiology of avian influenza. *Vaccine* **25**, No. 30, 5637-5644

ALTSCHUL, S. F.; W. GISH; W. MILLER; E. W. MYERS; D. J. LIPMAN (1990): Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* **215**, 403-410

AMBROSIUS, H. (1976): Chapter 12: Immunoglobulins and Antibody Production in Reptiles. In: Marchalonis, J. J. (ed): *Comparative Immunology*, Blackwell Scientific, Oxford, 298-334

ANONYM (1993a): Estimation of Filtration Rate of Zebra Mussels. Technical Note ZMR-4-06, US Army Corps of Engineers, Waterways Experiment Station, Vicksburg, USA

ANONYM (1993b): Acclimation Response of Zebra Mussels to Laboratory Testing. Technical Note ZMR-1-13, US Army Corps of Engineers, Waterways Experiment Station, Vicksburg, USA

ANONYM (2001): Protocol Animal Tissues. RNeasy[®] Mini Handbook 06/2001, Firma Qiagen, Hilden, 53-54

ANONYM (2007a): Highly Pathogenic Avian Influenza, last updated 07.08.2007. The Center for Food Security and Public Health, College of Veterinary Medicine, Iowa State University, Ames, Iowa

ANONYM (2007b): Fangstatistik für den Bodensee im Fangjahr 2007. Fischereiforschungsstelle Baden-Württemberg, Bildungs- und Wissenszentrum Aulendorf, Viehhaltung, Grünlandwirtschaft, Wild, Fischerei

AVTALION, R. R.; E. WEISS; T. MOELEM (1976): Regulatory effects of temperature upon immunity in ectothermic vertebrates. In: Marchalonis, J. J. (ed): Comparative Immunology, Blackwell Scientific, Oxford, 227-238

BAGGOTT, G. K. (2001): Development of extra-embryonic membranes and fluid compartments. In: Deeming, D. C. (ed.): Perspectives in Fertilization and Embryonic Development in Poultry. Lincolnshire, UK, Ratite Conference Books, 23-29

BERGMANN, S.; D. FICHTNER (2002): Die Infektiöse Anämie der Lachse (ISA). 4. Riemser Fischseminar, Insel Riems, 20. und 21. März 2002

BLACK, M. C. (2000): Collection of Body Fluids. In: G. K. Ostrander (ed): Handbook of Experimental Animals: The Laboratory Fish, Chapter 30, London, Academic Press, 513-527

BMELV (2008): Situation der Aviären Influenza in der Bundesrepublik Deutschland. Stand 10.10.2008, Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz, Berlin

BOOM, R.; C. J. A. SOL; M. M. M. SALIMANS, C. L. JANSEN; P. M. E. WERTHEIM-van DILLEN; J. van der NOORDAA (1990): Rapid and Simple Method for Purification of Nucleic Acids. Journal of Clinical Microbiology **28**, No. 3, 495–503

BREBAN, R.; J. M. DRAKE; D. E. STALLKNECHT; P. ROHANI (2009): The Role of Environmental Transmission in Recurrent Avian Influenza Epidemics. PLoS Computational Biology **5**, No. 4, 1-11

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. *Journal of Avian Diseases* **51**, No. 1, 285–289

BROWN, J. D.; G. GOEKJIANA; R. POULSONA; S. VALEIKAB; D. E. STALLKNECHT (2008): Avian influenza virus in water: Infectivity is dependent on pH, salinity and temperature. *Veterinary Microbiology* **136**, No. 1-2, 20-26

BUDZKO, D. B.; D. F. JELINEK; B. W. WILCKE (1981): Nonspecific Reactions in the Hemagglutination Inhibition Test for Detection of Rubella Antibodies. *Journal of Clinical Microbiology* **13**, No. 5, 818-823

BURKHARDT, W.; K. R. CALCI (2000): Selective Accumulation May Account for Shellfish-Associated Viral Illness. *Applied and Environmental Microbiology* **66**, No. 4, 1375-1378

BVET (2006): Untersuchungsergebnisse der Überwachung im Winter 2005-2006. Bundesamt für Veterinärwesen, Schweizerische Eidgenossenschaft, Bern, Schweiz

CAMPBELL, J. B.; M. ROMACH; M. L. ELLINS (1976): Rubella Hemagglutination-Inhibition Test: False-Positive Reactions in Sera Contaminated with Bacteria. *Journal of Clinical Microbiology* **4**, No. 5, 389-393

CAMPBELL, N. A.; J. B. REECE (2003): Teil VIII: Ökologie und Verhalten. In: *Biologie*, 6. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Berlin, 1307-1488

CARACO, N. F.; J. J. COLE; P. A. RAYMOND; D. L. STRAYER; M. L. PACE; S. E. G. FINDLAY; D. T. FISCHER (1997): Zebra Mussel Invasion in a large, turbid River: Phytoplankton Response to increased grazing. *Ecology* **78**, No. 2, 588-602

CHEN, H.; G. J. D. 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

COHEN, A. N.; A. WEINSTEIN (1998): The Potential Distribution and Abundance of Zebra Mussels in California. San Francisco Estuary Institute, Richmond, USA, administrated by the California Urban Water Agencies

CROCI, L.; D. DE MEDICI; S. DI PASQUALE; L. TOTI (2005): Resistance of hepatitis A virus in mussels subjected to different domestic cookings. *International Journal of Food Microbiology* **105**, No. 2, 139-144

CUSHING, J. E. Jr. (1942): An Effect of Temperature Upon Antibody-Production in Fish. *The Journal of Immunology* **45**, 123-126

DAVIS, L. M.; E. SPACKMAN (2008): Do crocodilians get the flu? Looking for influenza A in captive crocodilians. *Journal of Experimental Zoology Part A Ecological Genetics and Physiology* **309A**, 1-10

DI GIROLAMO, R.; J. LISTON; J. MATCHES (1977): Ionic Bonding, the Mechanism of Viral Uptake by Shellfish Mucus. *Applied and Environmental Microbiology* **33**, No. 1, 19-25

DUSSLING, U.; R. BERG (2001): Fische in Baden-Württemberg. Ministerium für Ernährung und Ländlichen Raum Baden-Württemberg, Stuttgart

ELLIS, A. E. (1999): Immunity to bacteria in fish. *Fish & Shellfish Immunology* **9**, No. 4, 291-308

ELLIS, A. E. (2001): The Immunology of Teleosts. In: ROBERTS, R. J. (editor): *Fish Pathology*, W. B.Saunders, Oxford, 3rd edition, 133-150

EVENSEN, O.; K. E. THORUD; Y. A. OLSEN (1991): A morphological study of the gross and light microscopic lesions of infectious anaemia in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Research in Veterinary Science* **51**, No. 2, 215-22

FANSLOW, D. L.; T. F. NALEPA; G. A. LANG (1995): Filtration rates of the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) on natural seston from Saginaw Bay, Lake Huron. J. Great Lakes Res. **21**, 489-500. In: SCHRÖTER-BOBSIN, U. (2005): Untersuchungen zur Einsatzmöglichkeit der Dreikantmuschel *Dreissena polymorpha* als biologischer Filter und Wasserhygienemonitor. Dissertation an der Fakultät Mathematik und Naturwissenschaften der Technischen Universität Dresden

FAUST, C.; D. STALLKNECHT; D. SWAYNE; J. BROWN (2009): Filter-feeding bivalves can remove avian influenza viruses from water and reduce infectivity. Proceedings of the Royal Society B **276**, 3727-3735

FEARE, C. J. (2006): Fischfarmen und das Risiko der Verbreitung der Aviären Influenza. Wild Wings Bird Management, Bird Life International

FENNER, F. J.; E. P. J. GIBBS; F. A. MURPHY; R. ROTT; M. J. STUDERT; D. O. WHITE (1993): Veterinary Virology. Academic Press, Inc., San Diego, California, 2nd edition, 511-522

FISHER, S. W.; D. C. GOSSIAUX; K. A. BRUNER; P. F. LANDRUM (1993): Investigations of the Toxicokinetics of Hydrophobic Contaminants in the Zebra Mussel (*Dreissena polymorpha*). Zebra Mussels, Biology, Impacts, and Control, T. F. Nalepa; D. W. Schloesser (eds.), Lewis Publishers, USA, Chapter 28, 465-490

FLI (2006a): Bewertung des Risikos zur Einschleppung von hochpathogenem aviären Influenzavirus H5N1 in Hausgeflügelbestände in Deutschland. Stand 05. September 2006, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit, Friedrich-Loeffler Institut, Insel Riems

FLI (2006b): Epidemiologisches Bulletin Nr. 35/2006, Lagebericht zur Aviären Influenza. Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit, Friedrich-Loeffler-Institut, Insel Riems

FLI (2006c): Epidemiologisches Bulletin Nr. 37/2006 Lagebericht zur Aviären Influenza. Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit, Friedrich-Loeffler-Institut, Insel Riems

FLI und BfR (2006a): Zum Risiko der Übertragung des Vogelgrippevirus über Trinkwasser. Gemeinsame Stellungnahme Nr. 017/2006 des Friedrich-Loeffler-Instituts und des Bundesinstitutes für Risikobewertung vom 22. März 2006

FLI und BfR (2006b): Geht von Muscheln und Fischen ein Infektionsrisiko bezüglich aviärer Influenza-A-Viren (H5N1) für den Menschen aus? Gemeinsame Stellungnahme Nr. 018/2006 des Bundesinstitutes für Risikobewertung, des Friedrich-Loeffler-Instituts und der Bundesforschungsanstalt für Ernährung und Lebensmittel vom 14. März 2006

FLI (2007a): Epidemiologisches Bulletin Nr. 04/2007, Lagebericht zur Aviären Influenza. Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit, Friedrich-Loeffler-Institut, Insel Riems

FLI (2007b): Epidemiologisches Bulletin Nr. 01/2007, Lagebericht zur Aviären Influenza. Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit, Friedrich-Loeffler-Institut, Insel Riems

FLI (2008): Epidemiologisches Bulletin Nr. 03/2008, Lagebericht zur Aviären Influenza. Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit, Friedrich-Loeffler-Institut, Insel Riems

GABLIKS, J. (1988): Influenza- A Virus Vaccine from Fish Cell Cultures. United States Patent, Patent Number 4

GALLAHER, W. R. (2009): Towards a sane and rational approach to management of Influenza H1N1 2009. Virology Journal **6**, No. 1, doi: 10.1186/1743-422X-6-51

GAMBARYAN, A. S.; J. S. ROBERTSON; M. N. MATROSOVICH (1999): Effects of Egg-Adaptation on the Receptor-Binding Properties of Human Influenza A and B Viruses. *Virology* **258**, No. 2, 232-239

GAUSH, C. R.; T. F. SMITH (1968): Replication and Plaque Assay of Influenza Virus in an Established Line of Canine Kidney Cells. *Applied Microbiology* **16**, No. 4, 588-594

GLOBIG, A. (2007): Untersuchungen zum Vorkommen von aviären Influenza- und aviären Paramyxoviren bei Wildvögeln in Deutschland. Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Grades einer Doktorin der Veterinärmedizin (Dr. med. vet.) durch die Tierärztliche Hochschule Hannover, Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft Service GmbH, Gießen, 1. Auflage

GLOBIG, A.; D. MATTHES; U. KRAATZ; P. STRUNK; W. FIEDLER; R. HÄUSLAIGNER; C. GRUND; T. METTENLEITER; T. HARDER; M. BEER (2008): Einsatz von Sentinels als Untersuchungsstrategie im AIV-Wildvogelmonitoring: Ergebnisse aus 1,5 Jahren Projektlaufzeit. Gemeinsame wissenschaftliche Tagung der Forschungsprogramme „Constanze“ und „Wildvögel und Vogelgrippe“; Bregenz, Österreich; 12.-13. Juni 2008

GÜRTLER, L. (2006): Virology of Human Influenza. *Influenza Report 2006*, B. S. Kamps, C. Hoffmann, W. Preiser (eds.), Flying Publisher, Paris, Cagliari, Wuppertal, Sevilla, 48-87

HAHON, N.; J. A. BOOTH; H. L. ECKERT (1972): Cell Attachment and Penetration by Influenza Virus. *Infection and Immunity* **7**, No. 3, 341-351

HARDER, T. (2007): AI-HA5-Spaltstellensequenzierung. Laboranweisung des Friedrich-Loeffler-Instituts, Insel Riems

HARDER, T. (2008): Höhen und (Un-) Tiefen moderner Influenza-Diagnostik. Gemeinsame wissenschaftliche Tagung der Forschungsprogramme „Constanze“ und „Wildvögel und Vogelgrippe“, Bregenz, Österreich, 12.-13. Juni 2008

HAUMACHER, R.; A. IKE; J. NAZIR; P. STUMPF; R. E. MARSCHANG; R. BÖHM (2008): Aviäre Influenzaviren in der Umwelt: Entwicklung von Keimträgermethoden sowie Tenazität im Wasser. Gemeinsame wissenschaftliche Tagung der Forschungsprogramme „Constanze“ und „Wildvögel und Vogelgrippe“, Bregenz, Österreich, 12.-13. Juni 2008

HAWKES, R. A. (1979): General principles underlying laboratory diagnosis of viral infections. Diagnostic procedures for viral, rickettsial and chlamydial infections, 5th edition, E. H. Lennette, N. J. Schmidt (eds.), American Public Health Association, Washington D.C., 1-48

HEDGES, S. B. (1994): Molecular evidence for the origin of birds. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **91**, No. 7, 2621-2624

HIERHOLZER, J. C.; R. A. KILLINGTON (1996): Virus isolation and quantitation. B. W. J. Mahy.; H. O. Kangro (eds.), Virology Methods Manual. Academic Press, Harcourt Brace and Company, London, 25-46

HOFERER, M.; R. SCHNAUFER; R. STING (2006): Influenza A quant. RT-duplex-PCR (M1+IC2) (INFAQMPCR). Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt (CVUA) Stuttgart, Fellbach, Prüfverfahren: 046D07501, 06.09.2006, unveröffentlicht

HOFFMANN, B. (2006): Laboranweisung - Methode Real-time RT-PCR IVA-M1+IC2 duplex. Friedrich-Loeffler-Institut, Insel Riems, Version 2, 18.04.2006, unveröffentlicht

HOFFMANN, E.; J. STECH; I. LENEVA; S. KRAUSS; C. SCHOLTISSEK; P. S. CHIN; M. PEIRIS; K. F. SHORTRIDGE; R. G. WEBSTER (2000): Characterization of the Influenza A Virus Gene Pool in Avian Species in Southern China: Was H6N1 a Derivative or a Precursor of H5N1? Journal of Virology **74**, No. 14, 6309-6315

HUCHZERMEYER, F. W. (2003): Crocodiles: biology, husbandry and diseases. CABI Publishing. In: DAVIS, L. M.; E. SPACKMAN (2008): Do crocodilians get the flu? Looking for influenza A in captive crocodilians. *Journal of Experimental Zoology Part A Ecological Genetics and Physiology* **309A**, 1-10

HUDSON, A. R.; N. S. FISHER (1999): Rates and Routes of Trace Element Uptake in Zebra Mussels. *Limnology and Oceanography* **44**, No. 7, 1730-1749

IDEXX (2007): Testkit zum Nachweis von Antikörpern gegen das Virus der Aviären Influenza, ELISA (MultiS-Screen). Gebrauchsinformation, 17-20

IDEXX (2008): FlockChek AI MultiS-Screen Ab Test Kit Information Sheet, 1-2

ITO, T.; K. OKAZAKI; Y. KAWAOKA; A. TAKADA; R. G. WEBSTER; H. KIDA (1995): Perpetuation of influenza A viruses in Alaskan waterfowl reservoirs. *Archives of Virology* **140**, 1163–1172; In: WHO (2007): Review of latest available evidence on potential transmission of avian influenza (H5N1) through water and sewage and ways to reduce the risks to human health, WHO/SDE/WSH/06.1, 10/10/2007. World Health Organization, Water, Sanitation and Health Public, Health and Environment, Geneva, 2006

ITO, T.; H. GOTO; E. YAMAMOTO; H. TANAKA; M. TAKEUCHI; M. KUWAYAMA; Y. KAWAOKA; K. OTSUKI (2001): Generation of a Highly Pathogenic Avian Influenza A Virus from an Avirulent Field Isolate by Passaging in Chickens. *Journal of Virology* **75**, No. 9, 4439-4443

JACOBSON, E.; J. M. GASKIN; D. PAGE; W. O. IVERSON; J. W. JOHNSON (1981): Paramyxo-like virus associated illness in a zoological collection of snakes. *Journal of the American Veterinary Medical Association* **179**, 1227-1230

JACOBSON, E. R.; F. ORIGGI (2002): Use of serology in reptile medicine. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine* **11**, No. 1, 33-45

JORGENSEN, C. B.; T. KIOBOE; H. U. RIISGORD (1984): Ciliary and mucus-net filter feeding with special reference to fluid mechanical characteristics. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **15**, 283-292. Zitiert in: SCHRÖTER-BOBSIN, U. (2005): Untersuchungen zur Einsatzmöglichkeit der Dreikantmuschel *Dreissena polymorpha* als biologischer Filter und Wasserhygienemonitor. Dissertation an der Fakultät Mathematik und Naturwissenschaften der Technischen Universität Dresden

JOSEPH T.; J. MCAULIFFE; B. LU; L. VOGEL; D. SWAYNE; H. JIN; G. KEMBLE; K. SUBBARAO (2008): A live attenuated cold-adapted influenza A H7N3 virus vaccine provides protection against homologous and heterologous H7 viruses in mice and ferrets. *Virology* (Epub ahead of print)

JULKUNEN I.; R. PYHÄLÄ; T. HOVI (1985): Enzyme immunoassay, complement fixation and hemagglutination inhibition tests in the diagnosis of influenza A and B virus infections. Purified hemagglutinin in subtype-specific diagnosis. *Journal of Virological Methods* **10**, No. 1, 75-84

KALETA, E. F.; G. HERGARTEN; A. YILMAZ (2005): Avian influenza A viruses in birds - an ecological, ornithological and virological view. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift* **112**, Nr. 12, 441-480

KATCHANOVA, A. A. (1961): Some Data on the Reproduction of *Dreissena polymorpha* Pallas in the Uchinsk Reservoir. *Tr. Vses. Hidrobiol. Ova* **11**, 117-121. In: SPRUNG, M. (1993): *The Other Life: An Account of Present Knowledge of the Larval Phase of Dreissena polymorpha, Zebra Mussels, Biology, Impacts, and Control*, T. F. Nalepa; D. W. Schloesser (eds.), Lewis Publishers, USA, Chapter 2, 39-53

KAWAOKA, Y.; N. J. COX; O. HALLER; S. HONGO; N. KAVERIN; H.-D. KLENK; R. A. LAMB; J. MCCAULEY; P. PALESE; E. RIMSTAD; R. G. WEBSTER (2005): Orthomyxoviridae. In: FAUQUET, C. M.; M. A. MAYO; J. MANILOFF; U. DESSELBERGER; L. A. BALL (2005): Virus Taxonomy, Classification and Nomenclature of Viruses, Eight Report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses. Elsevier Academic Press, San Diego, USA, 681-693

KENDAL A. P.; H. F. MAASAB; G. I. ALEXANDROVA; Y. Z. GHENDON (1981): Development of cold-adapted recombinant live, attenuated influenza A vaccines in the USA and USSR. *Antiviral Research* **1**, 339-365

KIBENGE, M. T.; B. OPAZO; A. H. ROJAS; F. S. KIBENGE (2002): Serological evidence of infectious salmon anaemia virus (ISAV) infection in farmed fishes, using an indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Diseases of Aquatic Organisms* **51**, No. 1, 1-11

KINZELBACH, R. (1992): The Main Features of the Phylogeny and Dispersal of the Zebra Mussel *Dreissena polymorpha*. In: *Limnologie Aktuell, The Zebra Mussel Dreissena polymorpha*, D. Neumann; H. A. Jenner (eds.), Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Vol. 4, 5-17

KRAMER, I. (2003): Fische und die Uferzone des Bodensees, Auswirkungen der Extremsituation im Sommer 2003. Arbeitsgruppe Bodenseeufer (AGBU), Thema des Monats - Oktober 2003

LANG, A. S.; A. KELLY; J. A. RUNSTADLER (2008): Prevalence and diversity of avian influenza viruses in environmental reservoirs. *Journal of General Virology* **89**, 509-519

LEE, R.; D. KAY; R. J. WILKINSON; L. FEWTRELL; C. STAPLETON (2003): Impact of Intermittent Discharges on the Microbial Quality of Shellfish. R&D Technical Report P2-266/TR, Environment Agency, Bristol

LEES, D. N. (2000): Viruses and bivalve shellfish. *International Journal of Food Microbiology* **59**, No. 1-2, 81-116

LEES, D. N.; K. HENSHILWOOD; W. J. DORÉ (1994): Development of a Method for Detection of Enteroviruses in Shellfish by PCR with Poliovirus as a Model. *Applied and Environmental Virology* **60**, No. 8, 2999-3005

LE GUYADER, F.; E. DUBOIS; D. MENARD; M. POMMEPUY (1994): Detection of Hepatitis A Virus, Rotavirus, and Enterovirus in naturally contaminated shellfish and sediment by reverse transcription-semi-nested PCR. *Applied Environmental Microbiology* **60**, No. 10, 3665-3671

LE GUYADER, F.; L. HAUGARREAU; L. MIOSSEC; E. DUBOIS; M. POMMEPUY (2000): Three-year study to assess human enteric viruses in shellfish. *Applied Environmental Microbiology* **66**, No. 8, 3241-3248

LE GUYADER, F. S.; F. LOISY; R. L. ATMAR; A. M. HUTSON; M. K. ESTES; N. RUVOËN-CLOUET; M. POMMEPUY; J. LE PENDU (2006): Norwalk Virus-specific Binding to Oyster Digestive Tissues. *Emerging Infectious Diseases* **12**, No. 6, 931-936

LELAND, D. S.; C. C. GINOCCHIO (2007): Role of Cell Culture for Virus Detection in the Age of Technology. *Clinical Microbiology Reviews* **20**, No. 1, 49-78

LfL (2007): Institut für Fischerei, Staatliche Fischbrutanstalt Nonnenhorn. Infolyer, Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft (LfL), Freising-Weißenstephan, 1. Auflage

LINCOLN, C. K.; M. G. GABRIDGE (1998): Cell culture contamination: sources, consequences, prevention, and elimination. *Methods in Cell Biology* **57**, 49-65

LIU J.; H. XIAO; F. LEI (2005): Highly pathogenic H5N1 influenza virus infection in migratory birds. *Science Express*. **309**, No. 5738,1206

LUPIANI, B.; S. M. REDDY (2008): The history of avian influenza. Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases **32**, No. 4, 311-323

MAASAB H. F. (1967): Adaption and growth characteristics of influenza virus at 25 °C. Nature (London) **213**, 612-614

MAASAB H. F.; A. P. KENDAL; G. D. ABRAMS; A. S. MONTO (1982): Evaluation of cold-recombinant influenza virus vaccine in ferrets. Journal of Infectious Diseases **146**, 780-790

MANCINI, D. A. P.; R. M. Z. MENDONÇA; A. M. CIANCIARULLO; L. S. KOBASHI; H. G. TRINDADE; W. FERNANDES; J. R. PINTO (2004): Influenza in heterothermics. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical **37**, 204-209

MARSCHANG, R. E.; S. DONAHOE; R. MANVELL; J. LEMOS-ESPINAL (2002): Paramyxovirus and Reovirus Infections in wild-caught Mexican lizards (*Xenosaurus und Abronia spp.*). Journal of Zoo and Wildlife Medicine **33**, No. 4, 317-321

MCMAHON, R. F.; T. A. USSERY (1995): Thermal Tolerance of Zebra Mussels (*Dreissena polymorpha*) Relative to Rate of Temperature Increase and Acclimation Temperature. Technical Report EL-95-10, US Army Corps of Engineers® Waterways Experiment Station, Zebra Mussel Research Program, Washington D.C.

MCMAHON, R. F. (1996): The Physiological Ecology of the Zebra Mussel, *Dreissena polymorpha*, in North America and Europe. American Zoologist **36**, 339-363

MJAALAND, S.; E. RIMSTAD; K. FALK; B. H. DANNEVIG (1997): Genomic Characterization of the Virus Causing Infectious Salmon Anemia in Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.): an Orthomyxo-Like Virus in a Teleost. Journal of Virology **71**, No. 10, 7681–7686

MODROW, S.; D. FALKE; U. TRUYEN (2003): Orthomyxoviren. Molekulare Virologie, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 2. Auflage, 317-342

MONTEIRO, L.; D. BONNEMAISON; A. VEKRIS; K. G. PETRY; J. BONNET; R. VIDAL; J. CABRITA; F. MÉGRAUD (1997): Complex Polysaccharides as PCR Inhibitors in Feces: *Helicobacter pylori* Model. Journal of Clinical Microbiology **35**, No. 4, 995-998

MORTENSEN, S. H. (1993): Passage of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) through invertebrates in an aquatic food chain. Diseases of Aquatic Organisms **16**, 41-45

MORTON, B. (1993): The Anatomy of *Dreissena polymorpha* and the Evolution and Success of the Heteromyarian Form in the Dreissenoidea. Zebra Mussels, Biology, Impacts, and Control, T. F. Nalepa; D. W. Schloesser (eds.), Lewis Publishers, USA, Chapter 12, 185-215

MÜLLER, H. (2006): Biologie der Influenzaviren. Berliner und Münchner Tierärztliche Wochenschrift **119**, No. 3, 91–100

MUNIAIN-MUJIKA, I.; R. GIRONES; G. TOFIÑO-QUESADA; M. CALVO; F. LUCENA (2002): Depuration dynamics of viruses in shellfish. International Journal of Food Microbiology **77**, No. 1-2, 125-133

NAZIR, J.; R. HAUMACHER; A. IKE; P. STUMPF; R. BÖHM; R. E. MARSCHANG (2009): Long-Term Study on Tenacity of Avian Influenza Viruses in Water (Distilled Water, Normal Saline and Surface Water) at Different Temperatures. Avian Diseases, article in press, doi: 10.1637/8754-033109-ResNote.1

NIELSEN, O.; A. CLAVIJO; J. A. BOUGHEN (2001): Serologic Evidence of Influenza A Infection in Marine Mammals of Arctic Canada. Journal of Wildlife Diseases **37**, No. 4, 820-825

NOORDHUIS, R.; H. REEDERS; A. B. DE VAATE (1992): Filtration Rate and Pseudofaeces Production in Zebra Mussels and their Application in Water Quality Management. In: Limnologie Aktuell, The Zebra Mussel *Dreissena polymorpha*, D. Neumann; H. A. Jenner (eds.), Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Vol. 4, 5-17

NÜMANN, W. (1978): Versuch einer Klassifizierung der Bodenseecoregonen durch Vergleich kombinierter Merkmale und die Eingliederung der sogenannten Braunfelchen. Archiv Hydrobiologie **82** (1/4), 500-521 zitiert in: DUSSLING U., R. BERG (2001): Fische in Baden-Württemberg, Ministerium für Ernährung und Ländlichen Raum Baden-Württemberg, Stuttgart

NUTTALL, C. P. (1990): Review of the Caenozoic Heterodont Bivalve Superfamily Dreissenacea. Palaeontology **33**, 707-737. In: MORTON, B. (1993): The Anatomy of *Dreissena polymorpha* and the Evolution and Success of the Heteromyarian Form in the Dreissenoida, Zebra Mussels, Biology, Impacts, and Control, T. F. Nalepa; D. W. Schloesser (eds.), Lewis Publishers, USA, Chapter 12, 185-215

NYLUND, A.; A. M. KVENSETH; B. KROSSØY; K. HODNELAND (2003): Replication of the infectious salmon anaemia virus (ISAV) in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). Journal of Fish Diseases **20**, No. 4, 275-279

OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES (OIE) (1996): Newcastle disease. Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines, Lists A and B diseases of mammals, birds and bees, 3rd ed. OIE, Paris, France, 164

OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES (OIE) (2005): Avian Influenza. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, Chapter 2.7.12. OIE - World Organisation for Animal Health, 12 rue de Prony 75017 Paris, France (http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A_00037.htm)

POMMEPUY, M.; M.-P. CAPRAIS; J.-C. LE SAUX; C. LE MENNEC; S. PARNAUDEAU; Y. MADEC; M. MONIER; G. BREST; F. LE GUYADER (2002): Evaluation of viral shellfish depuration in a semi-professional tank. 4th International Conference on Molluscan Shellfish Safety, 04.-08.06.02, Santiago de Compostella, 485-499

POSCHETTO, L. F.; A. IKE; T. PAPP; U. MOHN; R. BÖHM; R. E. MARSCHANG (2007): Comparison of the Sensitivities of Noroviruses and Feline Calicivirus to Chemical Disinfection under Field-Like Conditions. *Applied and Environmental Microbiology* **73**, 5494-5500

REY, P. (2005): **Prinzipielle Überlegungen zur Neozoenausbreitung.** In: Wirbellose Neozoen im Bodensee, neu eingeschleppte invasive Benthos-Arten, Monitoringprogramm Bodenseeufer 2004, Landesanstalt für Umweltschutz, Baden-Württemberg (LfU) (Hrsg.), 1. Auflage, 2-15

RICE, E. W.; N. J. ADCOCK; M. SIVAGANESAN; J. D. BROWN; D. E. STALLKNECHT; D. E. SWAYNE (2007): Chlorine Inactivation of Highly Pathogenic Avian Influenza Virus (H5N1). *Emerging Infectious Diseases* **13**, No. 10, 1568-1570

ROHANI, P.; R. BREBAN; D. E. STALLKNECHT; J. M. DRAKE (2009): Environmental transmission of low pathogenicity avian influenza viruses and its implications for pathogen invasion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, No. 25, 10365-10369

SAWICKI, L.; R. RYKOWSKA (1966): The Effect of Environmental Temperature on the Course of Influenza Virus Infection in Mice and Frogs. *Acta Microbiologica Polonica* **15**, 97-100

SCHOLTISSEK, C. (2006): Influenza Pandemie Planung. *Berliner und Münchner Tierärztliche Wochenschrift* **119**, No. 3, 179-185

SCHOLTISSEK, C.; E. NAYLOR (1988): Fish farming and influenza pandemics. *Nature* **331**, 215

SCHRÖTER-BOBSIN, U. (2005): Untersuchungen zur Einsatzmöglichkeit der Dreikantmuschel *Dreissena polymorpha* als biologischer Filter und Wasserhygienemonitor. Dissertation an der Fakultät Mathematik und Naturwissenschaften der Technischen Universität Dresden

SCHWAB, H. (1995): Muscheln (Bivalvia). In: Süßwassertiere, ein ökologisches Bestimmungsbuch. Ernst Klett Verlag GmbH, Stuttgart, 1. Auflage, 230-237

SCHWAB, K. J.; F. H. NEILL; M. K. ESTES; T. G. METCALF; R. L. ATMAR (1998): Distribution of Norwalk virus within shellfish following bioaccumulation and subsequent depuration by detection using RT-PCR. Journal of Food Protection **61**, No. 12, 1674-1680

SELLWOOD, J.; A. BOSCH (2008): Progress of Working Group 2: Analytical Methods. COST 929 Symposium „Current developments in food and environmental virology“ 9.-11.10.2008, Pisa, Italien

SEN, H. G.; G. W. KELLEY; N. R. UNDERAHL; G. A. YOUNG (1961): Transmission of Swine Influenza Virus by Lungworm Migration. The Journal of Experimental Medicine **113**, No. 3, 517-520

SENNE, D. A. (1989): Virus propagation in embryonating eggs. Laboratory Manual for the Isolation and Identification of Avian Pathogens, 3rd ed., H. G. Purchase, L. H. Arp, C. H. Domermuth, J. E. Pearson (eds.), American Association of Avian Pathologists, Kendall/Hunt Publishing Co., Dubuque, IA. 176-181

SHIEH, Y.-S. C.; K. R. CALCI; R. S. BARIC (1999): A Method To Detect Low Levels of Enteric Viruses in Contaminated Oysters. Applied and Environmental Microbiology **65**, No. 11, 4709-4714

SHOPE, R. E. (1943): The Swine Lungworm as a Reservoir and Intermediate Host for Swine Influenza Virus. Journal of Experimental Medicine **77**, No. 2, 111-126

SKÅR, C. K.; S. MORTENSEN (2007): Fate of infectious salmon anaemia virus (ISAV) in experimentally challenged blue mussels *Mytilus edulis*. *Diseases of Aquatic Organisms* **74**, 1-6

SMITH, W.; C. H. ANDREWES; P. P. LAIDLAW (1933): A Virus obtained from Influenza Patients. *The Lancet* **1**, 66-68

SODDEMANN, W. (2005): Influenza in Deutschland: Als Zoonose durch Trinkwasser übertragbar? *Umwelt, Medizin, Gesellschaft* **18**, No. 1, 49-60

SPACKMAN, E.; D. A. SENNE; T. J. MYERS; L. L. BULAGA; L. P. GARBBER; 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. *Journal of Clinical Microbiology* **40**, No. 9, 3256–3260

SPRUNG, M.; U. ROSE (1988): Influence of food size and food quantity on the feeding of the mussel *Dreissena polymorpha*. *Oecologia* **77**, 526-532. Zitiert in: SCHRÖTER-BOBSIN, U. (2005): Untersuchungen zur Einsatzmöglichkeit der Dreikantmuschel *Dreissena polymorpha* als biologischer Filter und Wasserhygienemonitor. Dissertation an der Fakultät Mathematik und Naturwissenschaften der Technischen Universität Dresden

SPRUNG, M. (1993): The Other Life: An Account of Present Knowledge of the Larval Phase of *Dreissena polymorpha*. In: *Zebra Mussels, Biology, Impacts, and Control*, T. F. Nalepa; D. W. Schloesser (eds.), Lewis Publishers, USA, Chapter 2, 39-53

STADEN, R. (1996): The Staden Sequence Analysis Package. *Molecular Biotechnology* **5**, 233-241

STAEHELI, P.; Y.-X. YU; R. GROB; O. HALLER (1989): A Double-Stranded RNA-Inducible Fish Gene Homologous to the Murine Influenza Virus Resistance Gene Mx. *Molecular and Cellular Biology* **9**, No. 7, 3117-3121

STALLKNECHT, D. E. (1998): Ecology and Epidemiology of Avian Influenza Viruses in Wild Bird Populations: Waterfowl, Shorebirds, Pelicans, Cormorants, Etc. In: Proceedings of the fourth international symposium on avian influenza, D. E. Swayne (ed.). American Association of Avian Pathologists, Kennett Square, Pennsylvania, 61–69

STALLKNECHT, D. E.; J. D. BROWN (2007): Wild Birds and the Epidemiology of Avian Influenza. *Journal of Wildlife Diseases* **43**, No. 3 Supplement, 2007, S15–S20

STARICK, E.; O. WERNER; T. HARDER; A. GLOBIG; B. HOFFMANN; M. BEER (2007): Sequence analysis of HA and NA genes of H5N1 HPAIV isolates from Germany clearly identifies two clusters. Unveröffentlicht

STUHLBERG, C. S.; R. SCHAPIRA (1953): Virus Growth in Tissue Culture Fibroblasts. *The Journal of Immunology* **70**, 51 -59

SUGIMURA, T.; Y. MURAKAMI; T. OGAWA (2000): The Susceptibility of Culture Cells to Avian Influenza Viruses. *The Journal of Veterinary Medical Science* **62**, No. 6, 659-660

SÜSS, J.; J. SCHÄFER; H. SINNECKER; R. G. WEBSTER (1994): Influenza virus subtypes in aquatic birds of eastern Germany. *Archives of Virology* **135**, 101-114

SWAYNE D. E.; D. J. KING (2003): Zoonosis Update. Avian influenza and Newcastle disease. *Journal of the American Veterinary Medical Association* **222**, No. 11, 1534-1540

SWAYNE D. E.; D. A. HALVORSON (2008): Influenza. *Diseases of Poultry*, 12th ed., Y. M. Saif, A. M. Fadly, J. R. Clisson, L. R. McDougald, L. K. Nolan, D. E. Swayne (eds.), Blackwell Publishing Ltd, Oxford, UK, Chapter 6, 153-184

TEIFKE, J. P.; R. KLOPFLEISCH; 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. *Journal of Veterinary Pathology* **44**, 137–143

TIZARD, I. R. (2008): Chapter 37: The Evolution of the immune system. In: *Veterinary Immunology an introduction*, 8th ed., W. B. Saunders Co., Philadelphia, USA

TOBITA, K.; A. SUGIURA; C. ENOMOTO; M. FURUYAMA (1975): Plaque Assay and Primary Isolation of Influenza A Viruses in an Established Line of Canine Kidney Cells (MDCK) in the Presence of Trypsin. *Medical Microbiology and Immunology* **162**, No. 1, 9-14

TRAN, T. K. H. (2008): Comparison of methods for the quantification of a low pathogenic avian influenza virus. M.Sc.-Thesis, Institut für Umwelt- und Tierhygiene sowie Tiermedizin (460b), Universität Hohenheim, Stuttgart

USAHA (1994): Report of the Committee on Transmissible Diseases of Poultry and Other Avian Species. Criteria for determining that an AI virus isolation causing an outbreak must be considered for eradication. In: *Proceedings of the 98th Annual Meeting U.S. Animal Health Association*, U.S. Animal Health Association: Grand Rapids, MI, 522. In: SWAYNE D. E., D. A. HALVORSON (2003): *Influenza*. In: SAIF, Y. M. (editor in chief): *Diseases of Poultry*. Iowa State University Press, Iowa, USA, 11th ed., 135-160

VAN ZYL (2006): Chapter 7: Laboratory Findings. *Influenza Report 2006*, B. S. Kamps, C. Hoffmann, W. Preiser (eds.), Flying Publisher, Paris, Cagliari, Wuppertal, Sevilla, 150-159

VOGEL, G.; M. ALT (2005): Quantitativer Nachweis von Influenzaviren-RNA mittels „Real time detection“ (Taq Man[®] RT-PCR). Kantonales Laboratorium, Gesundheitsdepartement des Kantons Basel-Stadt, Schweiz, SOP 397, nicht veröffentlicht

WALZ, N. (1975): Die Besiedlung von künstlichen Substraten durch die Larven von *Dreissena polymorpha*, Archiv für Hydrobiologie, Suppl. **47**, 423-431. In: SPRUNG, M. (1993): The Other Life: An Account of Present Knowledge of the Larval Phase of *Dreissena polymorpha*. In: Zebra Mussels, Biology, Impacts, and Control, T. F. Nalepa; D. W. Schloesser (eds.), Lewis Publishers, USA, Chapter 2, 39-53

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

WEBSTER, R. G.; W. J. BEAN; O. T. GORMAN; T. M. CHAMBERS; Y. KAWAOKA (1992): Evolution and Ecology of Influenza A Viruses. *Microbiological Reviews* **56**, No. 1, 152-179

WERNER, O.; E. F. KALETA (2005): Orthomyxoviridae. In: SIEGMANN, O.; R. NEUMANN (Hrsg.): Kompendium der Geflügelkrankheiten, Schlütersche Verlagsgesellschaft mbH & Co. KG, Hannover, 6. Auflage, 135-142

WERNER, O.; T. C. HARDER (2006): Avian Influenza. *Influenza Report 2006*, B. S. Kamps, C. Hoffmann, W. Preiser (eds.), Flying Publisher, Paris, Cagliari, Wuppertal, Sevilla, 48-87

WERNER, S. (2004): Einfluss überwinternder Wasservögel auf Chara-Arten und *Dreissena polymorpha* am westlichen Bodensee. Landesanstalt für Umweltschutz Baden-Württemberg, Institut für Seenforschung, 1-73

WERNER, S.; M. MÖRTL; H.-G. BAUER; K.-O. ROTHHAUPT (2005): Strong impact of wintering waterbirds on zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) populations at Lake Constance, Germany. *Freshwater Biology* **50**, No. 8, 1412-1426

WHO MEMORANDUM (1980): A revision of the system of nomenclature for influenza viruses. *Bulletin of the World Health Organization* **58**, 585–591

WHO (2007): Review of latest available evidence on potential transmission of avian influenza (H5N1) through water and sewage and ways to reduce the risks to human health, WHO/SDE/WSH/06.1, 10/10/2007. World Health Organization, Water, Sanitation and Health Public; Health and Environment Geneva, 2006

WHO (2008): H5N1 avian influenza: Timeline of major events. World Health Organization

WONG, W. H.; J. S. LEVINTON; B. S. TWINING; N. FISHER (2003): Assimilation of Micro- and Mesozooplankton by Zebra Mussels: A Demonstration of the Food Web Link between Zooplankton and Benthic Suspension Feeders. *Limnology and Oceanography* **48**, No. 1, Part 1, 308-312

YAMAMOTO, Y.; K. NAKAMURA; M. OKAMATSU; A. MIYAZAKI; M. YAMADA; M. MASE (2008): Detecting Avian Influenza Virus (H5N1) in Domestic Duck Feathers. *Emerging Infectious Diseases* **14**, No. 10

ZARKOV, I. S. (2006): Comparison of haemagglutination inhibition (HI), immunodiffusion (ID) and ELISA tests for detecting anti avian influenza antibodies in chicken after inoculations with inactivated antigen. *Revue de Médecine Vétérinaire* **157**, No. 6, 336-340

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. *Journal of Virology* **8**, No. 24, 12229-12235

9. ANHANG

Tabelle 9.1: Fischproben Langenargen

Nr.	Spezies	G (cm)	GW (g)	1. Probenart	Ct-Wert	HAH-Test		
						H6	H5	H4
1	Barsch	20,0	92,8	Ki, Schu, RT, KT, BLUT	alle > 42	≥ 256	16	≥ 256
2	Barsch	18,5	73,2	Ki, Schu, RT, KT	alle > 42			
3	Felchen	27,0	156,8	Ki, Schu, RT, KT, BLUT	alle > 42	8	16	
4	Felchen	28,0	181,1	Ki, Schu, RT, KT	alle > 42			
5	Felchen	27,5	149,2	Ki, Schu, RT, KT, BLUT	alle > 42	16	16	-
6	Felchen	29,5	192,2	Ki, Schu, RT, KT, BLUT	alle > 42	16	16	-
7	Barsch	20,0	81,0	Ki, Schu, RT, KT	alle > 42			
8	Barsch	18,5	67,7	Ki, Schu, RT, KT, BLUT	alle > 42	≥ 256	32	≥ 256
9	Rotaugen	21,0	109,6	Ki, Schu, RT, KT	alle > 42			
10	Trüsche	26,0	121,0	Ki, Schu, RT, KT	alle > 42			
11	Trüsche	26,5	110,4	Ki, Schu, RT, KT	alle > 42			
12	Hasel	23,0	136,4	Ki, Schu, RT, KT	alle > 42			
13	Hasel	23,0	140,1	Ki, Schu, RT, KT	alle > 42			
14	Hasel	23,0	149,9	Ki, Schu, RT, KT	alle > 42			
15	Hasel	22,5	116,5	Ki, Schu, RT, KT	alle > 42			
16	Hecht	28,0	123,0	Ki, Schu, RT, KT, BLUT	alle > 42	-	-	-
17	Schleie	16,5	64,5	Ki, Schu, RT, KT, BLUT	alle > 42	-	-	-

Nr.	Spezies	G (cm)	GW (g)	1. Probenart	Ct-Wert	HAH-Test		
						H6	H5	H4
18	Barsch	25,0	82,0	Ki, Schu, RT, KT	alle > 42			
19	Barsch	19,0	91,0	Ki, Schu, RT, KT	alle > 42			
20	Barsch	16,0	51,2	Ki, Schu, RT, KT	alle > 42			
21	Barsch	17,5	56,1	Ki, Schu, RT, KT	alle > 42			
22	Barsch	19,0	52,4	Ki, Schu, RT, KT	alle > 42			
23	Barsch	16,5	48,8	Ki, Schu, RT, KT	alle > 42			
24	Felchen	31,5	234,1	Ki, Schu, RT, KT, BLUT	alle > 42	4	8	-
25	Felchen	32,5	256,0	Ki, Schu, RT, KT, BLUT	alle > 42	4	32	-
26	Felchen	28,5	202,4	Ki, Schu, RT, KT, BLUT	alle > 42	-	-	-
27	Felchen	30,5	214,5	Ki, Schu, RT, KT, BLUT	alle > 42	-	8	-
28	Felchen	30,5	201,4	Ki, Schu, RT, KT, BLUT	alle > 42	4	16	-
29	Felchen	28,0	150,2	Ki, Schu, RT, KT, BLUT	alle > 42	≥ 256	16	≥ 256
30	Trüsche	32,5	227,2	Ki, Schu, RT, KT	alle > 42			
31	Trüsche	33,0	218,9	Ki, Schu, RT, KT	alle > 42			
32	Trüsche	32,5	211,5	Ki, Schu, RT, KT	alle > 42			
33	Trüsche	31,0	187,5	Ki, Schu, RT, KT	alle > 42			
34	Hasel	22,0	118,8	Ki, Sch, RT, KT	alle > 42			
35	Felchen	31,0	274,1	Ki, Sch, RT, KT, BLUT	alle > 42	-	16	-
36	Felchen	30,0	287,3	Ki, Sch, RT, KT, BLUT	alle > 42	-	-	-
37	Barsch	22,0	142,7	Ki, Sch, RT, KT	alle > 42			

Nr.	Spezies	G (cm)	GW (g)	1. Probenart	Ct-Wert	HAH-Test			
						H6	H5	H4	
38	Barsch	22,0	120,7	Ki, Sch, RT, KT	alle > 42				
39	Barsch	21,0	100,0	Ki, Sch, RT, KT	alle > 42				
40	Rotauge	21,0	124,5	Ki, Sch, RT, KT	alle > 42				
41	Rotauge	20,5	93,8	Ki, Sch, RT, KT	alle > 42				
42	Hasel	23,0	158,3	Ki, Sch, RT, KT, BLUT	alle > 42	-	64	≥ 256	
43	Felchen	32,0	278,0	nur BLUT	alle > 42	-	8	4	
44	Hasel	23,0	121,3	nur BLUT	alle > 42	-	-	-	
45	Felchen	33,0	332,6	nur BLUT	alle > 42	-	8	-	
46	Felchen	32,5	280,5	nur BLUT	alle > 42	-	8	4	
47	Felchen	30,5	238,0	Ki, Schu, RT, KT, BLUT	alle > 42 Intensität* 0,129 (Ki), 0,138 (Schu), 0,144 (RT), 0,143 (KT)	-	-	-	
48	Felchen	31,5	252,6	Ki, Schu, RT, KT, BLUT	alle > 42 Intensität* 0,136 (Ki), 0,123 (Schu), 0,124 (RT), 0,106 (KT)	2	8	-	
49	Felchen	27,0	200,3	Ki, Schu, RT, KT, BLUT	alle > 42 Intensität* 0,126 (Ki), 0,141 (Schu), 0,138 (RT), 0,132 (KT)	-	8	-	
50	Felchen	28,5	193,1	Ki, Schu, RT, KT, BLUT	alle > 42 Intensität* 0,14 (Ki), 0,13 (Schu), 0,126 (RT), 0,114 (KT)	8	32	-	
51	Saibling	38,0	469,2	Ki, Schu, RT, KT, BLUT	alle > 42 Intensität* 0,148 (Ki), 0,169 (Schu), 0,16 (RT), 0,153 (KT)	-	-	-	
52	Saibling	32,5	293,2	Ki, Schu, RT, KT, BLUT	alle > 42 Intensität* 0,168 (Ki), 0,165 (Schu), 0,155 (RT), 0,146 (KT)	-	-	-	
53	Rotauge	23,0	153,0	Ki, Schu, RT, KT	alle > 42 Intensität* 0,124 (Ki), 0,131 (Schu), 0,136 (RT), 0,123 (KT)				
54	Hasel	22,0	120,6	Ki, Schu, RT, KT, BLUT	alle > 42 Intensität* 0,121 (Ki), 0,112 (Schu), 0,115 (RT), 0,106 (KT)	≥ 256	≥ 256	≥ 256	
55	Barsch	23,0	154,4	Ki, Schu, RT, KT	alle > 42 Intensität* 0,157 (Ki), 0,138 (Schu), 0,131 (RT), 0,123 (KT)				
56	Barsch	26,5	225,0	Ki, Schu, RT, KT	alle > 42 Intensität* 0,12 (Ki), 0,132 (Schu), 0,125 (RT), 0,109 (KT)				
57	Barsch	25,0	214,2	Ki, Schu, RT, KT	alle > 42 Intensität* 0,154 (Ki), 0,169 (Schu), 0,152 (RT), 0,153 (KT)				

Nr.	Spezies	G (cm)	GW (g)	1. Probenart	Ct-Wert	HAH-Test		
						H6	H5	H4
58	Barsch	12,0	39,1	Ki, Schu, RT, KT	alle > 42 Intensität* 0,18 (Ki), 0,175 (Schu), 0,148 (RT), 0,149 (KT)			
59	Barsch	11,0	40,3	Ki, Schu, RT, KT	alle > 42 Intensität* 0,149 (Ki), 0,167 (Schu), 0,161 (RT), 0,166 (KT)			
60	Kaulbarsch	12,5	28,6	Ki, Schu, RT, KT	alle > 42 Intensität* 0,172 (Ki), 0,2 (Schu), 0,175 (RT), 0,171 (KT)			
61	Kaulbarsch	16,0	51,7	Ki, Schu, RT, KT	alle > 42 Intensität* 0,178 (Ki), 0,179 (Schu), 0,165 (RT), 0,168 (KT)			

Proben 1-17: Langenargen 1, 03.04.07; Proben 18-33: Langenargen 2, 04.05.07; Proben 34-46: Langenargen 3, 09.10.07; Proben 47-61: Langenargen 4, 06.11.07

Nr. = Nummer, fortlaufend pro Entnahmeort; G = Größe in cm; GW = Gewicht in Gramm; Ki = Kiemen; Schu = Schuppen; RT = Rachtentupfer; KT = Kloakentupfer; * Die Proben wurden mit dem Cycler StepOne real-time PCR (Applied Biosystems Deutschland, GmbH) untersucht. Die von der Software ausgegebene Intensität lag unter dem Threshold value von 0,389 (Nr. 47-53) bzw. 0,367 (Nr. 53-61).

Tabelle 9.2: Fischproben Insel Reichenau

Nr.	Spezies	G (cm)	GW (g)	Probenart	Ct-Wert	HAH-Test		
						H6	H5	H4
1	Hecht	38,0	298,4	Ki, Schu, RT, KT,	alle > 42			
2	Hecht	37,0	288,4	Ki, Schu, RT, KT, BLUT	alle > 42	-	-	-
3	Hecht	35,0	253,9	Ki, Schu, RT, KT	alle > 42			
4	Felchen	31,8	249,2	Ki, Schu, RT, KT, BLUT	alle > 42	16	8	8
5	Felchen	31,0	232,6	Ki, Schu, RT, KT, BLUT	alle > 42	8	4	4
6	Felchen	24,5	166,4	Ki, Schu, RT, KT, BLUT	alle > 42	32	-	32
7	Rotauge	21,0	123,3	Ki, Schu, RT, KT, BLUT	alle > 42	-	8	32
8	Barsch	21,5	117,3	Ki, Schu, RT, KT	alle > 42			
9	Barsch	23,5	153,7	Ki, Schu, RT, KT	alle > 42			
10	Barsch	21,5	141,6	Ki, Schu, RT, KT	alle > 42			
11	Barsch	21,5	148,9	Ki, Schu, RT, KT	alle > 42			
12	Barsch	22,0	114,5	Ki, Schu, RT, KT	alle > 42			
13	Felchen	34,0	417,6	Ki, Schu, RT, KT	alle > 42			
14	Felchen	33,0	325,8	Ki, Schu, RT, KT, BLUT	alle > 42	16	8	4
15	Felchen	31,0	269,8	Ki, Schu, RT, KT, BLUT	alle > 42	≥ 256	64	32
16	Felchen	32,5	322,0	Ki, Schu, RT, KT, BLUT	alle > 42	-	8	
17	Felchen	33,0	332,0	Ki, Schu, RT, KT, BLUT	alle > 42	-	-	-
18	Felchen	35,0	405,2	Ki, Schu, RT, KT, BLUT	alle > 42	-	-	-
19	Barbe	65,0	> 2 kg	Ki, Schu, RT, KT, BLUT	alle > 42	≥ 256	-	4
20	Felchen	33,0	332,0	Ki, Schu, RT, KT, BLUT	alle > 42	4	4	2

Nr.	Spezies	G (cm)	GW (g)	Probenart	Ct-Wert	HAH-Test			
						H6	H5	H4	
21	Giebel	16,0	78,6	Ki, Schu, RT, KT	alle > 42				
22	Hecht	38,0	350,8	Ki, Schu, RT, KT, BLUT	alle > 42	-	-		2
23	Barsch	22,5	120,3	Ki, Schu, RT, KT	alle > 42				
24	Barsch	23,0	158,9	Ki, Schu, RT, KT	alle > 42				
25	Barsch	23,0	157,5	Ki, Schu, RT, KT	alle > 42				
26	Barsch	24,0	179,6	Ki, Schu, RT, KT	alle > 42				
27	Barsch	23,0	156,7	Ki, Schu, RT, KT	alle > 42				
28	Barsch	23,0	127,7	Ki, Schu, RT, KT	alle > 42				
29	Felchen	34,5	366,8	Ki, Schu, RT, KT, BLUT	alle > 42	-	-		-
30	Felchen	35,0	415,6	Ki, Schu, RT, KT, BLUT	alle > 42	-	4		16
31	Felchen	35,5	436,0	Ki, Schu, RT, KT, BLUT	alle > 42	-	-		-
32	Rotaugen	21,5	112,1	Ki, Schu, RT, KT	alle > 42				
33	Felchen	35,0	391,5	Ki, Schu, RT, KT, BLUT	alle > 42	-	64		≥ 256
34	Felchen	33,0	349,0	Ki, Schu, RT, KT, BLUT	alle > 42	-	-		-
35	Felchen	33,0	342,3	Ki, Schu, RT, KT, BLUT	alle > 42	-	8		32
36	Barsch	22,0	133,0	Ki, Schu, RT, KT	alle > 42				
37	Barsch	24,0	165,3	Ki, Schu, RT, KT	alle > 42				
38	Felchen	32,0	292,4	Ki, Schu, RT, KT, BLUT	alle > 42	-	-		-
39	Felchen	32,5	301,5	Ki, Schu, RT, KT, BLUT	alle > 42	-	4		
40	Felchen	32,0	294,4	Ki, Schu, RT, KT, BLUT	alle > 42	-	8		8

Nr.	Spezies	G (cm)	GW (g)	Probenart	Ct-Wert	HAH-Test		
						H6	H5	H4
41	Felchen	32,0	274,0	Ki, Schu, RT, KT, BLUT	alle > 42	-	-	-
42	Felchen	31,0	262,7	Ki, Schu, RT, KT, BLUT	alle > 42 Intensität* 0,078 (Ki), 0,093 (Schu), 0,094 (RT), 0,136 (KT)	-	-	-
43	Felchen	29,0	221,2	Ki, Schu, RT, KT, BLUT	alle > 42 Intensität* 0,11 (Ki), 0,104 (Schu), 0,114 (RT), 0,111 (KT)	≥ 256	32	≥ 256
44	Felchen	29,5	265,4	Ki, Schu, RT, KT, BLUT	alle > 42 Intensität* 0,133 (Ki), 0,144 (Schu), 0,126 (RT), 0,131 (KT)	-	-	-
45	Felchen	35,5	358,7	Ki, Schu, RT, KT, BLUT	alle > 42 Intensität* 0,152 (Ki), 0,136 (Schu), 0,127 (RT), 0,107 (KT)	-	-	-
46	Felchen	34,0	407,8	Ki, Schu, RT, KT, BLUT	alle > 42 Intensität* 0,172 (Ki), 0,156 (Schu), 0,154 (RT), 0,135 (KT)	≥ 256	16	≥ 256
47	Barsch	21,0	124,4	Ki, Schu, RT, KT	alle > 42 Intensität* 0,192 (Ki), 0,168 (Schu), 0,154 (RT), 0,159 (KT)			
48	Barsch	23,5	158,9	Ki, Schu, RT, KT	alle > 42 Intensität* 0,159 (Ki), 0,164 (Schu), 0,134 (RT), 0,146 (KT)			
49	Barsch	25,0	242,1	Ki, Schu, RT, KT	alle > 42 Intensität* 0,148 (Ki), 0,128 (Schu), 0,13 (RT), 0,127 (KT)			
50	Barsch	23,5	160,4	Ki, Schu, RT, KT	alle > 42 Intensität* 0,155 (Ki), 0,148 (Schu), 0,14 (RT), 0,14 (KT)			
51	Barsch	22,0	135,3	Ki, Schu, RT, KT	alle > 42 Intensität* 0,15 (Ki), 0,147 (Schu), 0,119 (RT), 0,114 (KT)			
52	Barsch	20,5	123,8	Ki, Schu, RT, KT	alle > 42 Intensität* 0,165 (Ki), 0,169 (Schu), 0,16 (RT), 0,149 (KT)			
53	Barsch	21,5	140,8	Ki, Schu, RT, KT	alle > 42 Intensität* 0,177 (Ki), 0,176 (Schu), 0,16 (RT), 0,158 (KT)			

Proben 1-12: Reichenau 1, 19.04.07; Proben 13-28: Reichenau 2, 25.05.07; Proben 29-41: Reichenau 3, 21.06.07; Proben 42-53: Reichenau 4, 23.10.07

Nr. = Nummer, fortlaufend pro Entnahmeort; G = Größe in cm; GW = Gewicht in Gramm; Ki = Kiemen; Schu = Schuppen; RT = Rachentupfer; KT = Kloakentupfer;

* Die Proben wurden mit dem Cycler StepOne real-time PCR (Applied Biosystems Deutschland, GmbH) untersucht. Die von der Software ausgegebene Intensität lag unter dem Threshold value von 0,473 (Nr. 42-47) bzw. 0,531 (Nr. 48-53).

Danksagungen

An erster Stelle möchte ich mich bei Prof. Dr. H.-J. Thiel und Prof. Dr. R. Böhm sowie PD Dr. R. E. Marschang für die wissenschaftliche Betreuung und die Annahme als Doktorandin bedanken. Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von Frau PD Dr. med. vet. Rachel E. Marschang durchgeführt. Ihr danke ich für die Überlassung des interessanten Themas sowie für ihre permanente konstruktive Betreuung. Dank Ihrer freundschaftlichen Unterstützung und ihrer ständigen Bereitschaft Ratschläge und Anregungen zu geben, konnten auch schwierigere Problemstellungen gemeistert werden. Am Institut für Umwelt- und Tierhygiene der Universität Hohenheim möchte ich den anderen „Influenza-Forschern“ Dr. sc. arg. Renate Haumacher und Jawad Nazir, DVM sowie Tibor Papp, DVM, MSc und den Masterstudenten Huong Tran und Maha Degan für den laufenden Austausch von Ergebnissen und Ideen sowie das gute freundschaftliche Verhältnis danken. Mein besonderer Dank gilt Dr. Renate Haumacher für die vielen fruchtbaren Diskussionen und fachkundigen Kommentare. Bedanken möchte ich mich auch bei den virologisch-technischen Assistentinnen Silvia Speck und Christa Schäfer für ihre Hilfe bei allen praktischen Problemen im Labor sowie allen anderen Institutsangehörigen für die vielen guten Gespräche und das angenehme Arbeitsklima.

Bei der Entnahme der Fischproben fand eine enge Kooperation mit der Fischereiforschungsstelle des Landes Baden-Württemberg (LVVG Aulendorf), Langenargen, statt. Allen voran danke ich Fischereimeister Andreas Revermann, der das Projekt mit Rat und Tat bei allen Fragen rund um die Bodenseefischerei unterstützt hat sowie Dr. Hans Güde vom Institut für Seenforschung der Landesanstalt für Umwelt, Messungen und Naturschutz Baden-Württemberg (LUBW), Langenargen, der die Dreikantmuscheln für die Versuche bereit gestellt hat. Da das Regierungspräsidium Stuttgart, Landesgesundheitsamt (LGA), ebenfalls ein Projekt im Rahmen der Untersuchungen „Wildvögel und Vogelgrippe (WuV)“ bearbeitete, fanden regelmäßig Treffen mit Dr. Jens Fleischer und Dr. Oliver Schneider vom LGA zum Austausch

von Erfahrungen und Ergebnissen statt. Weiterhin konnten vom LGA MDCK-Zellen sowie ein humanes Influenzaisolat bezogen werden. Hierfür danke ich herzlichst. Das Friedrich-Loeffler-Institut stellte Untersuchungsprotokolle, Zelllinien, Virusmaterial für die Versuche sowie monoklonale Antikörper gegen Influenzaviren für den Nachweis der Virusvermehrung in Zellkultur mittels Immunhistochemie bereit. Namentlich ist besonders die Zusammenarbeit mit Dr. Timm Harder, Prof. Dr. Jens P. Teifke sowie Dr. Bernd Hoffmann hervorzuheben. Auch ihnen bin ich zu großem Dank verpflichtet. Dem Chemischen- und Veterinäruntersuchungsamt (CVUA), Fellbach, möchte ich für die Hilfe bei Fragen zur real-time PCR sowie für die Bereitstellung von Fischzellen danken. Vom Gesundheitsdepartement des Kantons Basel-Stadt, Kantonales Laboratorium, Basel, Dr. Guido Vogel, konnte ein Protokoll zur Detektion von Influenzavirus-RNA in der real-time PCR bezogen werden. Dr. Antonio Pedro Alves de Matos vom (Curry Cabral Hospital und Biomaterials Department, ITB, Dental Medical School, Lisbon University, Lissabon) Portugal, danke ich für den Versuch von Influenzavirus-infizierten Zellkulturen elektronenmikroskopische Aufnahmen zu erstellen.

Dieses Projekt wurde im Rahmen des Forschungsprogrammes „Wildvögel und Vogelgrippe (WuV)“ durch das Ministerium für Ernährung und Ländlichen Raum, Baden-Württemberg (MLR) finanziert. Ohne die bereitgestellten Mittel wäre eine Durchführung der Untersuchungen nicht möglich gewesen.

Weiterhin möchte ich Tibor Papp, DVM, MSc und Dr. med. vet. Matthias Grassmann für den moralischen Rückhalt und die unendliche Geduld danken.

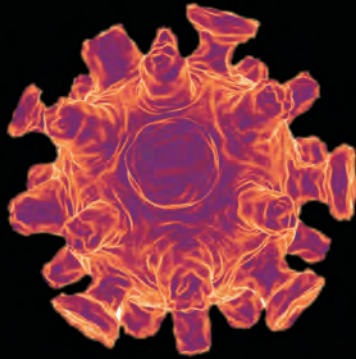
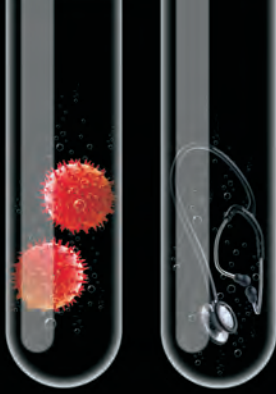
Doch am meisten gilt mein Dank meinen lieben Eltern für die unermüdliche Unterstützung. Ohne sie wäre weder das Studium der Tiermedizin noch die Erstellung der Doktorarbeit möglich gewesen.

Erklärung:

nach §10(5) der Promotionsordnung des Fachbereichs Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Petra Stumpf



edition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFBENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-5621-6



9 783835 956216