



Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz
- Dienstsitz Berlin - 11055 Berlin

An die
Vorsitzende des Ausschusses für Ernährung,
Landwirtschaft und Verbraucherschutz des Deutschen
Bundestages
Frau Ulrike Höfken, MdB
Platz der Republik 1
11011 Berlin

Dr. Gerd Müller

Parlamentarischer Staatssekretär
Mitglied des Deutschen Bundestages

HAUSANSCHRIFT Wilhelmstraße 54, 10117 Berlin

TEL +49 (0)1888 529 – 4460

FAX +49 (0)1888 529 – 4401

E-MAIL 02@bmelv.bund.de

INTERNET www.bmelv.de

AZ 324-3607-1/0001

324-3607-1/0005

DATUM **06. Sep. 2007**

Bericht der Bundesregierung über die aktuelle Situation der Geflügelpest und Ergebnisse des Monitorings bei Wildvögeln in den letzten zwölf Monaten in Deutschland und angrenzendem Ausland

Sehr geehrte Frau Vorsitzende,

beigefügten Bericht der Bundesregierung über die aktuelle Situation der Geflügelpest und Ergebnisse des Monitorings bei Wildvögeln in den letzten zwölf Monaten in Deutschland und dem angrenzenden Ausland erhalten Sie mit der Bitte um Kenntnisnahme und Weiterleitung an den Ausschuss.

Mit freundlichen Grüßen

**Bericht der Bundesregierung
über die aktuelle Situation der Vogelgrippe und Ergebnisse des Monitorings
bei Wildvögeln in den letzten zwölf Monaten in Deutschland
und im angrenzenden Ausland**

– Stand 29. August 2007 –

1. Hausgeflügel

Im Zusammenhang mit dem Geflügelpestgeschehen im mitteldeutschen Raum bei Hausgeflügel und Wildvögeln ist am 06.07.2007 in einer Hobbyhaltung in Thüringen hoch pathogene aviäre Influenza (HPAI) vom Subtyp H5N1 festgestellt worden. Die dort eingerichteten Restriktionszonen waren nach Abschluss der vorgesehenen Umgebungsuntersuchungen am 14.08.2007 aufgehoben worden.

Am 25.08.2007 wurde durch das Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit (FLI) als Nationales Referenzlaboratorium für AI der Nachweis von H5N1-Virus in seiner hochpathogenen Form in einem Entenmastbetrieb mit 169.857 Tieren in Wachenroth, Landkreis Erlangen-Höchstadt, Bayern bestätigt (siehe Anlage 1). Es handelt sich um einen zur Wichmann-Gruppe gehörenden Betrieb, auf dessen Gelände sich auch ein zugelassener Geflügelschlachtbetrieb befindet.

Nationale Maßnahmen

Unmittelbar nach der Bestätigung von HPAI H5N1 in Wachenroth wurden ein Sperrbezirk (Radius 3 km) und ein Beobachtungsgebiet (Radius 10 km) festgelegt, in denen der Transport von Geflügel und Geflügelerzeugnissen verboten bzw. nur unter Auflagen möglich ist (Zone A). Am 26.08.2007 wurde der gesamte Bestand (165.857 Tiere) vorbeugend getötet. 4000 Enten waren bereits verendet.

Zusätzlich wurde gemäß den Vorgaben der Entscheidung 2006/415/EG unter Berücksichtigung der geographischen und epidemiologischen Gegebenheiten eine Pufferzone (Zone B) mit einem Radius von ca. 13 km eingerichtet. Es wurden epidemiologische Ermittlungen zu Lieferungen von lebenden Tieren seit dem 30.7.07 zur Ermittlung der Kontakte und Transportwege aus dem Betrieb in andere Betriebe mit lebendem Geflügel sowie des Warenverkehrs im genannten Zeitraum angestellt. Alle identifizierten Kontaktbestände wurden klinisch und labordiagnostisch untersucht – bisher vorliegende Untersuchungsergebnisse sind sämtlich negativ.

Im epidemiologisch relevanten Zeitraum gelieferte Chargen von Geflügelfleisch wurden aus dem Handel genommen und die entsprechenden Rückstellproben auf AI untersucht. Für die noch im Betrieb befindlichen Chargen wurde eine Auslieferungssperre verhängt.

2. Wildvögel und andere Tiere

Nachdem in der 2. Hälfte des letzten Jahres in Deutschland nur bei einem Wildvogel hochpathogene aviäre Influenza (HPAI) Subtyp H5N1 festgestellt wurde (Feststellung am 03.08.2006), trat nun erneut HPAI H5N1 bei Wildvögeln auf.

Zwischen dem 24.06.2007 und dem 27.08.2007 wurde bei 327 Wildvögeln (Schwäne, Gänse, Schwarzhalstaucher, Haubentaucher) das Vorliegen von HPAI H5N1 durch das FLI bestätigt. Bei diesen Fällen handelt es sich um folgende Geschehen:

- zwei benachbarte Stadtseen in Nürnberg (Bundesland Bayern) (16 Fälle),
- ein See in Frohburg, Landkreis Leipziger Land (Bundesland Sachsen an der Grenze zum Bundesland Thüringen) sowie im benachbarten Windischleuba, Landkreis Altenburger Land (Bundesland Thüringen) (6 Fälle),
- ein Stausee in Badra, Kyffhäuserkreis (Bundesland Thüringen) und Kelbra, Kreis Mansfeld-Südharz (Bundesland Sachsen-Anhalt) (290 Fälle),
- in Ebeleben, Kyffhäuserkreis (2 Fälle) und Auleben, Kreis Nordhausen (9 Fälle) (Bundesland Thüringen),
- in Torgau, Landkreis Torgau-Oschatz (Bundesland Sachsen, in Nähe zum Bundesland Brandenburg) (1 Fall),
- in Machern, Muldentalkreis (Bundesland Sachsen) (1 Fall),
- ein Stausee nahe München (Bundesland Bayern) (3 Fälle).

Eine epidemiologische Risikobewertung der Situation in Deutschland ist auf der Homepage des FLI <http://www.fli.bund.de> verfügbar. Aufgrund der letzten HPAI-Fälle bei Wildvögeln wird das Risiko der Übertragung von H5N1 von Wildvögeln auf Hausgeflügel als hoch eingeschätzt. Die Veterinärbehörden haben umgehend reagiert und die Ausweisung von Risikozonen für einzelne Gebiete sowie die Einhaltung von Biosicherheitsmaßnahmen durch die Geflügelhalter im Land überprüft.

Nationale Maßnahmen

Es wurden unverzüglich die im europäischen Gemeinschaftsrecht vorgesehenen Maßnahmen ergriffen. Die zuständigen Veterinärbehörden haben unverzüglich nach Feststellung der Fälle gemäß der Entscheidung 2006/563/EG der Europäischen Kommission umfassende Maßnahmen ergriffen.

Um die Fundorte der toten Wildvögel wurde jeweils ein Sperrbezirk (Radius 3 km) eingerichtet. Hier gilt ein Verbringungsverbot für Geflügel und -erzeugnisse. Weiterhin gibt es Desinfektionsvorgaben für Geflügelbetriebe, eine Aufstockung von Wildbeständen ist verboten und ein Jagdverbot für Federwild wurde ausgesprochen. Hunde und Katzen dürfen für 21 Tage nicht frei herumlaufen.

Zusätzlich wurde in allen betroffenen Gebieten auf der Grundlage einer Risikoanalyse ein Beobachtungsgebiet (Radius 10 km) eingerichtet, in dem das Geflügel aufzustallen ist sowie Verbringungsbeschränkungen unterliegt. Die Aufstockung von Wildbeständen ist hier ebenfalls verboten.

Die Jagd auf Federwild ist nur mit Genehmigung der zuständigen Behörden erlaubt.

Des Weiteren erfolgt im Auftrag der zuständigen Behörden eine tägliche Sammlung von verendeten Vögeln sowie deren Untersuchung auf HPAI.

Die Bürger werden durch Informationstafeln in den betroffenen Gebieten über die Situation sowie die Verhaltensweisen z.B. beim Auffinden toter Tiere informiert.

3. Bekämpfungsmaßnahmen im Gesetzes- und Verordnungsbereich

Die die Geflügelpest betreffenden Maßnahmen bei Geflügel und Wildvögeln sind in Umsetzung von EU-Recht (insbesondere Geflügelpest-Richtlinie 2005/94/EG sowie EU-Entscheidungen in Bezug auf Biosicherheitsmaßnahmen) derzeit auf fünf Rechtsvorschriften verteilt. Anmerkung: Der Entwurf der Neufassung der Geflügelpest-Verordnung ist dem Bundesrat für eine Verabschiedung am 12.10.2007 zugeleitet worden. Mit der Neufassung der Geflügelpestverordnung werden die im folgenden genannten fünf Rechtsverordnungen in einer Vorschrift zusammengefasst.

Geflügelpest-Verordnung

Mit der Geflügelpest-Verordnung wurden die Richtlinien des Rates 92/40/EWG (Geflügelpest) und 92/66/EWG (Newcastle-Krankheit - ND) in nationales Recht umgesetzt. Die Verordnung ist die Grundlage für alle AI (hochpathogenes und niedrigpathogenes aviäres Influenzavirus) und ND betreffenden Ausbrüche (*für hochpathogenes aviäres Influenzavirus: Definition Verdacht, Seuchenfeststellung, Maßnahmen bei Verdacht bzw. Seuchenfeststellung; Tötungsanordnung, Einrichtung von Sperrbezirk und Beobachtungsgebiet, Kontaktbetriebe, Aufhebung der angeordneten Maßnahmen; Impfung, Maßnahmen in Schlachthöfen und Grenzkontrollstellen; Maßnahmen bei niedrig pathogener aviärer Influenza in Vogelhaltungen*).

Nutzgeflügel-Geflügelpestschutzverordnung

Mit der Nutzgeflügel-Geflügelpestschutzverordnung werden bereits die sich aus der Richtlinie 2005/94/EG ergebenden Maßnahmen bei Feststellung von H5N1 bei Nutzgeflügel umgesetzt. Diese wurden wegen des floriden Geflügelpestgeschehens in Europa von der Kommission mit den Entscheidungen 2006/415/EWG und 2006/416/EWG „vorgezogen“. Mit der Entscheidung 2006/416/EWG werden im Wesentlichen die für den betroffenen Geflügel haltenden Betrieb bei Feststellung von H5N1 geltenden Maßnahmen und mit

der Entscheidung 2006/415/EWG die Maßnahmen, die für die Restriktionszonen gelten, vorgezogen.

Wildvogel-Geflügelpestschutzverordnung

Die Wildvogel-Geflügelpestschutzverordnung dient der Umsetzung der Entscheidung 2006/563/EG, mit der Maßnahmen bei Feststellung von H5N1 bei einem Wildvogel implementiert wurden (die Geflügelpest-Richtlinie enthält keine Maßregeln bei Feststellung von H5N1 bei einem Wildvogel). Die Entscheidung/Verordnung sieht im Wesentlichen Maßnahmen im Sperrbezirk und im Beobachtungsgebiet vor (Verbringungsverbote für Nutzgeflügel und von ihnen stammenden Erzeugnissen), sieht aber gleichzeitig auch die Möglichkeit vor angemessen zu reagieren, indem die Größe von Sperrbezirk und Beobachtungsgebiet sowohl in Bezug auf die Größe als auch in Bezug auf die Maßnahmen variiert bzw. auf deren Einrichtung ganz verzichtet werden kann.

Geflügelpestschutzverordnung

Die Geflügelpestschutzverordnung enthält sog. „Biosicherheitsmaßnahmen“ und basiert im Wesentlichen auf der Entscheidung 2005/731/EG (Verbot der Jagd mit Lockvögeln (mit Ausnahmen), Jagdausübungsberechtigte haben gehäuftes Auftreten kranker oder verendeter Wildvögel anzuzeigen, Verbot der Fütterung und Tränkung von Geflügel außerhalb des Stalles, Reglementierung der Durchführung von Geflügelausstellungen, Geflügelmärkten etc, Ermächtigung Vögel in Zoologischen Gärten zu impfen).

Geflügel-Aufstallungsverordnung

Die Geflügel-Aufstallungsverordnung sieht die grundsätzliche Aufstallung von Geflügel in geschlossenen Ställen oder unter einer überstehenden, nach oben gegen Einträge gesicherten dichten Abdeckung und einer gesicherten Seitenbegrenzung vor; Ausnahmen sind möglich. Zudem sieht die Verordnung Untersuchungspflichten vor für die Fälle, in denen Ausnahmen erteilt worden sind.

4. Weitere Maßnahmen

I. Monitoring bei Wildvögeln

Im Jahre 2006 wurde das hochpathogene aviäre Influenzavirus (HPAIV) des Subtyps H5N1 in 344 Fällen nachgewiesen. Insgesamt wurden 69.136 Proben von Wildvögeln entnommen.

Von 13.979 im Zeitraum 01.01. und 22.08.2007 (Stichtag) entnommenen Proben wurde in 329 Fällen HPAIV H5N1 nachgewiesen. Details ergeben sich aus nachstehender Tabelle.

	davon in Vogeluntergruppen								ge- samt
	Schwä- ne ¹	Wild- gänse ²	Wild- enten ³	Greif- vögel ⁴	Eulen	Lappen- taucher ⁵	Wat- vögel ⁶	An- dere	
Proben- anzahl	1807	3328	2764	780	323	378	1275	3324	13979
HPAIV H5N1 positiv (TSN)**	22	2	7	0	0	294	0	4	329

1) Schwäne: u. a. Zwerg-, Sing-, Höckerschwäne; 2) Wildgänse: u. a. Grau-, Saat-, Bleiß- Kanadagans;
3) Wildenten: u. a. Stock-, Krick-, Schnatterente; 4) Greifvögel: u. a. Mäusebussard, Turmfalke, Sperber; 5)
Lappentaucher: u. a. Hauben- und Schwarzhalstaucher 6) Watvögel: u. a. Lach-, Silber-, Sturmmöwe,
Schnepfenvögel; *) Monitoringergebnisse für den Monat August noch nicht vollständig verfügbar auf Grund der
Meldefristen; **) gemeldet als Fälle im Tierseuchennachrichtensystem (TSN)

Die o. g. Daten für das Jahr 2007 entstammen der nationalen Wildvogeldatenbank. Von den 13.979 Proben sind 4.930 von toten und/oder erkrankten Tieren erhoben worden; die weiteren 9.049 wurden als Kotproben oder von lebenden Tieren entnommen.

II. Forschungs-Sofortprogramm-Influenza (FSI)

Aufteilung der Mittel:

Die dem FSI zu Verfügung stehenden Mittel sind zu gleichen Teilen zwischen dem Friedrich-Loeffler-Institut, dem Robert-Koch-Institut und dem Paul-Ehrlich-Institut aufgeteilt. (FSI wurde am 22.3.2006 von der Bundesregierung beschlossen.)

Stand des FSI

Der beigefügte Bericht des Friedrich-Loeffler-Instituts (Anlage 2, Stand 05.07.2007) enthält Angaben zu den wissenschaftlichen Fragestellungen und dem erreichten Forschungsstand der einzelnen Projekte im Rahmen des FSI.

Impfstudie

Hinsichtlich der Pilotstudie über die Durchführung einer Aviären Influenzavirus (AIV) Subtyp H5 Feld-Impfstudie in drei Geflügelbeständen in Nordrhein-Westfalen (Stand: 30.07.2007) ist folgendes festzuhalten:

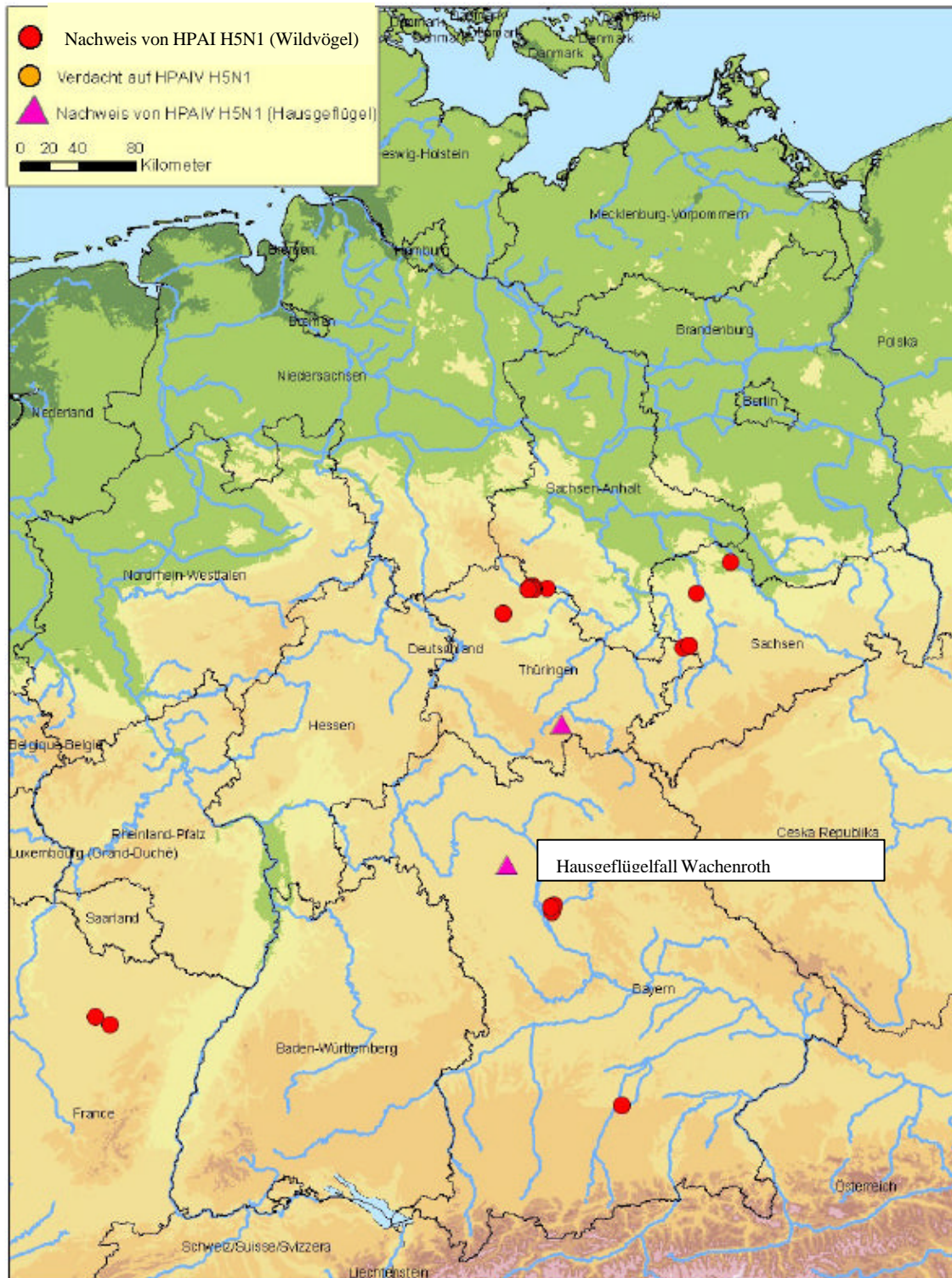
Nach Einholung aller erforderlichen Genehmigungen und Abschluss entsprechender Verträge konnte im November 2006 mit den Impfungen der Legehennen die Pilotstudie zum Einsatz kommerziell erhältlicher AIV H5-Impfstoffe gestartet werden. Die zu impfenden Legehennen,

Gänse und Enten wurden mit zwei Impfungen im Abstand von 4 Wochen grundimmunisiert. Ein Teil der Legehennen und Gänse wurde nach Ablauf von sechs Monaten revakziniert. Vor und in definierten Abständen nach den Impfungen wurden Blut- und Tupferproben von geimpften und ungeimpften Tieren entnommen und serologisch sowie virologisch untersucht. Bei nahezu allen bisher untersuchten Proben der geimpften Tiere konnte eine Reaktion auf die Impfung anhand vorhandener Antikörper gegen den Impfstoff nachgewiesen werden.

Bis zum Berichtszeitpunkt wurden sieben der insgesamt zwölf im Projektzeitraum vorgesehenen Belastungsversuche durchgeführt. Bei den Legehennen zeigte sich nach Abschluss der bisher drei durchgeführten Belastungsversuche, dass eine einmalige Impfung nicht ausreicht, um die Tiere vor einer Erkrankung durch HPAIV zu schützen. Nach der zweiten Impfung sind die Tiere zwar vor Erkrankung geschützt, scheiden jedoch zum Teil weiter Virus aus, das auf ungeimpfte Tiere übertragen wird und zum Tode führt. Gänse sind bereits nach einer Impfung vor klinischer Erkrankung geschützt, scheiden jedoch ebenfalls weiter Virus aus, das nach den bisherigen Ergebnissen auf ungeimpfte Kontakttiere übertragen werden kann. Geimpfte und auch ungeimpfte Enten erkrankten im bisher durchgeführten Belastungsversuch nicht klinisch. Über eine Virusausscheidung dieser Tiere kann aufgrund laufender Untersuchungen bisher keine Aussage gemacht werden.

Die bisher erzielten Versuchsergebnisse bestätigen die Bedeutung einer Überprüfung des Einsatzes inaktivierter H5-Impfstoffe in konventionellen Geflügelhaltungen, da die erzielten Ergebnisse teilweise von den unter Laborbedingungen gewonnenen Erkenntnissen abweichen. Das gewählte Konzept der Überprüfung sowohl der Ausscheidung von Virus als auch der möglichen Übertragung auf ungeimpfte Kontakttiere im Belastungsversuch hat sich bewährt und ermöglicht praxisrelevante Aussagen. Aus den noch folgenden im Projektplan vorgesehenen Arbeiten werden weitere Erkenntnisse hinsichtlich des Effekts einer Revakziniierung auf die Virusausscheidung im Belastungsversuch sowie zur Effektivität der Impfung im Einsatz bei Mastenten erwartet.

Lokalisation von Ausbruchs- und Verdachtsfällen von aviärem Influenzavirus des Typs H5N1 in Deutschland



Forschungs-Sofort-Programm Influenza

Inflenzaviren sind als Krankheitserreger bei Tier und Mensch seit langem bekannt. Wildvögel stellen ein natürliches Reservoir für alle Inflenzaviren dar, aus dem sporadisch und unvorhersehbar Inflenzaviren auf andere Wirte, so z.B. Nutzgeflügel, oder auf Säugetiere wie z.B. Schweine oder den Menschen, übergehen können. Erst in diesen Spezies kann es dann zum Ausbruch von schwerwiegenden Erkrankungen kommen, die als räumlich begrenzte Epidemien und umfassende Pandemien bedeutende Ausmaße annehmen können. Diese ständige Bedrohung wurde in den letzten Wochen, Monaten und Jahren durch die geographische Ausbreitung des Inflenzavirustyps H5N1 von Südostasien bis nach Mitteleuropa und Afrika auch einer breiteren Öffentlichkeit bewusst. Gleichzeitig wurde deutlich, dass trotz jahrzehntelanger Forschung große Lücken bestehen hinsichtlich der Biologie und Ökologie der Inflenzaviren, ihrem krankmachenden Potential, der Zahl möglicher Wirte sowie auch der Entwicklung von empfindlichen Schnelltesten zum Vor-Ort-Nachweis der Viren und bei der Bereitstellung adäquater Impfstoffe für Mensch und Tier.

Unter der Federführung der Ressortforschungsinstitute des Bundes werden im Rahmen eines Sofortprogramms (Forschungs-Sofort-Programm Influenza [FSI]) wesentliche Wissenslücken geschlossen werden. Die auf veterinärmedizinische Fragestellungen fokussierte Projekte werden vom Friedrich-Loeffler-Institut (FLI) bearbeitet und konzentrieren sich auf die Bereiche (i) Diagnostik, (ii) Impfstoffentwicklung, (iii) Epidemiologie und (iv) Pathogenese. Zielrichtung ist, die Verbreitung des Virus in der Wildvogelpopulation zu beobachten und einen Eintrag in das Nutzgeflügel zu verhindern, um so eine Exposition des Menschen in Deutschland weitestgehend zu reduzieren. Die Laufzeit der Projekte beträgt im Regelfall 3 Jahre.

Kurzbericht der Projektziele und der bisher erreichten Ergebnisse

(Stand: 05.07.2007)

1 Diagnostik

1.1 Moderne molekulare Diagnostikmethoden

Für den schnellen Nachweis von Infektionen mit AIV (speziell HPAI H5N1) und zur feindiagnostischen Charakterisierung sind moderne molekulardiagnostische Methoden unerlässlich. Die real-time PCR-Technik, die derzeit bereits in großem Umfang am FLI Anwendung findet, hat entscheidende Vorteile in der Routinediagnostik. Für die weitere schnelle und umfassende Charakterisierung von Virusisolaten sind der Einsatz und die Weiterentwicklung zusätzlicher molekulardiagnostischer Methoden jedoch unerlässlich.

1.1.1 Entwicklung und Einsatz der DNA-Chip-Technologie für eine umfassende Inflenzavirus-Diagnostik

Projektleiter: Dr. Bernd Hoffmann, PD. Dr. Martin Beer
Laufzeit: 3 Jahre

Für die ad hoc-Analytik der verschiedenen AIV-Isolate bietet sich besonders die DNA-Chip-Technologie an, da hier parallele Analysen einer Vielzahl von verschiedenen Genomabschnitten möglich sind. In der veterinärmedizinischen Inflenzadiagnostik sollen DNA-Chip-Systeme in folgenden Bereichen entwickelt und eingesetzt werden:

- a) Identifizierung von Influenza A-Viren
- b) Charakterisierung von HA- und NA-Subtypen.
- c) Molekulare Charakterisierung von Isolaten eines aktuellen Seuchengeschehens
- d) Anwendung der DNA-Chip-Technologie zur Analyse von Virulenzmarkern.
- e) Parallele differenzialdiagnostische Abklärung von weiteren, veterinärmedizinisch bedeutsamen Pathogenen.

Bisherige Ergebnisse aus dem Projekt (Stand: 05.07.2007):

- *Vergleichende Analyse von mehr als 2000 HA- und mehr als 3000 NA-Sequenzen*
- *Erstellung von sog. Konsensussequenzen sowie Ableitung von Primern und Sonden*
- *Erstellung einer Primer und Sonden-Datenbank mit mehr als 240 Einträgen*
- *Anlegen eines Stamm-Panels (82 AIV-Stämme unterschiedlicher Ha- und NA-Subtypen) zur Validierung der PCRs und DNA-Chips*
- *Etablierung von zwei unterschiedlichen DNA-Chip-Systemen*
- *Entwicklung von verschiedenen multiplex PCR-Systemen für die Amplifikation von HA- und NA-Genabschnitten aller Subtypen (16x HA und 9xNA)*
- *Entwicklung und Prüfung von ersten Prototyp-DNA-Chips für die Identifizierung und Subtypisierung von Influenza-A-Viren (HA-Chip und NA-Chip)*
- *Analyse aktueller Isolate mit den ersten Prototyp-DNA-Chips*

1.1.2 Ultraschnelle Ad-Hoc-Pathotypisierung und Charakterisierung von AIV-Gesamtgenomen

Projektleiter: Dr. Bernd Hoffmann, PD Dr. Martin Beer, Dr. Axel Karger
 Laufzeit: 3 Jahre

AIV-Isolate werden nicht nur verschiedenen Subtypen, sondern auch zwei Pathotypen (niedrig pathogen = LPAI; hoch pathogen = HPAI) zugeordnet. Diese Unterscheidung ist für weitere Maßnahmen relevant, da nur HPAI-Viren Geflügelpest auslösen können und nur die HPAI H5N1 humanpathogenes Potential aufweist. Für AIV ist dabei insbesondere die Spaltstelle des Hämagglutinins entscheidend. Hierzu ist eine Sequenzanalyse des Spaltstellenbereiches notwendig. Für die Analyse anderer Genomabschnitte (z.B. einzelne Aminosäureaustausche, phylogenetische Untersuchungen im Rahmen einer molekularen Epidemiologie), aber auch Interspezies-Transmission, sind zudem schnelle Vergleiche von Gesamtgenomsequenzen unerlässlich. Derzeit sind jedoch sowohl die Spaltstellensequenzierung (1 bis 3 Tage) als auch die Gesamtgenomsequenzierung (7 bis 28 Tage) sehr zeitaufwändig und arbeitsintensiv. Auf Basis der folgenden Techniken soll daher ein vollständiges neues System zur Feincharakterisierung aufgebaut werden, das zudem die DNA-Chip-Technologie sinnvoll ergänzt:

- a) DNS-Sequenzierung mit ultrahohem Durchsatz (ultra-high-throughput DNA sequencing) mit Hilfe der neuen Technik des Genome Sequencer 20 (Roche). Pro Woche kann so ein Durchsatz von etwa 20 AIV-Genomen erreicht werden.
- b) Für die ultraschnelle Bestimmung der Sequenz der HA-Spaltstelle sollen neue Analysetechniken für die Nukleinsäure- und Proteinbestimmung eingesetzt werden. Hierdurch können Spaltstellensequenzen innerhalb von Stunden exakt analysiert und AIV-Isolate pathotypisiert werden.

Bisherige Ergebnisse aus dem Projekt (Stand: 05.07.2007):

- *Inbetriebnahme des Sequenziersystems „Genome Sequencer 20“ (Fa. Roche)*
- *Positive Validierung des Verfahrens und erfolgreiche Sequenzierung erster klonierter viraler Vollängengenome mit hoher Abdeckung*
- *Entwicklung eines Verfahrens zur direkten Sequenzierung von Virusgenomen aus Probenmaterial: cDNA-Synthese und repräsentative Amplifikation viraler Sequenzabschnitte*
- *Erste Validierungsläufe mit direkter Virusgenom-Sequenzierung*

1.2 Optimierung der konventionellen AIV-Diagnostik

1.2.1 AIV-Nachweise: Biochip-Detektion, HAH, Antigen-Schnelltest

Projektleiter: PD Dr. Timm Harder
 Laufzeit: 3 Jahre

Konventionelle Diagnostikmethoden sind als Referenzmethoden bei der Entwicklung neuer Diagnostikverfahren unerlässlich.

Die Subtypisierung von Virusisolaten mittels Hämagglutinations- und Neuraminidase-Hemmungstest erfordern eine möglichst breite Palette monospezifischer Antiseren von jedem H- und N-Subtyp, die laufend aktualisiert werden muss. Das ist auch die Voraussetzung für gezielte Untersuchungen zur Antigenvariation, die in Zukunft beim Einsatz von Impfstoffen an Bedeutung gewinnen werden.

Für die serologische Untersuchung verschiedener Vogel- und Geflügelarten ist die Entwicklung bzw. Prüfung vorhandener ELISA-Tests (speziesunabhängige kompetitive ELISAs, H5- und H7-spezifische Tests) erforderlich. Daher sollen folgende Methoden entwickelt bzw. validiert werden:

- a) Bio-Chip mit monoklonalen Antikörpern als spezies-unabhängiges Detektionssystem zum gleichzeitigen Nachweis von Antikörpern verschiedener Spezifität (HA, NA).
- b) Validierung des Hämagglutinations-Hemmungstests (HAH) für zahlreiche wichtige Vogelarten („Gold-Standardtest“) z.B. auch für Wassergeflügel und Wildvögel.
- c) Schnellmethoden zum einfachen Nachweis von Influenzaantigenen auf der Basis von Immunoassays werden von zahlreichen Herstellern angeboten. Da sie in der Praxis auf großes Interesse stoßen, ist eine eingehende Prüfung der Sensitivität und Spezifität sowie die Erarbeitung von Kriterien bzw. Empfehlungen für ihren Einsatz erforderlich.
- d) Sensitive molekulare Virusdiagnostik, die auch vor Ort in einem betroffenen Bestand eingesetzt werden kann (on-site Diagnostik), kann die Reaktionszeiten zur Einleitung tierseuchenrechtlicher Maßnahmen zum Schutz vor der Geflügelpest erheblich verringern. Verschiedene Systeme dieser Art sind in Entwicklung und werden im Rahmen dieses Projektes auf ihre Eignung geprüft.

Bisherige Ergebnisse aus dem Projekt (Stand: 05.07.2007):

- *Auswahl geeigneter HPAIV-Stämme Quelle für die Proteinexpression*
- *Auswahl geeigneter Biochip-Technologie*
- *Herstellung erster Expressionskonstrukte für die Subtypen H5 und H7*
- *Expression von H5 und H7 in verschiedenen Systeme (z. B. Baculovirus) und Proteinreinigung*
- *Herstellung von Expressionskonstrukten mit zusätzlichen stabilisierenden Chaperon-Bestandteilen*

- *Charakterisierung der Expressionskonstrukte für die Anwendung im Biochip*
- *Evaluierung konfektionierter LAMP-Testkits (H5, H7) als on-site Diagnostikverfahren*

1.2.2 AIV-Nachweise: Sensitive rekombinante Zellkultursysteme

Projektleiter: PD Dr. Timm Harder
 Laufzeit: 3 Jahre

Die Arbeit mit Influenzaviren wird wesentlich durch den Umstand erschwert, dass niedrig-pathogene Subtypen sich nicht kontinuierlich in Zellkulturen vermehren lassen. Virusisolierungen und Massenvermehrungen (Impfstoffproduktion) müssen weiterhin in embryonierten Hühnereiern durchgeführt werden, was teuer und zeitaufwändig ist. Um Zellkulturen permissiv auch für niedrig-pathogene Influenzaviren zu machen, müssen zumindest drei Kriterien berücksichtigt werden:

- a) die Produktion infektiöser Nachkommenvirionen erfordert die endoproteolytische Spaltung des Hämagglutinins
- b) Expression von Sialinsäurerezeptoren verschiedener Typen (SIA alpha 2,3- oder SIA alpha 2,6 Galbeta1-3(4) GLCNAbeta1- bzw. SIA alpha 2,3 Galbeta1-3(4)-Neu5Gc)
- c) Typ-I Interferone hemmen die Replikation von Influenzaviren effektiv.

Basierend auf der Zellkultursammlung des FLI soll die prinzipielle Permissivität verschiedener Zellkulturen von u.a. Schwein, Ente und Schwan geprüft werden. Zellen mit einer Basispermissivität werden mittels Transfektion mit einer sezernierbaren trypsinergen Protease versehen (z.B. human airway-specific protease, enteropeptidase, mast cell tryptase). Nach einer Analyse der Sialorezeptoren der Zelllinie werden ggf. fehlende Sialotransferase ergänzt (etabliertes Verfahren der Fa. Glycotope, Berlin). Verfahren zur endogenen Blockade der Interferonexpression werden zusätzlich geprüft (z.B. RNAi-Technologie, Co-Expression von pestiviralem Npro).

Die resultierende(n) Zelllinien sollen in der Diagnostik (Virusanzucht, Neutralisationstests) den Einsatz embryonierter Hühnereier erübrigen.

Bisherige Ergebnisse aus dem Projekt (Stand: 05.07.2007):

- *Erstellen einer Liste der zu prüfenden Zellkulturen*
- *Auswahl erster Kulturen und in vitro Charakterisierung der Kulturen*
- *Prüfen der Empfänglichkeit mit verschiedenen LPAIV-Stämmen*
- *Auswahl geeigneter Zelllinien für die Herstellung rekombinanter Kulturen*
- *Konstruktion der ersten Expressionsvektoren*
- *Etablierung eines Reportersystems für die Proteaseaktivitätsmessung*
- *Auswahl von Verfahren für die Blockade der Interferonproduktion*

1.3 Referenzmaterialien für die Validierung und Qualitätssicherung der Diagnostik der AIV

Projektleiter: Dr. C. Grund
 Laufzeit: 3 Jahre

Sowohl für die aktuelle Diagnostik als auch für die Entwicklung und Validierung neuer diagnostischer Methoden wird Referenzmaterial (Virusstämme, Virus-RNA, Antiseren) benötigt. Ebenso erfordern die unter epidemiologischen Gesichtspunkten durchzuführenden

Untersuchungen über die Herkunft, Veränderung und Verwandtschaftsbeziehungen von Erregern definiertes Referenzmaterial.

Anzustreben ist eine analog der in der TSE-Forschungsplattform eingerichtete nationale Probenbank. Diese Probenbank für Aviäre Influenza (AI) muss folgende Materialien umfassen:

- a) Virusstämme
 - alle H5N1-Virusisolate von verschiedenen Vogel- und anderen Spezies aus Deutschland und möglichst viele Isolate aus anderen Ländern,
 - AIV-Referenzstämme und Isolate aller H- und N-Subtypen, insbesondere der Subtypen H5 und H7 aus Hausgeflügel und Wildvögeln,
- b) Seren
 - Hyperimmunseren und Infektionsseren von verschiedenen Tierarten gegen AIV H5N1 sowie gegen AIV aller H- und N-Subtypen,
 - Positive und negative Feldseren von möglichst vielen verschiedenen Vogel- und Geflügelarten
- c) monoklonale Antikörper, möglichst gegen alle H- und N-Subtypen
- d) Genom-Proben und umfangreiche Genomsequenzen
- e) Organ- und Abstrichmaterial von infizierten Tieren.

Das Referenzmaterial wird im Rahmen der diagnostischen Tätigkeit des nationalen Referenzlabors, beim Wildvogelmonitoring, durch gezielte Tierexperimente und durch Austausch mit anderen Arbeitsgruppen gewonnen. Voraussetzung für eine breite erfolgreiche Nutzung ist die exakte Charakterisierung, Lagerung und Archivierung des Referenzmaterials mit Hilfe eines Labor-Informations-Management-Systems (LIMS).

Bei Bedarf kann Material in Form von RNA-Genom, inaktivierten Antigenen, replikationsfähigen Virusstämmen und spezifischen Seren an andere Arbeitsgruppen oder Einrichtungen abgegeben werden (Lagerhaltung, LIMS, Plattform zur Probenverteilung).

Sind in anderen Einrichtungen die veterinärhygienischen und sicherheitstechnischen Voraussetzungen für die Arbeit mit vermehrungsfähigen HP AIV nicht gegeben, können auch bestimmte Fragestellungen in Kooperation im FLI bearbeitet werden, wie z.B. die Prüfung und Validierung von Nachweismethoden für HPAIV.

Bisherige Ergebnisse aus dem Projekt (Stand: 05.07.2007):

- *Datensammlung zu vorhandenen Referenzstämmen und Seren des FLI*
- *Auswahl geeigneter Stämme für die Herstellung von Referenzmaterial (z. B. H5, H7, H6, H2)*
- *Herstellung von Referenzmaterial in größerer Menge (z. B. mehr als 2 Liter inaktivierte Virussuspension aus mehr als 1000 beimpften Hühnereiern), für 24 verschiedene AIV, insbesondere der Subtypen H5 und H7*
- *Immunisierung von versch. Spezies für die Gewinnung von Anti-Seren*
- *Erste Antiseren aus immunisierten Hühner gegen AIV der Subtypen H5N1, H6N2, H8N4, H1N1, H14N5, H11N6 und H16N3*
- *Charakterisierung der jeweiligen Referenzvirus bzw. Serumchargen*
- *Erstellen einer Datenbank- und Lagerstruktur für Referenzmaterialien*

1.4 Spezifische und sensitive Markerdiagnostik

1.4.1 Entwicklung einer DIVA-Diagnostik

Projektleiter: PD Dr. Martin Beer
Laufzeit: 3 Jahre

Zur Umsetzung eines DIVA (*differentiating infected from vaccinated animals*)-Impfkonzeptes bedarf es neben dem markierten Impfstoff auch der Möglichkeiten, serologische Reaktionen der Impflinge unter Ausnutzung des Markerprinzips detektieren zu können. Bezüglich einer Impfung gegen die Geflügelpest sind drei Strategien denkbar:

- a) Detektion Neuraminidase (NA)-spezifischer Antikörper beim Einsatz von NA-disparaten, inaktivierten Vollvirusimpfstoffen (z.B. Feldvirus H5N1, Impfstoff N5N9)
- b) Detektion von NP- oder M2-spezifischen Antikörpern beim Einsatz von Subunit-Vakzinen, die keine NP-Proteine besitzen (z.B. rekombinante HA/NA-Proteine, Vektorvakzinen [NDV, FPV], DNA/RNA-Vakzinen)
- c) Detektion von NS-1-spezifischen Antikörpern beim Einsatz von gereinigten Vollvirus- oder Subunit-Vakzinen.

Beim Aufbau einer Markerdiagnostik beim Geflügel wirkt sich das große Artenspektrum problematisch aus. Dies wird noch verschärft, wenn auch Impfungen bei Zoovögeln berücksichtigt werden. Daher ist geplant, bevorzugt Testformate zu entwickeln, die auf dem Prinzip des kompetitiven ELISAs beruhen und damit eine artunabhängige Antikörperdetektion möglich machen.

Voraussetzung zur Etablierung solcher Tests ist die Produktion immunogener rekombinanter Proteine sowie die Herstellung kompetitierender monoklonaler Antikörper gegen diese Zielantigene. In der aufwändigen Validierungsphase sind hochspezifische und gut dokumentierte Referenzseren sowie eine adäquate statistische Unterstützung ebenso wie die Erprobung unter Feldbedingungen erforderlich.

Bisherige Ergebnisse aus dem Projekt (Stand: 05.07.2007):

- *Auswahl von Proteinen für die DIVA-Technologie (NP, NS1, NA)*
- *Auswahl geeigneter AIV-Donorstämme für die Proteinexpression*
- *Expression von NS1, NP und N1 in verschiedenen Expressionssystemen (Baculovirus, Sindbis Virus)*
- *Charakterisierung der rekombinanten Viren sowie der Expressionsprodukte*
- *Aufbau erster indirekter ELISA-Systeme mit den ausgewählten rekombinanten Proteinen*
- *Erstellen eines Serumpanel für die Prüfung von DIVA-Tests (negative Seren, Seren infizierter Tiere, Seren geimpfter Tiere, Seren geimpfter und dann infizierter Tiere)*

1.4.2 Herstellung monoklonaler Antikörper zur serologischen Diagnostik

Projektleiter: Dr. Malte Dauber
Laufzeit: 3 Jahre

Die Influenzaviren werden serologisch in 16 antigene Subtypen des Oberflächenproteins Hämagglutinin (HA 1-16) und 9 antigene Neuraminidasesubtypen (N1-N9) unterschieden. Diese können neben den anderen sechs Segmenten des Influenzavirus frei reassortieren und damit neue Viren generieren. Beim Geflügel sind es bisher die Subtypen H5 und H7, die zu hoch pathogenen Varianten mutieren können. Eine Unterscheidung der einzelnen HA-spezifischen Antikörper voneinander ist derzeit nur durch den Hämagglutinations-Hemmungstest (HAH) möglich. Der Test erfordert die ständige Bereitstellung von

Geflügelerythrozyten und entsprechenden spezifischen Antigenen (H1-16) und Antiseren (anti-H1-16). Ziel des Projektes ist die Generierung von monoklonalen Antikörpern, die eine serologische Zuordnung zum jeweiligen Subtyp mittels eines Spezies-unabhängigen ELISA-Verfahrens ermöglicht. Darüber hinaus können Subtypisierungen automatisiert werden und so bei großen Probenzahlen (z.B. Wildtiermonitoring) angewendet werden. Ein weiterer wichtiger Aspekt ist auch die Bestimmung des Neuraminidase-Subtyps. Bisher erfolgt das Prüfen auf Neuraminidase-spezifische Antikörper mit sehr aufwändigen Testen.

Es sollen ebenfalls monoklonale Antikörper etabliert werden, die den jeweiligen Subtyp (N1-N9) spezifisch erkennen. Diese Antikörper sollen dann ebenfalls auf ihre Eignung in Spezies-unabhängigen Tests untersucht werden. Diese NA-Antikörper sollen auch auf ihre Eignung für den Einsatz in einer Markervakzine unter Nutzung der DIVA-Strategie untersucht werden. Die generierten Antikörper sind ebenfalls Voraussetzung für die Entwicklung eines BioChip.

Bisherige Ergebnisse aus dem Projekt (Stand: 05.07.2007):

- *Auswahl und Vermehrung geeigneter aviärer Influenzaviren für die Immunisierung von Mäusen zur Generierung monoklonaler Antikörper (H5N1, H5N2, H5N3, H7N1, H5N6, H1N1)*
- *Herstellung, Reinigung und Konzentrierung von Virussuspensionen (z. B. H5N1, H5N2, H5N3, H5N6, H7N1)*
- *Immunisierung von Mäusen mit den ersten Viruspräparationen (3 verschiedene Gruppen)*
- *Erste Zellfusionen zur Generierung AIV-spezifischer monoklonaler Antikörper (Subtyp H5-immunisierter Mäuse)*

2. Impfstoffentwicklung

2.1 Entwicklung viraler Vektorvakzinen/Markervakzinen

Projektleiter: Dr. Angela Römer-Oberdörfer, Dr. Jutta Veits
Laufzeit: 3 Jahre

Verfügbare inaktivierte Impfstoffe gegen Geflügelpest beim Nutzgeflügel haben zahlreiche Nachteile, u.a. die Notwendigkeit zur individuellen Applikation und das Fehlen eines praktikablen Systems zur Differenzierung von infizierten und geimpften Tieren. Zur Bekämpfung der Infektiösen Laryngotracheitis (ILT) und der "Newcastle Disease" (ND) des Geflügels werden seit langem abgeschwächte ILT- bzw. ND-Lebendvirusimpfstoffe eingesetzt, die für eine Massenapplikation über Aerosol oder Trinkwasser geeignet sind. Zur Nutzung als Geflügelpestimpfstoffe werden die Hämagglutinin- (und Neuraminidase-)Gene verschiedener hoch pathogener aviärer Influenzaviren (HPAIV) an verschiedenen Stellen in die Genome von ILTV und NDV inseriert und Hühner mit den erhaltenen H5- bzw. H7-exprimierenden Virusmutanten immunisiert und belastungsinfiziert. Darüber hinaus erlauben die Vektorvakzinen eine serologische Unterscheidung geimpfter und Influenzavirus-infizierter Tiere (DIVA-Prinzip). Im Rahmen des Projekts werden auch in Zusammenarbeit mit anderen wissenschaftlichen Einrichtungen (u.a. PEI) und Industrieunternehmen (u.a. Creatogen) neu entwickelte bzw. in der Entwicklung befindliche Markerimpfstoffe gegen HPAIV vergleichend mit den Eigenentwicklungen getestet. Das FLI ist derzeit die einzige Stelle in Deutschland, wo entsprechende Belastungsinfektionen mit HPAIV H5N1 Asia in relevanten Zielspezies (Huhn, Ente, Gans, Pute) durchgeführt werden können.

Bisherige Ergebnisse aus dem Projekt (Stand: 05.07.2007):

- *Es wurden ILTV-Rekombinanten generiert, die das AIV H5- bzw. das AIV N1-Gen tragen*
- *Zurzeit wird die Fremdgenexpression dieser rekombinanten Viren geprüft.*

- Weiterhin wird mittels reverser Genetik an der Insertion der AIV Hämagglutinine H4, H6 bzw. H9 in das NDV-Genom gearbeitet
- NDV-Rekombinanten mit Insertion der AIV H5 bzw. N1-Gene in der intergenen Region zwischen den NDV-F und –HN Genen konnten bereits generiert werden
- Weitere NDV-Rekombinanten mit Insertion der AIV H5 bzw. AIV N1-Gene in alternativen NDV-Genomlokalisationen sind in Arbeit.

2.2 Pilotstudie zum Einsatz kommerziell erhältlicher AIV H5-Impfstoffe

Projektleiter: PD Dr. Timm Harder

Laufzeit: 2 Jahre

Derzeit sind inaktivierte H5-Vollvirusvakzinen die einzige kurzfristig zur Verfügung stehende Möglichkeit zur Prophylaxe gegen H5N1-Infektionen beim Hausgeflügel. Diese Vakzinen zeigen zwar im Experiment mit geringen Tierzahlen und bei Verwendung von SPF-Tieren eine akzeptable Wirksamkeit gegen Belastungsinfektionen. Erfahrungen aus dem Feld (z.B. Italien, Mexiko) lassen jedoch erhebliche Probleme beim Einsatz in großen Tierbeständen vermuten. Hierzu fehlen allerdings wissenschaftlich belegte Daten.

Für eine umfassende Einschätzung der Wirksamkeit der vorhandenen, inaktivierten Vollvirusvakzinen soll daher eine Pilotstudie in ausgewählten Betrieben mit Enten, Gänsen und Hühnern durchgeführt werden. Hierzu werden die Tiere unter Feldbedingungen immunisiert und danach serologisch untersucht. Die Schutzwirkung wird anhand einer am FLI durchgeführten Belastungsinfektion zufällig ausgewählter Tiere überprüft.

Die Pilotstudie stellt die Basis für eine weitere Bewertung der Impfung mit konventionellen inaktivierten AIV H5- und H7-Vakzinen dar. Diese Ergebnisse werden durch Untersuchungen (Serologie und Virologie) an geimpften Zootieren (verschiedene Spezies, unterschiedliche Zeitpunkte nach der Impfung) ergänzt.

Bisherige Ergebnisse aus dem Projekt (Stand: 05.07.2007):

- *Auswahl geeigneter Bestände*
- *Auswahl des Impfstoffes (H5N1)*
- *Massenimmunisierung der Hühner, Enten und Gänse*
- *Analyse der Serokonversion und erste Testinfektionen mit H5N1/Asia sind abgeschlossen*
- *Vorläufige Ergebnisse zeigen, dass eine einmalige Immunisierung nicht alle Tiere klinisch vor HPAIV H5N1 schützen konnte.*
- *Vorläufige Ergebnisse zeigen, dass eine zweimalige Immunisierung guten klinischen Schutz bietet, aber dennoch (z. B. im Versuch mit geimpften Hühnern) Infektionsvirus vom Typ H5N1/Asia ausgeschieden und an naive Kontaktiere weitergegeben wurde.*

2.3 Entwicklung einer Subunit- und inaktivierten Vollvirus-Vakzine zur Immunisierung von Katzen gegen eine Influenza H5N1-Infektion

Projektleiter: PD Dr. Dr. Thomas W. Vahlenkamp

Laufzeit: 1 Jahr

Katzen lassen sich mit HPAI H5N1 Asia infizieren. Ein Impfstoff soll hier insbesondere der Minimierung des potentiellen Übertragungsriskos des Virus von Katzen auf den Menschen dienen. In einem Pilotversuch soll die grundsätzliche Möglichkeit einer Immunisierung von Katzen gegen eine H5N1-Infektion geprüft werden. Hierfür werden zwei inaktivierte Impfstoffe auf der Basis des aus einer rüganer Katze isolierten H5N1-Virus hergestellt und

auf ihre Wirksamkeit getestet. Drei Gruppen von je 5 Katzen (zwei Impfstoffpräparationen [Subunit, Vollvirus] plus negative Kontrollgruppe) werden in die Wirksamkeitsprüfung einbezogen. Eine weitere Gruppe nicht immunisierter Katzen wird für die Übertragungsexperimente benötigt. Nach zweimaliger Immunisierung im Abstand von je drei Wochen wird die Wirksamkeit der Impfung durch Belastungsinfektion der Tiere mit dem hochpathogenen aviären H5N1-Virus getestet. Hierbei wird neben der Immunantwort und klinischen Symptomen insbesondere die Virusausscheidung quantitativ ermittelt. Darüber hinaus wird ebenfalls die Übertragung der Infektion von immunisierten Katzen nach Belastungsinfektion auf nicht infizierte Tiere untersucht.

Bisherige Ergebnisse aus dem Projekt (Stand: 05.07.2007):

- *Infektion von Katzen mit unterschiedlichen Virusmengen zur Festlegung der Dosis für die Impfversuche*
- *Untersuchung von Blut-, Organ- und Tupferproben zur Bestimmung der Ausscheidungswege und der Menge an ausgeschiedenem infektiösem Virus*
- *Infektion von Katzen durch unterschiedliche Applikation des Virus, um die Empfänglichkeit der Tiere über den Gastrointestinaltrakt zu untersuchen*
- *Herstellung einer subtyp-spezifischen inaktivierten Vakzine*
- *Immunisierung von Katzen mit der inaktivierten subtyp-spezifischen Vakzine*
- *Messung der spezifischen Antikörperantwort gegen das Impfvirus und das zur Belastung zu verwendende HPAI H5N1 Virus.*

3. Epidemiologie

3.1 Serologische Untersuchungen zur Empfänglichkeit von ausgewählten Vogelspezies und Säugetieren in natürlichen Ausbruchsgebieten der aviären Influenza H5N1-Infektion

Projektleiterin: Dr. Anja Globig

Laufzeit: 1 Jahr, Projekt abgeschlossen

Die Infektion von Wildvögeln mit dem HPAIV H5N1 in Europa bietet momentan eine besondere Möglichkeit, die Empfänglichkeit und Verbreitung des Erregers unter den verschiedenen Vogel- und Säugetierspezies in den natürlichen Ausbruchsgebieten durch gezielte serologische Felduntersuchungen zu untersuchen.

Neben Untersuchungen verschiedener Wild- und Wasservogelarten auf das Vorhandensein von Antikörpern gegen das HPAIV H5N1 werden auch Säugetiere untersucht. Dies soll somit auch Aufschluss über mögliche Übertragungswege geben sowie eine Expositionsabschätzung erlauben. Bei den Säugetieren werden insbesondere Blutproben von Tierarten innerhalb der Felidae und Mustelidae (Katzen- und Marderartige) sowie ausgewählte Spezies (Fuchs, Wildschwein, Maus, Ratte) untersucht. Neben verschiedenen Wasservögeln sollen in den Ausbruchsgebieten in Deutschland insbesondere Proben von Aasfressern (Greif- und Rabenvögel) analysiert werden. Der Nachweis H5N1-spezifischer Antikörper erfolgt durch ein kompetitives ELISA-System, welches die speziesunabhängige Detektion ermöglicht. Die Seren sollen Eingang in eine zu errichtende Datenbank finden.

Bisherige Ergebnisse aus dem Projekt (Stand: 05.07.2007):

- *Etablierung von Fangmöglichkeiten von Wildvögeln auf der Insel Rügen*
- *Zusammenarbeit mit dem LALLF in Mecklenburg-Vorpommern*
- *Untersuchung von mehr als 2902 Proben von 92 Vogelarten sowie Proben von 142 Katzen, 1 Steimarder und 4 Igel*

- *Es wurden 10 Proben mit positiver AIV-PCR nachgewiesen. Ein AIV H5 Virus wurde dabei nicht festgestellt. Die folgenden AIV konnten angezüchtet werden: H16N2, H13N8.*
- *Es wurden in insgesamt in 14 Proben von Möwen und Höckerschwänen AIV-Antikörper nachgewiesen*
- *Serologische Hinweise auf einen Kontakt mit AIV der Subtypen H5 konnten für das Serumprobenkontingent nicht gewonnen werden.*
- *keinerlei Hinweise, dass sich das hochpathogene aviäre Influenzavirus H5N1 Asia in der Wildvogel- oder Säugetierpopulation auf Rügen etabliert hat.*

3.2 Erstellung einer Datenbank zur epidemiologischen Analyse des AIV-Geschehens in Wildvögeln in Deutschland

Projektleiter: PD Dr. Franz J. Conraths
 Laufzeit: Aufbau 3 Jahre, danach fortlaufend

Da sich die H5N1-Infektion bei Wildvögeln einer Beeinflussung durch den Menschen weitgehend entzieht, kommt einem Monitoring in den Wildvogelpopulationen eine besondere Bedeutung bei. Die dabei erhaltenen Daten müssen bundesweit gesammelt und epidemiologisch analysiert werden. Zu diesem Zweck ist eine Datenbank zu erstellen, in welche für jedes einzelne beprobte Tier die Tierart, Datum, Ort der Probenahme, Befunde (positive und negative Testergebnisse) und Diagnosemethode eingehen. In die Beprobung sind auch Tierarten einzubeziehen, die im Rahmen des regulären Monitoring nicht erfasst werden (seltene Entenarten; Nutzung des so genannten „Beifangs“ von Wildvögeln in der Küstenfischerei).

Der Verlauf der Ausbreitung und das betroffene Artenspektrum unter den Wildvögeln und anderen betroffenen Tieren ist epidemiologisch zu untersuchen. Um zuverlässige epidemiologische Kenngrößen (z.B. Schätzung von Prävalenz und Inzidenz) und potenzielle Risikofaktoren analysieren zu können, müssen die Ergebnisse aller beprobten Tiere in einem standardisierten Format in einer Datenbank dokumentiert werden. Die Daten werden dann mathematisch-statistisch untersucht, das Verhalten der Infektion in Raum und Zeit ermittelt und visualisiert (zum Beispiel durch Kartographie). Anhand der jeweiligen Stichprobenumfänge (Anzahl der beprobten Tiere pro Tierart) ist die Genauigkeit der Schätzungen zu bestimmen. Mathematische Modelle, die helfen können, den weiteren Verlauf der Infektion bei Wildtieren zu prognostizieren, werden mit den Daten aus dem Wildvogelmonitoring erstellt.

Bisherige Ergebnisse aus dem Projekt (Stand: 05.07.2007):

- *In Deutschland wurde in Zusammenarbeit den Bundesländern und Ornithologen ein Untersuchungsprogramm zum Wildvogelmonitoring bezüglich des Auftretens aviärer Influenzaviren erstellt und die Beprobungs- und Untersuchungsaufgaben auf die Länder verteilt*
- *Durchführung von Flächenmonitoring (Vögel verschiedener Arten, insbesondere solche, die als besonders exponiert oder empfänglich für aviäre Influenzaviren angesehen werden, um flächendeckend das geographische Vorkommen aviärer Influenzaviren einschätzen zu können) sowie Punktmonitoring (Gebiete, in denen hochpathogene Influenzaviren nachgewiesen worden sind, Beprobung eines breiten Artenspektrum, um die Verbreitung unter einer Bandbreite von Wildvogel- Arten bewerten zu können*
- *Beprobung toter und erkrankter Tiere sowie klinisch gesunder Wildvögel*
- *Genauere ornithologische Klassifizierung und eine Georeferenzierung auf Gemeindeebene*

3.3 Beteiligung an internationalen Vorhaben zur Tierseuchenbekämpfung (darunter Wildtiermonitoring)

Projektleiter: Prof. Dr. Th. C. Mettenleiter
Laufzeit: Aufbau 3 Jahre, danach fortlaufend

Innerhalb weniger Monate hat sich HPAI H5N1 über Eurasien und bis nach Nord- und Westafrika ausgebreitet. Es sind auch Länder betroffen, in denen Zugvögel, die in Deutschland überwintern, ihre Brutgebiete haben oder überwintern. Darüber hinaus wurden Infektionen in Ländern nachgewiesen (vor allem auf dem afrikanischen Kontinent), in denen Zugvögel überwintern, deren Brutgebiete in Deutschland liegen. Viele dieser Länder können aus eigener Kraft kein adäquates Wildvogelmonitoring unterhalten. Um hier Abhilfe zu schaffen, soll in enger Kooperation mit internationalen Organisationen (FAO, OIE) eine epidemiologische Task Force etabliert werden, die speziell für Einsätze im internationalen Rahmen geschult und ausgerüstet wird.

Bisherige Ergebnisse aus dem Projekt (Stand: 05.07.2007):

- *Seit Februar ist internationale Einsatzgruppe einsatzbereit und bereits in mehreren internationalen Einsätzen aktiv gewesen*
- *Durchführung einer Trainings-Maßnahme zur Diagnostik der Aviären Influenza in Senegal für Mediziner und Veterinäre aus Nord- und Westafrika durchgeführt, in Zusammenarbeit mit ILRI-Nairobi und gefördert durch gtz.*
- *In Zusammenarbeit mit CIRAD-Frankreich und RVC-Großbritannien ist ein FAO-Projekt in Vorbereitung, welches die Risikofaktoren der Aviären Influenza in betroffenen afrikanischen Ländern untersuchen soll. Im Rahmen der Vorbereitung sind zwei Experten nach Kairo, Ägypten und Montpellier, Frankreich gereist.*
- *Zurzeit halten sich zwei weitere Mitglieder der Gruppe in Ghana auf, um Trainingsmaßnahmen zur Diagnostik, Überwachung und Bekämpfung der AI durchzuführen. Die gtz finanziert auch diese Maßnahme.*
- *Weitere Einsätze zur Weiterbildung im Rahmen der Vogelgrippe-Bekämpfung sind in Zusammenarbeit mit gtz in Burkina Faso, Togo, Madagaskar und Mauritius im Gespräch.*

3.4 Erstellung von Datenbanken zum serologischen Monitoring bei Wildvögeln

Projektleiter: PD Dr. Franz J. Conraths
Laufzeit: 2 Jahre

Bisher wurde HPAI H5N1 nur bei toten Tieren in Deutschland gefunden. Befunde aus Asien zeigen jedoch, dass lebende Tiere (z.B. bestimmte Entenarten, Feldsperlinge) das Virus beherbergen können. Bei lebenden Schwänen, die in Kroatien untersucht wurden, ergaben sich Hinweise auf das Vorhandensein von Antikörpern gegen H5N1-Virus. Das Vorkommen von lebenden, seropositiven Tieren muss als Hinweis darauf gewertet werden, dass sich das Virus in der Wildvogelpopulation etabliert und die Infektion nicht bei allen betroffenen Tieren letal verläuft.

Es ist daher erforderlich, das Wildvogelmonitoring auf serologische Untersuchungen von toten, kranken und dem Anschein nach gesunden Vögeln auszudehnen, um eine Etablierung der Infektion in Teilen der Wildvogelpopulation (ggf. in bestimmten Arten, z.B. Entenvögeln) frühzeitig erkennen zu können. Voraussetzung für die Durchführung des serologischen Monitorings ist das Vorhandensein validierter serologischer Tests. Die Validierung muss mit Hilfe von geeignetem Referenzmaterial erfolgen, das durch experimentelle Infektionen

hergestellt wird oder im Rahmen des Wildvogelmonitorings gesammelt wird. Geeignete Probenbanken (inklusive einer Datenbank mit exakter Dokumentation) sind zu erstellen.

Bisherige Ergebnisse aus dem Projekt (Stand: 05.07.2007):

- Erstellung einer zentrale Wildvogelmonitoring-Datenbank für die Eingabe und erweiterte Auswertung der erhobenen Daten. Die Datenbank ist seit dem 01. Dezember 2006 im Routinebetrieb.
- Neue umfangreiche Analysemöglichkeiten durch die Tatsache nicht nur positive Befunde berücksichtigt werden, sondern auch die enorme Anzahl an negativen beprobten Tieren (z.B. Stichprobenbeurteilung in Zeit und Raum, Prävalenzschätzungen)
- Den Nutzern in den Veterinär- und Untersuchungsämtern werden online Auswertungsmöglichkeiten in Form von Tabellen, Diagrammen und Karten bereitgestellt

Tabelle: Anzahl untersuchter Wildvögel im Monitoring 2007 (Stand 04.07.2007)

gesamt in 2007	davon in Untergruppen							davon positiv (HPAI- H5N1)
	Schwäne ¹	Wild- gänse ²	Wild- enten ³	Greif- vögel ⁴	Eulen	Tauben	Wat- vögel ⁵	
9643	1446	2812	1743	387	169	74	1087	15*

1) Schwäne: u.a. Zwerg-, Sing-, Höckerschwäne; 2) Wildgänse: u.a. Grau-, Saat-, Bleiß- Kanadagans; 3) Wildenten: u.a. Stock-, Krick-, Schnatterente; 4) Greifvögel: u.a. Mäusebussard, Turmfalke, Sperber; 5) Watvögel: u.a. Lach-, Silber-, Sturmmöwe, Schnepfenvögel; *gemeldet im Tierseuchennachrichtensystem

- Die nationale Wildvogeldatenbank umfasst Daten aus allen Bundesländern, darunter befinden sich alle bisherigen Ausbruchsgebiete.
- 1762 Proben wurden im Jahre 2007 bisher von toten und erkrankten Tieren untersucht. 7608 Proben wurden im aktiven Teil der Überwachung als Kotproben oder als Proben von lebenden Tieren gezogen. Bisher wurden 171 unterschiedliche Vogelarten untersucht.

3.5 Monitoring mit Indikatortieren in Gebieten mit hoher Wasservogeldichte

Projektleiterin: Anja Globig
 Laufzeit: 3 Jahre

In Gebieten, in denen sich während Frühjahrs-, aber vor allem während des Herbstzuges viele wilde Wasservögel sammeln, werden Indikatoranlagen eingerichtet. Diese wurden in der Vorpommerschen Boddenlandschaft (Insel Koos), am Bodensee „Drehscheibe“ des Vogelzugs; Radolfzell) und am Felchower See (Uckermark) errichtet.

Die Anlagen sind so zu gestalten, dass die Indikatortiere in Kontakt mit Wildvögeln kommen. Als Indikatortiere fungieren handzähme Stockenten oder Krickenten (gestutzte Flügel) aus Aufzuchtstationen, die in regelmäßigen Abständen beprobt werden (Tupfer und Blutentnahme). Die Tiere werden im Freiland unter kontrollierten Bedingungen (großes Gehege mit Einflugsmöglichkeit für Wildvögel) gefüttert, beobachtet und in das Vorkommen von wilden Wasservögeln in ihrer Nähe zahlenmäßig und unter exakter Artbestimmung regelmäßig protokolliert. Nach Möglichkeit werden wilde Wasservögel in der Nähe der Anlage eingefangen und beringt bzw. nach Ringen kontrolliert, um eine Aussage über deren Herkunft zu treffen.

Bisherige Ergebnisse aus dem Projekt (Stand: 05.07.2007):

- Auswahl geeigneter Standorte
- Errichtung von drei Sentinelanlagen (Mecklenburg-Vorpommern, Brandenburg, Baden-Württemberg) mit flugunfähigen Wildenten
- 14 tägige Beprobung sowie Analyse der Proben
- Erste Virusnachweise (PCR, Virusisolierung) für LPAIV (auch H5) in den Anlagen in Brandenburg und Mecklenburg-Vorpommern
- Einige Proben in der Virusisolierung AIV- und APMV positiv
- Nachweis der AIV-Serokonversion bei den Sentineltieren in Brandenburg und Mecklenburg-Vorpommern
- Keine AIV-Nachweise bei den Sentineltieren in Baden-Württemberg
- Sentinelanlagen haben sich bisher als Detektionssysteme bewährt
- Erste Studien zum Verlauf der LPAIV-Infektionen in den Sentinelanlagen

3.6 Untersuchungen zur molekularen Epidemiologie in der Wildvogelpopulation

Projektleiterin: Elke Starick

Laufzeit: 3 Jahre

Influenzaviren sind genetisch nicht stabil. Unter dem Selektionsdruck, der sich in einer Wirtspopulation unter anderem durch deren Zusammensetzung (Spektrum der betroffenen Wirtsarten) und durch Umweltfaktoren (z.B. Klima, Temperatur) ergibt, muss mit einer raschen genetischen Anpassung des Virus gerechnet werden. Daten aus Asien zeigen, dass sich in H5N1-infizierten Wildvogelpopulationen genetische Veränderungen vollziehen. Derartige Vorgänge sind auch in Deutschland zu erwarten. Molekularbiologische Untersuchungen, die Veränderungen des Virus aufdecken, sind dringend erforderlich, um Anpassungsvorgänge des Virus an die spezifischen Verhältnisse in Mitteleuropa zu erkennen und um Hinweise auf den Ablauf von Infektketten in den Wildvogel-/ Wildtierpopulationen zu erhalten.

Bisherige Ergebnisse aus dem Projekt (Stand: 05.07.2007):

- Etablierung von Methoden zur schnellen Analyse von AIV-Genomen
- Vollängensequenzierung mehrerer H5N1-Isolate aus dem Jahr 2006 (siehe Weber *et al.*, JGV, 2007)
- Sequenzierung kompletter HA- und NA-Sequenzen von H5N1-Stämmen ($n = 26$) aus verschiedenen Spezies und Lokalisationen in Deutschland
- Phylogenetische Feinanalyse der Sequenzdaten
- Definition von zwei H5N1-Clustern in Deutschland (Nord- und Süd-Klauster; Publikation in Vorbereitung)
- Sequenzanalyse der Stämme der neuen H5N1-Ausbrüche 2007 (siehe Promed-Mail) und Definition eines dritten H5N1-Clusters in Deutschland
- Sammlung von Wildvogelproben aus verschiedenen Ländern zur vergleichenden Analyse

4. Pathogenese

4.1 Untersuchungen zur Empfänglichkeit von ausgewählten Vogelspezies und Säugetieren für das in Deutschland isolierte HPAIV H5N1

Projektleiter: Prof. Dr. Th. C. Mettenleiter, PD Dr. Martin Beer

Laufzeit: 3 Jahre

Das in Deutschland bei Wildvögeln aufgetretene HPAIV H5N1 zeichnet sich durch einen breiten Spezies-Tropismus aus. Unter experimentellen als auch natürlichen Bedingungen werden beispielsweise von infizierten Katzen Virusmengen ausgeschieden, die für die Übertragung der Infektion auf nicht infizierte Kontakttiere ausreichen. Dies wurde bisher bei anderen Influenzaviren nicht beobachtet.

Um mehr Einsicht über die Mechanismen der Virusvermehrung, Zelltropismus, Virusausscheidung, Inkubationsperiode etc. zu gewinnen, sind experimentelle Infektionen notwendig. Da der klinische Verlauf der H5N1-Infektion bei den unterschiedlichen Spezies zwischen asymptomatischer Infektion, milden respiratorischen Erscheinungen und schwerer systemischer Krankheit mit 100% Mortalität variiert, sind detaillierte Untersuchungen für die einzelnen ausgewählten Spezies notwendig. Innerhalb des Wirtschaftsgeflügels werden Untersuchungen insbesondere bei Huhn, Hausente, Hausgans und Pute durchgeführt. Entsprechend ihrer Verfügbarkeit werden ebenfalls Infektionen bei ausgewählten Singvögeln durchgeführt. Innerhalb der Säugetiere werden experimentelle Infektionen bei ausgewählten, für die Virusverbreitung bzw. Übertragung auf den Menschen möglicherweise besonders relevanten Tierspezies durchgeführt, darunter Katzen und Hunde.

Bisherige Ergebnisse aus dem Projekt (Stand: 05.07.2007):

- *Auswahl und Charakterisierung geeigneter H5N1-Stämme (HPAI A/cat/germany/R606/06 für Untersuchungen an Säugetieren und HPAI A/swan/germany/R65/06 für Untersuchungen an Vögeln*
- *Infektionsversuch mit geimpften und ungeimpften Falken*
- *Infektionsversuch (intranasal und intratracheal) mit Rindern*
- *Infektionsversuch mit Puten (Bestimmung der minimalen Infektionsdosis)*
- *Infektionsversuch mit Hunden*

4.2 Untersuchungen zur Pathogenese des hämorrhagischen Syndroms und zum Organotropismus von hochvirulenten H5N1-Isolaten in unterschiedlichen Spezies

Projektleiter: Prof. Dr. Jens P. Teifke
Laufzeit: 3 Jahre

Der klinische Verlauf aviärer Influenzavirusinfektionen im Hausgeflügel variiert zwischen asymptomatischer Infektion, milden respiratorischen Erscheinungen und schwerer systemischer Krankheit mit 100% Mortalität, die sich als hämorrhagische Diathese mit Schock äußert. HPAIV besitzen auch einen ausgeprägten Endotheliotropismus, wobei auch die betroffene Tierart berücksichtigt werden muss.

H5N1 stimuliert die Produktion von TNF-alpha und anderer proinflammatorischer Zytokine und Chemokine in humanen Monozyten und Makrophagen stimuliert. Untersuchungen dieser Art sind bislang beim Geflügel nicht durchgeführt worden. Unsere bisherigen Studien ergaben, dass H7N7 oder H5N1 im Huhn auch zu einer ausgedehnten Infektion von Endothelzellen in allen Organen führten, die schwerwiegende Krankheitsverläufe zur Folge hatten. Im Unterschied dazu war nach Infektion von Tauben mit H5N1 lediglich ein prominenter Neurotropismus des Virus nachzuweisen. Die Gründe hierfür sind bislang völlig unbekannt.

Ausgehend von den Beobachtungen beim aktuellen Seuchengeschehen kann der fulminante Krankheitsverlauf bei Schwänen sowohl durch den Neuro- als auch Endotheliotropismus erklärt werden, während beim infizierten Säuger (Katze) offenbar der Pneumotropismus im Vordergrund steht. Diese Einzelbeobachtungen müssen in unterschiedlichen Vogelspezies (Huhn, Ente, Gans, Schwan) und Säugetierarten (Hausschwein, Wildschwein, Fuchs, Ratte, Maus, Frettchen) überprüft werden, wobei auch Nichtvertebraten wie Anneliden oder Arthropoden als Vektoren berücksichtigt werden sollen.

Bisherige Ergebnisse aus dem Projekt (Stand: 05.07.2007):

- *Weitere pathologische Etablierung unterschiedlicher Infektionsmuster an natürlich und experimentell infizierten Vogelspezies*
- *Präparation von ausgewählten Geweben zur Bestimmung der Viruslast sowie der Zytokin- und Chemokinantwort*
- *Kollektivierung von Zell-Linien für die Etablierung geeigneter Zellkulturuntersuchungen in-vitro*

4.3 Untersuchungen zur Induktion der unspezifischen und spezifischen Immunantwort nach H5N1-Influenzavirus-Infektion

Projektleiter: Prof. Dr. Lothar Stitz

Laufzeit: 3 Jahre

Virusinfektionen führen zur Induktion einer frühzeitigen unspezifischen zellulären Abwehrreaktion durch NK-Zellen und einer darauf folgenden spezifischen Immunantwort durch T-Zellen. Ziel dieses Projektes ist die Charakterisierung der Immunantwort nach Infektion mit H5N1-Influenzaviren, um durch eine spezifische Stimulation des Immunsystems eine Beschleunigung der antiviralen Immunantwort und damit eine Reduktion des Virustiters in der Lunge oder gar eine Elimination des Virus erreichen zu können.

Hierzu soll in ausgewählten Tiermodellen die Kinetik und Spezifität der antiviralen zellulären Immunreaktion nach Isolierung der entsprechenden Effektorzellen aus der Lunge oder aus dem Blut untersucht werden. Dabei werden virale Peptide identifiziert, gegen die eine solche Abwehrreaktion induziert wird sowie das Spektrum der lokal synthetisierten Zytokine und Antikörper analysiert. Durch Einsatz verschiedener Stimulanzien des Immunsystems, wie etwa Interferon, wird untersucht, ob nach einer H5N1-Infektion durch frühzeitige Induktion der Immunantwort die Infektion beeinflusst werden kann.

Bisherige Ergebnisse aus dem Projekt (Stand: 05.07.2007):

- *Etablierung eines Tiermodells (Maus) zur Charakterisierung der zellulären Immunantwort*
- *Adaptierung und Charakterisierung von relevanten Influenzavirusisolaten*
- *Erste Analysen der Entzündungsreaktion in der Lunge, wobei besonderer Wert auf den Nachweis von inflammatorischen und pro-inflammatorischen lokal synthetisierten Zytokinen gelegt wurde*
- *Untersuchung verschiedener Methoden zur Generierung von Aerosolen um eine möglichst natürliche Exposition zu gewährleisten*

4.4 Untersuchungen zum Virulenzpotential von Influenzaviren

Projektleiter: Dr. Jürgen Stech

Laufzeit: 3 Jahre

Die Virulenz von Influenzaviren wird nicht allein von einem viralen Protein oder einem Genomsegment bestimmt. In Vögeln (hier hauptsächlich Wassergeflügel) vermehren sich Influenzaviren aller Subtypen (HA1-HA16). Die meisten dieser Influenzaviren sind für das Hühnergeflügel niedrig pathogen (IpAIV) und verursachen lediglich leichte Organveränderungen. Ausschließlich Viren der Subtypen H5 und H7 können hochpathogene Varianten (HPAIV) ausbilden, die die klassische Geflügelpest mit schweren klinischen Symptomen verursachen. Warum ausschließlich Vertreter dieser Subtypen dazu in der Lage sind, ist unbekannt. Durch Serienpassagen kann eine Virulenzsteigerung durch Mutation an der Spaltstelle des Hämagglutinins erfolgen. Diese ermöglicht es dann, dass das Virus sich

im gesamten Tierkörper vermehren kann und damit die schweren klinischen Symptome hervorruft.

Ziel der Untersuchungen ist es zu klären, ob auch HA anderer Subtypen in der Lage sind, diese Eigenschaft zu erwerben. Dazu soll das von uns etablierte reverse genetische System für Influenzaviren genutzt werden. Dazu sollen HA anderer Subtypen (HA3, HA4, HA6, HA9) mittels gerichteter Veränderung der Spaltstelle verändert werden. Die so gentechnisch mutierten Gene sollen dann zur Generierung von rekombinanten Influenzaviren (auch mit Neuraminidasen unterschiedlich virulenter Influenzaviren) genutzt werden, die ausschließlich im Tierversuch auf ihre Virulenz hin untersucht werden.

Bisherige Ergebnisse aus dem Projekt (Stand: 05.07.2007):

- *Klonierung aller vorgesehenen Hämagglutininsubtypen (HA3, HA4, HA6, HA9)*
- *Bestätigung der Spaltstellensequenz durch Sequenzierung*
- *Für den Serotyp H3 konnten bereits drei verschiedene rekombinante Viren hergestellt werden (unveränderte Wildtyp sowie zwei verschiedene Spaltstellenmutanten)*
- *Bei der experimentellen Infektion von Hühnern zeigte sich, dass die H3-Viren mit den ausgewählten polybasischen Spaltstellen nicht stärker virulent waren als der Wildtyp.*