



Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landwirtschaft und Umwelt

Untersuchungen zum Infektionsschutz in Freilandhaltung von Geflügel unter Berücksichtigung der Aviären Influenza

Carmen Patrizia Fahn

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades

eines Doktors der Agrarwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. W. M. Windisch

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. Dr. h.c. J. Bauer
2. apl. Prof. Dr. M. Büttner
(Ludwig-Maximilians-Universität München)

Die Dissertation wurde am 30.01.2013 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 24.04.2013 angenommen.

*ALLES, WAS GEGEN DIE NATUR IST, HAT
AUF DAUER KEINEN BESTAND.*

Charles Darwin

MEINEN ELTERN

Roland und Ingrid Fahn

Inhaltsverzeichnis

A	EINLEITUNG	1
B	LITERATUR.....	3
1	Bestandszahlen und Geflügelhaltung in Deutschland	3
2	Ökologische Geflügelhaltung	4
3	Melde- und anzeigepflichtige Infektionskrankheiten bei Geflügel.....	5
4	Aviäre Influenza	6
4.1	Ätiologie.....	7
4.2	Genetische Variabilität von Influenzaviren	10
4.3	Tenazität von Influenzaviren	11
4.4	Virusreservoir und Infektionswege am Beispiel AIV	12
4.5	Klinische Symptomatik.....	14
4.6	Diagnostik.....	16
4.7	Tierseuchenrechtliche Aspekte	18
4.8	Epidemiologie	19
4.8.1	Situation weltweit	20
4.8.2	Situation in Deutschland	21
5	Auswirkungen der Aviären Influenza auf die Geflügelhaltung	23
C	MATERIAL UND METHODEN	24
1	Material	24
1.1	Chemikalien.....	24
1.2	Gebrauchslösungen.....	24
1.3	Gebrauchsmaterialien.....	25
1.4	Verbrauchsmaterialien	26
1.5	Technische Geräte	26
1.6	Primer und Sonden.....	28
1.7	Probenmaterial	29
1.7.1	Probenmaterial zur Testung des vogelspezifischen Genabschnitts.....	29
1.7.2	Positivkontrollen	30
1.7.3	Feldproben	31

2	Methoden	32
2.1	Methodenentwicklung	32
2.1.1	Aufbereitung der Proben	32
2.1.2	DNA-Extraktion	33
2.1.3	Nachweis eines vogelspezifischen Genabschnitts mittels PCR	36
2.1.3.1	Auswahl des Genabschnitts	37
2.1.3.2	Überprüfung der Spezifität	37
2.1.3.3	Überprüfung der Sensitivität	44
2.1.3.4	Testung der Methodik an Feldproben	44
2.1.3.5	Endpunkt-PCR	44
2.1.3.6	Entwicklung der kompetitiven internen Amplifikationskontrolle	45
2.1.4	Nachweis von Influenzaviren	50
2.1.4.1	RNA-Extraktion	51
2.1.4.2	Real-time RT-PCR	51
2.2	Entwicklung und Prüfung eines netzgeschützten Barriersystems	53
2.3	Dummyversuch	53
2.3.1	Wahl der Standorte	53
2.3.2	Aufbau der Areale	54
2.3.3	Probennahme	58
2.3.4	Lyophilisierung und Homogenisierung der Proben	58
2.3.5	Nachweis des vogelspezifischen mitochondrialen Cytochrom <i>b</i> -Genabschnitts	59
2.3.5.1	DNA-Extraktion	59
2.3.5.2	Endpunkt-PCR	59
2.3.5.3	Agarosegelelektrophorese	60
2.3.5.4	Statistische Auswertung	60
2.4	Sentinelversuch	61
2.4.1	Wahl der Standorte	61
2.4.2	Aufbau der Sentinelanlagen	62
2.4.3	Entwicklung eines speziellen Hygieneprotokolls	66
2.4.4	Einstellung der Tiere	67
2.4.5	Tiergesundheit und Überlebensrate	67
2.4.5.1	Legeleistung	67
2.4.5.2	Tierbestand	67
2.4.5.3	Statistische Auswertung	68
D	ERGEBNISSE	69
1	Methodenentwicklung	69
1.1	Aufbereitung der Proben	69
1.2	DNA-Extraktion	70
1.3	Überprüfung der Spezifität	73
1.3.1	Federkeratigen	73
1.3.2	Mitochondriales Cytochrom <i>b</i> -Gen	74
1.4	Überprüfung der Sensitivität	78
1.5	Testung der Methodik an Feldproben	79
1.6	Endpunkt-PCR	82
1.7	Entwicklung der kompetitiven internen Amplifikationskontrolle	83

2	Versuche zum Nachweis von Influenza-A-RNA.....	84
3	Vergleich der netzgeschützten und ungeschützten Areale.....	88
3.1	Ermittlung des aviären Eintrags	88
3.1.1	Areal auf dem Gelände von E.ON am Ismaninger Speichersee.....	89
3.1.2	Areal auf dem Gelände der Stadtwerke München in Wang.....	92
3.1.3	Areal bei der Kläranlage in Wang	93
3.1.4	Areal auf dem Versuchsgut Grünschwaige	95
3.1.5	Areal auf der Versuchsstation Viehhausen	97
3.2	Tiergesundheit und Überlebensrate.....	100
3.2.1	Legeleistung	101
3.2.2	Verlustraten	104
E	DISKUSSION.....	108
1	Methodenentwicklung	108
1.1	Aufbereitung der Proben.....	109
1.2	DNA-Extraktion	110
1.3	Überprüfung der Spezifität	111
1.3.1	Federkeratigen	112
1.3.2	Mitochondriales Cytochrom <i>b</i> -Gen.....	113
1.4	Überprüfung der Sensitivität	116
1.5	Testung der Methodik an Feldproben	117
1.6	Versuche zum Nachweis von Influenza-A-RNA	118
2	Vergleich der netzgeschützten und ungeschützten Areale.....	119
2.1	Ermittlung des aviären Eintrags	119
2.1.1	Methodik.....	119
2.1.2	Dummyversuch.....	126
2.2	Tiergesundheit und Überlebensrate	126
F	ZUSAMMENFASSUNG.....	130
G	SUMMARY	132
H	LITERATURVERZEICHNIS.....	134
I	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	162
J	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	165
K	TABELLENVERZEICHNIS.....	168
L	ANHANG	170

1	Sequenzierergebnisse.....	170
2	Detaillierte Auflistung des Tierbestandes in Prozent der Anfangstierzahl.....	172
3	Detaillierte Auflistung der durchschnittlichen Legeleistung in Eier/Huhn/Woche.....	173

A Einleitung

Immer wieder treten weltweit - darunter auch in Deutschland - Infektionskrankheiten in Nutztierbeständen auf, welche die Durchführung intensiver Bekämpfungsmaßnahmen zur Folge haben. Als Beispiel ist die Aviäre Influenza (Klassische Geflügelpest, Vogelgrippe) zu nennen, welche durch Influenza-A-Viren ausgelöst wird und für die alle Geflügelarten empfänglich sind [FLI, 2005]. Die hochpathogene Virusvariante A(H5N1) ist seit 2003 für größere Krankheitsausbrüche auf der ganzen Welt verantwortlich. In Deutschland wurde diese Variante erstmals Anfang April 2006 in einem Putenzuchtbetrieb bei Leipzig in Sachsen nachgewiesen. Bei dem Ausbruch verendeten über 700 Tiere; die restlichen rund 13.300 noch lebenden Puten, Hühner und Gänse des Betriebes wurden aus Sicherheitsgründen gekeult. Diese Tötungen erfolgten aufgrund strikter gesetzlicher Vorgaben und sollten eine weitere rasante Ausbreitung des Virus verhindern. Zudem wurden andere drastische Maßnahmen ergriffen. Einerseits wurden Sperrbezirke von 3 km und Beobachtungsgebiete von 10 km um einen betroffenen Betrieb eingerichtet, andererseits erteilte die EU z.B. Importverbote für Geflügel und Geflügelprodukte sowie Federn. Des Weiteren wurde ein vorsorgliches Monitoring bei Haus- und Wildgeflügel gestartet. Ebenso fand anlässlich dieses Seuchenzuges eine Überarbeitung der Geflügelpest-Verordnung (GeflPestV) statt, die seither zahlreiche Neuerungen zum Schutz gegen die Vogelgrippe enthält. Von besonderer tierschutzrechtlicher Relevanz ist hierbei die Aufstallungspflicht, welche seit 2006 besteht und in der „Verordnung zur Aufstallung des Geflügels zum Schutz vor der Klassischen Geflügelpest (Geflügel-Aufstallungsverordnung) vom 9. Mai 2006“ geregelt wird. Da der Eintrag von Viren in einen Geflügelbestand zumeist durch direkten oder indirekten Kontakt zwischen Wildvögeln und Nutzgeflügel erfolgt [WHO, 2006a], soll mit dieser Maßnahme die Übertragung der Aviären Influenza von Wildtieren auf das Nutzgeflügel verhindert werden. Eine Aufstallung führt allerdings dazu, dass die Tiere auf einem meist viel zu engen Raum in schlechter Stallluft und im Sommer bei viel zu hohen Temperaturen gehalten werden, obwohl ausreichend Freiland- und Grünflächen zur Verfügung stehen würden, auf der eine artgerechte Haltung möglich wäre. Insbesondere im Sommer sind die Tiere extremem Hitzestress ausgesetzt. Diese beengte und oft artwidrige Tierhaltung stresst die Tiere und schwächt das Immunsystem [BICKHARDT, 1992; GROSS & SIEGEL, 1983], was wiederum die Entstehung und Ausbreitung von Krankheiten innerhalb eines Bestandes begünstigt. Zudem ist die Aufstallungspflicht nicht mit den Grundsätzen sowie den gesetzlichen Grundlagen der ökologischen Tierhaltung [Verordnung (EG) Nr. 1804/1999] vereinbar und stellt auch unter anderem aus rechtlichen Gründen ein großes Problem dar. Deshalb ist es erforderlich, dem Tierhalter tierschutzkonforme Alternativen zur Verfügung zu stellen.

Das Ziel dieser Arbeit war es daher, unter Feldbedingungen zu prüfen, ob eine speziell gestaltete Voliere, die den unmittelbaren Kontakt zwischen Wildvögeln und Nutzgeflügel verhindert, im Vergleich zur Freilandhaltung, einen ausreichenden Infektionsschutz bietet und somit wieder eine tiergerechte Haltung ermöglicht. Eine objektive Einschätzung des bestehenden Infektionsrisikos sollte anhand einer vergleichenden Erfassung des Eintrags organischen Materials aviären Ursprungs erfolgen. Begleitend dazu wurde, in Zusammenarbeit mit dem Institut für Biologische Sicherheitsforschung GmbH (Halle), sowie dem Institut für Medizinische Mikrobiologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, ein Parallelversuch mit Sentinelherden durchgeführt. Dieser diente ebenfalls der Überprüfung der Infektionssicherheit anhand bakteriologischer und virologischer Untersuchungen. Die zusätzliche Erfassung von Legeleistung und Verlustraten beider Gehegeformen sollte Rückschlüsse auf Tiergesundheit und Schutz vor Raubtieren und Greifvögeln ermöglichen.

B Literatur

1 Bestandszahlen und Geflügelhaltung in Deutschland

Nach Angaben des Statistischen Bundesamtes schlüpfen im Jahr 2010 in Deutschland insgesamt rund 662,9 Mio. Hühnerküken, 0,9 Mio. Gänseküken, 24,1 Mio. Entenküken und 46,3 Mio. Truthühner- und Perlhühnerküken. Von den 662,9 Mio. Hühnerküken gehörten ca. 613,5 Mio. den Mastrassen an, die übrigen 49,4 Mio. Küken zählten zu den Legerassen, wobei davon wiederum 5,4 Mio. Tiere für die Zucht und Vermehrung bestimmt waren. Es gab 1139 Legehennen-haltende Betriebe, auf die ca. 36,7 Mio. Legehennen kamen, wobei hier nur Betriebe mit 3000 und mehr Hennenhaltungsplätzen berücksichtigt wurden. Die Anzahl der Betriebe mit Käfighaltung ist innerhalb der letzten 10 Jahre von 1144 mit 35,6 Mio. Legehennen auf 155 mit rund 6,7 Mio. Tieren beachtlich gesunken [DESTATIS, 2011]. Dieser Trend ist auf das Verbot der konventionellen Käfighaltung für Legehennen, welches seit dem 1. Januar 2012 europaweit besteht und durch die Richtlinie 1999/74/EG 1999 erlassen wurde, zurückzuführen. In Deutschland wurde dieses Verbot durch die „Erste Verordnung zur Änderung der Tierschutz-Nutztierhaltungsverordnung vom 28. Februar 2002 (BGBl. Jahrgang 2002 Teil 1 Nr. 16)“ umgesetzt und untersagt die konventionelle Käfighaltung sogar schon seit dem 1. Januar 2007. Im Gegensatz zur EU, in der ausgestaltete Käfige noch erlaubt sind, ist in Deutschland die Haltung von Legehennen in dieser Form bereits seit 2010 verboten. Seitdem erfolgt die Legehennenhaltung nur noch in Kleingruppenhaltungen, welche ebenfalls der Käfighaltung zugeordnet wird, in Boden- und Freilandhaltung sowie nach Richtlinien ökologischer Verbände. Auch die Kleingruppenhaltung soll in Deutschland verboten werden und infolgedessen sind die bestehenden Regelungen der Tierschutz-Nutztierhaltungsverordnung zur Kleingruppenhaltung seit dem 1. April 2012 nicht mehr anzuwenden. Da sich bisher Bund und Länder allerdings nicht über die zeitlich befristete Übergangsregelung für bestehende Anlagen einigen konnten, liegt die Regelung bei den Ländern selbst [BMELV, 2012]. Infolge dieser Entwicklungen gewinnen alternative Haltungssysteme für Legehennen stark an Bedeutung. So ist insbesondere in der Bodenhaltung ein sprunghafter Anstieg von 604 Betrieben mit rund 8,7 Mio. Legehennen im Jahr 2008 auf 783 Betriebe mit ca. 23,0 Mio. Tieren im Jahr 2010 zu verzeichnen. Auch nahmen die Anzahl der in Freilandhaltung gehaltenen Hennen sowie der Tierbestand in der ökologischen Erzeugung zu [DESTATIS, 2011]. In Abbildung 1 wird die Struktur der Legehennenbetriebe im Jahr 2010 verdeutlicht.

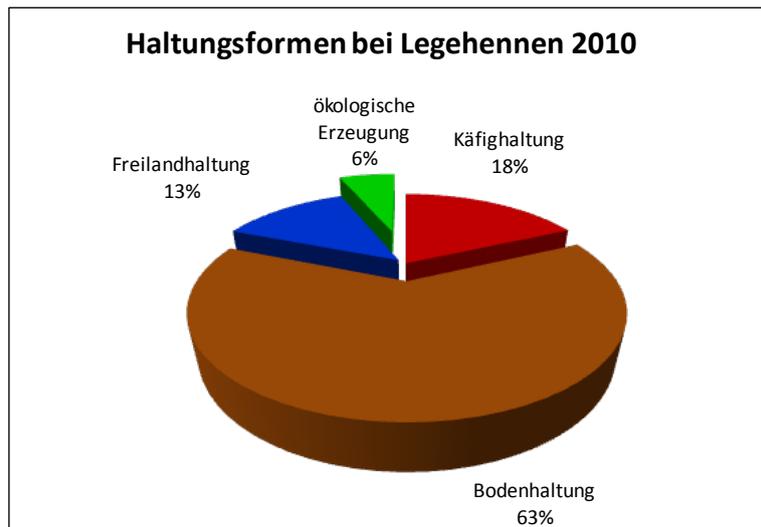


Abbildung 1: Struktur der Legehennenplätze in Deutschland 2010 [DESTATIS, 2011]

2 Ökologische Geflügelhaltung

Da tiergerechte Haltung von Nutztieren für den Verbraucher ein immer wichtigeres Entscheidungskriterium für den Kauf eines Produktes ist und diese mit ökologischer Erzeugung assoziiert wird, gewinnt die Tierhaltung im ökologischen Landbau weiterhin an Bedeutung [OPPERMANN *et al.*, 2009]. Die ökologische Geflügelhaltung wird seit August 1999 durch die EG-Verordnung 1804/1999 für die Länder der Europäischen Union einheitlich geregelt und gibt den gesetzlichen Mindeststandard vor [SCHUHMACHER, 2001]. So ist Geflügel unter anderem mindestens während eines Drittels der Lebenszeit freier Zugang zu Auslaufflächen zu gewähren. Weiterhin sind die Ausläufe so zu gestalten, dass ausreichend Schutzvorrichtungen wie Bäume, Sträucher oder Unterstände, genügend Tränken und Futterstellen, Raufutter sowie Scharrmaterial vorhanden sind und überwiegend Pflanzenbewuchs aufweisen. Wassergeflügel muss ein ständiger Zugang zu einem fließenden Gewässer, einem Teich oder einem See möglich sein. Auch ist die Höchstbesatzdichte je Stall- und Auslauffläche geregelt. So gilt für Legehennen ein Höchstbesatz von 6 Tieren pro m² Stallfläche. Die Auslauffläche hingegen beträgt 4 m² pro Tier [Verordnung (EG) Nr. 1804/1999]. Die verbandsinternen Anforderungen regionaler Ökoanbauverbände, wie Biokreis e.V., Bioland e.V. und Demeter e.V. liegen zum Teil auch über dem EU-Standard [BLE, 2011].

3 Melde- und anzeigepflichtige Infektionskrankheiten bei Geflügel

Tierkrankheiten, die auf Haustiere und Süßwasserfische übertragen werden können, unterliegen der Meldepflicht und werden in der „Verordnung über meldepflichtige Tierkrankheiten in der Fassung der Bekanntmachung vom 11. Februar 2011 (BGBl. I S. 252), die durch Artikel 2 der Verordnung vom 19. Juli 2011 (BGBl. I S. 1403) geändert worden ist“, aufgelistet und jeweils dem aktuellen Infektionsgeschehen angepasst. Beim Ausbruch einer solchen Tierkrankheit werden keine staatlichen Maßnahmen ergriffen. Die TKrMeldpfIV ist insbesondere für solche Infektionskrankheiten erlassen worden, welche für die Praxis bedeutsam werden können und gut diagnostizierbar sind [www.bmelv.de]. Die Meldepflicht dient also vor allem dem Überblick über das Auftreten der in der TKrMeldpfIV gelisteten Infektionskrankheiten, wodurch ein frühzeitiger Einsatz geeigneter Bekämpfungsmaßnahmen gewährleistet werden kann [BMELV, 2011a]. Derzeit gelten folgende Krankheiten bei Geflügel als meldepflichtig: Campylobakteriose, Chlamydiose, Infektiöse Bursitis (Gumboro-Krankheit) bei Puten und Hühnern, Infektiöse Laryngotracheitis des Geflügels (ILT) bei Hühnern, Listeriose, Mareksche-Krankheit bei Hühnern, niedrigpathogene aviäre Influenza bei Wildvögeln, Salmonellose, Tuberkulose und Vogelpocken [TKrMeldpfIV; BMELV, 2011a].

Im Gegensatz zur meldepflichtigen Tierkrankheit, die nur bei Auftreten der Krankheit oder derer Erreger gemeldet wird, ist bei anzeigepflichtigen Tierseuchen bereits der Verdacht zu melden. Dies soll die frühzeitige Erkennung von Seuchenausbrüchen und deren Tilgung garantieren und dadurch die Weiterverbreitung der Tiersuche verhindern [BMELV, 2011b]. Das Vorkommen einer anzeigepflichtigen Tierseuche zieht zum Schutz der Tierbestände, aber auch zum Schutz der menschlichen Gesundheit sowie vor volkswirtschaftlichen Schäden, die Durchführung staatlicher Maßnahmen nach sich [BMELV, 2011b]. In der „Verordnung über anzeigepflichtige Tierseuchen in der Fassung der Bekanntmachung vom 19. Juli 2011 (BGBl. I S. 1404)“ werden alle anzeigepflichtigen Tierseuchen aufgelistet. Für Geflügel relevant sind Infektionen mit dem West-Nil-Virus, die Newcastle Disease, die niedrigpathogene aviäre Influenza bei einem gehaltenen Vogel und die Geflügelpest [TierSeuchAnzV]. Diese gelten außerdem als Zoonosen [www.oie.de; WANG *et al.*, 2008]. Das West-Nil-Virus gehört zur Familie der *Flaviviridae* und besitzt ein sehr breites Wirtsspektrum. Es repliziert sich in Vögeln, Reptilien, Amphibien, Säugetieren, Moskitos und Zecken. Das hauptsächliche Virusreservoir stellen allerdings Wildvögel dar. Moskitos übertragen das Virus auf andere Vögel, aber auch auf Menschen und Pferde [OIE, 2012]. Im Süden Deutschlands bergen veränderte Klimabedingungen und das Vorhandensein des

Hauptvektors, der Stechmücke, die Gefahr, dass das Virus nicht nur eingetragen wird sondern sich auch anschließend verbreitet [ZIEGLER *et al.*, 2011]. Mit Ausnahme eines Ausbruches bei Wildvögeln in Österreich im September 2008, wurde das West-Nil-Virus in Europa bei Geflügel noch nicht nachgewiesen. Ein aktives Überwachungsprogramm des FLI im Jahr 2009 in Deutschland zeigte, dass untersuchte Proben von Standvögeln und Wirtschaftsgeflügel in Freilandhaltung weder Antikörper gegen das West-Nil-Virus noch spezifische Nukleinsäuren aufwiesen, wohingegen in Proben von Zugvögeln spezifische Antikörper nachweisbar waren [ZIEGLER *et al.*, 2011].

Der Erreger der Newcastle Disease (atypische Geflügelpest) ist das Newcastle-Disease-Virus, auch als APMV-1 bezeichnet, und wird der Familie der *Paramyxoviridae* zugeordnet [ICTVdB MANAGEMENT, 2006b]. Wildvögel und wilde Wasservögel gelten als Virusreservoir [LINDH *et al.*, 2008]. In ungeimpften Beständen verläuft die Erkrankung perakut mit einer Mortalität von bis zu 100 % und ist daher weltweit eine der bedeutendsten Infektionskrankheiten des Geflügels, welche außerdem zu großen Verlusten in der Geflügelwirtschaft führen kann [GRUND & KÜBLBÖCK, 2011]. Über ein Drittel der knapp 180 bei der O.I.E. gelisteten Länder meldeten im Jahr 2010 Ausbrüche von Newcastle Disease [www.oie.de]. Durch Eradikationsprogramme und Einführung der Impfpflicht für Hühner und Puten, welche von der Größe des Bestands unabhängig ist und EU-weit durch die Richtlinie 92/66/EWG des Rates vom 14. Juli 1992 geregelt wird, konnte diese Tierseuche in Deutschland stark eingedämmt werden [GRUND & KÜBLBÖCK, 2011].

Die aktuellste und derzeit sowohl für die menschliche Gesundheit als auch für die Geflügelindustrie weltweit bedeutendste anzeigepflichtige Tierseuche ist die Aviäre Influenza. Aus diesem Grund wird im Folgenden auf diese Infektionskrankheit näher eingegangen.

4 Aviäre Influenza

Aviäre Influenza (Vogelgrippe, Klassische Geflügelpest) wird durch Influenza-A-Viren ausgelöst. Diese Krankheit wurde erstmals 1878 durch den Italiener Perroncito beschrieben, welcher rund um Turin ein Krankheitsgeschehen mit hoher Herdenmortalität bei Hühnern, aber auch bei anderem Geflügel beobachtete [PERRONCITO, 1878]. Cenatti und Savonuzii gelang 1901 der Nachweis, dass für diese Krankheit ein Erreger, der einen bakterien- und hefedichten Keramikfilter passieren kann, also ein ultrafiltrierbares Agens, verantwortlich ist [ALEXANDER & BROWN, 2009; CENTANNI & SAVONUZZI, 1901; KRÜGER *et al.*, 2000], welches aber erst 1955 als Influenza-A-Virus charakterisiert wurde [SCHÄFER, 1955]. Seit seiner Entdeckung verursachten Ausbrüche der Aviären Influenza immer wieder enorme

Verluste in der Geflügelhaltung [ALEXANDER & BROWN, 2009]. So wurden weltweit seit 2003 aufgrund von „highly pathogenic avian influenza“ (HPAI) Ausbrüchen pro Jahr hunderte Millionen von Hühnern sowie anderes Zuchtgeflügel getötet und unschädlich beseitigt [ALI, 2010]. Alleine in China führten solche Seuchenzüge zwischen 2004 und 2009 zur Keulung von 36 Mrd. Hühnern [MU *et al.*, 2011]. Auch in den Niederlanden grassierte im Jahr 2003 eine durch den Subtyp H7N7 hervorgerufene HPAI-Epidemie, welche das Merzen von 30 Mio. Tieren innerhalb von nur zwei Monaten nach sich zog [STEGEMAN *et al.*, 2004]. Im gleichen Jahr verursachte ein HPAI-Ausbruch in Belgien die Tötung von nahezu 2,3 Mio. Vögeln und dadurch rund 30 Mio. Euro an direkten Kosten, welche zumeist aus den Vernichtungskosten und den Entschädigungen für die betroffenen Höfe bestanden. Der gesamte wirtschaftliche Schaden, der sich aus direkten Kosten, Folgekosten und Marktschäden zusammensetzt, wird hingegen auf mehr als das Doppelte geschätzt. Als Grund hierfür gilt unter anderem das Transportverbot, das die Auslieferung von Bruteiern sowie Eintagsküken aus den Brütereien verhinderte. Infolgedessen wurden diese unschädlich beseitigt. Schlachtereien waren wegen der mangelnden Belieferung nicht ausgelastet und mussten ebenfalls Umsatzeinbußen hinnehmen. Auch die Produktion der Futtermittelanbieter sank aufgrund dieses Seuchenzuges um die Hälfte [VANDENDRIESSCHE *et al.*, 2010].

4.1 Ätiologie

Influenza-A-Viren gehören ebenso wie Influenza-B-Viren, Influenza-C-Viren, Thogoto- und Isaviren zur Familie der *Orthomyxoviridae* (griechisch: „orthos“ = gerade, richtig; „myxa“ = Schleim) [MODROW, 2003]. Tabelle 1 zeigt eine Übersicht der Vertreter dieser Virusfamilie.

Tabelle 1: Übersicht der *Orthomyxoviridae* nach MODROW *et al.* [2003] mit Modifikationen

Genus	Vertreter	RNA-Segmente	Wirtsspektrum
Influenzavirus A	Influenza A Virus	8	Vertebraten (v.a. Mensch, Schwein, Pferd, Marderartige, Meeressäuger, Vögel)
Influenzavirus B	Influenza B Virus	8	Vertebraten (Mensch, Robbe)
Influenzavirus C	Influenza C Virus	7	Vertebraten (Mensch, Schwein)
Thogotovirus	Thogotovirus	6	Vertebraten (Rinder, Schafe, Ziegen, Nagetiere), Arthropoden (Zecken)
	Dhorivirus	7	Vertebraten (Rinder, Schafe, Ziegen, Nagetiere), Arthropoden (Zecken)
Isavirus	Infectious Salmon Anemia Virus	8	Vertebraten (Fische)

Antigene Unterschiede im Nukleoprotein (NP) und Matrixprotein (M1) von Influenzaviren erlauben eine Klassifizierung in Typ A, B oder C.

Influenza-A-Viren sind behüllte Viren, die ein einsträngiges und segmentiertes Ribonukleinsäuregenom mit negativer Polarität (-ssRNA) aufweisen [WERNER & KALETA, 2005]. Sie sind pleomorph, also sehr unterschiedlich in Größe und Form, und zeigen sich in sphärischer oder filamentöser Gestalt. Ihr Durchmesser beträgt 80-120 nm, und ihre Länge variiert von 200-300 nm [ICTVdB MANAGEMENT, 2006a; WEBSTER *et al.*, 1978]. Das komplette Genom besteht aus 13.600 Nukleotiden und ist größtenteils sequenziert. Die 5'-Enden der einzelnen Segmente besitzen eine konservierte Region und sind komplementär zu den 3'-Enden. Dadurch bilden sich in diesen Bereichen Doppelstränge aus, woraus sich eine quasizirkuläre Form der RNA ergibt. Die molekulare Masse (M_r) eines Viruspartikels beträgt 250×10^6 , die spezifische Dichte $1,2 \text{ g/cm}^3$ [ICTVdB MANAGEMENT, 2006a]. Die 8 RNA-Segmente kodieren für 10 bis 11 Virusproteine: die Polymeraseproteine (PB1, PB2, PA, PB1-F2), das Nukleokapsidprotein (NP), HA, NA, die Matrixproteine (M1, M2) und die Nichtstrukturproteine (NS1, NS2/NEP) [THOMAS & NOPPENBERGER, 2007]. Das PB1-F2 Protein ist zwar in fast allen humanen Influenza-A-Isolaten vorhanden, fehlt aber bei vielen Virusisolaten vom Tier [CHEN *et al.*, 2001; ZELL *et al.*, 2007].

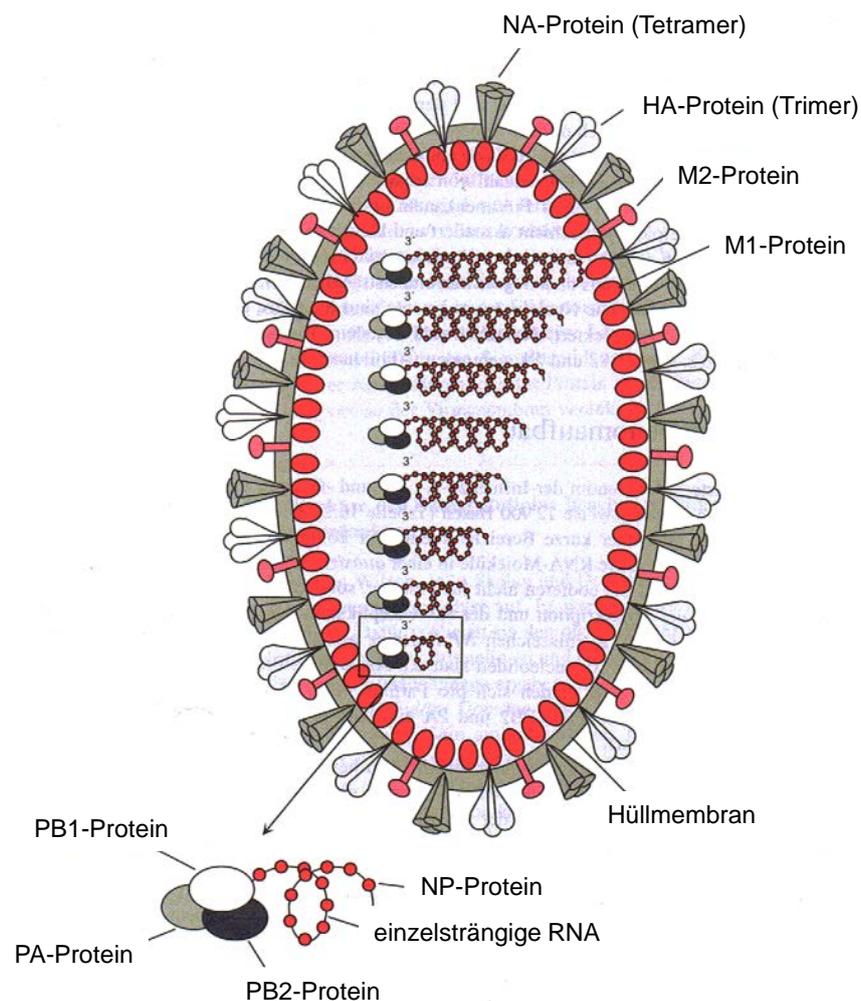


Abbildung 2: Schematische Darstellung eines Influenzavirus [MODROW *et al.*, 2003]

Weiterhin werden Influenza-A-Viren anhand der Oberflächenantigene (Spikes) Hämagglutinin (HA oder H) und Neuraminidase (NA oder N) in Subtypen unterteilt [HORIMOTO & KAWAOKA, 2005]. Zum jetzigen Zeitpunkt sind 16 H-Subtypen (H1-H16) und 9 N-Subtypen (N1-N9) bekannt [FOUCHIER *et al.*, 2005], die in vermutlich allen Kombinationsmöglichkeiten vorkommen können [CAPUA *et al.*, 2006].

HA stellt das Hauptoberflächenantigen dar, gegen das der Wirt neutralisierende Antikörper bildet. Zudem ist es für die Bindung des Virus an sialinsäurehaltige Rezeptoren der Wirtszelle und dessen anschließende Fusion verantwortlich [SKEHEL & WILEY, 2000; WEBSTER *et al.*, 1992]. Außerdem bindet es ebenfalls an Erythrozyten von Hühnern sowie anderen Spezies und führt so zur Agglutination. Diese Eigenschaft stellt die Basis wichtiger diagnostischer Tests dar [WERNER & KALETA, 2005]. NA ist ebenfalls ein wichtiges Oberflächenantigen. Es spaltet Sialinsäurereste von Glykoproteinen und Glykolipiden auf der Wirtszelloberfläche ab. Dies führt zur Freisetzung neu synthetisierter Virionen aus der Zelle, in der sie gebildet wurden, und somit zu einer erleichterten Virusverbreitung [WEBSTER *et al.*, 1992].

Da Aviäre Influenzaviren (AIV) grundsätzlich pathogen sind, sich aber stark in ihrer Virulenz unterscheiden, kann zusätzlich eine Einteilung in zwei verschiedene Gruppen erfolgen: die „low pathogenic avian influenza“ (LPAI) und die „highly pathogenic avian influenza“ (HPAI). Für diese Unterschiede ist das HA verantwortlich, von welchem bei der Virusvermehrung zuerst das Vorläuferprotein (HA₀) gebildet wird [PASICK *et al.*, 2005; WERNER & KALETA, 2005]. Damit HA an einer Zelle anhaften und diese infizieren kann, muss HA₀ durch proteolytische Enzyme der Wirtszelle in zwei Untereinheiten gespalten werden. Unterbleibt diese Spaltung, ist das Virus nicht infektiös. Welche Enzyme angreifen können, ist von der Aminosäuresequenz der HA₀-Spaltstelle abhängig [WERNER & KALETA, 2005]. So kann HA₀ von LPAIV nur durch extrazelluläre Proteasen gespalten werden, die von Zellen sezerniert werden, welche den Respirations- und Verdauungstrakt auskleiden [PASICK *et al.*, 2005]. Dadurch entsteht im Wesentlichen lediglich eine lokale Infektion dieser Organe. Bei HPAIV zeichnet sich die HA₀-Spaltstelle durch mehrere basische Aminosäuren aus [VEY *et al.*, 1992; WERNER & KALETA, 2005]. Dies führt zu einer Spaltbarkeit durch eine Familie intrazellulärer Proteasen, welche weitreichend im Gewebe verteilt sind [PASICK *et al.*, 2005]. Somit ist eine Vermehrung in diversen Zellarten und Organen möglich, wodurch es zu einer schweren generalisierten Infektion kommt [WERNER & KALETA, 2005]. Zu diesen HPAI-Viren gehören ausschließlich Viren mit den H-Subtypen H5 und H7, was nicht gleichzeitig bedeutet, dass alle H5 und H7 Subtypen hoch virulent sind [PASICK *et al.*, 2005; PÉREZ *et al.*, 2012]. Niedrigpathogene Vertreter der H5 und H7 Stämme besitzen, im Gegensatz zu HPAI-Viren, typischerweise nur zwei basische Aminosäuren an der Spaltstelle [SENNE *et al.*, 1996; WOOD *et al.*, 1993].

Die Bezeichnung der Influenzaviren wird von der WHO-Fachkommission vorgegeben und muss folgende Angaben der Erstisolierung beinhalten: Antigentyp (A, B oder C)/ Wirtsart/ geographischer Ursprung/ Referenznummer des Stammes/ Jahr der Isolierung (H- sowie N-Subtyp) [ASSAAD *et al.*, 1980]. So wird z.B. das Isolat, das von einem toten Singschwan stammt, welcher im frühen Februar 2006 auf der Insel Rügen im südwestlichen Teil der Ostsee gefunden wurde, A/Swan/Germany/R65/06 (H5N1) benannt [WEBER *et al.*, 2007].

4.2 Genetische Variabilität von Influenzaviren

Innerhalb der letzten 100 Jahre litt die Menschheit unter vier großen Influenzapandemien: 1918, 1957, 1968 und jüngst 2009 [JIN & MOSSAD, 2005; MISHRA, 2011]. Ursache hierfür war die Einschleppung eines neuen Virus entweder aviären oder porcinen Ursprungs bzw. durch Reassortment verschiedener Influenzavirusstämme in die Bevölkerung [MISHRA, 2011]. Auch der Vertreter HPAIV H5N1, der zuerst 1996 in Guandong, einer Provinz Chinas, isoliert wurde, gab Anlass zur Sorge, das Potential zu besitzen, eine solch gravierende Pandemie auszulösen. Entwickelt sich dieses Virus durch Antigendrift oder Antigen shift weiter, könnte nicht nur die Speziesbarriere zur Infektion von Menschen überwunden sondern auch die Übertragung von Mensch zu Mensch ermöglicht werden [JIN & MOSSAD, 2005]. Ein so entstandenes „Supervirus“ wäre in seiner Antigenstruktur einzigartig. Dadurch wäre die Übertragung, Infektion sowie Replikation in mehreren Wirtstieren möglich und zugleich eine Resistenz gegen bekannte Viruzide denkbar [SAXENA *et al.*, 2010].

Antigendrift

Der Begriff Antigendrift bezeichnet die geringfügigen, aber dafür häufigen Veränderungen innerhalb eines Subtyps, welche auf Punktmutationen zurückzuführen sind. Dafür verantwortlich ist die RNA-abhängige RNA-Polymerase (Replicase). Diese besitzt eine Fehlerrate von etwa 10^{-5} [MODROW, 2003] bis 10^{-3} Nukleotiden [MATROSOVICH *et al.*, 2006] beim Einbau der komplementären Basen während der Replikation. Zusätzlich fehlt der viralen Polymerase bei allen RNA-Viren die Fähigkeit des Korrekturlesens der bereits eingebauten Nukleotide (Proofreading) [POLAND *et al.*, 2007; PROENÇA-MÓDENA *et al.*, 2007]. Solche Punktmutationen ereignen sich hauptsächlich in den Genen, die für HA und NA kodieren [PROENÇA-MÓDENA *et al.*, 2007]. Dies kann bei bis zu 50 % der Fälle zum Austausch von Aminosäuren und somit zu einer Variierung in der Sekundär- sowie Tertiärstruktur der Proteine führen, wodurch sich ebenso die antigenetischen Eigenschaften des Virus verändern können [GALLAHER, 2009]. Die neue Struktur der Antigenoberfläche hat eine fehlende oder verminderte Kreuzreaktion mit Antikörpern, die bei früheren Infektionen gebildet wurden und noch vorhanden sind, zur Folge. Daraus resultieren unter

Umständen Infektionen mit schweren Krankheitssymptomen [AL FARESS *et al.*; 2005]. Bei aviären Influenza-A-Virusstämmen wird Antigen drift seltener beobachtet als bei humanen Influenza-A-Virusstämmen [MÜLLER, 2006]. Dies ist vermutlich auf den beschränkten Selektionsdruck bei Vögeln zurückzuführen [WEBSTER *et al.*, 1982]. Ebenso scheint das HA von Influenza-B-Viren solchen Veränderungen weniger stark unterworfen zu sein [MÜLLER, 2006].

Antigenshift

Antigenshift bezeichnet den Austausch eines oder mehrerer Gensegmente zwischen zwei miteinander verwandten Viren, die simultan eine Wirtszelle infiziert haben (Reassortment). Die Voraussetzung hierfür ist die Segmentierung des Virusgenoms. So können beim Vermehrungsprozess die RNA-Segmente der beiden verschiedenen „Eltern“-Viren neu kombiniert werden, woraus Nachkommen gemischter Genotypen (Reassortanten) resultieren [GALLAHER, 2009; MODROW *et al.*, 2003; WERNER & KALETA, 2005]. Infizieren solche Reassortanten einen Organismus, ist dieser für die neuen Antigenstrukturen voll empfänglich, da sein Immunsystem noch keine Antikörper dagegen besitzt [MÜLLER, 2006]. Antigenshift ist nicht nur innerhalb von Subtypen möglich, sondern auch intersubtypisch. Auch weltweit auftretende Pandemien können die Folge dieses Reassortments sein. Ein Beispiel dafür stellt das als Erreger der „Schweinegrippe“ bekannte Influenzavirus H1N1 dar, das Anfang März 2009 in Nordamerika ausbrach und sich bis nach Europa ausbreitete. H1N1 ist eine Reassortante von porcinen, aviären und humanen Influenzaviren [GALLAHER, 2009]. Als Risikowirt („mixing vessel“) für das Antigenshift gilt das Schwein, da es neben den porcinen auch für aviäre sowie humane Influenza-A-Subtypen empfänglich ist [HAMPSON & MACKENZIE, 2006; MODROW *et al.*, 2003].

4.3 Tenazität von Influenzaviren

Die Tenazität (lateinisch: „tenacitas“ = Hartnäckigkeit) eines Krankheitserregers beschreibt seine Widerstandsfähigkeit gegenüber Umwelteinflüssen und somit den Erhalt seiner Infektions- und Vermehrungsfähigkeit außerhalb seines natürlichen Habitats, also des Wirtstiers. Temperatur, pH-Wert, UV-Strahlung, Feuchtigkeit bzw. Trockenheit, chemische Zusammensetzung sowie Struktur der Umgebung sind Faktoren, welche die Tenazität beeinflussen. Sind Geschwindigkeit und Bedingungen der Virusinaktivierung bekannt, können Diagnostik und Maßnahmen zur Eindämmung der Erregerausbreitung leichter eingeleitet und durchgeführt werden [BÖHM, 2002]. Aviäre Influenza-A-Viren (AIV) besitzen eine eher geringe Tenazität [HAAS, 2009]. So lassen sie sich bei einer Temperatur von 56 °C für drei Stunden bzw. bei 60 °C für 30 min vollständig inaktivieren [O.I.E, 2002].

Eingefroren hingegen kann die Infektiosität über lange Zeiträume erhalten bleiben [YILMAZ & KALETA, 2004]. Liegt die Gefriertemperatur unterhalb von -50 °C , ist eine Konservierung des Virus sogar auf unbeschränkte Zeit möglich [WERNER & HARDER, 2006a]. Niedrige pH-Werte hingegen führen zu einer Inaktivierung des Virus. Allerdings variiert der Grenzwert des pH-Werts, bei dem die Infektiosität verloren geht und ist vom H-Subtyp des Virusstamms abhängig. Allgemein sind aber Virusstämme mit nichtgespaltenem HA stabiler [SCHOLTISSEK, 1985]. Unterschiedliche Studien zeigten weiterhin, dass AIV über einen längeren Zeitraum auch in Wasser infektiös bleibt [ITO *et al.*, 1995; STALLKNECHT *et al.*, 1990 a und b; WEBSTER *et al.*, 1978], wobei es nach BROWN *et al.* [2009] bei einem leicht alkalischen pH-Wert (7,4-8,2), Temperaturen unterhalb von 17 °C und frischem bis leicht salzigem Wasser (0-20000 ppm) am stabilsten ist. Gefrorene Seen konservieren Influenza-A-Viren lange Zeit [ZHANG *et al.*, 2006]. Einen weiteren wichtigen Faktor für die Tenazität stellt die Oberfläche dar, auf der sich das Virus befindet. So zeigten Untersuchungen von BEAN *et al.* [1982], dass Inflenzaviren auf Händen innerhalb weniger Minuten inaktiviert waren, wohingegen auf Plastik und Stahl 48 h später noch infektiöse Viren nachgewiesen werden konnten. Im Vergleich zu Stahloberflächen erfolgt auf Kupferoberflächen eine Inaktivierung von Influenza-A-Viren wesentlich schneller [NOYCE *et al.*, 2007]. Ebenso verkürzen poröse im Gegensatz zu nicht porösen Materialien die Dauer der Infektiosität [TIWARI *et al.*, 2006].

Zur Flächendesinfektion eignen sich laut Richtlinie des Bundesministeriums für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz über Mittel und Verfahren für die Durchführung der Desinfektion bei anzeigepflichtigen Tierseuchen (Stand 2007) Formalin (35-37 % Formaldehyd), Peressigsäurelösung (15 % oder 40 % Peressigsäure) und Handelsdesinfektionsmittel, die in der „Liste der nach den Richtlinien der DVG geprüften und als wirksam befundenen Desinfektionsmittel für die Tierhaltung (Handelspräparate)“ aufgeführt sind [BMELV, 2007].

4.4 Virusreservoir und Infektionswege am Beispiel AIV

Phylogenetische Studien haben gezeigt, dass Wasservögel, insbesondere Arten der Ordnungen *Anseriformes* (vor allem Enten, Gänse und Schwäne) und *Charadriiformes* (vorzugsweise Möwen, Schwalben und Watvögel) das größte natürliche Reservoir von Influenza-A-Viren darstellen. Bei ihnen wurden alle Influenzasubtypen und ebenso die meisten Kombinationen von HA und NA nachgewiesen. Diese Vogelarten sind, mit Ausnahme der trockensten Regionen der Welt, global verbreitet. Infolgedessen besteht eine nahezu weltweite Abdeckung mit Wirtsspezies für Influenza-A-Viren. Die bei Wasservögeln zumeist klinisch inapparent verlaufende Infektion ist auf die beinahe perfekte Koexistenz der

dort überdauernden Viren, welche ausschließlich Biotypen geringer Pathogenität darstellen, mit ihren Wirten zurückzuführen. Dies wird durch die effiziente Virusreplikation mit ausbleibender Krankheit des Wirtstiers verdeutlicht [ALEXANDER, 2000; OLSEN *et al.*, 2006; WEBSTER *et al.*, 1992]. Bei Vögeln infizieren Influenzaviren vorzugsweise Zellen des Gastrointestinaltrakts und werden in hohen Konzentrationen mit dem Kot [WEBSTER *et al.*, 1978], aber auch über Tränenflüssigkeit, Speichel und Nasensekret [WERNER, 2006; WERNER & KALETA, 2005; WHO, 2007] ausgeschieden. Eine Übertragung auf andere Wildvögel kann unter anderem auch durch die orale Aufnahme von kontaminiertem Oberflächenwasser resultieren [WEBSTER *et al.*, 1992]. Der Eintrag von Viren in einen Geflügelbestand erfolgt zumeist durch direkten oder indirekten Kontakt zwischen Wildvögeln und Hausgeflügel. Hier spielt vor allem die Freilandhaltung eine tragende Rolle, da Wildvögel bei dieser Haltungsform tagsüber jederzeit durch die offenen Ställe freien Zugang zu Futter- und Tränkeeinrichtungen der Nutztiere haben und diese möglicherweise mit Krankheitserregern verunreinigen können [WHO, 2006a]. Folglich besteht bei Geflügel mit Freilandauslauf ein höheres Infektionsrisiko als in Stallhaltung [WERNER, 2006]. Wurde eine empfängliche Geflügelart mit einem niedrigpathogenen Stamm infiziert, werden oft nur milde Symptome hervorgerufen. Gelegentlich verläuft eine Infektion auch symptomlos. Nach einer Adaptionsphase im Hausgeflügel können diese Viren schleichend einen leichten Abfall der Legetätigkeit bei Legehennen sowie eine reduzierte Wachstumsrate bei Mastgeflügel verursachen [CAPUA & MUTINELLI, 2001]. Handelt es sich um die Subtypen H5 oder H7, kann sich die ursprünglich niedrigpathogene Form durch spontane Mutation im HA-Gen zu einem HPAIV entwickeln. Diese hochpathogenen Phänotypen können innerhalb der Hausgeflügelpopulationen, aber auch zurück auf Wildvögel übertragen werden. Dort rufen sie Erkrankungen hervor, welche nach Wirtsart und -alter sowie Virusstamm zu variieren scheinen [WERNER & HARDER, 2006a]. Solche Infektionen von Wildvögeln traten nur sporadisch und zumeist lokal begrenzt auf [ALEXANDER, 2000], weshalb Wildvögel bei der Verbreitung von HPAIV eine epidemiologisch eher unwichtige Rolle einnahmen [SWAYNE & SUAREZ, 2000]. Mit dem Auftreten des HPAIV H5N1 Typ Asia änderte sich allerdings die Situation vermutlich grundlegend, da dieser Subtyp im Jahr 2005 für ein Massensterben von wilden Wasservögeln am See Qinghai im Nordwesten Chinas verantwortlich war und sich innerhalb kurzer Zeit annähernd weltweit ausbreitete [CHEN *et al.*, 2005]. Zusätzlich steigerte HPAIV H5N1 seine Pathogenität für einige Säugetierarten, unter anderem für Katzen, Frettchen, Mäuse, Hunde und Menschen, und besitzt ferner die Fähigkeit, die Speziesbarriere zu überwinden. Diese Tatsache war Grund zur Sorge vor einer möglichen Pandemie [BENGIS *et al.*, 2004; SONGSERM *et al.*, 2006a und b; WEBSTER *et al.*, 2006]. In Abbildung 3 werden die möglichen Infektionswege der Aviären Influenza schematisch dargestellt.

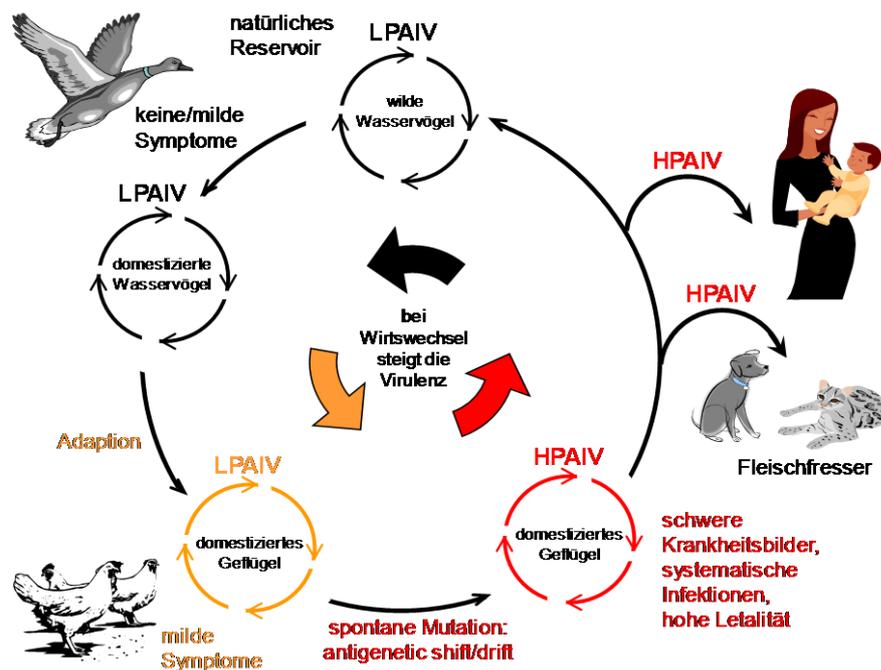


Abbildung 3: Infektionswege der Aviären Influenza nach PETER [2006] mit Modifikationen

4.5 Klinische Symptomatik

Die klinischen Symptome sind variabel und hängen von der Virulenz, der Infektionsdosis, Spezies, Alter und Geschlecht des betroffenen Vogels, gleichzeitig vorhandenen Krankheiten sowie der Umgebung bzw. dem Haltungssystem ab [ELBERS, 2005; ENTSCHEIDUNG 2006/437/EG DER KOMMISSION; WERNER & KALETA, 2005]. Die Ausbreitung des Virus innerhalb eines Bestands erfolgt in Mastgeflügelställen schneller als in Käfig- oder Freilandhaltungen [ENTSCHEIDUNG 2006/437/EG DER KOMMISSION]. Dies liegt an der hohen Besatzdichte empfänglicher Tiere und dem unweigerlich damit einhergehenden intensiven direkten Kontakt untereinander [CONRATHS *et al.*, 2005]. Außerdem ist die gleichzeitige Exposition einer Vielzahl an Individuen für eine rapide Verbreitung des Virus von großer Bedeutung [SIMS, 2008]. Der Erreger kann bei einer solchen Haltungsform zudem mehrere Passagen im Hausgeflügel durchlaufen, sich dadurch anpassen und seine Pathogenität gegebenenfalls steigern [CONRATHS *et al.*, 2005].

HPAI

Die hochpathogene Form der Aviären Influenza ist bei Hühnern und Puten durch eine systemische Erkrankung mit plötzlichem Auftreten schwerer Symptome und einer Mortalitätsrate von bis zu 100 % charakterisiert [SWAYNE & HALVERSON, 2008; SWAYNE & SUAREZ, 2000]. Zu den Hauptsymptomen gehören unter anderem eine reduzierte Futter- und/oder Wasseraufnahme, Apathie und Bewegungslosigkeit, ein stumpfes oder struppiges Federkleid, hohes Fieber, Atemnot, Niesen, Husten, Kopfödeme, Blauverfärbungen von Haut und Schleimhäuten, grünlicher Durchfall, Abnahme oder Aussetzen der Legeleistung sowie zentralnervöse Störungen [FLI, 2010a; KAADEN, 2002; ENTSCHEIDUNG 2006/437/EG DER KOMMISSION; WERNER & KALETA, 2005]. Nicht selten wird bei Hühnervögeln der plötzliche Tod ohne vorheriges Auftreten klinischer Symptome beobachtet [FLI, 2010a].

LPAI

Die „low pathogenic avian influenza“ (LPAI) besitzt bei hoher Morbidität meist nur eine geringe Mortalität [WERNER & KALETA, 2005] und zeichnet sich durch eine lokale Infektion des Respirations- und Verdauungstrakts mit milden klinischen Symptomen wie gestörtes Allgemeinbefinden, Zyanosen von Kamm und Kehllappen, gesträubtes Gefieder, vorübergehenden Abfall der Legeleistung, verringerte Futter- und Wasseraufnahme, Gewichtsverlust sowie Mattigkeit aus [CAPUA & MUTINELLI, 2001; SWAYNE & HALVERSON, 2008; WERNER & KALETA, 2005]. Ungünstige Umweltbedingungen oder andere Infektionen können die klinischen Symptome verstärken [SWAYNE & HALVERSON, 2008].

Differentialdiagnostik

Tritt plötzlich eine schwere Allgemeinerkrankung mit hoher Morbidität sowie Mortalität auf, muss immer an Aviäre Influenza gedacht werden. Da Krankheitsverlauf und Organveränderungen der Newcastle Disease ähneln, ist diese mittels virologischer Untersuchungen auszuschließen. Weiterhin sind Geflügelcholera und andere septikämische Erkrankungen, Entenpest, akute Infektiöse Laryngotracheitis, bakterielle Entzündungen der Kämme und Kehllappen sowie akute Vergiftungen differentialdiagnostisch abzuklären [WERNER & HARDER, 2006a; WERNER & KALETA, 2005].

4.6 Diagnostik

Liegt der Verdacht der Aviären Influenza vor, werden die Proben gemäß der Angaben des EU-Handbuchs zur Diagnose der Aviären Influenza entnommen, transportiert, im Labor analysiert und der Befund ausgewertet. Diese Maßnahme stellt sicher, dass der Nachweis der Aviären Influenza EU-weit nach einheitlichen Methoden erfolgt [ENTSCHEIDUNG 2006/437/EG DER KOMMISSION].

Der Nachweis von AIV kann direkt oder indirekt erfolgen. Für den direkten Nachweis von AIV existieren grundsätzlich zwei Verfahren, die Klassische und die Molekulare Methode, welche der Feststellung des Influenza-A-Virus dienen und bei Bestätigung desselben dieses weiter spezifizieren und pathotypisieren.

Bei der Klassischen Methode wird zunächst das Virus in einem embryonierten Hühnerei isoliert. Dafür wird das zu untersuchende Probenmaterial speziell aufbereitet und in die Allantoishöhle von 8 bis 10 Tage vorbebrüteten Hühnereiern, welche aus spezifiziert pathogenfreien (SPF) Herden stammen sollten, beimpft. Nach Bebrütung der Eier bei 37 °C werden die Allantois- sowie die Amnionflüssigkeiten auf Hämagglutination untersucht. Erfolgt eine Hämagglutination, ist eine Kontamination auszuschließen [FLI, 2010a; ENTSCHEIDUNG 2006/437/EG DER KOMMISSION]. Abbildung 4 zeigt einen 15 Tage alten Embryonen aus einem unbehandelten Hühnerei im Vergleich zu einem Embryonen aus einem mit AIV H3N8 beimpften Hühnerei. Der Embryo aus dem mit AIV H3N8 beimpften Hühnerei ist deutlich schlechter entwickelt als der Embryo des unbehandelten Hühnereis.

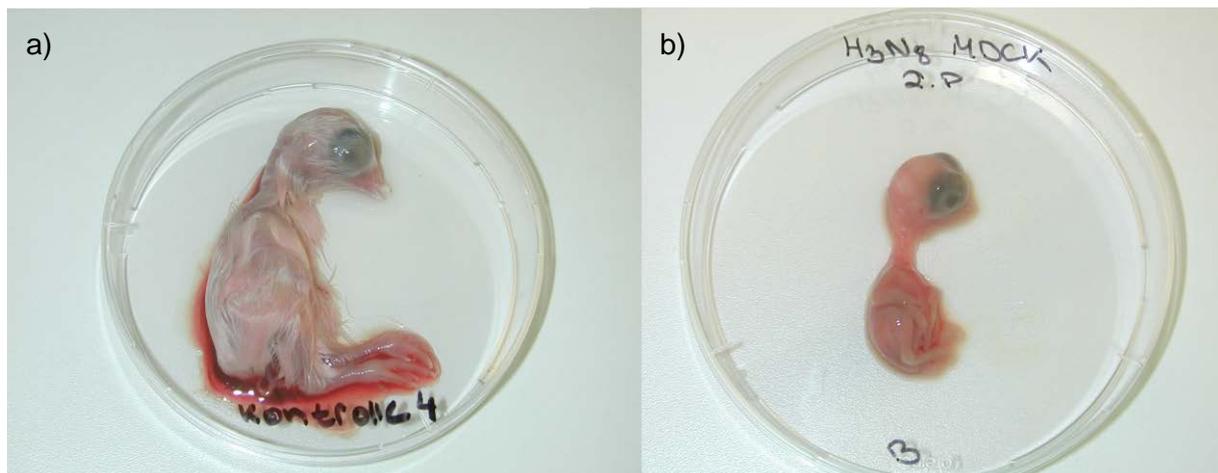


Abbildung 4: 15 Tage alte Embryonen a) Negativkontrolle; b) Positivkontrolle mit AIV H3N8 [FISCHER; 2010; IBS]

Hämagglutinierende Isolate werden, um die H-Subtypen zu charakterisieren, einem Hämagglutinationshemmungstest unterzogen. Dieser Test beruht auf der Fähigkeit der Influenza-A-Viren, Erythrozyten zu agglutinieren [FLI, 2010a; ENTSCHEIDUNG 2006/437/EG DER KOMMISSION]. Die Bestimmung des N-Subtyps kann analog mit einem Neuraminidasehemmtest bestimmt werden [AYMARD, 2003]. Für Angaben der Virulenz von Influenza-A-Viren wird mittels Tierversuch der intravenöse Pathogenitätsindex (IVPI) ermittelt. Influenzaviren mit einem Index von über 1,2 sind unabhängig von ihrem Subtyp als HPAIV einzustufen [ENTSCHEIDUNG 2006/437/EG DER KOMMISSION].

Für die Virusanzucht und die H-Subtypisierung werden 3-6 Tage benötigt, wobei in diesem Zeitraum nur der Verdacht auf HPAI besteht. Nach 14 Tagen kann die Pathogenität beurteilt werden, wodurch der Verdacht bestätigt wird. Der Ausschluss von AIV ist sogar erst nach 21 Tagen möglich [FLI, 2010a]. Zudem ist die Virusisolierung im embryonierten Hühnerei kostspielig und erfordert eine vorausschauende Planung, da die Embryonen 9-11 Tage vor Nutzung inkubiert werden müssen [SPACKMAN *et al.*, 2008].

Eine weitere Möglichkeit der AIV Isolierung und Vermehrung besteht in der Anwendung von Zellkulturen. Gegenwärtig erreichen Zellkulturen zur Isolierung von Influenzaviren allerdings nicht dieselbe hohe Sensitivität, die bei der Anwendung von embryonierten Hühnereiern besteht. Aus diesem Grund ist diese Methode nicht als Standardmethode zu empfehlen [BEER *et al.*, 2006; CLAVIJO *et al.*, 2002; FLI, 2010a; MORESCO *et al.*, 2009].

Mit Hilfe der molekularen Methode, der Polymerase-Kettenreaktion (PCR, Polymerase Chain Reaction) kann eine Infektion mit HPAIV schneller nachgewiesen bzw. ausgeschlossen werden als mit der klassischen Methode. Auch die molekulare Methode folgt beim Nachweis Aviärer Influenza einem Stufenprinzip. So wird zuerst, um die Anwesenheit von Influenza-A spezifischer RNA zu überprüfen, eine Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR) durchgeführt, welche ein Fragment des Matrixproteingens amplifiziert [FLI, 2010a]. Fällt der Nachweis von Influenza-A-RNA positiv aus, werden weitere RT-PCRs durchgeführt, welche dem subtypspezifischen Nachweis von H5 und H7 dienen. Diese Untersuchungen basieren auf einer Amplifizierung von definierten Fragmenten des jeweiligen HA-Gens und detektieren somit anzeigepflichtige AIVs [DYBKAER *et al.*, 2004; FLI, 2010a; SPACKMAN *et al.*, 2002]. Wurde der Subtyp H5 bzw. H7 nachgewiesen, kann durch Sequenzierung des Genabschnitts, der für die Spaltstelle des HA kodiert, die erwartungsgemäße Pathogenität des Virus bestimmt werden. Befinden sich an der Spaltstelle mehrere basische Aminosäuren, wird das Virus als HPAIV eingestuft [WERNER & KALETA, 2005].

Mit Hilfe einer generischen RT-PCR, die auf einer konservierten Region des HA2-Gens basiert, und anschließender Sequenzanalyse ist außerdem eine schnelle Identifizierung aller

H-Subtypen von Influenza-A-Viren möglich [PHIPPS *et al.*, 2004]. Weiterhin existieren für alle bisher bekannten 9 N-Subtypen von Influenza-A-Viren subtypspezifische RT-PCRs [FEREIDOUNI *et al.*, 2009]. Dies ermöglicht eine vollständige Charakterisierung innerhalb weniger Tage. Eine Ausschlussdiagnose, also ein negatives Ergebnis des Nachweises des Matrixproteingens, kann sogar, im Gegensatz zur klassischen Methode, innerhalb eines einzigen Arbeitstages erfolgen [FLI, 2010a].

Der indirekte Nachweis von AIV erfolgt anhand serologischer Untersuchungen. Dabei werden mit Hilfe von ELISA Tests spezifische Antikörper nachgewiesen, die gegen die Nukleoprotein- bzw. Matrix-Antigene gebildet wurden [FLI, 2010a, VAHLENKAMP *et al.*, 2008]. Findet hierbei eine positive Reaktion statt, werden die Antikörper mittels Hämagglutinationshemmungstest (HAH-Test) subtypisiert [FLI, 2010a; GIESE *et al.*, 2008; LESCHNIK *et al.*, 2007].

Weitere mögliche Untersuchungsmethoden sind der Immundoppeldiffusions-Test, der Hämagglutinationstest, der Agar-Gel-Präzipitations-Test sowie der Virusneutralisationstest [ENTSCHEIDUNG 2006/437/EG DER KOMMISSION; VAHLENKAMP *et al.*, 2008; WERNER & KALETA, 2005].

4.7 Tierseuchenrechtliche Aspekte

Wie bereits in Kapitel B 4 beschrieben, kann die Geflügelpest zu enormen wirtschaftlichen Verlusten in der Geflügelindustrie führen und ist deshalb eine nach dem Tierseuchengesetz sowie dem Terrestrial Animal Health Code 2010 des Internationalen Tierseuchenamtes (Office International des Epizooties/O.I.E) anzeigepflichtige Infektionskrankheit. Aus diesem Grund ist bei bestehendem Verdacht auf Geflügelpest der zuständige Amtstierarzt zu informieren. Wird der Ausbruch der Geflügelpest amtlich bestätigt, erfolgt in fast allen Ländern weltweit die Bekämpfung mit Hilfe staatlich angeordneter Maßnahmen [WERNER & HARDER, 2006]. In Deutschland wird in der „Verordnung zum Schutz gegen die Geflügelpest (Geflügelpestverordnung) vom 18. Oktober 2007 (BGBl. I S. 2348), die zuletzt durch Artikel 1 der Verordnung vom 18. Dezember 2009 (BGBl. I S. 3939) geändert wurde“, die Bekämpfung der Aviären Influenza geregelt. Diese dient außerdem der Umsetzung der Richtlinie 2005/94/EG des Rates vom 20. Dezember 2005. Laut Geflügelpestverordnung wird die Geflügelpest wie folgt definiert: „Geflügelpest liegt vor, wenn a) hochpathogenes aviäres Influenza-A-Virus der Subtypen H5 oder H7, das für multiple basische Aminosäuren im Spaltbereich des Hämagglutininmoleküls kodiert, durch Virus-, Antigen- oder Genomnachweis (virologische Untersuchung) oder b) andere als in Buchstabe a genannte Influenzaviren mit einem intravenösen Pathogenitätsindex von mehr als 1,2 in sechs Wochen alten Hühnern durch virologische Untersuchung (hochpathogenes aviäres Influenzavirus) bei

einem gehaltenen Vogel oder hochpathogenes aviäres Influenza-A-Virus des Subtyps H5N1 bei einem Wildvogel durch eine virologische Untersuchung nachgewiesen worden ist.“ Da Heilversuche verboten sind, werden die Tiere des betroffenen Betriebs getötet und unschädlich beseitigt. Diese Maßnahme soll den Erreger schnellstmöglich tilgen. Weiterhin werden Ställe, Einrichtungsgegenstände, Gerätschaften sowie Fahrzeuge, die für den Transport getöteter oder verendeter Vögel genutzt wurden, fachgerecht gereinigt und desinfiziert. Außerdem werden um den Ausbruch der Seuche Schutz- und Überwachungszonen eingerichtet, innerhalb derer der Verkehr von Menschen, Tieren und Produkten gesperrt oder eingeschränkt ist. Schutzimpfungen gegen Geflügelpest sind ebenso wie Heilversuche generell verboten. Allerdings können durch die zuständige Behörde, nach einer Zustimmung der Kommission der Europäischen Gemeinschaft, Ausnahmen erteilt werden. Dazu gehören z.B. Impfungen in Zoos, amtlich zugelassenen Einrichtungen, Institutionen oder Zentren, aber auch zur Arterhaltung oder zur Erhaltung seltener Rassen.

4.8 Epidemiologie

In den letzten Jahren unterlag die Epidemiologie der Aviären Influenza einer grundlegenden Veränderung [ALEXANDER, 2007], was sich unter anderem in einer verkürzten Frequenz der HPAI-Ausbrüche zeigt. So fanden von 1959 bis 1995, also innerhalb von 37 Jahren, 14 HPAI-Ausbrüche statt. Dies entspricht einer Häufigkeit von einem Ausbruch alle 2,64 Jahre. In den 13 Jahren von 1996 bis 2008 wurde das Auftreten von HPAIV hingegen 11 Mal berichtet, wodurch sich eine Erhöhung der Frequenz auf einen HPAI-Ausbruch alle 1,18 Jahre ergibt [ALEXANDER & BROWN, 2009]. Ebenso steigerte sich die Zahl des betroffenen Geflügels pro HPAI-Ausbruch. Diese zwei Phänomene begründen sich zum einen in einer größeren Bekanntheit der Aviären Influenza und ihrer besseren Diagnosemöglichkeiten, der Erfolglosigkeit, die Infektionen in Geflügel zu kontrollieren und auszumerzen, der fortlaufenden Entwicklung und Industrialisierung der Geflügelhaltung weltweit sowie der freieren Berichterstattungen und Untersuchungen der Krankheit. Zum anderen können Abweichungen der Flugrouten von Wildvögeln auf Grund klimatischer Veränderungen für diesen Trend verantwortlich sein [ALEXANDER, 2007].

Tabelle 2 zeigt eine Übersicht der seit 1959 dokumentierten HPAI-Erstausbrüche bei Geflügel.

Tabelle 2: Berichtete HPAI-Erstausbrüche bei Geflügel seit 1959 modifiziert nach ALEXANDER & BROWN [2009] und RODRIGUEZ-LECOMPTÉ *et al.* [2011]

	HPAIV	Subtyp	Geschätzte Zahl betroffenen Geflügels
1	A/chicken/Scotland/59	H5N1	1 kleiner Betrieb
2	A/turkey/England/63	H7N3	29.000
3	A/turkey/Ontario/7732/66	H5N9	8.000
4	A/chicken/Victoria/76	H7N7	58.000
5	A/chicken/Germany/79	H7N7	600.000 Hühner, 80 Gänse
6	A/turkey/England/199/79	H7N7	9.000
7	A/chicken/Pennsylvania/1370/83	H5N2	17.000.000
8	A/turkey/Ireland/1378/83	H5N8	307.000, davon 270.000 Enten
9	A/chicken/Victoria/85	H7N7	240.000
10	A/turkey/England/50–92/91	H5N1	8.000
11	A/chicken/Victoria/1/92	H7N3	18.000
12	A/chicken/Queensland/667-6/94	H7N3	22.000
13	A/chicken/Mexico/8623-607/94	H5N2	unbekannt – Millionen?
14	A/chicken/Pakistan/447/94	H7N3	> 6.000.000
15	A/goose/Guandong/96	H5N1	unbekannt – mehrere hundert Millionen
	A/chicken/Hong Kong/97		
	A/chicken/Eurasia and Africa/2003–2006		
16	A/chicken/NSW/97	H7N4	310.000
17	A/chicken/Italy/330/97	H5N2	8.000
18	A/turkey/Italy/99	H7N1	13.732.912
19	A/chicken/Chile/2002	H7N3	634.000
20	A/chicken/Netherlands/2003	H7N7	> 28.000.000
21	A/chicken/Texas/2004	H5N2	6.608
22	A/chicken/Canada-BC/2004	H7N3	> 17.000.000
23	A/ostrich/S. Africa/2004	H5N2	> 30.000
24	A/chicken/N. Korea/2005	H7N7	219.000
25	A/turkey/England/2007	H5N1	160.000
26	A/chicken/Canada/2007	H7N3	540
27	A/chicken/England/2008	H7N7	15.000
28	A/chicken/Spain/2009	H7N7	30.000

4.8.1 Situation weltweit

In Südostasien wurde 1997 erstmals ein HPAIV des Subtyps H5N1 detektiert. Dieses hat sich, beginnend im Dezember 2003, zunächst erheblich im gesamten südostasiatischen Raum ausgebreitet und sorgte dort für AI-Ausbrüche, die ein bis zu diesem Zeitpunkt unerreichtes Ausmaß annahmen. Südkorea, Vietnam, Japan, Thailand, Kambodscha, Laos, Indonesien, China und Malaysia gehörten zu den zuerst betroffenen Ländern [WERNER, 2005]. Im Frühjahr 2005 führte das HPAIV H5N1 am See Qinghai in China zu einem Massensterben von wilden Wasservögeln [CHEN *et al.*, 2005]. Trotz gravierender Maßnahmen die weitere Ausbreitung des Virus zu verhindern, fand es sich im Verlauf des Sommers und Herbstes 2005 auch in westlicher gelegenen Regionen, also in der Mongolei, in Kasachstan sowie im Süden Russlands [UNGER *et al.*, 2007]. Ende 2005 erreichte das

Virus die Schwarzmeerregion sowie, mit der Türkei, Rumänien, Kroatien und der ukrainischen Halbinsel Krim, Europa [HARDER *et al.*, 2006]. Sowohl in Indonesien als auch in Ägypten gilt bei Geflügel die Infektion mit HPAIV H5N1 als endemisch [METTENLEITER, 2011]. Gegen Ende Winter und Anfang Frühling 2006 wurden der O.I.E HPAI-Geschehen von zahlreichen europäischen Ländern (Bulgarien, Griechenland, Italien, Slowenien, Österreich, Deutschland, Bosnien-Herzegowina, Frankreich, Ungarn, Slowakei, Schweiz, Serbien-Montenegro, Polen, Dänemark und Schweden) gemeldet [TEIFKE *et al.*, 2007; WHO, 2006b]. Seit 2003 berichteten weltweit inzwischen 63 Länder den Ausbruch von HPAIV H5N1 in Haugeflügel und/oder Wildvögeln (<http://www.oie.int>). Alleine von Januar bis März 2011 fanden bereits insgesamt 153 Ausbrüche in 12 Ländern (Bangladesch, Kambodscha, Ägypten, Hong Kong, Indonesien, Japan, Myanmar, Korea, Indien, Vietnam, Westjordanland und Israel) statt. Indessen kam es im Zeitraum zwischen November 2003 und März 2011 nur in 16 Ländern zu 539 bestätigten Fällen von H5N1 beim Menschen, wobei davon 318 tödlich endeten. Dies entspricht einer Letalität von 58,9 % [FAO, 2011]. Dies zeigt, dass die Wahrscheinlichkeit, sich mit HPAIV H5N1 zu infizieren, gering ist. Erfolgt allerdings eine Infektion mit HPAIV H5N1, verläuft die Erkrankung sehr stark.

4.8.2 Situation in Deutschland

Seit dem Jahr 1979, in dem der Influenza-A-Subtyp H7N7 für einen Ausbruch von Aviärer Influenza in Deutschland verantwortlich war, wurde erst wieder am 08.05.2003 der Verdacht auf Geflügelpest in einem Mastbestand in Nordrhein-Westfalen amtlich bestätigt. Hierbei handelte es sich ebenfalls um den HPAIV-Subtyp H7N7, der kurz zuvor in den Niederlanden 255 Ausbrüche verursachte. Es erfolgte daraufhin unter anderem die unschädliche Beseitigung aller Tiere des Seuchenbetriebes sowie des gesamten Geflügels im Umkreis von 1 km. Weitere Maßnahmen, wie Sperrzonen oder Transportverbote, wurden ergriffen [WERNER, 2004]. Von Juni 2004 bis Januar 2005 wurden im Rahmen eines Monitoringprogramms deutschlandweit 829 Bestände überwiegend serologisch auf die AIV-Subtypen H5 und H7 untersucht. Dabei wurden in vier Gänsebeständen in Nordrhein-Westfalen sowie in einer Gänsehaltung in Niedersachsen Antikörper gegen AIV H5 bzw. AIV H7 festgestellt. Die Tiere dieser positiv getesteten Herden wurden vorbeugend getötet [WERNER, 2005]. 2005 konnte trotz intensiver AI-Monitoringuntersuchungen (9.578 Wildvögel sowie eine repräsentative Anzahl an Hausgeflügel) kein HPAIV nachgewiesen werden. LPAIV unterschiedlicher Subtypen, darunter auch H5N1, befanden sich allerdings sowohl in der Wildvogelpopulation als auch in zwei Hausgeflügelbeständen [HARDER *et al.*, 2006]. Im Februar 2006 trat HPAIV H5N1 Asia zunächst bei wilden Wasservögeln auf der Insel Rügen auf. Von dort aus verbreitete sich das Virus entlang der Ostseeküste bis hin zur

Nordsee sowie nach Brandenburg und infizierte nunmehr auch ein größeres Spektrum an Vogelarten. Auch in Süddeutschland wurden Infektionen von HPAIV H5N1 bei Wildvögeln nachgewiesen, wobei diese sich vor allem am Bodensee und in Franken manifestierten. Deutschlandweit konnten im Jahr 2006 344 Fälle von HPAIV H5N1 bei Wildvögeln und ein Ausbruch in einem Hausgeflügelbestand in Sachsen im April festgestellt werden. Zusätzlich wurde das Virus bei Hauskatzen und einem Steinmarder detektiert [UNGER *et al.*, 2007]. 2007 erfolgte ein erneuter Nachweis von HPAIV H5N1 bei 326 Wildvögeln, wobei 325 davon tot aufgefunden worden waren. Ein Großteil der infizierten Wildvögel befand sich an der Talsperre Kelbra in Sachsen-Anhalt nahe der Grenze zu Thüringen. Auch bei sechs Hausgeflügelhaltungen kam es zu Ausbrüchen Aviärer Influenza. Neben kleinen Beständen von 10 bis 32 Tieren mit Enten, Gänsen und Hühnern in Thüringen sowie Brandenburg, waren auch zwei große Betriebe in Bayern mit ungefähr je 17.000 Mastenten betroffen, in denen die Tiere entweder verendet sind oder gekeult wurden. Die Ausbrüche stehen räumlich sowie zeitlich mit bei Wildvögeln vorkommenden Fällen in Verbindung [HARDER *et al.*, 2008; HARDER *et al.*, 2009]. Ende 2008 trat ein erneuter Fall von HPAIV H5N1 in einem Mischgeflügelbetrieb in Sachsen auf, wobei sich insgesamt die Situation deutlich beruhigte. Bei Wildvögeln konnte im gleichen Jahr kein HPAIV H5N1 nachgewiesen werden. Dagegen wurden im Landkreis Cloppenburg in Niedersachsen aufgrund eines LPAIV H5N3-Geschehens mit 34 amtlich festgestellten Ausbrüchen bei Hausgeflügel ca. 610.000 Tiere getötet. Diese Maßnahme begründete sich in dem Risiko, dass sich niedrigpathogene Varianten des Subtyps H5 oder H7 durch Mutation zu hoch pathogenen Virusvarianten entwickeln können [HARDER & SCHOENE, 2010; SCHOENE *et al.*, 2009]. Im Jahr 2009 kam es zu weiteren LPAI-Ausbrüchen in Hausgeflügel, unter anderem in Nordrhein-Westfalen in einem Putenbetrieb, verursacht durch den Subtyp H7N7, sowie in Thüringen in einem gemischten Wassergeflügelbestand, ausgelöst durch den Subtyp H5N2. Im Januar wurde HPAIV H5N1 einzig bei einer am Starnberger See erlegten Stockente detektiert [HARDER & SCHOENE, 2010]. 2010 ging das LPAI-Geschehen weiter. So wurden im November 17.000 Enten und Gänse in Mecklenburg-Vorpommern getötet. Grund hierfür war die Angst, dass der in Routineuntersuchungen entdeckte LPAIV H5N2 in den hochpathogenen Subtyp H5N1 mutiert (<http://www.promedmail.org>). Der jüngste LPAI-Ausbruch ereignete sich in Nordrhein-Westfalen. Am 27.05.2011 wurde zunächst das Vorliegen des Subtyps H7N7 in einem hühnerhaltenden Betrieb durch das Nationale Referenzlabor für Geflügelpest am FLI bestätigt. Weitere Betriebe waren betroffen. So sind in zehn Stallungen 83 Tiere positiv auf H7N7 getestet und mehr als 100.000 Vögel getötet worden. Anfang Juni kam es auch in Baden-Württemberg und Bayern zu einem Ausbruch in zwei Geflügelbetrieben. Beide hatten Kontakt zu einem der auf H7N7 positiv getesteten Betriebe in Nordrhein-Westfalen. Ende Juni waren zudem Betriebe in Sachsen betroffen.

Phylogenetische Untersuchungen des LPAIV haben eine enge Verwandtschaft mit Viren ergeben, die im März 2011 für einen AI-Ausbruch in den Niederlanden verantwortlich waren bzw. im Juli 2010 im Zoo Hannover nachgewiesen wurden [<http://www.animal-health-online.de>; <http://www.oie.int>; <http://www.promedmail.org>; FLI, 2011a]. Eine Infektion mit HPAIV H5N1 bei Menschen konnte in Deutschland bisher nicht bestätigt werden [WHO, 2011].

5 Auswirkungen der Aviären Influenza auf die Geflügelhaltung

Das weltweite Auftreten der Aviären Influenza zog einige gesetzliche Konsequenzen nach sich. Darunter fällt auch die Aufstallungspflicht, welche in der Geflügelpest-Verordnung vorgeschrieben, aber aus tierschutzrechtlichen Gründen kritisiert wird. Da die Betriebe zumeist nicht auf eine dauerhafte Aufstallung ausgerichtet sind, kommt es durch den Platzmangel zu einer eingeschränkten Bewegungsfreiheit der Tiere [SALZBORN, 2007]. Zudem besteht eine hohe Belastung durch Ammoniak und organischen Staub, welcher sich im Allgemeinen aus Partikeln der Einstreu, des Futters, von Hühnerfedern sowie –kot zusammensetzt und sowohl mit Bakterien und Pilzen als auch mit Endotoxinen behaftet ist [DANUSER, 2000]. Das Fehlen von Klimareizen, Tageslicht und Bademöglichkeiten bei Wassergeflügel sind weitere Faktoren, die zu extremem Stress sowie zu einer verminderten Immunabwehr führen. Die entstehenden hohen Besatzdichten begünstigen zusätzlich die Entwicklung und Ausbreitung von Krankheiten innerhalb eines Bestandes. Auch spontane Mutationen von LPAIV zu HPAIV werden durch die beschleunigten Tierpassagen erleichtert [SALZBORN, 2007]. In kleinen, extensiven Geflügelhaltungen ist die Wahrscheinlichkeit einer solchen Mutation wesentlich geringer [TURNER, 2004]. Infolge der Aufstallung kann es außerdem zu einer verminderten Legeleistung sowie zu Aggressivität und Verhaltensstörungen der Tiere kommen [SALZBORN, 2007]. Im Hinblick auf die Geflügelproduktion konnte ein negativer Zusammenhang zwischen dem Auftreten der Aviären Influenza und der Nachfrage an Geflügelfleisch festgestellt werden [BEACH & ZHEN, 2009]. Außerdem erleidet die ökologische Geflügelproduktion durch die Aufstallungspflicht, zusätzlich zu den wirtschaftlichen Einbußen, einen Imageverlust [DAMME, 2006], auch wenn in der Verordnung (EG) Nr. 699/2006 festgesetzt wurde, dass es „den Erzeugern erlaubt werden muss, ihr Geflügel ohne Verlust des ökologischen Status in Ställen zu halten, wenn zum Schutz der Gesundheit von Mensch und Tier auf der Grundlage des Gemeinschaftsrechts Beschränkungen, einschließlich tierseuchenrechtlicher Beschränkungen, beschlossen werden, die dem Zugang von Geflügel zu Auslauf- oder Weideflächen entgegenstehen“.

C Material und Methoden

1 Material

1.1 Chemikalien

Chemikalie	Art.-Nr.	Hersteller
100 bp Ladder	N3231L	New England Biolabs GmbH (Frankfurt am Main)
Borsäure	A3581	AppliChem GmbH (Darmstadt)
Bromphenolblau (4 %ig)	1.08122	Merck KGaA (Darmstadt)
Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB)	A-6284	AppliChem GmbH (Darmstadt)
Chloroform-Isoamylalkohl 24:1	C0549-1QT	Sigma Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen)
Dinatriumethyldiamintetraessigsäure (Na ₂ EDTA)	1.08454	Merck KGaA (Darmstadt)
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat (Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O)	1.06580.1000	Merck KGaA (Darmstadt)
Ethanol, 100 %ig	1.00983.2500	Merck KGaA (Darmstadt)
Ethidiumbromid (EtBr)	E-8751	Sigma Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	E-4884	Sigma Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen)
Flüssigstickstoff		Linde AG (Unterschleißheim)
GenAgarose LE	M3044.055	Genaxxon Bioscience (Biberach)
Glycerin	A3552	AppliChem GmbH (Darmstadt)
Isopropanol, 100 %ig	1.09634.2511	Merck KGaA (Darmstadt)
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	1.04873.0250	Merck KGaA (Darmstadt)
Lysozym (54.500 U/mg Protein)	L-6876	Sigma Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen)
Natriumchlorid (NaCl)	1.06404.1000	Merck KGaA (Darmstadt)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	L-4390	AppliChem GmbH (Darmstadt)
Proteinase K (30 U/mg Protein)	M3036.0500	Genaxxon Bioscience (Biberach)
Salzsäure (HCl)	0319	Merck KGaA (Darmstadt)
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	1.08382	Merck KGaA (Darmstadt)
Ultra Pure™ Glycogen	10814-010	InVitrogen GmbH (Karlsruhe)

1.2 Gebrauchslösungen

100 bp Ladder

100 bp Ladder	50 µl
Gelladepuffer	50 µl
Steriles, deionisiertes Wasser	100 µl

CTAB-NaCl

CTAB (0,2 M)	36,64 g
NaCl (0,5 M)	1,46 g
Destilliertes Wasser	50 ml

Ethidiumbromid (10 mg/l)

Ethidiumbromid	1 g
Steriles, destilliertes Wasser	100 ml

Gelladepuffer (GLB)

Gesättigte Bromphenolblaulösung	750 µl
Glycerin (40 %ig)	5000 µl
Nuklease-freies Wasser	4250 µl

NaCl

NaCl	14,61 g
Destilliertes Wasser	50 ml

PBS-Puffer (pH 7,4)

Dinatriumhydrogenphosphat	1,44 g
NaCl	8 g
KCl	0,2 g
Kaliumdihydrogenphosphat	0,24 g
Steriles, destilliertes Wasser	1 l

SDS (10 %ig)

SDS	5 g
Destilliertes Wasser	50 ml

TBE-Puffer (0,5 %ig)

Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (0,9 M)	108 g
Borsäure (0,9 M)	55 g
Na ₂ EDTA pH 8 (0,5 M)	40 ml
Steriles, destilliertes Wasser	1 l

TE-Puffer

Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (10 mM)	1,21 g
EDTA (1 mM)	0,37 g
Steriles, destilliertes Wasser	1 l

1.3 Gebrauchsmaterialien

Gebrauchsmaterial	Art.-Nr.	Hersteller/Vertreiber
Attrappe Hahn/Huhn	680-A/679-B	Traumland der Figuren (Recklinghausen)
Kunstrasen getuftet	2154987	OBI (Freising)
Mahlgefäß (10 ml) und Edelmahlkugeln	69985	Qiagen (Hilden)
Mörser	410-9113	VWR International GmbH (Darmstadt)
Pistill	410-9323	VWR International GmbH (Darmstadt)
Saugrohr	2863-1480	Kärcher (Freising-Achering)
Saugschlauch	9012-0040	Kärcher (Freising-Achering)
Schweiz Metall-Gebirgskraxe	54763-01-000	Räer (Hildesheim)
Spanngurt mit Klemmschnalle	55555-00-220	Räer (Hildesheim)
Turbobürste für Nass-/Trockensauger	4130-1770	Kärcher (Freising-Achering)
Wanne für Lyophilisator	600.587.62	IKEA (Eching)
Zeltnagel offen	10000053409	doorout.com GmbH & Co.KG (Fulda)

1.4 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Art.-Nr.	Hersteller
Destilliertes Wasser		Eigenproduktion
Filtertüten für Nass-/Trockensauger	6.904-263.0	Kärcher (Freising-Achering)
GenElute™ PCR Clean-Up Kit	NA1020	Sigma Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen)
INSTANT Virus RNA Kit	845-KS-4250050	AJ Innuscreen (Jena)
INTYPE IC-RNA	05-901	Labor Diagnostik Leipzig (Leipzig)
LightCycler® FastStart DNA Master SYBR Green I	12239264001	Roche Applied Science (Mannheim)
LightCycler® Kapillaren	11909339001	Roche Applied Science (Mannheim)
LightCycler® TaqMan® Master	4735536001	Roche Applied Science (Mannheim)
Nukleasefreies Wasser	P119	Promega GmbH (Mannheim)
PCRFast® Geflügel	TG1009	Th.Geyer (Berlin)
PCR Master Mix	M7505	Promega GmbH (Mannheim)
peqGOLD TriFast™	30-2010	PeqLab Biotechnologie GmbH (Erlangen)
Pipetten-Filterspitzen (0,5-10 µl)	70.1115.410	Sarstedt AG & Co.KG (Nümbrecht)
Pipetten-Filterspitzen (10-100 µl)	70.762.412	Sarstedt AG & Co.KG (Nümbrecht)
Pipetten-Filterspitzen (100-1000 µl)	70.760.411	Sarstedt AG & Co.KG (Nümbrecht)
PowerSoil™ DNA Isolation Kit	12888-50	MO BIO Laboratories, Inc. (Carlsbad, USA)
pUC19-Plasmid-DNA	X911.1	Carl Roth (Karlsruhe)
QIAamp® DNA Stool Mini Kit	51504	Qiagen (Hilden)
QIAamp® Viral RNA Mini Kit	52904	Qiagen (Hilden)
Reaktionsgefäße aus PP, PCR-clean (0,5 ml)	211-2163	VWR International GmbH (Darmstadt)
Reaktionsgefäße aus PP, PCR-clean (1,5 ml)	211-2164	VWR International GmbH (Darmstadt)
Reaktionsgefäße aus PP, PCR-clean (2,0 ml)	211-2165	VWR International GmbH (Darmstadt)
Reaktionsgefäße aus PP, steril (15 ml)	188271	Greiner Bio-One International AG (Frickenhausen)
Reaktionsgefäße aus PP, steril (50 ml)	227261	Greiner Bio-One International AG (Frickenhausen)
RNA PowerSoil™ Total RNA Isolation Kit	12866-25	MO BIO Laboratories, Inc. (Carlsbad, USA)
RNasefreies Wasser	129112	Qiagen (Hilden)
Schuhüberzüge CPP Größe S	113-1020	VWR International GmbH (Darmstadt)
Superscript™ III One-Step RT-PCR System with Platinum® Taq DNA Polymerase	12574-026	Invitrogen (Karlsruhe)

1.5 Technische Geräte

Technisches Gerät	Typ-Bezeichnung	Hersteller/Vertreiber
Analysenwaage	R200D	Sartorius AG (Göttingen)
Analysenmühle	A 10	Jahnke & Kunkel IKA® Labortechnik (Staufen)
Elektrophoresekammer	40-1214	PeqLab Biotechnologie GmbH (Erlangen)
Gefriertrocknungsanlage	P12KS	Dieter Piatkowski (München)
Laborschwingmühle	TissueLyser II	Qiagen (Hilden)
LightCycler®	1.x	Roche Applied Science (Mannheim)
Mikrowellenherd		Bauknecht Hausgeräte GmbH (Stuttgart)
Mikrozentrifuge	Mini Spin®	Eppendorf AG (Hamburg)

Technisches Gerät	Typ-Bezeichnung	Hersteller/Vertreiber
Minizentrifuge	Sprout™, Nr. 552010	Biozym Scientific GmbH (Hess)
Nass-/Trockensauger	A 2701	Kärcher (Freising-Achering)
Spannungsgerät für Agarosegele	EV 234	PeqLab Biotechnologie GmbH (Erlangen)
Spectrophotometer NanoDrop	ND-1000/UV/VIS	PeqLab Biotechnologie GmbH (Erlangen)
Sterilwerkbank Herasafe	HS 12	Kendro Laboratory Products GmbH (Hanau)
Thermocycler	T 3000	Biometra GmbH (Göttingen)
Thermomixer	Comfort	Eppendorf AG (Hamburg)
Tischzentrifuge	Galaxy 16 DH	VWR International GmbH (Darmstadt)
UV-Gerät	983506	ITF Labortechnik GmbH & Co.KG (Wasserburg)
Vortex Genie 2	G560 E	Scientific Industries (Bohemia, USA)
Vortexadapter	13000-V1	Mo Bio Laboratories, Inc. (Carlsbad, USA)
Wasserbad	Typ 1013	Gesellschaft für Labortechnik GmbH (Burgwedel)

1.6 Primer und Sonden

Name	Sequenz (5' → 3')	Lokalisation Genbank / Position	Amplikonlänge [bp]	T _m (°C)**	Referenz
Federkeratin for	GTG GTG ATT CAG CCC TCT C	X00316 / 94-112	186	61,0	eigene Arbeit
Federkeratin rev	CCT GCC AGA GAA GCG GCT GC	X00316 / 279- 260		61,4	eigene Arbeit
Federkeratin A for	GAG CCT TTG CTT CCT TGA TG	X17511 / 172-191	166	57,3	eigene Arbeit
Federkeratin A rev	GGC TGG CAA GAT GGA TAT GT	X17511 / 337-318		57,3	eigene Arbeit
Federkeratin C + flanks for	CAC CAG CTC TGT TCT GCT TG	J00847 / 217-236	229	59,4	eigene Arbeit
Federkeratin C + flanks rev	CAT GGC TGT AGG ATG GGA GT	J00847 / 445-426		59,4	eigene Arbeit
Keratin_F*	CAG CTC CTT CCC CCA GAA	X00316 / 144-161		57,5	eigene Arbeit
Keratin_R*	AGA CAC CTC CTG CCA GAG AAAG	X00316 / 287-268	144	57,7	eigene Arbeit
Keratin_TM*	6FAM-TCC AGC ACC TCT GCT GCT GTT GGC-BBQ	X00316 / 175-198		70,1	eigene Arbeit
Sim	GAC CTC CCA GCT CCA TCA AAC ATC TCA TCT TGA TGA AA	X52392 / 14953-14990	227	72,4	MATSUNAGA <i>et al.</i> [1999]
Chicken	AAG ATA CAG ATG AAG AAG AAT GAG GCC	X52392 / 15179-15153		59,6	MATSUNAGA <i>et al.</i> [1999]
Sim-pUC19	GAC CTC CCA GCT CCA TCA AAC ATC TCA TCT TGA TGA AA <u>TTG CCG GGA AGC</u> <u>TAG AGT AA</u>	L09137 / 1878-1897	456	81,4	eigene Arbeit
Chicken-pUC19	AAG ATA CAG ATG AAG AAG AAT GAG GCG GCT ATG <u>TGG CGC GGT ATT AT</u>	L09137 / 2268-2249		77,0	eigene Arbeit
IVA-M_1for	AGA TGA GTC TTC TAA CCG AGG TCG	konservierte Region in allen Typ A Influenza Matrixgenen			SPACKMAN <i>et al.</i> [2002] SPACKMAN <i>et al.</i> [2002] SPACKMAN <i>et al.</i> [2002]
IVA-M1.1rev	TGC AAA AAC ATC TTC AAG TYT CTG				
IVA-M_FAM-BBQ	FAM-TCA GGC CCC CTC AAA GCC GA- BBQ				
EGFP12-F	TCG AGG GCG ACA CCC TG	U55761 / 439-456			HOFFMANN <i>et al.</i> [2006]
EGFP10-R	CTT GTA CAG CTC GTC CAT GC	U55761 / 813-794	375		HOFFMANN <i>et al.</i> [2006]
EGFP-1-DYXL	DYXL-AGC ACC CAG TCC GCC CTG AGC A-BBQ	U55761 / 703-724			HOFFMANN <i>et al.</i> [2006]

* designt von TIB MOLBIOL GmbH

** T_m (°C): thermodynamischer Schmelzpunkt (Methode TIB MOLBIOL)

1.7 Probenmaterial

1.7.1 Probenmaterial zur Testung des vogelspezifischen Genabschnitts

Um die Spezifität des gewählten vogelspezifischen Genabschnitts zu testen, wurden diverse Proben tierischer Herkunft gesammelt.

Material von Vögeln

In Zusammenarbeit mit der Klinik für Vögel, Reptilien, Amphibien und Zierfische der Ludwig-Maximilians-Universität München in Oberschleißheim und dem Tierpark Hellabrunn in München konnten Federn, Kotproben oder Kloakentupfer folgender Vogelarten gewonnen werden (Tabelle 3):

Tabelle 3: Liste der auf den vogelspezifischen Genabschnitt getesteten Vogelarten und entnommenen Materials

Vogelart	Wissenschaftlicher Name	Ordnung	Federn	Kot/Kloakentupfer
Amsel	<i>Turdus merula</i>	Passeriformes	+	/
Blässhuhn	<i>Fulica atra</i>	Gruiformes	/	+
Brauner Sichler	<i>Plegadis falcinellus</i>	Ciconiiformes	/	+
Buntspecht	<i>Picoides major</i>	Piciformes	+	+
Elster	<i>Pica pica</i>	Passeriformes	+	+
Fasan	<i>Phasianus colchicus</i>	Galliformes	+	+
Grünfink	<i>Carduelis chloris</i>	Passeriformes	+	+
Hausrotschwanz	<i>Phoenicurus ochruros</i>	Passeriformes	+	/
Höckerschwan	<i>Cygnus olor</i>	Anseriformes	/	+
Hyazinthara	<i>Anodorhynchus hyacinthinus</i>	Psittaciformes	+	+
Kanadagans	<i>Branta canadensis</i>	Anseriformes	/	+
Kolkrabe	<i>Corvus corax</i>	Passeriformes	+	+
Kuhreiher	<i>Bubulcus ibis</i>	Ciconiiformes	+	+
Löffelente	<i>Anas clypeata</i>	Anseriformes	/	+
Mäusebussard	<i>Buteo buteo</i>	Falconiformes	+	+
Mönchsgrasmücke	<i>Sylvia atricapilla</i>	Passeriformes	+	+
Nymphensittich	<i>Nymphicus hollandicus</i>	Psittaciformes	+	+
Rebhuhn	<i>Perdix perdix</i>	Galliformes	+	+
Ringeltaube	<i>Columba palumbus</i>	Columbiformes	/	+
Roter Sichler	<i>Eudocimus ruber</i>	Ciconiiformes	/	+
Rothalsgans	<i>Branta ruficollis</i>	Anseriformes	/	+
Sakerfalke	<i>Falco cherrug</i>	Falconiformes	+	+
Spatz/Haussperling	<i>Passer domesticus</i>	Passeriformes	+	/
Sperber	<i>Accipiter nisus</i>	Falconiformes	+	+
Star	<i>Sturnus vulgaris</i>	Passeriformes	+	+
Steinadler	<i>Aquila chrysaetos</i>	Falconiformes	+	+
Stockente	<i>Anas platyrhynchos</i>	Anseriformes	/	+
Sumpfohreule	<i>Asio flammeus</i>	Strigiformes	+	+
Turmfalke	<i>Falco tinnunculus</i>	Falconiformes	+	+
Waldkauz	<i>Strix aluco</i>	Strigiformes	+	+
Waldohreule	<i>Asio otus</i>	Strigiformes	+	+
Waldrapp	<i>Geronticus eremita</i>	Ciconiiformes	+	+
Wanderfalke	<i>Falco peregrinus</i>	Falconiformes	+	+
Wespenbussard	<i>Pernis apivorus</i>	Falconiformes	+	+
Wintergoldhähnchen	<i>Regulus regulus</i>	Passeriformes	+	/
Witwenpfeifgans	<i>Dendrocygna viduata</i>	Anseriformes	/	+
Wüstenbussard	<i>Parabuteo unicinctus</i>	Falconiformes	/	+

+: vorhandenes Untersuchungsmaterial

/: kein Untersuchungsmaterial vorhanden

Weiteres Probenmaterial

Zudem wurden die in Tabelle 4 aufgeführten Kotproben von Reptilien sowie die unterschiedlichen Probenmaterialien von Insekten und weiteren Tierarten untersucht. Reptilien wurden deshalb in die Untersuchungen mit aufgenommen, da diese durch ihre sehr nahe Verwandtschaft zu Vögeln [NICKEL *et al.*, 1992; SAWYER & KNAPP, 2003; STORCH & WELSCH, 2005] möglicherweise falsch positive Ergebnisse erzeugen können, Insekten und Regenwürmer dagegen, weil sie auf den Versuchsflächen häufig vertreten waren. Die von diesen Tieren gewonnenen Proben stammten größtenteils aus der Auffangstation für Reptilien München e.V..

Tabelle 4: Liste weiterer auf den vogelspezifischen Genabschnitt getesteter Tierarten

Tierart	Wissenschaftlicher Name
Abgottschlange	<i>Boa constrictor</i>
Blauzungenskink	<i>Tiliqua scincoides</i>
Gecko	<i>Gekkonidae</i>
Gelbe Dionennatter	<i>Elaphe dione</i>
Griechische Landschildkröte	<i>Testudo hermanni</i>
Grüne Wasseragame	<i>Physignathus cocincinus</i>
Grüner Leguan	<i>Iguana iguana</i>
Hausmaus	<i>Mus musculus</i>
Hauspferd	<i>Equus ferus caballus</i>
Hausratte	<i>Rattus rattus</i>
Hausschwein	<i>Sus scrofa domestica</i>
Heimchen	<i>Acheta domesticus</i>
Königsnatter	<i>Lampropeltis</i>
Königspython	<i>Python regius</i>
Leopardgecko	<i>Eublepharis macularius</i>
Mauereidechse	<i>Podarcis muralis</i>
Mittelmeergrille	<i>Gryllus bimaculatus</i>
Prärie-Strumpfbandnatter	<i>Thamnophis radix</i>
Regenwurm	<i>Lumbricida</i>
Ritteranolis	<i>Anolis equestris</i>
Rotkehlanolis	<i>Anolis carolinensis</i>
Stachelleguan	<i>Sceloporus</i>
Steppenwaran	<i>Varanus exanthematicus</i>
Teppichpython	<i>Morelia spilota variegata</i>
Wanderheuschrecke	<i>Locusta migratoria</i>

1.7.2 Positivkontrollen

Als Positivkontrolle zur Testung des vogelspezifischen Genabschnitts dienten Federn von Hühnern, die auf der Versuchsstation Viehhausen der Technischen Universität München gehalten wurden. Dagegen diente ein RNA-Extrakt des Influenzavirus H8N4, das vom Referenzlabor des Friedrich-Löffler-Instituts zur Verfügung gestellt wurde, als Positivkontrolle zum Nachweis von Influenza A mittels real-time RT-PCR.

1.7.3 Feldproben

Die Feldproben wurden von den geschützten sowie den ungeschützten Arealen der fünf festgelegten Standorte (siehe Kapitel C 2.3.1) gewonnen. Hierbei kam das in Kapitel C 2.3.3 beschriebene Verfahren zum Einsatz.

2 Methoden

2.1 Methodenentwicklung

2.1.1 Aufbereitung der Proben

Um eine hohe Reproduzierbarkeit zu gewährleisten, wurden verschiedene Methoden zur Homogenisierung mit Hilfe von Staub aus einem Hühnerstall, der sowohl Federn als auch Strohfasern enthielt, im 4x-Ansatz getestet. Dies erfolgte anhand eines Aliquots dieser Probe im Originalzustand sowie weiteren Aliquots, welche mit Hilfe von Flüssigstickstoff, einer Schlagmühle und dem TissueLyser II der Firma Qiagen zerkleinert wurden. Eine anschließende DNA-Extraktion mit nachfolgender real-time PCR mit einem vogelspezifischen Genabschnitt als Zielsequenz zeigte das Resultat dieser Aufbereitungsmethoden.

Flüssigstickstoff

Nach der Überführung der Probe in eine Porzellanreibschale wurde Flüssigstickstoff hinzugefügt. Durch dessen extrem niedrige Temperatur von -196 °C gefriert das Probenmaterial sehr schnell und macht es spröde. Dies erleichterte, sobald der Flüssigstickstoff vollständig verdampft war, das Zermörsern der Probe mit dem Pistill.

Schlagmühle

Das Prinzip der Schlagmühle beruht auf dem Zertrümmern des Probenmaterials durch einen Hartmetallschläger, der mit hoher Drehzahl rotiert. Dabei entsteht Wärme. Ist diese zu hoch, kann sich das, durch daraus resultierende Veränderungen der Probe, negativ auf die weiteren Untersuchungen auswirken. Um diesen Effekt möglichst gering zu halten, wurde die Probe 2 Mal im Abstand von 1 min für 15 s gemahlen.

TissueLyser II

Der TissueLyser II ist eine Laborschwingmühle der Firma Qiagen. Für diese Homogenisierungsmethode wurde die Probe in ein gerätespezifisches Mahlgefäß mit einem Volumen von 10 ml gegeben. Zusätzlich befand sich in diesem Gefäß eine Edelstahlkugel, welche durch Schwingungen des TissueLyasers II bei einer Frequenz von 30 Hz für 30 s die groben Bestandteile der Probe zu feinem Staub zerdrückte.

Für die statistische Auswertung der Ergebnisse der Probenaufbereitung (crossing points der real-time PCR mit der Zielsequenz des mitochondrialen Cytochrom *b*) wurde eine

einfaktorielle Varianzanalyse mit dem fixen Faktor „Probenaufbereitung“ mit der GLM-Prozedur von SAS (Vers. 9.2, SAS Institute Inc., Cary, USA) anhand des Tukey-Tests durchgeführt. Gegenstand der Varianzanalyse waren signifikante Mittelwertunterschiede zwischen den Probenaufbereitungen (nicht homogenisiert, Flüssigstickstoff, Schlagmühle, TissueLyser II). Das Signifikanzniveau lag bei $p < 0,05$.

2.1.2 DNA-Extraktion

Zur Isolierung der DNA sowohl aus Federn als auch aus Vogelkot wurden drei verschiedene Verfahren getestet, nämlich der PowerSoil™ DNA Isolation Kit von MoBio Laboratories Inc., der QIAamp® DNA Stool Mini Kit der Firma Qiagen und die Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB)-Extraktion nach KORTHALS *et al.* [2008a] mit Modifikationen.

Bei der Extraktion mit dem PowerSoil™ DNA Isolation Kit wurde ein Aliquot der Probe in ein bereitgestelltes Reaktionsgefäß überführt, welches mit einer Pufferlösung und den sogenannten „beads“ gefüllt ist. Nach Zugabe einer lysierenden Lösung erfolgt ein zehnminütiger Vortex-Schritt, der die mechanische und chemische Lysis der Zellen unterstützt. Die weiteren Arbeitsschritte bewirken eine Präzipitation organischer und nicht organischer Substanzen, die Bindung der DNA an eine Silika-Membran, die Beseitigung von Huminsäuren und anderen Kontaminanten mit vor allem inhibitorischer Wirkung und die anschließende Freisetzung der aufgereinigten DNA von der Silika-Membran. Die genauen Arbeitsschritte werden in Abbildung 5 beschrieben.

Die Präparation mit dem QIAamp® DNA Stool Mini Kit erfolgte nach dem Protokoll zur Isolation von DNA aus Faeces für humane DNA-Analysen. Im ersten Schritt werden die Zellen mit einem Puffer lysiert. Die nachfolgende Zugabe einer testkuiteigenen InhibitEX-Tablette dient der Bindung von Kotbestandteilen, welche bei einer PCR inhibierend wirken können. Die weiteren Arbeitsschritte bewirken einen Proteinverdau sowie die Aufreinigung der DNA mit Hilfe der QIAamp® Mini Spin Column (Abbildung 6).

Das Prinzip der CTAB-Extraktion beruht auf einer chemischen und enzymatischen Lysis der Zellen mit einer anschließenden auf Chloroform-Isoamylalkohol basierenden DNA-Isolierung. Die Aufarbeitung der DNA aus dem Hühnerstallstaub erfolgte nach dem Schema in Abbildung 7.



Abbildung 5: Extraktion der DNA mit dem PowerSoil™ DNA Isolation Kit (MoBio Laboratories Inc.) nach Herstellerangaben

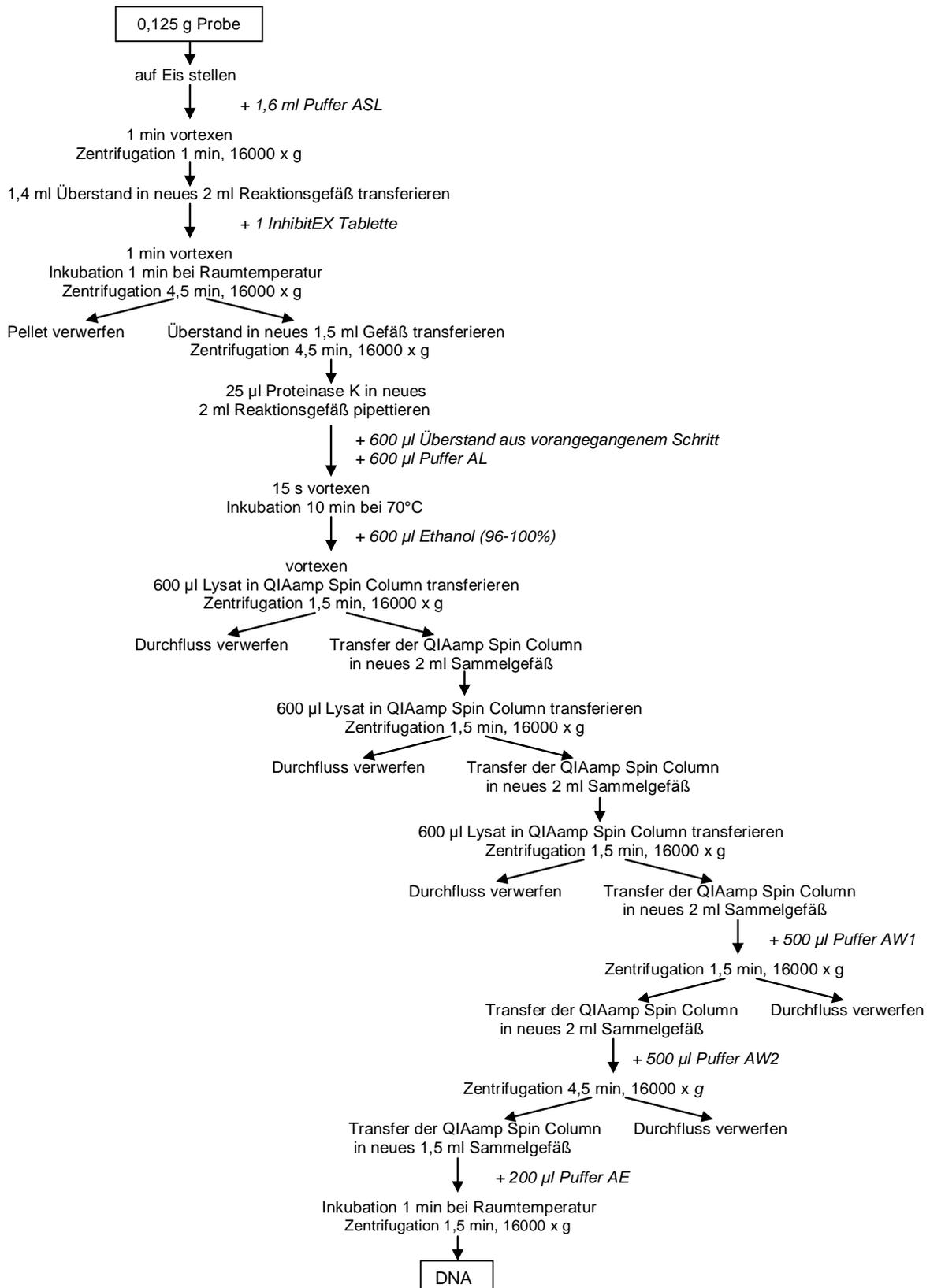
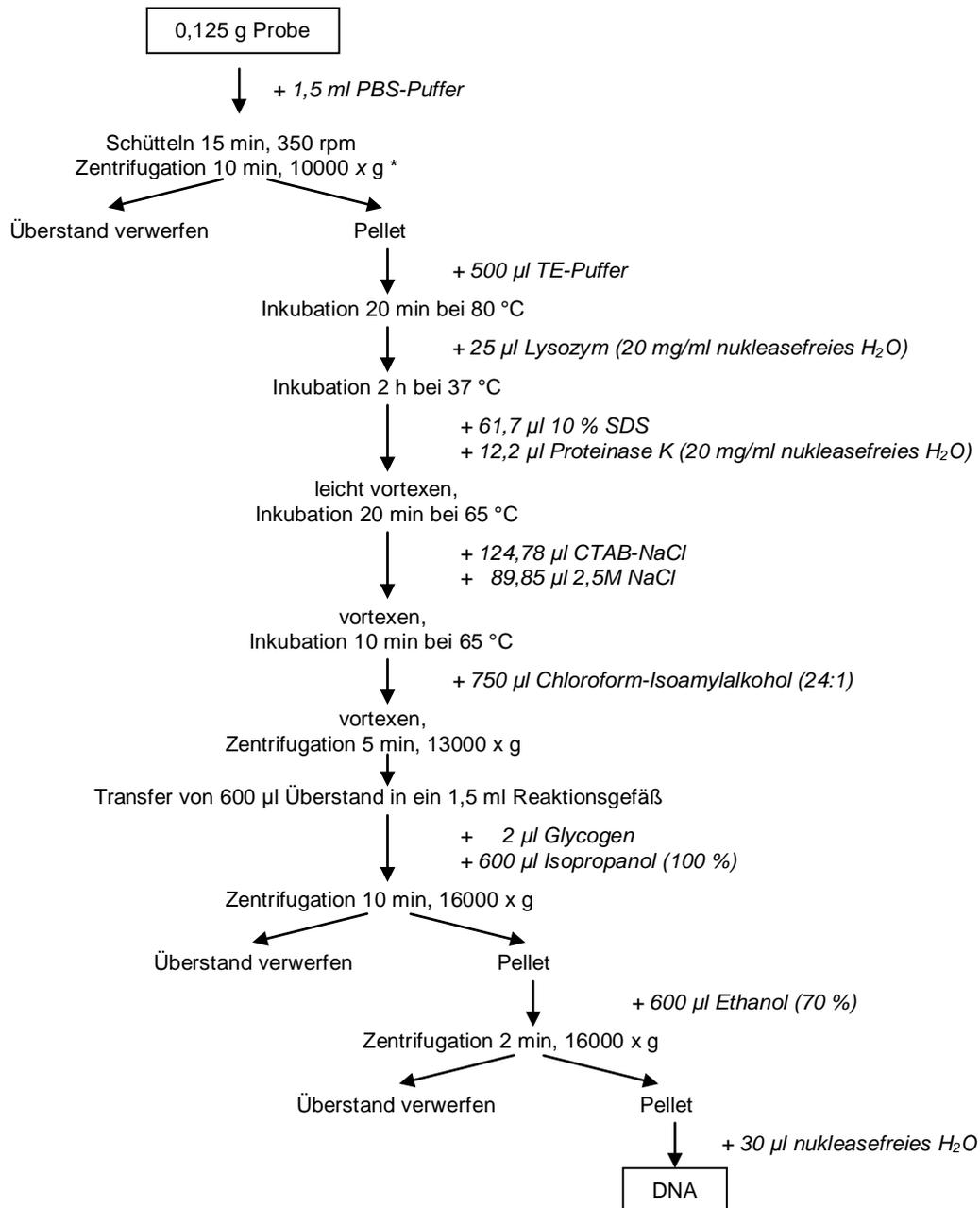


Abbildung 6: Extraktion der DNA mit dem QIAamp® DNA Stool Mini Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben



* ab hier nach Protokoll

Abbildung 7: Extraktion der DNA mit CTAB nach Korthals *et al.* [2008a] mit Modifikationen

2.1.3 Nachweis eines vogelspezifischen Genabschnitts mittels PCR

Um den aviären Eintrag quantitativ mittels real-time PCR mit dem LightCycler[®] zu bestimmen, wurde eine Gensequenz herangezogen, die über das gesamte Vogelspektrum verbreitet, aber bei keiner anderen taxonomischen Klasse vorhanden ist.

2.1.3.1 Auswahl des Genabschnitts

Als vogelspezifisches Gen erschien das Federkeratingen als geeignet, da die Ausbildung von Federn für die Klasse *Aves* spezifisch ist [BRUSH, 1996; NICKEL *et al.*, 1992]. Deshalb wurden verschiedene Sequenzabschnitte des Federkeratingens vom Huhn mit Sequenzen diverser Tierarten mit Hilfe der Programme BLAST der Gendatenbank von NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) und Ensembl (<http://www.ensembl.org/index.html>) verglichen. Dieser Schritt diente dazu, eine für Vögel spezifische Sequenz zu finden und für diese geeignete Primer zu designen.

Weiterhin wurde ein Sequenzabschnitt des mitochondrialen Cytochrom *b* ebenfalls als für möglicherweise geeignet erachtet, da dieser bereits in einer Publikation von MATSUNAGA *et al.* [1999] zur Identifikation der Fleischart Huhn gegen Rind, Schwein, Schaf, Ziege und Pferd erfolgreich eingesetzt wurde.

2.1.3.2 Überprüfung der Spezifität

Um herauszufinden, ob sich die beiden gewählten Sequenzabschnitte, des Federkeratingens oder des mitochondrialen Cytochrom *b*, als vogelspezifisch erweisen, wurde jeweils mit den entsprechenden Primerpaaren und Temperaturprofilen eine real-time PCR mit dem LightCycler[®] durchgeführt. Für eine erste Abschätzung des Funktionierens der Methode wurden Proben vom Huhn sowie der Säugetiere Pferd und Schwein untersucht. Die Säugetiere wurden deshalb gewählt, weil der Verwandtschaftsgrad zum Huhn sehr gering ist und dadurch eine Amplifikation des gewählten Federkeratingensequenzabschnitts unwahrscheinlich erschien. Anschließend erfolgte eine Ausweitung der Untersuchungen auf in Tabelle 3 und Tabelle 4 aufgelistete Tierarten. Aufgrund der sehr nahen Verwandtschaft von Reptilien und Vögeln [NICKEL *et al.*, 1992; STORCH & WELSCH, 2005] und der damit einhergehenden Wahrscheinlichkeit, falsch-positive Ergebnisse zu erzielen, wurden Proben von Reptilien in die Untersuchungen mit einbezogen. Zusätzlich wurden Insekten, Regenwürmer und andere Tiere auf Vorkommen bzw. Abwesenheit dieses Genabschnitts mittels real-time PCR getestet.

Federkeratingen

Zur Testung des Federkeratingens wurden die in Kapitel C 1.6 aufgeführten Primerpaare eingesetzt. Die nachfolgenden Abbildungen (Abbildung 8, Abbildung 9 und Abbildung 10) zeigen die Basensequenzen der in der PCR zu amplifizierenden DNA-Fragmente sowie die Lage der jeweiligen Primer und Sonden.

```

                                                                 Federkera-
                                                                 gagcctttg
121 cttgtttttc tggcattcac taggtotttc totatgtgta gaacttgatg tgagcctttg
   gaacaaaaag accgtaagtg atccagaaaag agatacacat cttgaactac actcggaaac

tin A for
cttccttgat g⇨
181 cttccttgat ggtgcctcct gcctgcttct ctctgcttgt caatgtggtg ggggaggggt
   gaaggaacta ccacggagga cggacgaaga gagacgaaca gttacacaac cccctcccaa

241 gggagaaggc cttgggctac ctctgctggc gttcttgggg atctgggggc tgccaagcct
   ccctcttccg gaacccgatg gagacgaccg caagaacccc tagacccccg acggttcgga

301 cactctggcc atgcaataca tatccatctt gccagccatg cctcttctct gggtcagcag
   gtgagaccgg tacgttatgt ataggtagaa cggtcggtac ggagaagaga cccagtcgct
   ⇨ tgt gtaggtagaa cggtcgg
                                                                 Federkeratin A rev

```

Abbildung 8: Sequenz des mit den Primern Federkeratin A for und Federkeratin A rev zu amplifizierenden Federkeratingenabschnitts (X17511) sowie Lage der Primer (türkis)

```

                                                                 Federkeratin C + flanks for
                                                                 cacc agctctgttc tgcttg⇨
181 agaccttggg atgagccttg ctccctgttg tgctcccacc agctctgttc tgcttgccag
   tctggaacca tactcggaac gaggaacaac acgaggggtg tcgagacaag acgaacggtc

241 tgtgaggtgt ggtgggagaa ggcctttggc tgactctact ggtgattctg gggatctggg
   aactccaca ccacctctt ccggaaaccg actgagatga cactaagac ccctagacc

301 ctgcccaagc ctctgtccct gctccgctg tccctgatcc cggcctgtg cctcctgtct
   gagcggttcg gagacagga cgaaggcggac agggactagg ggccggacac ggaaggacaga

361 tggcaatcag gccaccaggc tacttctcac gcagcctgtg cttttcttgt cctctctcca
   accgtagtc cggtggtccg atgaagagtg cgctggacac gaaaagaaca ggagagaggt

421 ggtctactcc catctacag ccatgtctg cttcgatctg tgccgtccct gtggcccgac
   ccagatgagg gtaggatgtc ggtacaggac gaagctagac acggcagga caccgggctg
   ⇨ tgagg gtaggatgtc ggtac
                                                                 Federkeratin C + flanks rev

```

Abbildung 9: Sequenz des mit den Primern Federkeratin C + flanks for und Federkeratin C + flanks rev zu amplifizierenden Federkeratingenabschnitts (J00847) sowie Lage der Primer (pink)

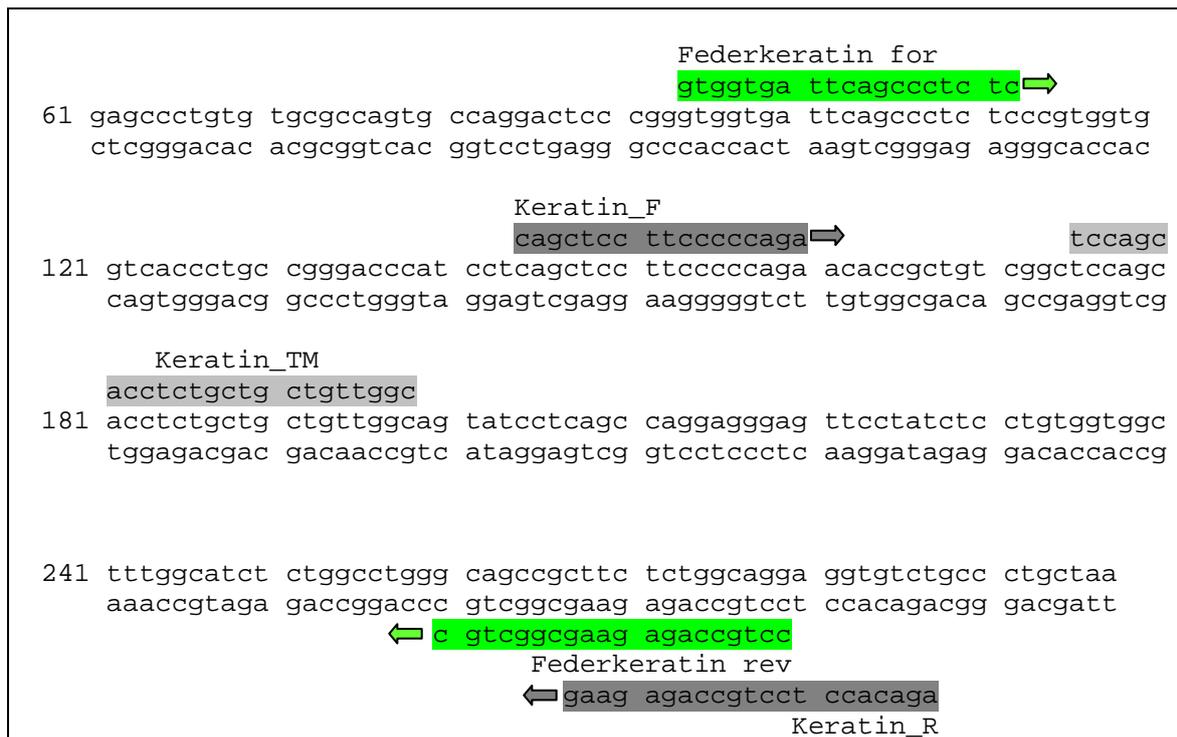


Abbildung 10: Sequenz des mit den Primern Federkeratin for und Federkeratin rev (grün), sowie dem Sondensystem, bestehend aus den Primern Keratin_F und Keratin_R (dunkelgrau) und der Sonde Keratin_TM (hellgrau) zu amplifizierenden Federkeratingenabschnitts (X00316) sowie Lage der Primer

Je nach Primerpaar variierte das Temperaturprofil der jeweiligen real-time PCR, wobei insbesondere die Annealingtemperatur und -zeit, die Zyklenzahl sowie die Magnesiumkonzentration optimiert bzw. angepasst wurden. Als Master Mix diente der LightCycler® FastStart DNA Master SYBR Green I Kit der Firma Roche Applied Science. Für jedes Primerpaar (Federkeratin for und Federkeratin rev, Federkeratin A for und Federkeratin A rev, Federkeratin C + flanks for und Federkeratin C + flanks rev, Keratin_F und Keratin_R) wurden unterschiedliche Magnesiumkonzentrationen getestet, wodurch sich das Pipettierschema im Bezug auf MgCl₂ sowie H₂O dementsprechend veränderte (Tabelle 5).

Tabelle 5: Reaktionsansatz zum Nachweis des Federkeratingens mittels real-time PCR mit SYBR Green I

Komponenten	Konzentration der Stammlösung	Volumen [µl]		
		Endkonzentration Mg ²⁺		
		2 mM	3 mM	4 mM
SYBR Green I MasterMix*	10 x konzentriert	2,0		
Primer forward	10 µM	1,0		
Primer reverse	10 µM	1,0		
MgCl ₂	25 mM	0,8	1,6	2,4
H ₂ O		13,2	12,4	11,6
template DNA		2,0		
Endvolumen		20,0		

*FastStart Taq DNA-Polymerase, Reaktionspuffer, dNTP-Mix, SYBR Green I Farbstoff, 10 mM MgCl₂

Die Annealingtemperatur ist von der Basenabfolge der Primer abhängig und wird etwa 5 °C unter deren Schmelztemperatur [T_M] angesetzt. Entsprechend der T_M der verwendeten Primer wurden die in Tabelle 6 aufgeführten Annealingtemperaturen getestet. Eine Erhöhung dieser Temperatur in gleichmäßigen Schritten von je 2 °C diente der Optimierung. Ebenso empfahl es sich, aufgrund der differierenden Länge der entstehenden Amplifikate, zwei unterschiedliche Inkubationszeiten des Annealingschritts zu prüfen. Das nachstehende Temperaturprofil (Tabelle 6) traf für alle vier Primerpaare zu.

Tabelle 6: Temperaturprofil am LightCycler® zum Nachweis des Federkeratins mit SYBR Green I

Programm	Zieltemperatur [°C]	Inkubationszeit [s]	Zyklen
Initiale Denaturierung	95	600	
Amplifikation	Denaturierung	95	40/45
	Annealing	53/55/57/59/61	
	Elongation	72	
Schmelzkurve	Segment 1	95	
	Segment 2	65	
	Segment 3	95	
Kühlphase	40	30	

Für den Nachweis des Federkeratins mit Hilfe des in Zusammenarbeit mit TIB MOLBIOL entwickelten Sondensystems, bestehend aus den Primern Keratin_F und Keratin_R, sowie der mit dem Fluoreszenzfarbstoff FAM versehenen Sonde Keratin_TM, wurde als Master Mix der LightCycler® TaqMan® Master eingesetzt. Dieser ist speziell auf die Detektion des hier gewählten Sondensystems ausgelegt. Tabelle 7 zeigt die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes einer solchen real-time PCR.

Tabelle 7: Reaktionsansatz der real-time PCR zum Nachweis des Federkeratins mit Sonde

Komponenten	Konzentration der Stammlösung	Volumen [µl]
Master Mix*	5 x konzentriert	4,0
Keratin_F	10 µM	1,0
Keratin_R	10 µM	1,0
Keratin_TM	10 µM	0,2
H ₂ O		8,8
template DNA		5,0
Endvolumen		20,0

* FastStart Taq DNA-Polymerase, Reaktionspuffer, dNTP-Mix (mit dUTP statt dTTP), MgCl₂

Das Temperaturprofil wurde nach den Empfehlungen der Firma Roche für den LightCycler® TaqMan® Master Kit eingestellt. Da aber die Annealingtemperatur von der Basenabfolge der eingesetzten Primer abhängig ist, wurde weiterhin die optimale Temperatur mit Hilfe einer Versuchsreihe diesbezüglich ermittelt (Tabelle 8).

Tabelle 8: Temperaturprofil am LightCycler® zum Nachweis des Federkeratins mit Sonde

Programm		Zieltemperatur [°C]	Inkubationszeit [s]	Zyklen
Initiale Denaturierung		95	600	
Amplifikation	Denaturierung	95	10	45
	Annealing	49/51/53/55/57	40	
	Elongation	72	1	
Kühlphase		40	30	

Mitochondriales Cytochrom *b*

Für den Nachweis des mitochondrialen Cytochrom *b* fand der PCRFast Kit für Geflügel der Firma Th. Geyer Verwendung. Dazu wurden die Reaktionsansätze nach dem vom Unternehmen empfohlenen Standardprotokoll hergestellt (Tabelle 9).

Tabelle 9: Reaktionsansatz der real-time PCR zum Nachweis des mitochondrialen Cyt *b* mit SYBR Green I

Komponenten	Konzentration der Stammlösung	Volumen [µl]
SYBR Green I MasterMix*	10 x konzentriert	2,0
MgCl ₂	25 mM	1,2
H ₂ O		6,8
template DNA		10,0
Endvolumen		20,0

*FastStart Taq DNA-Polymerase, Reaktionspuffer, dNTP-Mix, SYBR Green I Farbstoff, 10 mM MgCl₂

Das Temperaturprofil wurde gemäß Qualitätszertifikat des Instituts für Produktqualität (IfP) mit anschließender Schmelzkurve eingestellt (Tabelle 10). Allerdings wurde die Anzahl der Zyklen von 30 auf 40 erhöht, da die erwartete DNA-Menge des Untersuchungsmaterials geringer einzuschätzen war als im Lebensmittelbereich, für den der PCRFast Kit für Geflügel ursprünglich entwickelt wurde.

Tabelle 10: Temperaturprofil am LightCycler® zum Nachweis des mitochondrialen Cyt *b* mit SYBR Green I

Programm		Zieltemperatur [°C]	Inkubationszeit [s]	Zyklen
Initiale Denaturierung		95	600	
Amplifikation	Denaturierung	95	10	40
	Annealing u. Elongation	60	60	
Schmelzkurve	Segment 1	95	0	
	Segment 2	65	15	
	Segment 3	95	0	
Kühlphase		40	30	

Zur Überprüfung des Reaktionsverlaufs wurden stets sowohl eine Positivkontrolle als auch eine Negativkontrolle bei jedem Versuchsansatz mitgeführt.

Schmelzkurvenanalyse

Um das in der real-time PCR entstandene Amplifikat zu bestimmen, wurde nach 45 Zyklen eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Hierfür wurde die Temperatur stetig in einem Intervall von 0,1 °C pro Sekunde beginnend bei 65 °C bis hoch zu 95 °C gesteigert, wobei eine kontinuierliche Messung der Fluoreszenzintensität stattfand. Diese Temperaturerhöhung bewirkt das Aufschmelzen der komplementären DNA-Stränge in Einzelstränge. Die Schmelztemperatur [T_M] hängt von der Basenzusammensetzung des Amplifikationsprodukts ab und ist dadurch für jede doppelsträngige DNA spezifisch. T_M wird als die Temperatur definiert, bei der 50 % der Ziel-DNA denaturiert ist und somit in Einzelsträngen vorliegt. Sequenzen, die überwiegend GC-Basen aufweisen, schmelzen bei einer höheren Temperatur als AT-reiche Sequenzen. Durch die erste negative Ableitung der Fluoreszenz zur Temperatur ($-dF/dT$ vs T) kann ein Schmelzpeak erstellt werden, wobei der Höhepunkt der Kurve der Schmelztemperatur entspricht. Dieser Peak wiederum ermöglicht die Verifizierung und Differenzierung unterschiedlicher Amplifikate.

Agarosegelelektrophorese

Bei der Agarosegelelektrophorese werden die in der real-time PCR entstandenen Fragmente nach ihrer Größe elektrophoretisch aufgetrennt und mit fluoreszierenden Farbstoffen, z.B. Ethidiumbromid [AAIJ & BORST, 1972; BORST, 2005], unter UV-Licht sichtbar gemacht [THIEMAN & PALLADINO, 2007].

Zur Herstellung des 1 %igen Agarosegels wurde 1 g Agarose eingewogen, mit 100 ml 0,5 x TBE-Puffer aufgeschüttet und im Mikrowellenherd aufgeköcht, bis das Agarosepulver vollständig gelöst vorlag. Nach kurzem Abkühlen erfolgte die Zugabe von 3,6 ml Ethidiumbromid, welches sich zwischen die Basen der DNA einlagert (interkaliert) und durch Anregung im UV-Licht sichtbar gemacht werden kann. Danach wurde das Gemisch zur Auspolymerisierung in eine mit einem passenden Kamm präparierte Gelkammer gegossen und anschließend in eine mit 0,5 x TBE-Puffer gefüllte Laufkammer überführt. 8 µl des PCR-Produkts wurden mit 2 µl GLB versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Zusätzlich erfolgte das Auftragen von 15 µl der 100 bp DNA-Leiter als Größenstandard auf das Gel. Die Auftrennung der DNA-Fragmente fand bei einer Spannung von 200 V und 45-minütiger Laufzeit statt.

Sequenzierung

Auch wenn alle Wildvögel zur taxonomischen Klasse der Vögel gehören, unterscheiden sie sich in einigen Abschnitten der DNA. Diese Sequenzdiversität kann unter anderem zur Identifizierung von Vogelarten herangezogen werden [HERBERT *et al.*, 2004]. Um zu überprüfen, ob auch der gewählte Sequenzabschnitt des mitochondrialen Cytochrom *b* solchen Sequenzunterschieden unterliegt und dadurch zu zur Positivkontrolle abweichende Schmelzkurven führt, wurde stichprobenweise DNA aus Proben von Wanderfalke, Mäusebussard, Stockente, Turmfalke, Spatz, Kolkrabe sowie Amsel extrahiert, mittels real-time PCR vervielfältigt, auf das Agarosegel aufgetragen und nach dem Ende des Laufs mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten. Anschließend erfolgte die Aufreinigung der Banden mittels QIAquick Gel Extraction Kit der Firma Qiagen (Abbildung 11). Die so gewonnenen Produkte wurden zur Sequenzierung der Firma Sequiserve geschickt und deren Ergebnisse anschließend mit der entsprechenden Sequenz des Huhns verglichen und ausgewertet.

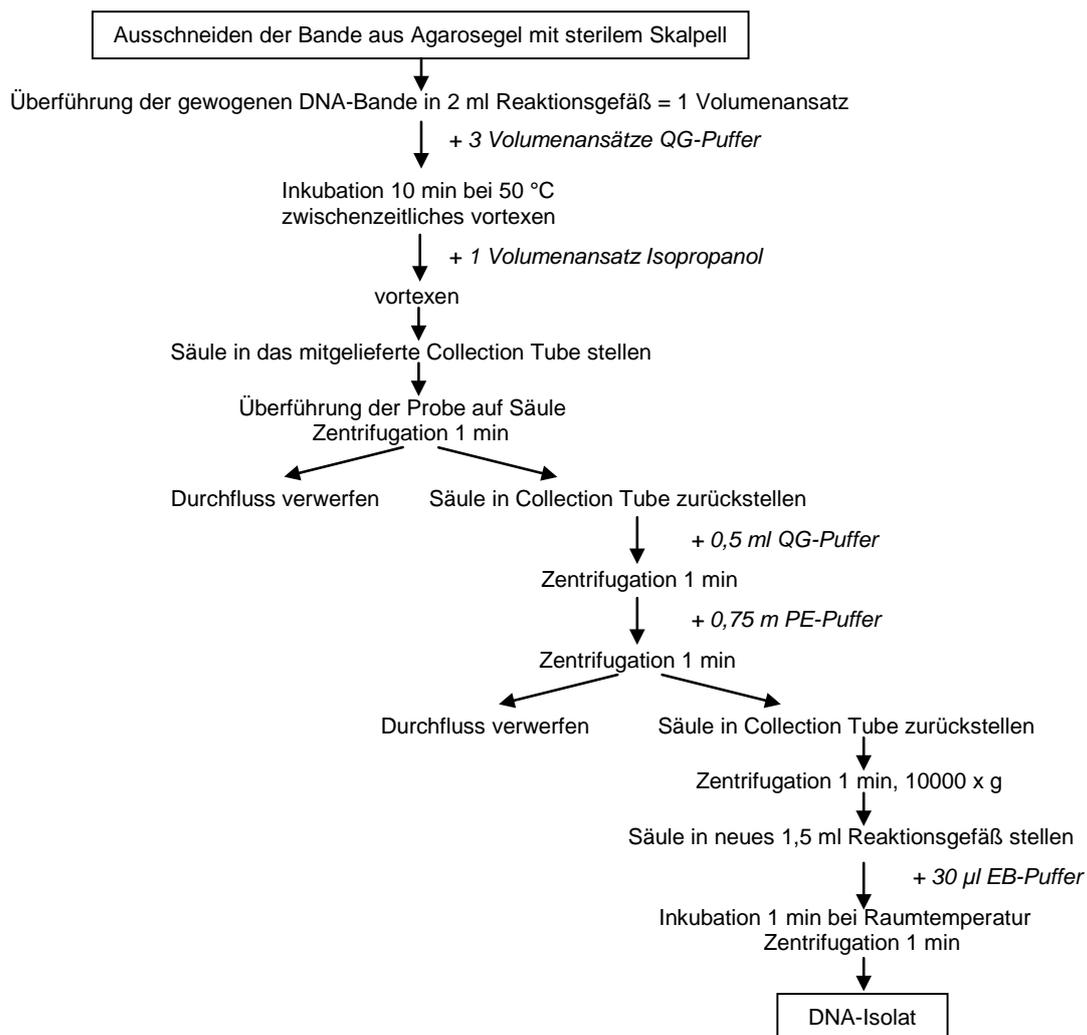


Abbildung 11: Eluierung von Banden aus Agarosegelen mit dem QIAquick Gel Extraction Kit nach Herstellerangaben

2.1.3.3 Überprüfung der Sensitivität

Die Sensitivität wird durch die Wahrscheinlichkeit für die richtig-positiven Ergebnisse charakterisiert, also für die entsprechend positive Klassifizierung eines Falls, der das Kriterium, auf dessen Hinblick untersucht wird, erfüllt [BENDER & LANGE, 2001; GOLDHAMMER & HARTIG, 2008]. Im Bezug auf die vorliegende Arbeit bedeutet dies, dass die Methode als umso sensitiver betrachtet werden kann, je mehr Vogelarten positiv auf den untersuchten vogelspezifischen Sequenzabschnitt des mitochondrialen Cytochrom *b* getestet werden. Zur Prüfung der Sensitivität dieses Sequenzabschnitts wurden deshalb Federn, Kloakentupfer bzw. Kotproben verschiedener Vogelarten (Tabelle 3) untersucht.

2.1.3.4 Testung der Methodik an Feldproben

Um zu prüfen, ob die entwickelte und validierte Methode ebenfalls bei den Feldproben anwendbar ist, wurden beispielhaft 20 Proben, die am Standort Wang sowohl auf den ungeschützten als auch auf den mit Netzen geschützten Flächen gewonnen wurden, mittels real-time PCR untersucht. Die nachfolgend durchgeführte Agarosegelelektrophorese diente der Überprüfung der Spezifität des Amplifikats. Eine zusätzlich mitgeführte Positivkontrolle zeigte das Funktionieren der real-time PCR.

Wie aber aus den Ergebnissen in Kapitel D1.5 hervorgeht, wurden in Umweltproben unspezifische Produkte gebildet, welche zu falsch-positiven Ergebnissen führten. Aus diesem Grund wurde die Methode auf Endpunkt-PCR umgestellt. Dies verhindert zwar nicht die Bildung dieser unspezifischen Produkte, allerdings ist es möglich, sie aufgrund ihrer abweichenden Produktlänge und der daraus resultierenden unterschiedlichen Laufhöhe im Gel vom gesuchten Genabschnitt zu unterscheiden.

2.1.3.5 Endpunkt-PCR

Für die Umstellung der real-time PCR auf eine Endpunkt-PCR zum Nachweis des mitochondrialen Cytochrom *b* mussten die PCR-Bedingungen angepasst werden. Diese beinhalteten die Annealingtemperatur und -dauer, die Anzahl der durchgeführten Zyklen sowie die eingesetzte Menge an Template in die PCR-Reaktion. Wie aus Tabelle 11 hervorgeht, wurden zwei unterschiedliche Volumina bezüglich der Menge an eingesetztem Template getestet.

Tabelle 11: Reaktionsansatz der Endpunkt-PCR zum Nachweis des mitochondrialen Cytochrom *b*

Komponenten	Konzentration der Stammlösung	Volumen [μ l]
Promega Mix*	2 x konzentriert	12,50
Primer Sim	10 μ M	1,25
Primer Chicken	10 μ M	1,25
H ₂ O		5,00/9,00
template DNA		5,00/1,00
Endvolumen		25,00

* Taq DNA-Polymerase (50 U/ml), Reaktionspuffer (pH 8,5), dNTP-Mix (je 400 μ M), 3 mM MgCl₂

Das Temperaturprofil wurde insbesondere bezüglich der Annealingtemperatur optimiert. Wie Tabelle 12 zeigt, wurden Temperaturen von 55 °C, 60 °C und 65 °C geprüft. Ebenso wurde die Endpunkt-PCR sowohl mit 30 als auch mit 50 Zyklen durchgeführt.

Tabelle 12: Temperaturprofil der Endpunkt-PCR zum Nachweis des mitochondrialen Cytochrom *b*

Programm	Zieltemperatur [°C]	Inkubationszeit [s]	Zyklen
Initiale Denaturierung	95	180	
Denaturierung	95	30	30/50
Annealing	55/60/65	60	
Elongation	72	60	
Terminale Elongation	72	600	

Anschließend erfolgte die Auswertung mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese.

2.1.3.6 Entwicklung der kompetitiven internen Amplifikationskontrolle

Bei der internen Amplifikationskontrolle (IAC) handelt es sich um ein in Länge und Anzahl an Kopien definiertes DNA-Fragment, welches jeder Probe hinzugegeben und in demselben Reaktionsgefäß wie die Ziel-DNA gleichzeitig mit dieser amplifiziert wird [HOORFAR *et al.*, 2004]. Die IAC dient dem Ausschluss von falsch-negativen Ergebnissen [PALLEN *et al.*, 1992], die durch PCR-inhibierende Matrixkomponenten, aber auch durch Fehlfunktion des Thermocyclers, einen fehlerhaften PCR-Mix oder eine geringe Aktivität der DNA-Polymerase bedingt sein können [RÅDSTRÖM *et al.*, 2003]. Dies ist insofern von Bedeutung, da bekannt ist, dass Bodenproben einige PCR-inhibierende Substanzen, vor allem Huminsäuren [TEBBE & VAHJEN, 1993] sowie Polysaccharide aus Pflanzen [DEMEKE & ADAMS, 1992], enthalten. Im Gegensatz zur nicht-kompetitiven IAC, bei der zur Amplifikation der Ziel-DNA und der IAC zwei verschiedene Primerpaare eingesetzt werden, wobei zwei unterschiedliche PCR-Reaktionen unter denselben Bedingungen funktionieren müssen, wird bei der kompetitiven IAC ein gemeinsames Primerpaar verwendet [HOORFAR *et al.*, 2004; SACHADYN & KUR, 1998].

Die einfachste Vorgehensweise, eine kompetitive IAC herzustellen, besteht in der Konstruktion von PCR-Produkten, welche in ihrer Länge differieren und infolgedessen durch eine Agarosegelelektrophorese von der Ziel-DNA visuell leicht zu unterscheiden sind. Ein Verfahren hierfür stellt die sogenannte „composite primer technique“ dar [HOORFAR *et al.*, 2004; SACHADYN & KUR, 1998; SIEBERT & LARRICK, 1992]. Die Primer, die hierbei eingesetzt werden, besitzen am 5'-Ende überhängende Enden, die mit den Primern der diagnostischen Reaktion identisch sind, wohingegen die 3'-Enden zu einer vorher festgelegten, zur Ziel-DNA heterologen DNA-Sequenz komplementär sind [HOORFAR *et al.*, 2004; SACHADYN & KUR, 1998]. Als Template für die IAC wurde, basierend auf der Publikation von SACHADYN & KUR [1998], das Plasmid pUC19 von *Escherichia coli* gewählt. Unter Berücksichtigung bestimmter Kriterien, unter anderem der Länge des gewünschten Amplifikats, wurde mit Hilfe des Programms Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) ein passendes Primerpaar für dieses Plasmid designt. Da eine Vergrößerung eines DNA-Fragments im Bezug zum anderen theoretisch die Kinetik der Reaktion in Richtung des kleineren DNA-Produkts lenkt, ist es ratsam, die IAC größer als die Ziel-Sequenz zu wählen [SACHADYN & KUR, 1998]. Zudem berichten ABDULMAWJOOD *et al.* [2002], dass eine IAC-Größe von weniger als 500 bp die ursprüngliche Sensitivität der PCR nicht beeinflusst. Da die Ziel-Sequenz 227 bp beträgt, wurde für die in dieser Arbeit verwendeten IAC eine Länge von 456 bp gewählt. Abbildung 12 zeigt die komplette Basensequenz der IAC sowie die Lage der zusammengesetzten Primer, wobei die blau unterlegten Sequenzen jeweils die Primerabschnitte darstellen, die an das pUC19-Plasmid binden. Die gelb unterlegten Sequenzen markieren dagegen die überhängenden Enden, bestehend aus den diagnostischen Primern Sim und Chicken.

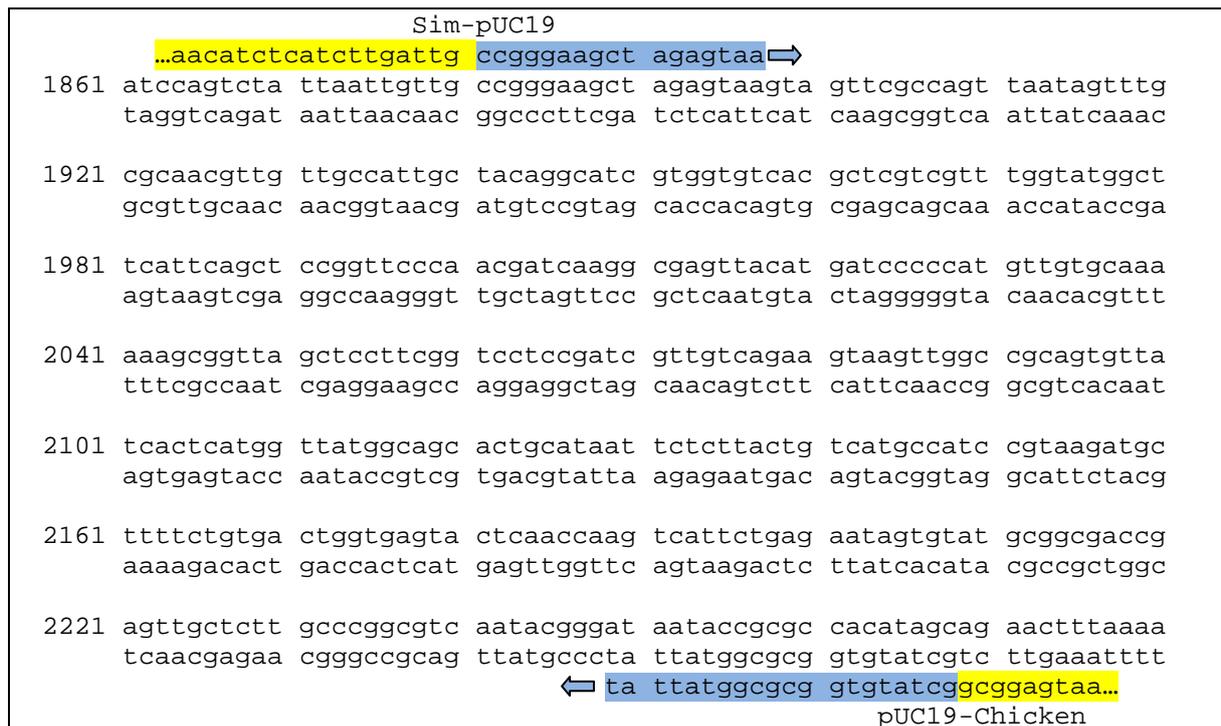


Abbildung 12: Sequenz der IAC und Lage der zusammengesetzten Primer

: Primer, die an die pUC19-Plasmid-DNA binden
 : Überhängende, diagnostische Primer

Zur Herstellung der IAC wurden zunächst 50 µg pUC19-Plasmid-DNA in 500 µl nukleasefreiem Wasser gelöst. Diese diente in der darauf folgenden konventionellen PCR als Template. Der restliche Mastermix wurde nach folgendem Pipettierschema (Tabelle 13) hergestellt.

Tabelle 13: Reaktionsansatz zur Herstellung der IAC mittels konventioneller PCR

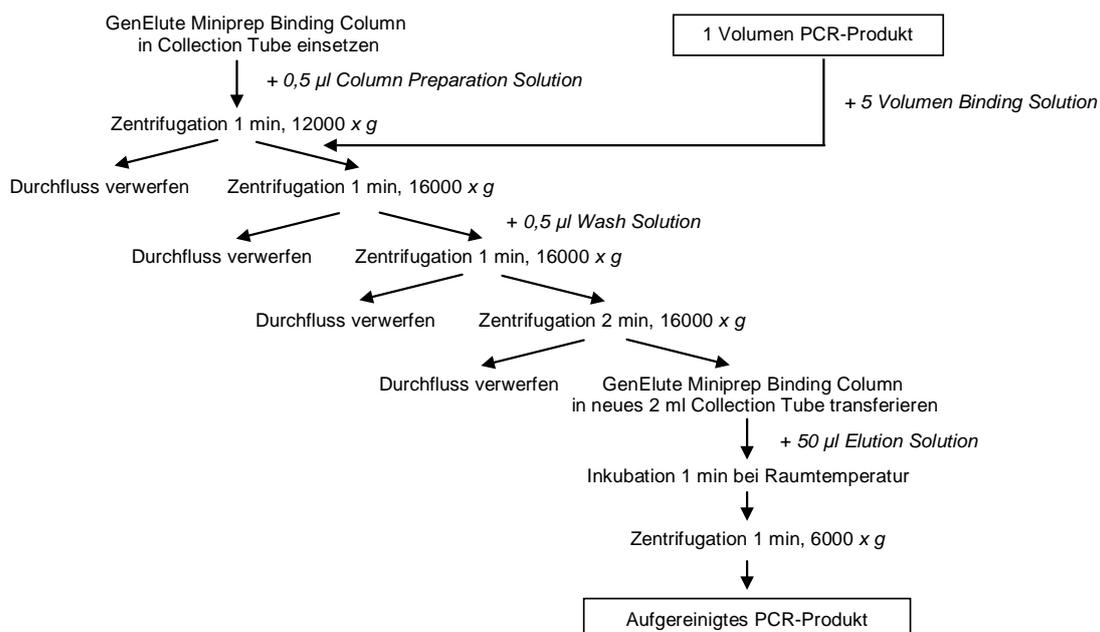
Komponenten	Konzentration der Stammlösung	Volumen [µl]
Promega Mix	2 x konzentriert	12,5
Primer Sim-pUC19	10 µM	1,0
Primer Chicken-pUC19	10 µM	1,0
H ₂ O		9,5
pUC19-Plasmid-DNA		1,0
Endvolumen		25,0

Das Temperaturprofil wird in Tabelle 14 dargestellt. Unter Berücksichtigung der von TIB MOLBIOL angegebenen thermodynamischen Schmelzpunkte der zusammengesetzten Primer wurde die Annealingtemperatur auf 79 °C festgesetzt. Diese ungewöhnlich hohe Annealingtemperatur ist auf die sehr lange Sequenz der zusammengesetzten Primer zurückzuführen.

Tabelle 14: Temperaturprofil zur Herstellung der IAC mittels konventioneller PCR

Programm	Zieltemperatur [°C]	Inkubationszeit [s]	Zyklen
Initiale Denaturierung	95	180	
Denaturierung	95	60	45
Annealing	79	60	
Elongation	72	180	
Terminale Elongation	72	600	

Um sicherzustellen, dass das Amplifikat der IAC die gewünschte Größe von 456 bp aufweist, wurde ein Teil des PCR-Produkts mittels Agarosegelelektrophorese überprüft. Anschließend erfolgte die Aufreinigung des restlichen PCR-Produkts mit dem GenElute™ PCR Clean-Up Kit von Sigma Aldrich Chemie GmbH mit nachfolgendem Protokoll nach Herstellerangaben (Abbildung 13). Dieser Schritt diente der Entfernung von restlichen Primern und anderen Verunreinigungen, welche bei einer weiteren PCR zur Bildung unspezifischer Fragmente führen würden.

**Abbildung 13: Aufreinigung von PCR-Produkten mit dem GenElute™ PCR Clean-Up Kit**

Aufgrund der Konkurrenz der zu amplifizierenden DNA-Fragmente um die Primer ist bei der kompetitiven IAC die Konzentration der IAC selbst der wichtigste zu berücksichtigende Parameter. Diese ist so zu wählen, dass sie die geringste reproduzierbare Menge an IAC darstellt, wodurch gerade noch ein positives Signal erzeugt wird. Eine zu hohe IAC-Konzentration führt durch Abbau des Ziel-Signals zu falsch-negativen Ergebnissen [HOORFAR et al., 2004]. Aus diesem Grund erfolgte nach der DNA-Aufreinigung die Quantifizierung der DNA-Konzentration mit dem NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer. Diese Messung ergab eine DNA-Konzentration der pUC19-DNA mit zusätzlich eingebauter

Sequenz der diagnostischen Primer von 25,0 ng/μl. Die Ermittlung der optimalen Konzentration der in die PCR einzusetzenden internen Amplifikationskontrolle erfolgte mittels dezimaler Verdünnungsreihe von 10^{-3} bis 10^{-12} . Tabelle 15 zeigt die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes, Tabelle 16 das Temperaturprofil der durchgeführten konventionellen PCR. Hierbei richtet sich die Annealingtemperatur erneut nach dem thermodynamischen Schmelzpunkt der für die weiteren Untersuchungen eingesetzten diagnostischen Primer Sim und Chicken und liegt bei 65 °C.

Tabelle 15: Reaktionsansatz zur Ermittlung der optimalen IAC-Konzentration mittels Endpunkt-PCR

Komponenten	Konzentration der Stammlösung	Volumen [μl]
Promega Mix	2 x konzentriert	12,50
Primer Sim	10 μM	1,25
Primer Chicken	10 μM	1,25
H ₂ O		8,00
pUC19-Plasmid-DNA	$10^{-3}/10^{-4}/10^{-5}/10^{-6}/10^{-7}/10^{-8}/10^{-9}/10^{-10}/10^{-11}/10^{-12}$	1,00
template DNA		1,00
Endvolumen		25,00

Tabelle 16: Temperaturprofil zur Ermittlung der optimalen IAC-Konzentration mittels Endpunkt-PCR

Programm	Zieltemperatur [°C]	Inkubationszeit [s]	Zyklen
Initiale Denaturierung	95	180	
Denaturierung	95	30	50
Annealing	65	60	
Elongation	72	60	
Terminale Elongation	72	600	

Die Auswertung der PCR erfolgte mittels Agarosegelelektrophorese.

Zusammenfassend wird in Abbildung 14 die Konstruktion der kompetitiven IAC schematisch dargestellt.

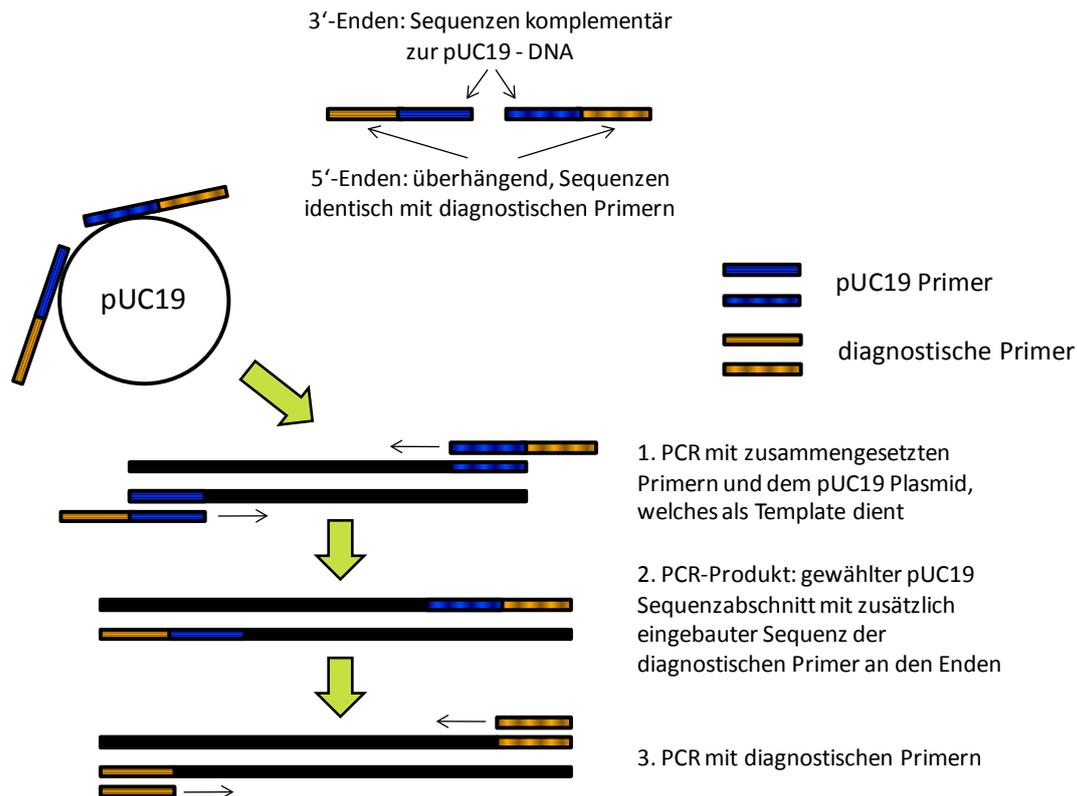


Abbildung 14: Schema der Konstruktion der IAC mit der „composite primer technique“ nach SACHADYN & KUR [1998] mit Modifikationen

Bei der Auswertung ist zu beachten, dass aufgrund der Konkurrenz um die Primer bei verhältnismäßig größerer Menge an Ziel-DNA eine Amplifikation der IAC möglicherweise unterbleibt. Ein solches Ergebnis ist dennoch als positiv zu werten. Erzielen sowohl die IAC als auch die Ziel-DNA ein negatives Ergebnis, wird eine Inhibition der PCR vermutet, weshalb das Ergebnis keine Gültigkeit besitzt [HOORFAR *et al.*, 2004].

2.1.4 Nachweis von Influenzaviren

Der Nachweis von Influenza-A-Viren erfolgte mit Hilfe der real-time RT-PCR. Hierbei wird die virale RNA zunächst durch das Enzym reverse Transkriptase, eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben, da RNA nicht als Matrize für die Polymerase geeignet ist [KAWASAKI, 1989]. Anschließend erfolgt eine PCR, wobei die im ersten Schritt entstandene cDNA als Matrize dient. Diese zwei Schritte können entweder in einem Reaktionsgefäß durchgeführt werden (One-Tube-RT-PCR) oder räumlich wie auch zeitlich getrennt voneinander stattfinden (Two-step-RT-PCR) [WACKER & GODARD, 2005]. Da dieser Test eine Nukleinsäuresequenz des Virus nachweist, besteht die Möglichkeit eines direkten Erregernachweises auch dann, wenn das Virus selbst bereits nicht mehr infektiös ist.

2.1.4.1 RNA-Extraktion

Für die Isolierung der RNA aus den Bodestaubproben wurden unterschiedliche Kits getestet. Diese waren der RNA PowerSoil™ Total RNA Isolation Kit von MoBio Laboratories Inc., der QIAamp® Viral RNA Mini Kit von Qiagen, der INSTANT Virus RNA Kit von AJ Innuscreen sowie ein Flüssig-Flüssig-Verfahren mit dem peqGOLD TriFast™ von Peqlab. Vorbereitend wurden 150 mg Probenmaterial eingewogen, mit 3 ml sterilem PBS versetzt und 30 min bei 350 rpm geschüttelt. Um die Eignung der Kits für diese Probenmatrix zu überprüfen, wurden die Proben vor dem Schütteln sowohl mit einem RNA-Extrakt des Influenzavirus H8N4, zur Verfügung gestellt vom nationalen Referenzlabor für Geflügelpest (NRL für AI), als auch mit der INTYPE IC-RNA [HOFFMANN *et al.*, 2006], einer heterologen Kontroll-RNA, die zur Amplifikationskontrolle oder als Positivkontrolle für die RNA-Extraktion eingesetzt werden kann, artifiziell kontaminiert. Anschließend wurde die Probe 3 min bei 200 x g zentrifugiert und der Überstand in die Extraktion, welche jeweils nach Herstellerangaben erfolgte, eingesetzt. Zusätzlich wurden jeweils RNA und IC-RNA in Abwesenheit der Staubprobe als Extraktionskontrolle mitgeführt.

2.1.4.2 Real-time RT-PCR

Für den Nachweis von Influenza-A-RNA mittels real-time RT-PCR kam eine standardmäßig am Bayerischen Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL) in Oberschleißheim und vom Deutschen Nationalen Referenzlabor anerkannte Methode zum Einsatz. Bei diesem Test wird das IVA-M1 System, basierend auf der Publikation von SPACKMAN *et al.* [2002], angewandt, welches noch modifiziert und mit einem heterologen internen Kontrollsystem kombiniert wurde. Für diese Untersuchung wurde der LightCycler® 480 eingesetzt.

Vor der Herstellung des Mastermixes wurden zwei verschiedene Primer-Sonden-Mixe zusammenpipettiert, wobei der erste dem Nachweis der viralen RNA (Tabelle 17), der zweite dem Nachweis der RNA der internen Kontrolle (Tabelle 18) diene.

Tabelle 17: Primer-Sonden-Mix 1 (IVA-M1.1-Mix-FAM) zum Nachweis der viralen RNA mittels real-time RT-PCR

Komponenten	Konzentration der Stammlösung	Volumen [µl]
Primer IVA-M_1for	100 µM	20,0
Primer IVA-m1.1rev	100 µM	20,0
Sonde IVA-M_1FAM-BHQ	100 µM	2,5
RNasefreies H ₂ O		147,5
Endvolumen		200,0

Tabelle 18: Primer-Sonden-Mix 2 (EGFP-Mix 6 (Limit5)) zum Nachweis der RNA der internen Kontrolle mittels real-time RT-PCR

Komponenten	Konzentration der Stammlösung	Volumen [μ l]
Primer EGFP-12-F	100 μ M	5,0
Primer EGFP10-R	100 μ M	5,0
Sonde EGFP-1-HEX	332 μ M	0,75
RNasefreies H ₂ O		189,25
Endvolumen		200,0

Tabelle 19 zeigt die genaue Zusammensetzung des für den Nachweis der RNA von Influenza-A-Viren eingesetzten Mastermixes.

Tabelle 19: Reaktionsansatz zum Nachweis der RNA von Influenza-A-Viren mittels real-time RT-PCR

Komponenten	Konzentration der Stammlösung	Volumen [μ l]
RNasefreies H ₂ O		2,5
2x Reaction Mix*	2 x konzentriert	12,5
Superscript TM III RT/Platinum [®] Taq Mix		1,0
Primer-Sonden-Mix 1: IVA-M1.1-Mix-FAM		2,0
Primer-Sonden-Mix 2: EGFP-Mix 6 (Limit5)		2,0
Template RNA		5,0
Endvolumen		25,0

* Reaktionspuffer, dNTP-Mix (je 0,4 mM), 3,2 mM MgSO₄

Das Temperaturprofil für die real-time RT-PCR wurde wie folgt vom LGL in Oberschleißheim übernommen (Tabelle 20).

Tabelle 20: Temperaturprofil zum Nachweis der RNA von Influenza-A-Viren mittels real-time RT-PCR

Programm	Zieltemperatur [°C]	Inkubationszeit [s]	Zyklen
Reverse Transkription	50	1800	
Inaktivierung RT/Aktivierung Taq	94	120	
Denaturierung	94	30	42
Annealing	57	30	
Elongation	68	30	

2.2 Entwicklung und Prüfung eines netzgeschützten Barriersystems

Die Entwicklung und Prüfung des netzgeschützten Barriersystems übernahm die Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft (LfL). Neben der Prüfung von Materialien, Konstruktionen, Betriebssicherheit, Optimierung für den Praxiseinsatz im Allgemeinen sowie der Bewertung von Investitions- und laufenden Kosten, war die Überprüfung der Barrierewirkung auf Wildtiere bzw. Wildvögel von besonderer Bedeutung, da dadurch der direkte Kontakt zwischen Nutzgeflügel und Wildtieren verhindert und somit das Infektionsrisiko für das Nutzgeflügel gesenkt werden sollte. Bereits beim Aufbau einer Testvoliere, welche in erster Linie der Materialauswahl, dessen Erprobung sowie der Prüfung der statischen Eigenschaften diente, wurde die Barrierefunktion der speziell gestalteten Voliere visuell begutachtet. Eine umfangreichere Prüfung der Abwehrfunktion gegenüber Wildtieren wurde an einer mit den später aufgebauten netzgeschützten Arealen baugleichen Großvoliere mit betriebener Hühnerhaltung und einer Größe von 60 m x 60 m durchgeführt.

2.3 Dummyversuch

2.3.1 Wahl der Standorte

Bei der Wahl der Standorte wurde insbesondere darauf geachtet, dass sie möglichst viele Wildvögel, vor allem aber Wasservögel, die als Hauptreservoir der Aviären Influenza gelten [ALEXANDER, 2000; ALEXANDER & BROWN, 2009], in nächster Umgebung aufweisen. Das Ziel war es, dadurch eine „Worst-Case-Situation“ nachzustellen, da hierbei die Ansteckung von Hausgeflügel durch Wildtiere, insbesondere Wildvögel, am wahrscheinlichsten erfolgt. Ebenso stellte auch die Nähe zu geflügelhaltenden Betrieben ein weiteres Kriterium dar, da dadurch die Frage des potentiellen Austrags an organischem Vogelmaterial und somit zugleich die Gefahr der Krankheitsübertragung von Nutzgeflügel auf Wildtiere geklärt werden konnte. Die Notwendigkeit eines Stromanschlusses für die Probennahme wirkte zusätzlich auf die Wahl des Standorts ein. In Anbetracht dieser Bedingungen wurden folgende Areale in Bayern ausgewählt (Abbildung 15):

- Gelände von E.ON direkt am Ismaninger Speichersee: größtes Einzugsgebiet für Zugvögel in Bayern
- Gelände der Stadtwerke München in Wang bei Moosburg an der Isar: liegt direkt am Ausgleichsweiher, der zum Naturschutzgebiet Vogelfreistätte Mittlerer Isarstauseen gehört. Dieses wiederum zählt zu den wertvollsten Wasservogelschutzgebieten Bayerns und weist somit eine hohe Vogeldichte auf

- Kläranlage in Wang bei Moosburg an der Isar: ist ebenfalls in unmittelbarer Nähe vom Ausgleichsweiher gelegen
- Versuchsgut Grünschwaige: von Bäumen umrahmt, die stark von Sing-, aber auch von Greifvögeln frequentiert werden
- Versuchsstation Viehhausen: bietet sowohl die Nähe zu einem Geflügelhalter als auch Nähe zum Wald

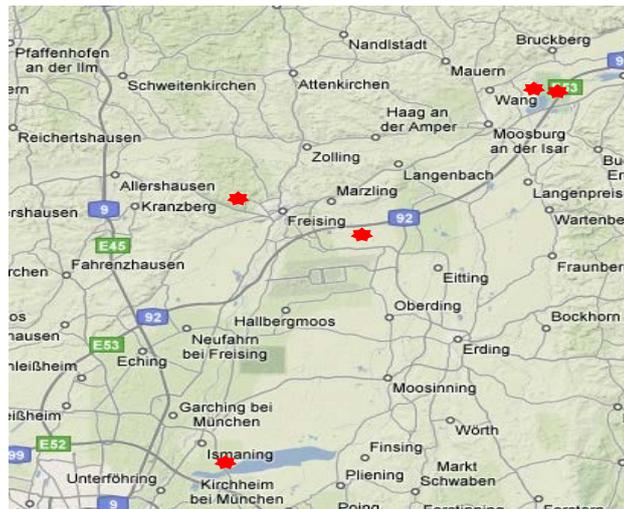


Abbildung 15: Standorte der Areale mit Hühnerattrappen

2.3.2 Aufbau der Areale

Nach Festlegen der Standorte fand die Präparierung der Areale für den Versuch statt. Hierzu wurden zwei Felder mit jeweils 10 m x 10 m möglichst nebeneinander bzw. mit gleichem Abstand zu in der Nähe gelegenen Wald, zu Straßen, Wasserflächen oder ähnlichen gebietsabhängigen Charakteristika abgesteckt, so dass der Einfluss der Umgebung in beiden Arealen nahezu identisch war. Der Aufbau der Volieren und der ungeschützten Freigehege erfolgte an allen Standorten durch die Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft.

Volieren

Für den Aufbau der Volieren wurde zuerst das Areal genau abgemessen und mit Hilfe einer Schnur abgesteckt. Für den Untergrabschutz erfolgte das Ausheben eines Grabens von ca. 30 cm Breite und 50 cm Tiefe mit einem Kleinbagger entlang dieser Linie. Mittig dieses Grabens entstanden mittels Erdbohrer an jeder Ecke, sowie im Abstand von 5 m zwischen jedem einzelnen Eckpunkt, insgesamt 8 Löcher mit einem Durchmesser von 30 cm und einer Tiefe von 100 cm. Diese Löcher erleichterten das Einbringen der 16 cm starken und 4 m langen Rundhölzer, welche später der Abspannung dienten. Die Rundhölzer wurden exakt

ausgerichtet und durch Zuschütten mit Erdresten bzw. Kies befestigt. Das Kürzen der Rundhölzer auf einer Höhe von 250 cm legte die Höhe des Barrieresystems fest. Für die Zaunflächen wurden 100 cm breite Zaunrollen aus Drahtgeflecht mit einer Länge von 25 m, einer Maschenweite von 19 mm x 19 mm sowie einer Maschenstärke von 1,35 mm verarbeitet. Das Anbringen des Zauns erfolgte entlang der Außenseite der Rundhölzer, am oberen Ende beginnend, wodurch drei sich leicht überlappende Bahnen entstanden. Die unterste Zaunbahn ragte ca. 50 cm in den zuvor ausgehobenen Graben und stellte somit den Untergrabschutz des Barrieresystems dar. Um auch das Eindringen von Kleinnagern, z.B. Wühlmäusen, in die Volieren zu verhindern, wurde im unteren Zaunbereich eine kleinere Maschenweite von 0,9 mm x 0,9 mm sowie eine Maschenstärke von 1,05 mm verwendet. Ein durch die sich überlappenden Zaunbahnen gezogener Spanndraht verknüpfte diese miteinander. Das ausgehobene Erdreich wurde anschließend wieder gleichmäßig in den Graben gefüllt und verdichtet. Die Stabilisierung des Systems erfolgte mit Hilfe von Stahlseilen, welche die Rundhölzer in einer Höhe von 2 m nach außen hin abspannten. Hierzu wurden die Stahlseile mit einer 8 mm starken Gewindestange und einer Ringmutter am jeweiligen Rundholz fixiert und mittels Erdanker, die die Werkstatt des Instituts für Landtechnik und Tierhaltung der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft in Freising anfertigte, in einem Abstand von 100 cm und einem Winkel von ca. 45° im Boden befestigt. Die Stahlseile der Eckpfeiler wurden mit je zwei Erdankern, die der anderen Pfeiler mit je einem Erdanker fixiert. Ferner spannten weitere Stahlseile und Spanschlösser die Rundhölzer auf einer Höhe von 2,5 m untereinander ab. Das zusätzliche Anbringen eines Schutznetzes auf das Barrieresystem sollte auch das Einfliegen von den kleinsten in Deutschland vorkommenden Vögeln, dem Zaunkönig sowie dem Goldhähnchen mit einer Größe von ca. 9,5 cm [www.nabu.de], verhindern. Hierfür wurde am äußeren Rand eines 10,5 m x 10,5 m großen UV-beschichteten Schutznetzes mit einer Maschenweite von 2 cm x 2 cm ein 4 mm starkes Stahlseil befestigt und über die Stahlseilkonstruktion der Voliere gezogen, so dass es auf allen Seiten 40-50 cm überhing. Die Befestigung der überhängenden Netzen erfolgte mittels Schrauben und Spanschlössern an den Außenseiten der Voliere. Um zu verhindern, dass das Netz beim Überziehen reißt, wurden zuvor die obere Kante des Zauns sowie alle weiteren kantigen Teile mit dehnbaren Kunststoffrohren verkleidet. Für den Voliereingang wurde am Rand einer Seite eine Öffnung von ca. 100 cm x 180 cm in den Zaundraht geschnitten, ohne dabei den Untergrabschutz zu beschädigen. Mit Hilfe einer von innen an den Zaun angebrachten Holzkonstruktion entstand eine Art ebenerdiger Türrahmen. In diesen wurde eine Tür mit Eisenrahmen und Drahtgeflechtbespannung eingesetzt, welche im Rahmen dieses Projekts speziell für diese Anwendung entwickelt und angefertigt wurde. Das zusätzliche Montieren kegelförmiger, aus Aluminium gefertigter Schutzhauben auf die Rundhölzer sollte das

Absetzen von Vögeln und einen dadurch erhöhten Koteintrag verhindern. Zusätzlich sollten sie aufgrund des Materials gegenüber einem eventuellen Blitzeinschlag gesichert sein. Des Weiteren befanden sich auf einer Höhe von 210 cm zwei Elektrolitzen mit einem Abstand zum Zaun von 5 cm bzw. 20 cm, die mit Hilfe von Isolatoren an der Außenseite der Voliere angebracht und mit einer Batterie für landwirtschaftliche Zwecke betrieben wurden. Damit sollte verhindert werden, dass Raubtiere wie Füchse und Marder am Zaun hochklettern und von oben in das Barriersystem eindringen. Nach *ACHILLES et al.* [2002] sind ein eingegrabener Zaun sowie Elektrozäune ein sinnvoller und wirksamer Schutz gegen Bodenräuber. Abbildung 16 zeigt die Skizze einer Voliere aus zwei verschiedenen Blickwinkeln.

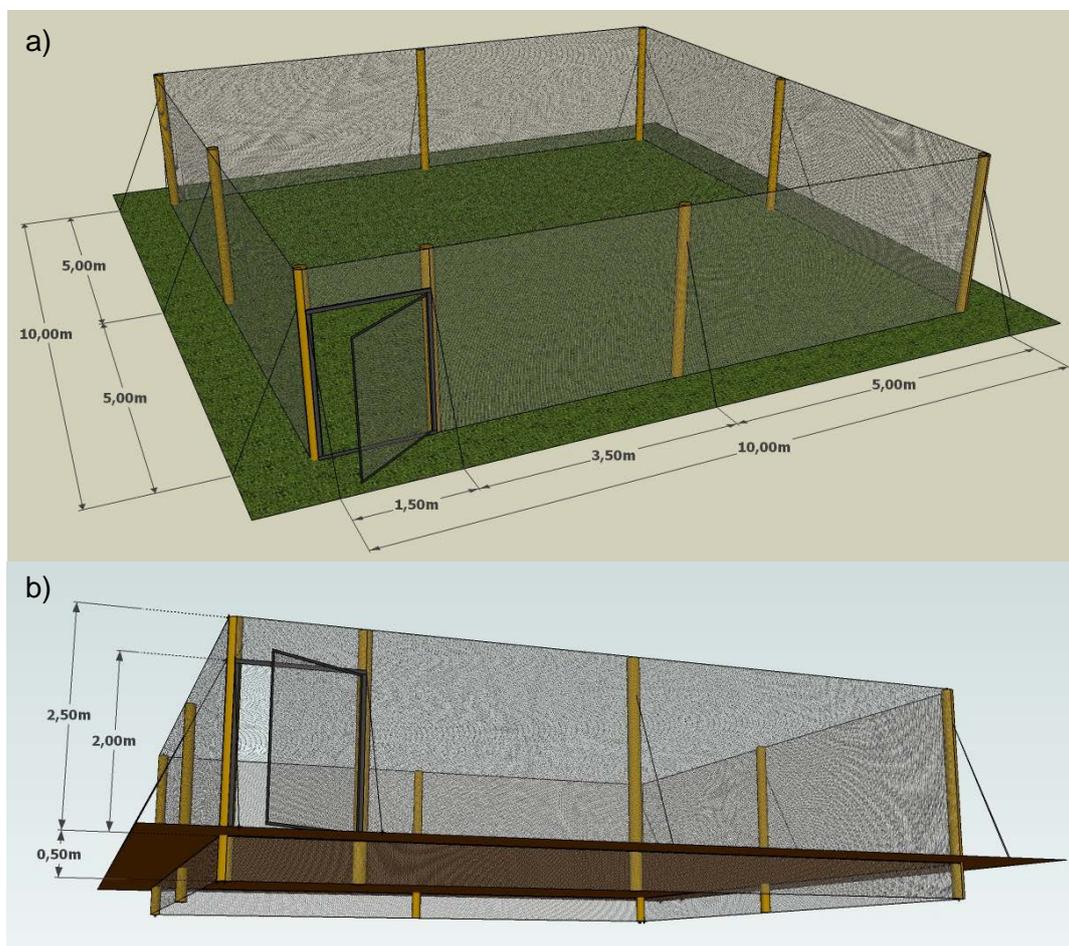


Abbildung 16: Skizze der Voliere a) Ansicht von schräg oben; b) Ansicht von schräg unten [STÜTZLEIN; 2008; LfL]

Ungeschütztes Freigehege

Um das ungeschützte Freigehege abzugrenzen, wurde ein Elektrozaun mit einer Maschenweite von ca. 15 cm x 15 cm verwendet. In diesen waren Befestigungsstäbe eingewebt, welche der Verankerung im Boden dienten. Die Höhe des Zauns betrug 90 cm. Um eine gewisse

Stabilität des Freigeheges zu gewährleisten, wurde der Elektrozaun an allen vier Ecken mittels 4 mm dicken Stahlseilen abgespannt und mit Holzpfählen im Boden befestigt.

Nach Abschluss der Bauarbeiten, die auf dem Areal bei E.ON Anfang Dezember 2008, auf dem Versuchsgut Viehhausen Mitte März 2009, auf dem Gelände der Stadtwerke München Ende Juli 2009 und auf dem Areal bei dem Klärwerk in Wang sowie am Versuchsgut Grünschwaige Mitte Juli 2009 abgeschlossen waren, wurden beide Areale mit getuftetem Kunstrasen vollständig ausgelegt und mit Hilfe von Zeltnägeln im Boden verankert. Diese Maßnahme gewährleistete eine saubere und für die Probenahme geeignete Oberfläche. Um möglichst realistische Bedingungen nachzuahmen, aber dennoch nur das von außen eingetragene organische Material aviären Ursprungs zu erfassen, erfolgte anschließend das Aufstellen von Hühnerattrappen auf den Versuchsflächen. Auf jedem Areal standen schließlich 24 Hühner sowie 1 Hahn. Die Anzahl von 25 Tieren pro Areal mit einer Fläche von 100 m², wurde aufgrund der EG-Verordnung 1804/99 vom 19.7.1999 gewählt, welche eine Auslauffläche von 4 m² pro Tier vorschreibt. Abbildung 17 zeigt exemplarisch sowohl ein geschütztes als auch ein ungeschütztes Areal auf dem Versuchsgut Grünschwaige nach deren Fertigstellung.



Abbildung 17: Geschütztes und ungeschütztes Areal auf dem Versuchsgut Grünschwaige

Die Probenahme auf dem Areal bei E.ON erfolgte vom 11.12.2008 bis 29.06.2010. In diesem Zeitraum war es möglich, die Flächen 46 Mal abzusaugen, woraus sich eine Gesamtprobenzahl von 92 ergab. Die Versuchsflächen auf dem Gelände der Stadtwerke München wurden vom 30.07.2009 bis 01.07.2010 26 Mal beprobt, wodurch insgesamt 52 Proben zur Untersuchung vorlagen. Der Beprobungszeitraum auf dem Areal bei dem Klärwerk in Wang erstreckte sich vom 27.07.2009 bis 01.07.2010. Innerhalb dieser 11

Monate wurden insgesamt 74 Proben gewonnen. Die Fertigstellung der Versuchsflächen auf dem Versuchsgut Grünschaibe erfolgte so, dass die Probennahme am 23.07.2009 beginnen konnte. Am 11.05.2010 fand die letzte Saugung statt. Nach diesem Zeitpunkt war es nicht mehr möglich, weitere Beprobungen durchzuführen, da eine auf der angrenzenden Wiese gehaltene Rinderherde den Elektrozaun durchbrochen und das ungeschützte Versuchsfeld zerstört hat. Dadurch wurde es so stark mit Erde und Rinderkot kontaminiert, dass es für weitere Probennahmen nicht mehr verwendbar war. Innerhalb des gesamten Beprobungszeitraums konnten je Fläche 26 Proben gewonnen werden. Die Probennahme der Flächen auf dem Versuchsgut Viehhausen begann am 31.03.2009. Die letzte Beprobung dieses Areals fand am 29.06.2010 statt. Innerhalb dieses Zeitraums wurden beide Flächen an 42 Tagen abgesaugt. Insgesamt konnten so von allen Flächen 354 Proben gewonnen werden.

2.3.3 Probennahme

Die Probennahme erfolgte mit dem Nass-/Trockensauger A2701 der Firma Kärcher. Dieser besaß mehrere Sets an Schläuchen und passenden Turbobürsten, wobei ein Set nur für jeweils ein Areal verwendet wurde. Diese Maßnahme verhinderte eine Verschleppung von Material von einem Gehege in ein anderes. Zusätzlich unterstützte das Einsetzen einer neuen Filtertüte für jede Probennahme die Vermeidung der Materialverschleppung. Der Nass-/Trockensauger wurde auf einer Metall-Gebirgskraxe mit Spanngurten befestigt und auf den Rücken geschnallt. Diese Vorkehrung verhinderte einen unerwünschten Eintrag durch den Kontakt des Nass-/Trockensaugers mit dem Erdboden. Vor Betreten der Versuchsflächen angezogene Einwegüberziehschuhe dienten gleichfalls der Verhinderung des Eintrags durch an den Schuhen haftende Partikel. Es wurde in einer Ecke mit dem Absaugen begonnen und anschließend das Areal mäanderförmig mit gleichmäßiger Geschwindigkeit abgescritten. Auf jeder Versuchsfläche lagen 5 Kunstrasenbahnen à 2 m Breite aus. Die Dauer der Probennahme jeder Bahn wurde auf 5 min festgesetzt, woraus eine Gesamtprobennahmezeit von 25 min pro Areal resultierte. Die so gewonnenen Proben dienten der nachfolgenden Untersuchung auf das Vorkommen der vogelspezifischen Gensequenz des mitochondrialen Cytochrom *b*.

2.3.4 Lyophilisierung und Homogenisierung der Proben

Um eine einheitliche Probenmatrix zu erhalten und die Probenmenge in Bezug auf die Beprobungsfläche und somit die auf die Flächen eingetragenen aviären Partikel miteinander vergleichen zu können, wurde das mit Hilfe des Nass-/Trockensaugers gewonnene Material

gefrieretrocknet und anschließend mit einer Schlagmühle 2x im Abstand von einer Minute für 15 s gemahlen. Dieser Schritt diente einerseits der Zerkleinerung, andererseits der Erzeugung einer möglichst homogenen Probe.

2.3.5 Nachweis des vogelspezifischen mitochondrialen Cytochrom *b*-Genabschnitts

2.3.5.1 DNA-Extraktion

Die Isolierung der DNA erfolgte mit dem PowerSoil™ DNA Isolation Kit von MoBio Laboratories Inc., wie bereits in Kapitel C 2.1.2 beschrieben.

2.3.5.2 Endpunkt-PCR

Der Nachweis des vogelspezifischen mitochondrialen Cytochrom *b* erfolgte anhand der bereits von MATSUNAGA *et al.* [1999] publizierten Primer Sim und Chicken. Abbildung 18 zeigt die komplette Basensequenz dieses Genabschnitts sowie die Lage der verwendeten Primer. Hierbei markieren die rot unterlegten Basen diejenigen, welche sich zur ursprünglichen Sequenz unterscheiden.

		Sim				
		gacctccc	agctccatca	aacatctcat	cttgatgaaa	⇒
14941	aactccctaa	tcgacctccc	agc ^c ccatcc	aacatctctg	cttgatgaaa	tttcggctcc
	ttgaggggatt	agctggaggg	tcggggtagg	ttgtagagac	gaactacttt	aaagccgagg
15001	ctattagcag	tctgcctcat	gacccaaatc	ctcaccggcc	tactactagc	catgcactac
	gataatcgtc	agacggagta	ctgggttttag	gagtggccgg	atgatgatcg	gtacgtgatg
15061	acagcagaca	catccctagc	cttctcctcc	gtagcccaca	cttgccggaa	cgtacaatac
	tgtcgtctgt	gtagggatcg	gaagaggagg	catcgggtgt	gaacggcctt	gcatgttatg
15121	ggctgactca	tccggaatct	ccacgcaaac	ggcgcctcat	tcttcttcat	ctgtatcttc
	ccgactgagt	aggccttaga	ggtgcgtttg	ccgcggagta	agaagaagta	gacatagaag
				←	gcggagta	agaagaagta
						gacatagaa
						Chicken

Abbildung 18: Lage und Basensequenz der Primer Sim und Chicken (gelb) auf dem mitochondrialen Cytochrom *b* (X52392). Rot unterlegte Basen markieren diejenigen, welche sich zur ursprünglichen Sequenz unterscheiden.

Da bei dem zu untersuchenden Probenmaterial eine PCR-Inhibition denkbar ist, erfolgte der Nachweis des mitochondrialen Cytochrom *b* mit einer zusätzlichen IAC. Diese wurde wie in Kapitel C 2.1.3.6 beschrieben hergestellt. Als Master Mix diente der PCR Master Mix von Promega GmbH. Aufgrund der Ergebnisse aus den Vorversuchen setzte sich der Reaktionsansatz einer Endpunkt-PCR wie folgt zusammen (Tabelle 21):

Tabelle 21: Reaktionsansatz zum Nachweis des mitochondrialen Cyt *b* mit IAC mittels Endpunkt-PCR

Komponenten	Konzentration der Stammlösung	Volumen [μ l]
Promega Mix	2 x konzentriert	12,50
Primer Sim	10 μ M	1,25
Primer Chicken	10 μ M	1,25
H ₂ O		8,00
pUC19-Plasmid-DNA	10 ⁻⁹	1,00
template DNA		1,00
Endvolumen		25,00

Weiterhin wurde folgendes Temperaturprofil für den Nachweis des mitochondrialen Cytochrom *b* mit gleichzeitiger Amplifikation der IAC gewählt (Tabelle 22).

Tabelle 22: Temperaturprofil zum Nachweis des mitochondrialen Cyt *b* mit IAC mittels Endpunkt-PCR

Programm	Zieltemperatur [$^{\circ}$ C]	Inkubationszeit [s]	Zyklen
Initiale Denaturierung	95	180	
Denaturierung	95	30	50
Annealing	65	60	
Elongation	72	60	
Terminale Elongation	72	600	

Bei jedem Reaktionsansatz wurde zusätzlich eine Negativkontrolle mitgeführt, d. h. anstelle der Template-DNA wurde nukleasefreies H₂O eingesetzt.

2.3.5.3 Agarosegelelektrophorese

Die Visualisierung der PCR-Produkte erfolgte mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese, wie in Kapitel C 2.1.3.2 beschrieben.

2.3.5.4 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der in diesem Forschungsprojekt gewonnenen Ergebnisse erfolgte mit Hilfe des χ^2 -Unabhängigkeitstests.

2.4 Sentinelversuch

Parallel zur Erfassung des Eintrags organischen Materials aviären Ursprungs wurde, in Zusammenarbeit mit dem Institut für Biologische Sicherheitsforschung GmbH (IBS) (Halle) sowie dem Institut für Medizinische Mikrobiologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (MLU), bei identischem Versuchsaufbau ein Praxistest mit Sentinelherden zur Überprüfung der Infektionssicherheit durchgeführt. Die Sentinelherden bestanden aus gegen Newcastle Disease geimpften SPF-Hühnern der Lohmann Tierzucht GmbH (Cuxhaven, Deutschland). Zusätzliche Parameter wie Legeleistung sowie Tierverluste wurden miterfasst.

2.4.1 Wahl der Standorte

Die Standorte wurden anhand verschiedener Kriterien ausgewählt. So sollten diese Standorte unter anderem in Gebieten liegen, welche ein erhöhtes Risiko für Aviäre Influenza aufweisen. Grund hierfür war, ebenso wie bei den Arealen mit den Hühnerattrappen, die Erhöhung des Infektionsdrucks und dadurch die Imitierung einer „Worst-Case-Situation“. Weiterhin war die Versorgung der Sentinelhühner durch geflügelhaltende und ökologisch wirtschaftende Betriebe abzusichern. Weitere Parameter, wie Gelände- und Bodenbeschaffenheit, Nähe zu Wäldern, Seen und Gebäuden, ausreichend große Abstände zu Bäumen sowie genügend große Flächen, um die netzgeschützten sowie die ungeschützten Gehege, zur Vermeidung einer Erregerübertragung untereinander, mit einem Abstand von mindestens 50 m voneinander aufzustellen, waren für die Standortwahl von Bedeutung. Unter Berücksichtigung der eben genannten Bedingungen wurden folgende Standorte innerhalb Deutschlands ausgewählt (Abbildung 19):

- Geflügelhof Halder in Hoßkirch (Baden-Württemberg)
- Gut Weyern bei Düren (Nordrhein-Westfalen)
- Laeisenhof in Ferschweiler (Rheinland-Pfalz)
- Versuchsstation Viehhausen (Bayern)
- Wässerndorf bei Kitzingen (Bayern)



Abbildung 19: Standorte der Areale mit Sentinelhühnern (grüne Punkte)

2.4.2 Aufbau der Sentinelanlagen

Auch der Aufbau der Volieren und der ungeschützten Freigehege für die Sentinelhühner fand an allen Standorten durch die Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft statt.

Volieren

Der Aufbau der Volieren für die Sentineltiere erfolgte wie bereits in Kapitel C 2.3.2 beschrieben, mit Ausnahme des Volierenzugangs. Da die Volieren nach Abschluss der Bauarbeiten einzig über die Stalleinheit betreten werden durften, wurden bereits beim Aufbau provisorische Öffnungen vorgesehen, welche den späteren Anschluss mit der Stalleinheit ermöglichten.

Ungeschütztes Freigehege

Das ungeschützte Freigehege bestand aus einem 1 m hohen Elektrozaun, der mit einer Weidezaunbatterie betrieben wurde, und einem zusätzlichen, oberhalb des Elektrozauns angebrachten, ebenso 1 m hohen, großmaschigen Drahtgeflecht. Dieses wurde mit Hilfe von Rundhölzern an jeder Ecke aufgebaut. Mehrere Abspannungen sicherten den Zaun

zusätzlich ab. Insgesamt betrug so die Höhe der Einzäunung 2 m. Um eine gewisse Stabilität der Freigehege zu erzielen, wurden diese an allen vier Ecken mittels 4 mm dicker Stahlseile abgespannt und mit Holzpfählen im Boden verankert. Auch hier wurden bereits beim Aufbau provisorische Öffnungen für den Anbau der Stalleinheit berücksichtigt.

Stalleinheit

Die Stalleinheiten, die nach Absprache aller beteiligten Projektpartner (TU München, LfL, IBS und MLU) von der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft geplant und entwickelt wurden, sollten so gestaltet werden, dass sie sowohl den für dieses Projekt nötigen hygienischen als auch den baulichen sowie haltungsbedingten Anforderungen entsprachen. Aus diesem Grund bestand eine Stalleinheit aus dem eigentlichen Hühnerstall und einer Hygieneschleuse. Insgesamt umfassten die Außenmaße einer Stalleinheit eine Breite von 4,20 m und eine Tiefe von 2,20 m. Davon nahm die Hygieneschleuse einen Bereich von 1,50 m x 2,20 m ein. Einteilung und Inventar der Hygieneschleuse werden in Abbildung 20 und Abbildung 21 dargestellt.

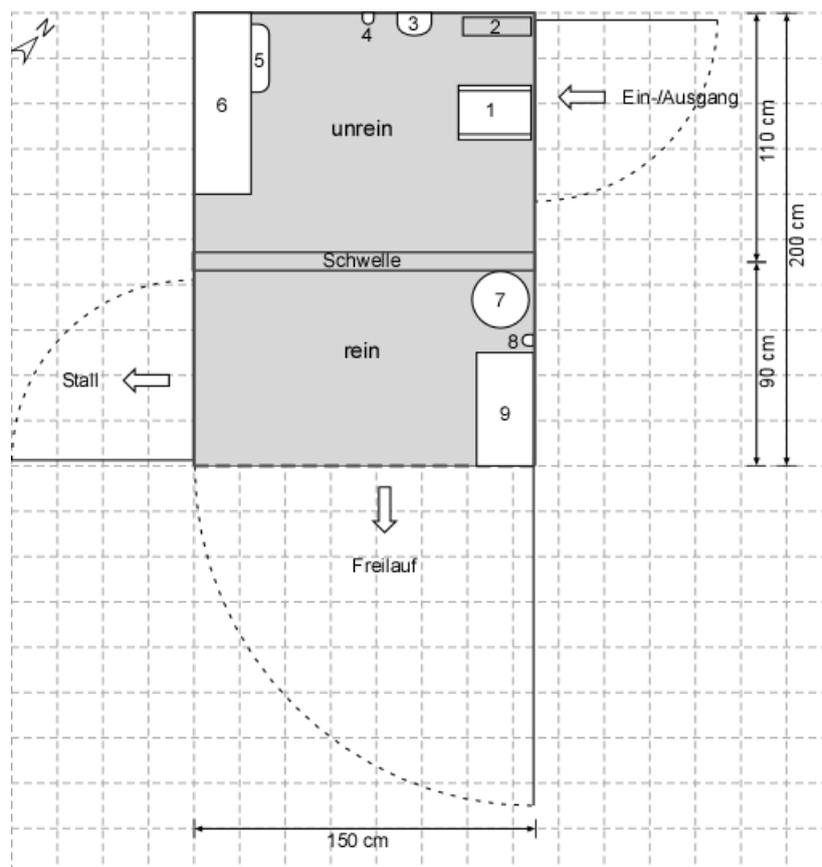


Abbildung 20: Schematische Darstellung der Hygieneschleuse [STÜTZLEIN & WEIL; 2008; LfL]

- (1) Desinfektionsmatte; (2) Mistschieber; (3) Spender für Händedesinfektionsmittel;
 (4) Doppelhaken im ‚Unrein‘-Bereich; (5) Abfallbehälter; (6) Regalboden im ‚Unrein‘-Bereich;
 (7) Hocker; (8) Doppelhaken im ‚Rein‘-Bereich; (9) Regalboden im ‚Rein‘-Bereich

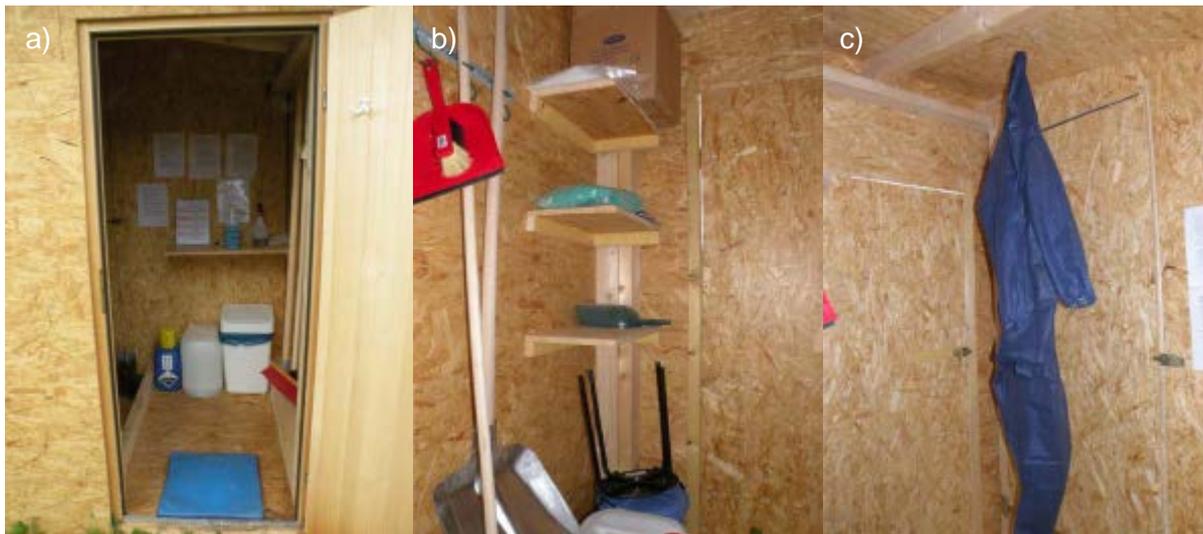


Abbildung 21: Hygieneschleuse a) unreiner Bereich; b) und c) reiner Bereich [STÜTZLEIN & WEIL 2009; LfL]

Die Ausführung der Stalleinheiten mit Schrägdach erfolgte in Holzbauweise. Weiterhin wurden Fenster, ein Schlupfloch, durch das die Tiere ins Freigehege gelangen konnten, eine Sitzvorrichtung mit integrierter Kotgrube, sogenannte „Fallnester“ für die Eiablage und eine solarbetriebene Lichtanlage in der Planung berücksichtigt. Zudem verfügten die Stalleinheiten über drei Türen. Eine der Türen diente dem Zugang in das Stallsystem, welche über den unreinen Bereich der Hygieneschleuse erfolgte. Die beiden anderen Türen führten vom reinen Bereich der Hygieneschleuse entweder in den Hühnerstall oder in das angrenzend eingezäunte Freigehege. Der Bau der so geplanten Stalleinheiten erfolgte anhand der Konstruktions- und Bauzeichnungen der LfL (Abbildung 22) durch einen Zimmereibetrieb, der anschließend auch an allen Standorten für den Aufbau der Ställe verantwortlich war.

Vor dem Aufbau der Stalleinheiten durch die Zimmerei an den jeweiligen Standorten wurden von der LfL Fundamente für die Ställe angelegt. Hierfür wurden an der Stelle, an der die Stalleinheit aufgebaut werden sollte, an acht Punkten ca. 60 cm tiefe und 50 cm x 50 cm breite Löcher für das Punktfundament mit Hilfe eines Kleinbaggers ausgehoben. Anschließend erfolgten das Füllen dieser Löcher mit Stein-Splitt und das Abdecken derselben mit Betonplatten. Nach dem Aufstellen der Stalleinheiten wurden diese in das jeweilige netzgeschützte bzw. ungeschützte System integriert. Am netzgeschützten System wurde, ebenso wie bei den Arealen mit den Hühnerattrappen, eine zusätzliche elektrische Barrieremaßnahme mittels Elektrolitzen um die Stalleinheit herum angebracht.

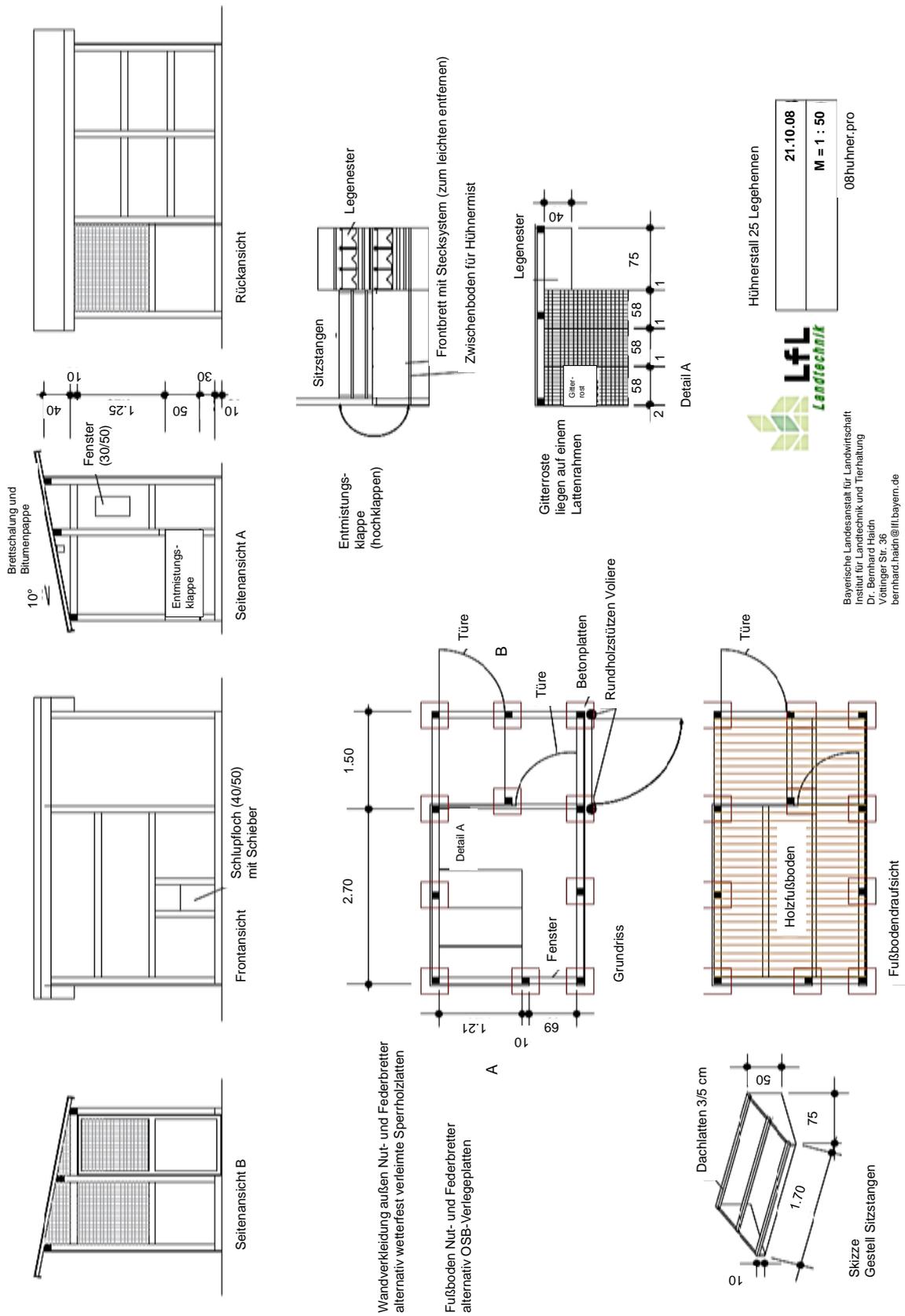


Abbildung 22: Konstruktions- und Bauplan der Stalleinheiten [LFL; 2008]

Um den Hühnern, wie es in der Richtlinie 1999/74/EG vorgeschrieben wird, einen zusätzlichen Schutz, insbesondere vor Raubvögeln, zu gewährleisten, wurde in beiden Gehegesystemen von ortsansässigen Schreinereien ein Unterschlupf errichtet. Dieser befand sich jeweils in der vom Stall am weitesten entfernten Ecke und bestand aus vier Holzpfosten, welche durch Einschlagen in den Boden befestigt wurden, und einer Holzplatte mit einer Größe von 1 m². Abbildung 23 zeigt exemplarisch sowohl ein netzgeschütztes (Volierenhaltung) als auch ein ungeschütztes Gehege.

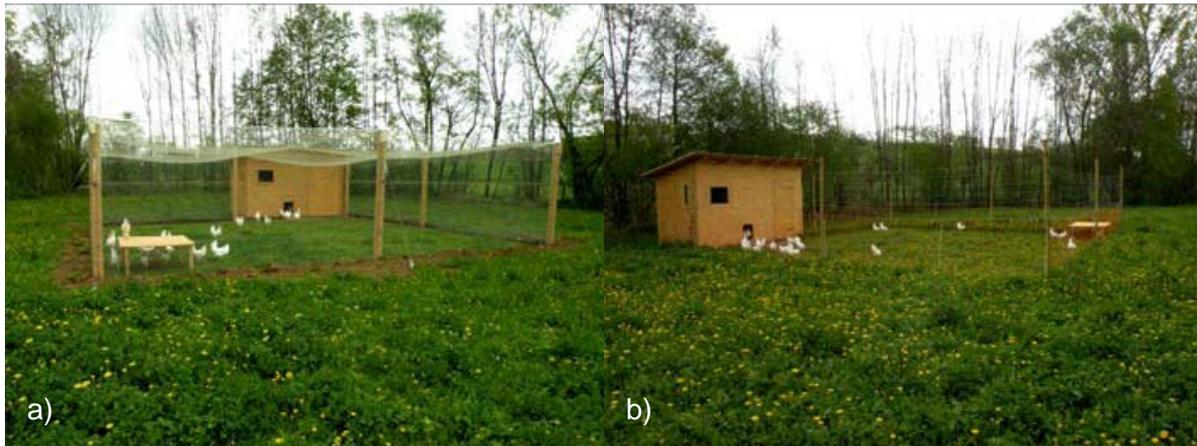


Abbildung 23: a) Volierenhaltung; b) ungeschütztes Gehege [STÜTZLEIN & WEIL; 2009; LfL]

2.4.3 Entwicklung eines speziellen Hygieneprotokolls

Um das Risiko einer anthropogenen Einschleppung von Infektionserregern zu minimieren, wurden die Ställe mit einer Hygieneschleuse ausgestattet. Nur über diese war das Betreten der Ställe sowie der Ausläufe möglich. Zusätzlich war folgendes Hygieneprotokoll bei jedem Betreten der Stallanlage einzuhalten:

Einschleusen

- Desinfektionsmatte benutzen (gefüllt mit dem Desinfektionsmittel Calgonit sterilid P6)
- Hände desinfizieren (mit Sterillium)
- Gehegefremde Schuhe ausziehen
- Einmaloverall anziehen (dabei jeglichen Kontakt zu Wänden, Gegenständen oder Boden im unreinen Bereich vermeiden)
- Wechsel in den reinen Bereich; dabei gehegeeigene Schuhe anziehen

Ausschleusen (erfolgte in umgekehrter Reihenfolge)

- Gehegeeigene Schuhe ausziehen und dabei in den unreinen Bereich wechseln
- Einmaloverall ausziehen
- Gehegefremde Schuhe anziehen

Um ein Einschleppen von Erregern durch Gerätschaften zu vermeiden, wurden alle im Innenbereich verwendeten Geräte vor der Nutzung desinfiziert. Auch das Futter und die Einstreu wurden gut verschlossen und somit möglichst sicher vor Nagern gelagert.

2.4.4 EInstallung der Tiere

Vor der EInstallung der Sentineltiere, die an den Standorten Düren, Viehhausen und Wässerndorf am 2. April 2009, in Ferschweiler sowie in Hoßkirch am 16. Juni 2009 erfolgte, wurde eine gründliche Desinfektion der Ställe durch Sprühdesinfektion durchgeführt. Anschließend wurden je 25 Tiere der Rasse LSL (White Leghorn) der Firma Lohmann Tierzucht GmbH (Cuxhaven), im Alter von etwa 20 Wochen, sowohl in die netzgeschützten als auch in die ungeschützten Gehege verbracht, ihr Allgemeinbefinden tierärztlich untersucht, gegen Newcastle Disease geimpft und mit Flügelmarken versehen. Die Anzahl der Hühner pro Gehege ergab sich auch hier unter Berücksichtigung der EG-Verordnung 1804/99 vom 19.7.1999.

2.4.5 Tiergesundheit und Überlebensrate

Neben der Überprüfung der Infektionssicherheit anhand bakteriologischer und virologischer Untersuchungen durch das Institut für Biologische Sicherheitsforschung GmbH sowie dem Institut für Medizinische Mikrobiologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg wurden sowohl die Verlustraten als auch die Legeleistung der Tiere in beiden Haltungsformen durch die bewirtschaftenden Betriebe erfasst. Beide Parameter ermöglichen ebenfalls Rückschlüsse auf Tiergesundheit und Schutz vor Raubtieren sowie Greifvögeln.

2.4.5.1 Legeleistung

An den fünf Standorten wurde die Legeleistung pro Huhn und Woche erfasst. Dies sollte über einen Zeitraum von 40 Wochen erfolgen. Allerdings war es aus technischen Gründen an den Standorten Wässerndorf bei Kitzingen sowie am Geflügelhof Halder in Hoßkirch nur für 34 bzw. 25 Wochen möglich, diese Daten zu sammeln.

2.4.5.2 Tierbestand

Zusätzlich zur Legeleistung wurde, um die Verlustraten beider Haltungsformen vergleichen zu können, an allen fünf Standorten (Geflügelhof Halder in Hoßkirch, Gut Weyern bei Düren, Laeisenhof in Ferschweiler, Versuchsstation Viehhausen und Wässerndorf bei Kitzingen) über 40 Wochen der Tierbestand sowohl in den geschützten als auch in den ungeschützten Arealen aufgezeichnet.

2.4.5.3 Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung der in diesem Forschungsprojekt gewonnenen Daten bezüglich Legeleistung und Tierbestand wurde das Softwareprogramm SigmaPlot 12.0 verwendet. Bei annähernd normal verteilten Variablen erfolgte die Prüfung der Signifikanz mit Hilfe des ungepaarten t-Tests. War diese Voraussetzung der Normalverteilung nicht erfüllt, wurde der Mann-Whitney Rank Sum Test eingesetzt.

D Ergebnisse

1 Methodenentwicklung

Für die Abschätzung des allgemeinen Infektionsschutzes für Geflügel durch speziell entwickelte netzgeschützte Flächen wurde eine molekularbiologische Methode entwickelt. Diese ermöglichte die Bestimmung des aviären Eintrags in die netzgeschützten sowie ungeschützten Auslauflächen mittels PCR.

1.1 Aufbereitung der Proben

Um eine möglichst optimal zerkleinerte und homogenisierte Probenmatrix und somit eine hohe Reproduzierbarkeit zu erreichen, wurden vier unterschiedliche Möglichkeiten der Probenaufbereitung im 4x-Ansatz durchgeführt und getestet. Hierzu diente eine Staubprobe aus einem Hühnerstall, die Federn sowie Strohfasern enthielt. Diese Probe wurde in mehrere Aliquots unterteilt, wobei ein Aliquot im Originalzustand für die DNA-Extraktion verwendet wurde, weitere Aliquots zuvor mit Hilfe von Flüssigstickstoff, der Schlagmühle oder dem TissueLyser II der Firma Qiagen zerkleinert wurden. Die DNA der jeweils unterschiedlich aufbereiteten Aliquots wurde anschließend mit Hilfe des PowerSoil™ DNA Isolation Kits extrahiert. Die daraus gewonnenen DNA-Extrakte wurden anschließend mittels real-time PCR mit der Zielsequenz des vogelspezifischen Genabschnitts des mitochondrialen Cytochrom *b* untersucht.

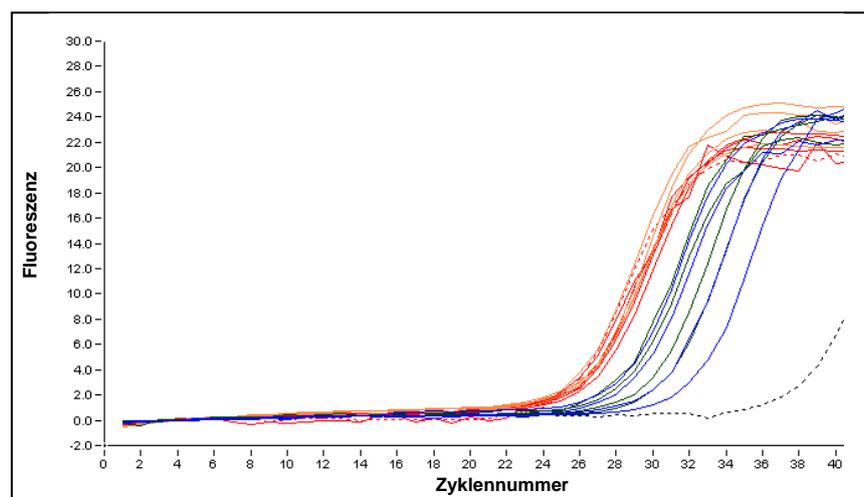


Abbildung 24: PCR-Amplifikationskurven der unterschiedlichen Probenaufbereitungsmöglichkeiten; als Zielsequenz diente ein Abschnitt des mitochondrialen Cytochrom *b*

- | | | | |
|---------------------|---------------------|--------------------------|-------------------|
| — (Blau) | Nicht homogenisiert | — (Grün) | Flüssigstickstoff |
| — (Orange) | Schlagmühle | — (Rot) | TissueLyser II |
| (Gestrichelt) | Negativkontrolle | (Rott gestrichelt) | Positivkontrolle |

Wie aus Abbildung 24 hervorgeht, steigen die Amplifikationskurven der nicht homogenisierten Hühnerstallstaubproben und der mit Flüssigstickstoff behandelten Proben deutlich später an als diejenigen, welche mit der Schlagmühle und dem TissueLyser II homogenisiert wurden. Ein später Anstieg weist auf eine geringe Menge an DNA in der Probe hin. Weiterhin liegen die Kurven weiter auseinander, was auf eine inhomogen verteilte Menge an DNA in den einzelnen Proben schließen lässt. Bei einem Vergleich der mittels Schlagmühle und TissueLyser II homogenisierten Proben erreichen diejenigen, welche mit der Schlagmühle behandelt wurden, ein höheres Fluoreszenzplateau.

Die Standardabweichung und Varianz der mittels real-time PCR erzielten „crossing point“-Werte der diversen Probenaufbereitungsmethoden verdeutlichen dieses Ergebnis. Zudem zeigt die statistische Auswertung mit $p = 0,0007$ einen hoch signifikanten Unterschied zwischen den Probenaufbereitungsverfahren nicht homogenisiert und Flüssigstickstoff gegenüber Schlagmühle und TissueLyser II (Tabelle 23). Der Standardfehler der Mittelwerte, abgeleitet aus der Varianzanalyse, liegt bei 1,128.

Tabelle 23: Mittels unterschiedlicher Probenaufbereitungsverfahren mit der real-time PCR erzielte „crossing point“-Werte; Zielsequenz stellt das mitochondriale Cytochrom *b* dar

	Mittelwert der „crossing points“ [Standardabweichung/Varianz]
Nicht homogenisiert ^a	29,91 [1,83/3,33]
Flüssigstickstoff ^a	29,16 [1,23/1,51]
Schlagmühle ^b	26,21 [0,31/0,10]
TissueLyser II ^b	26,28 [0,39/0,15]

a,b = signifikante Mittelwertunterschiede

Aufgrund der Ergebnisse, die mittels der real-time PCR gewonnen wurden, wurde für die Homogenisierung bei den weiteren Untersuchungen die Schlagmühle eingesetzt.

1.2 DNA-Extraktion

Um die Ergebnisse der unterschiedlichen DNA-Isolierungsverfahren vergleichen zu können, wurde zunächst die DNA-Konzentration der Extrakte mittels NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer im 3x-Ansatz ermittelt. Anschließend wurde eine real-time PCR durchgeführt, bei der als Zielsequenz ein Abschnitt des mitochondrialen Cytochrom *b* diente.

Tabelle 24: Mittels unterschiedlicher DNA-Extraktionsverfahren erzielte DNA-Konzentrationen aus Federn verschiedener Herkunft

Federn	Mittelwert [Standardabweichung/Varianz] der gemessenen DNA-Konzentrationen [ng/μl]		
	PowerSoil™ DNA Isolation Kit	QIAamp® DNA Stool Mini Kit	CTAB-Extraktion
Huhn	4,92 [0,40/0,16]	5,53 [0,83/0,68]	113,49 [19,83/393,17]
Waldrapp	9,21 [3,35/11,23]	0,77 [0,20/0,04]	15,76 [0,18/0,03]
Kolkrabe	2,74 [0,84/0,70]	n.m.*	9,77 [2,50/6,26]
Sakerfalke	2,93 [1,20/1,44]	1,40 [1,18/1,40]	11,33 [0,37/0,13]
Amsel	8,30 [0,59/0,34]	n.m.*	0,57 [0,40/0,16]

* n.m.: nicht messbar

Wie aus Tabelle 24 hervorgeht, konnte mit Hilfe des CTAB-Extraktionsverfahrens bei Federn insgesamt die höchste DNA-Konzentration aus den untersuchten Proben gewonnen werden. Eine Ausnahme bildet hierbei die Probe der Amsel, bei der nur eine DNA-Konzentration von 0,57 ng/μl gemessen wurde. Die niedrigsten Werte erzielte die DNA-Isolierung mit dem QIAamp® DNA Stool Mini Kit. Hierbei war die DNA-Konzentration der Proben von Kolkrabe und Amsel nicht messbar und die Werte der Proben von Waldrapp sowie Sakerfalke lagen deutlich unterhalb der mittels des PowerSoil™ DNA Isolation Kits gewonnenen Extrakte. Lediglich das DNA-Extrakt der Probe des Huhns wies eine etwas höhere DNA-Konzentration auf.

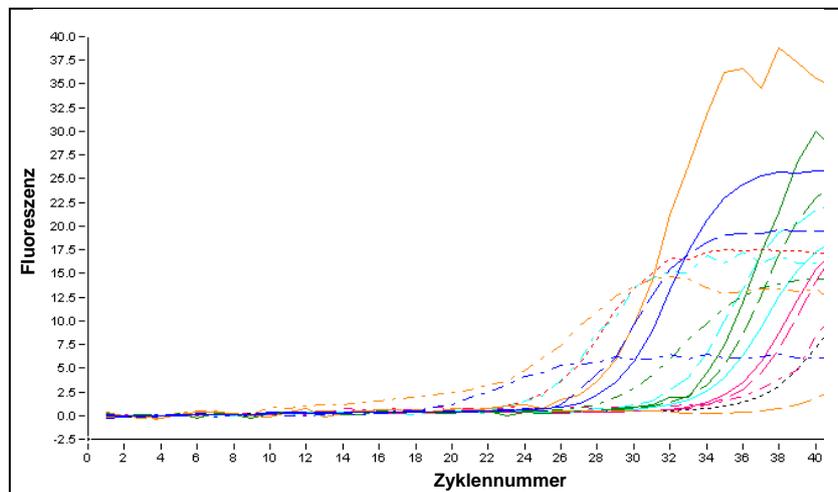


Abbildung 25: PCR-Amplifikationskurven der getesteten DNA-Extraktionsverfahren aus Federn unterschiedlicher Herkunft; als Zielsequenz diente ein Abschnitt des mitochondrialen Cytochrom *b*

— PowerSoil Kit - - - QIAamp® DNA Stool Mini Kit — · - CTAB-Extraktion
 ······ Negativkontrolle ······ Positivkontrolle
 blau: Huhn; orange: Waldrapp; grün: Kolkrabe; hellblau: Sakerfalke; pink: Amsel

Abbildung 25 zeigt die Amplifikationskurven der an Federn von verschiedenen Vögeln getesteten DNA-Extraktionsverfahren. Hierbei wurde mit der CTAB-Extraktion der früheste Anstieg der Amplifikationskurven erzielt, was sich bereits durch die Ergebnisse der Messung

der DNA-Konzentrationen (Tabelle 24) abzeichnete. Allerdings war die Intensität des Fluoreszenzplateaus am geringsten. Die DNA-Isolate des QIAamp® DNA Stool Mini Kit erzielten zwar ein höheres Fluoreszenzplateau als die der CTAB-Extraktion, allerdings begann der Anstieg der Amplifikationskurven mit Ausnahme der Amselprobe deutlich später. Der spätere Anstieg ist auf die geringere DNA-Konzentration des Extraktes zurückzuführen (Tabelle 24). Des Weiteren stieg die Amplifikationskurve der vom Waldrapp gewonnenen Probe deutlich nach der Negativkontrolle an, weshalb diese gemäß der „MIQE Guidelines“ als negativ zu bewerten ist [BUSTIN *et al.*, 2009; KAVANAGH *et al.*, 2011]. Auch die Messung der DNA-Konzentration ergab einen sehr geringen Wert für diese Probe (Tabelle 24). Das mit Hilfe des PowerSoil™ DNA Isolation Kits gewonnenen DNA-Isolats erreichte in der real-time PCR bei den Proben von Waldrapp, Kolkrabe und Huhn das höchste Fluoreszenzplateau, bei den Proben von Amsel und Sakerfalke lag sie jeweils nur knapp unter der mit dem QIAamp® DNA Stool Mini Kit erreichten Fluoreszenzniveaus. Ebenso erfolgte der Anstieg der Amplifikationskurven der Proben, die mit dem PowerSoil™ DNA Isolation Kit aufbereitet wurden, meist vor den Extrakten des QIAamp® DNA Stool Mini Kits oder nur kurz darauf. Dies spiegelt die Ergebnisse der Messungen der DNA-Konzentrationen wider (Tabelle 24). Die Negativkontrolle stieg bei Zyklus 36 an und lässt nach Einbeziehung der Schmelzkurvenanalyse auf die Entstehung von Primer-Dimeren schließen.

Die DNA-Konzentration der Extrakte der unterschiedlichen DNA-Isolierungsverfahren aus Kot verschiedener Herkunft wird in Tabelle 25 aufgeführt. Daraus geht hervor, dass das CTAB-Extraktionsverfahren, ebenso wie bei Federn, die höchste Menge an DNA isoliert. Mit Ausnahme der Probe der Amsel erzielte der QIAamp® DNA Stool Mini Kit, der insbesondere auf die DNA-Isolierung von DNA aus Faeces ausgelegt ist, höhere DNA-Konzentrationen als der PowerSoil™ DNA Isolation Kit.

Tabelle 25: Mittels unterschiedlicher DNA-Extraktionsverfahren erzielte DNA-Konzentrationen aus Kot verschiedener Herkunft

Kot	Mittelwert [Standardabweichung/Varianz] der gemessenen DNA-Konzentrationen [ng/µl]		
	PowerSoil™ DNA Isolation Kit	QIAamp® DNA Stool Mini Kit	CTAB-Extraktion
Huhn	5,71 [0,53/0,28]	39,40 [1,06/1,13]	1207,87 [12,82/164,35]
Waldrapp	2,53 [1,30/1,68]	9,99 [1,00/1,00]	197,90 [16,11/259,47]
Sakerfalke	8,36 [1,23/1,52]	74,63 [2,90/8,39]	989,24 [66,92/4478,21]
Amsel	21,17 [1,36/1,85]	13,44 [0,55/0,30]	207,03 [14,86/220,72]

Aus Abbildung 26 geht hervor, dass mit Ausnahme der vom Waldrapp stammenden Probe bei der DNA-Isolierung mittels CTAB bei Vogelkotproben, trotz einer hohen DNA-Konzentration im Extrakt, kein Anstieg der Amplifikationskurven erfolgte. Entgegen der

Ergebnisse der DNA-Konzentrationsmessungen der Extrakte (Tabelle 25), erzielten der PowerSoil™ DNA Isolation Kit von MoBio Laboratories Inc. und der QIAamp® DNA Stool Mini Kit von Qiagen bei den unten dargestellten Vogelarten miteinander vergleichbare Ergebnisse, wobei bei den Proben von Huhn und Waldrapp der QIAamp® DNA Stool Mini Kit, bei Proben von Sakerfalke sowie Amsel der PowerSoil™ DNA Isolation Kit eine bessere DNA-Ausbeute brachte. Eine Ausdehnung der Untersuchung auf weitere Vogelarten zeigte, dass, im Gegensatz zum QIAamp® DNA Stool Mini Kit, mit Hilfe des PowerSoil™ DNA Isolation Kits DNA aus sämtlichen Proben aller getesteten Vogelarten isoliert werden konnte. Aus diesem Grund wurde mit dem PowerSoil™ DNA Isolation Kit von MoBio Laboratories Inc. weitergearbeitet.

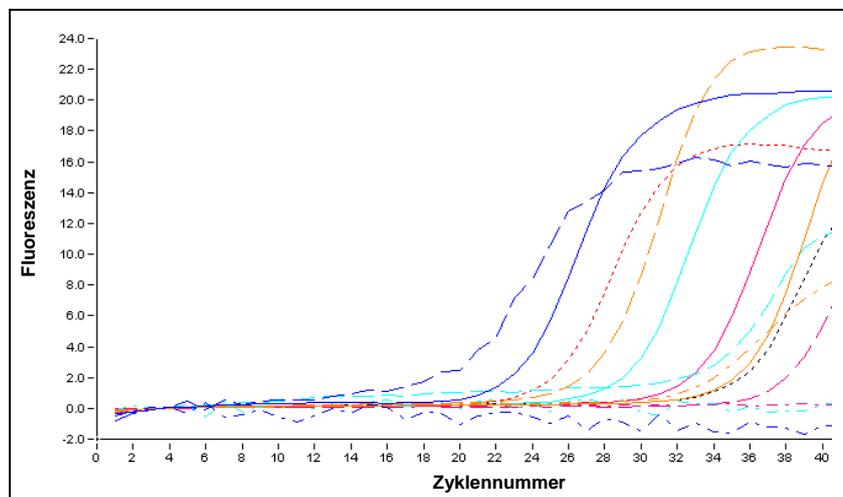


Abbildung 26: PCR-Amplifikationskurven der getesteten DNA-Extraktionsverfahren aus Kot unterschiedlicher Herkunft; als Zielsequenz diente ein Abschnitt des mitochondrialen Cytochrom *b*

— PowerSoil Kit - - - QIAamp® DNA Stool Mini Kit — · - CTAB-Extraktion
 ······ Negativkontrolle ······ Positivkontrolle
 blau: Huhn; orange: Waldrapp; hellblau: Sakerfalke; pink: Amsel

1.3 Überprüfung der Spezifität

Um den aviären Eintrag auf die netzgeschützten Flächen sowie auf die entsprechenden Referenzflächen molekularbiologisch erfassen zu können, wurden die gewählten Abschnitte des Federkeratins sowie des mitochondrialen Cytochrom *b* mittels real-time PCR auf ihre Spezifität überprüft.

1.3.1 Federkeratigen

Bei der Auswertung der real-time PCR zeigte sich, dass bei dem Nachweis des Federkeratins mit allen ausgewählten Primerpaaren ausnahmslos nicht nur der

spezifische Abschnitt des Federkeratins des Huhns, sondern auch bestimmte Abschnitte des Pferde- und Schweinegenoms vervielfältigt werden (Abbildung 27). Trotz Variationen in der Magnesiumkonzentration von 2 mM, 3 mM und 4 mM, der Annealingtemperatur, welche von 53 °C in Zwischenschritten bis hin zu 61 °C getestet wurde, der Annealingzeit von 5 s und 10 s sowie der Anzahl der Zyklen von 40 oder 45 konnte keine Verbesserung der Spezifität der real-time PCR erreicht werden.

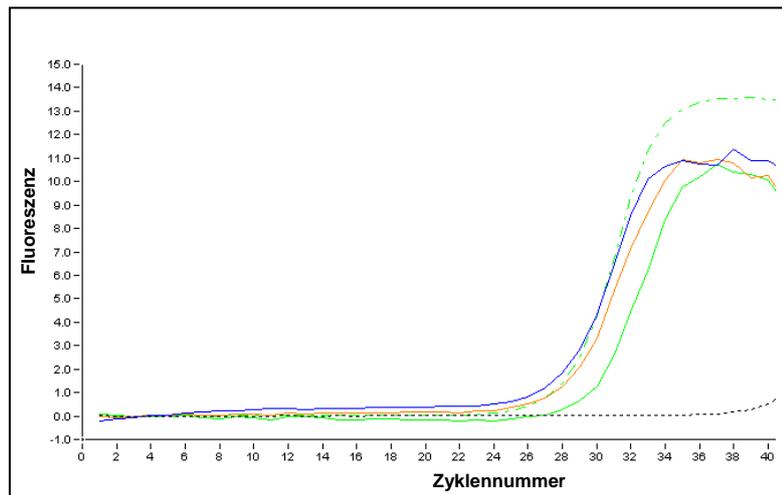


Abbildung 27: PCR-Amplifikationskurven von DNA-Isolaten von Huhn, Pferd und Schwein; als Zielsequenz diente ein Abschnitt des Federkeratins

— Kot - - - Federn Negativkontrolle
 blau: Pferd; rot: Schwein; grün: Huhn

Mit dem in Zusammenarbeit mit TIB MOLBIOL entwickelten Sondensystem, also den Primern Keratin_F und Keratin_R sowie der Sonde Keratin_TM (Kapitel C1.6 und Abbildung 10), wurden zwar die unspezifischen Fragmente bei Proben, die nicht aviärer Herkunft waren, nicht detektiert, gleichzeitig führte dies jedoch dazu, dass einige der ohne das Sondensystem detektierbaren Vogelspezies nicht mehr nachzuweisen waren. So blieben nicht nur Proben von Pferd, Schwein und Reptilien negativ, sondern auch von Star, Buntspecht, Grünfink, Stockente, Höckerschwan, Kanadagans, Blässhuhn und Sumpfohreule. Auch eine Veränderung der Annealingtemperatur, wobei 49 °C, 51 °C, 53 °C, 55 °C sowie 57°C getestet wurden, brachte keine Verbesserung der Detektierbarkeit.

1.3.2 Mitochondriales Cytochrom *b*-Gen

Der Nachweis eines Abschnitts des mitochondrialen Cytochrom *b* erzielte in der real-time PCR bezüglich des DNA-Isolats des Huhns ein positives Ergebnis, die DNA-Isolate von Pferd und Schwein hingegen blieben negativ. Die daraufhin auf andere Tierarten, mit Ausnahme der Spezies Vögel, ausgeweiteten Untersuchungen blieben negativ. So entstanden trotz der nahen Verwandtschaft der Reptilien und Vögel keine falsch-positiven

Ergebnisse. Dagegen konnten von Fasan, Amsel und Spatz stammende Proben als positiv getestet werden. Die hier gewonnenen Resultate bestätigen, dass der gewählte Sequenzabschnitt des mitochondrialen Cytochrom *b* für Vögel spezifisch ist. Aus diesem Grund basieren die weiteren Untersuchungen auf diesem Nachweisverfahren.

Schmelzkurvenanalyse

Die nach jedem real-time PCR-Lauf durchgeführte Schmelzkurvenanalyse diente der Verifizierung der entstandenen Amplifikate. Abbildung 28 zeigt beispielhaft die Schmelzkurven der von Wanderfalke, Mäusebussard, Buntspecht, Rebhuhn, Turmfalke, Sakerfalke und Hyazinthara gewonnenen Proben.

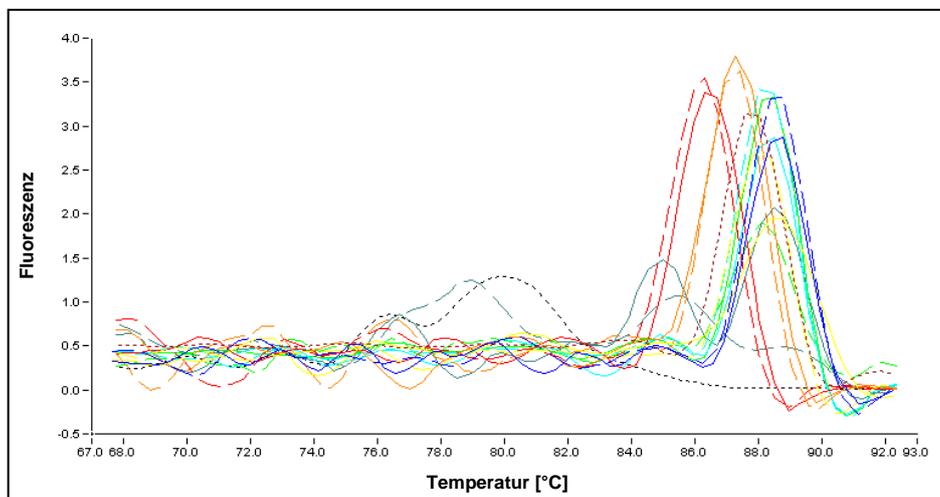


Abbildung 28: Schmelzkurvenanalyse von DNA-Isolaten verschiedener Vogelarten mit dem mitochondrialen Cytochrom *b* als Zielsequenz

————— Kot
 - - - - - Federn
 Negativkontrolle
 Positivkontrolle
 blau: Wanderfalke; gelb: Mäusebussard; orange: Buntspecht; rot: Rebhuhn;
 hellblau: Turmfalke; grün: Sakerfalke; grau: Hyazinthara

Bei der Auswertung dieser Schmelzkurvenanalyse ist zu erkennen, dass der Peak der Schmelzkurve der Positivkontrolle bei 87,8 °C liegt. Die Peaks der Proben der diversen Vogelarten befinden sich im Vergleich zur Positivkontrolle entweder etwas nach links oder nach rechts versetzt. Dagegen schmelzen die Amplifikate der zwei unterschiedlichen Ausgangsmaterialien, also sowohl des Kots als auch der Federn, von jeweils einer Vogelart bei derselben Temperatur auf. Auch liegen die Peaks der Schmelzkurven der Proben von Wanderfalke, Mäusebussard, Turmfalke sowie Sakerfalke auf derselben Höhe. Die Schmelzkurven beider Proben des Hyazintharas besitzen zwei Peaks, wobei sich der erste bei ca. 85 °C, der zweite bei ca. 88,5 °C befindet. Allerdings ist bei der Kotprobe der zweite Peak, bei den Federn der erste stärker ausgeprägt. Die Negativkontrolle weist ebenfalls einen Doppelpack bei etwa 76 °C und 80 °C auf. Da dieser sehr weit links liegt, lässt er sich

auf die Bildung von Primer-Dimeren zurückführen und ist somit von den anderen Peaks zu unterscheiden. Die Federprobe des Hyazintharas zeigt zu seinem bereits beschriebenen Doppelpeak ebenfalls einen der Negativkontrolle ähnlichen Doppelpeak. Aufgrund der unterschiedlichen Schmelzkurven ist nach jedem real-time PCR-Lauf eine Überprüfung der Amplifikatlänge von 227 bp und somit der Spezifität mittels Agarosegelelektrophorese notwendig.

Agarosegelelektrophorese

Abbildung 29 zeigt die gelelektrophoretische Auftrennung von DNA-Amplifikaten von Proben von Wanderfalke, Mäusebussard, Stockente, Turmfalke, Spatz, Kolkrabe und Amsel. Zusätzlich wurden eine Negativ- sowie eine Positivkontrolle aufgetragen. Die Negativkontrolle diente der Überprüfung auf Verunreinigungen der in die PCR eingesetzten Lösungen (PCR-Master Mix, Primer und nukleasefreies Wasser) oder von Verschleppungen von DNA über den Pipettiervorgang. Da auf dem Agarosegel keine Bande in dieser Linie sichtbar war, sie somit negativ blieb, kann eben genanntes ausgeschlossen werden. Bei einer positiven Negativkontrolle ist das Ergebnis nicht auswertbar und die PCR muss wiederholt werden [VAN PELT-VERKUIL *et al.*, 2008]. Die Positivkontrolle erzeugt ein deutlich positives Signal. Ihre Amplifikatgröße beträgt 227 bp, was auch der Abgleich mit der DNA-Leiter bestätigt. Die Banden der Proben der verschiedenen Vogelarten liegen auf derselben Höhe wie die Positivkontrolle. Die Amplifikate der jeweiligen Proben sind demnach genauso groß. Eine Ausnahme hierbei bildet die Bande der Probe eines Spatzes. Sie befindet sich ein wenig unterhalb der Positivkontrolle sowie der Banden der Proben der anderen Vogelarten, was auf ein kürzeres PCR-Produkt zurückzuführen ist. Ebenso werden bei der Probe einer Stockente neben der gesuchten Bande weitere Banden mit sowohl höherem als auch eine mit geringerem Molekulargewicht sichtbar.

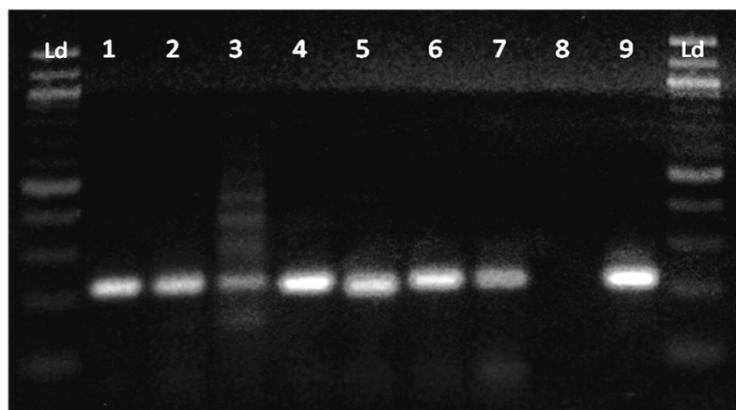


Abbildung 29: Gelelektrophoretische Trennung von DNA-Amplifikaten von Proben verschiedener Vogelarten mit dem mitochondrialen Cytochrom *b* als Zielsequenz

Ld: DNA Ladder; 1: Wanderfalke; 2: Mäusebussard; 3: Stockente; 4: Turmfalke; 5: Spatz; 6: Kolkrabe; 7: Amsel; 8: Negativkontrolle; 9: Positivkontrolle

Sequenzierung

Um die Basenabfolge und somit die eventuell bestehenden Sequenzunterschiede innerhalb der Klasse der Vögel zu bestimmen, wurden die Banden aus dem Agarosegel ausgeschnitten, mit dem QIAquick Gel Extraction Kit aufgereinigt und von der Firma Sequiserve sequenziert. Die Aufreinigung diente der Entfernung von überschüssigen Primern sowie den nicht eingebauten Nukleotiden (dNTPs), da diese die Hauptstörfaktoren in der Sequenzierreaktion darstellen [WERLE *et al.*, 1994]. Anschließend wurden die Ergebnisse miteinander sowie mit der Sequenz des Huhns verglichen. Hierbei waren die Sequenzen der PCR-Produkte der Proben von Wanderfalke, Mäusebussard, Turmfalke und Kolkkrabe absolut sauber und sicher zu editieren. Es zeigte sich, dass diese völlig identische Sequenzen besitzen, was sich bereits in der Schmelzkurvenanalyse (Abbildung 28) durch das Aufschmelzen der PCR-Produkte bei derselben Temperatur abzeichnete. Der darauffolgende Sequenzvergleich zwischen Huhn und Wanderfalke (Abbildung 30) ergab ebenfalls eine 100 %ige Übereinstimmung.

```

Query 1   GACCTCCCAGCTCCATCAAACATCTCATCTTGATGAAATTCGGCTCCCTATTAGCAGTC 60
          |||
Sbjct 1   GACCTCCCAGCTCCATCAAACATCTCATCTTGATGAAATTCGGCTCCCTATTAGCAGTC 60

Query 61  TGCCTCATGACCCAAATCCTCACCGGCCTACTACTAGCCATGCACTACACAGCAGACACA 120
          |||
Sbjct 61  TGCCTCATGACCCAAATCCTCACCGGCCTACTACTAGCCATGCACTACACAGCAGACACA 120

Query 121 TCCCTAGCCTTCTCCTCCGTAGCCACACTTGCCGGAACGTACAATACGGCTGACTCATC 180
          |||
Sbjct 121 TCCCTAGCCTTCTCCTCCGTAGCCACACTTGCCGGAACGTACAATACGGCTGACTCATC 180

Query 181 CGGAATCTCCACGCAAACGGCGCCTCATTCTTCTTCATCTGTATCTT 227
          |||
Sbjct 181 CGGAATCTCCACGCAAACGGCGCCTCATTCTTCTTCATCTGTATCTT 227

```

Abbildung 30: Vergleich des amplifizierten Sequenzabschnitts (mitochondriales Cytochrom *b*) der Proben von Huhn und Wanderfalke

Das PCR-Produkt aus der Probe einer Stockente lieferte, obwohl nur die Bande mit 227 bp ausgeschnitten wurde, zwei Sequenzen, welche sich aufgrund von Mischbasen punktuell unterschieden. Hierbei war ein Produkt zu den Sequenzen von Wanderfalke, Mäusebussard, Turmfalke und Kolkkrabe nahezu identisch. Das zweite Produkt dominierte etwas über das erste und unterschied sich zu diesem in mehreren Basen. Ebenso zeigte das PCR-Produkt der von der Amsel gewonnenen Probe im Vergleich zur Probe des Huhns einen Unterschied in der Basenabfolge von 15 % (Abbildung 31).

```

Query 1  GACCTCCCAGCTCCATCAAACATCTCATCTTGATGAAA-TTTCGGCTCCCTATTAG-CAG 58
          |||
Sbjct 1  GACCTCCCAGCTCCATCAAACATCTCATCTTGATGAAACTTTGGG-TCACTACTAGGCAT 59

Query 59 TCTGCCTCATGACCCAAATCCTCACCGGCCTACTACTAGCCATGCACTACACAGCAGACA 118
          |||
Sbjct 60 T-TGCTTAATTACACAAATTATCACAGGCTTACTACTAGCCACGCATTACACAGCAGACA 118

Query 119 CATCCCTAGCCTTCTCCTCCGIAGCCACACT-TGCCGGAACGTACAATACGGCTGACTC 177
          |||
Sbjct 119 CCTCCCTAGCCTTCAACTCAGTCGCCACA-TATGCCGAAATGTCCAATTTGGCTGACTA 177

Query 178 ATCCGGAATCTCCACGCAAACGGCGCCTCATTCTTCTTCATCTGTATCTT 227
          |||
Sbjct 178 ATCCGCAACCTCCATGCAAACGGCGCCTCATTCTTCTTCATCTGTATCTT 227

```

Abbildung 31: Vergleich des amplifizierten Sequenzabschnitts (mitochondriales Cytochrom *b*) der Proben von Huhn und Amsel

Beim PCR-Produkt der von einem Spatz gewonnenen Probe wurden nur zwei völlig unauswertbare Mischsequenzen erhalten. Hierbei fiel auf, dass unter anderem ein PCR-Produkt auftrat, dessen Sequenz um 9 Basen kürzer als die der anderen PCR-Produkte war. Dieses Ergebnis zeichnete sich bei wiederholten Versuchen schon im Agarosegel aufgrund der abweichenden Laufweite (Abbildung 29) ab.

Wie die Ergebnisse der Sequenzierung bestätigen, kommen die zur Positivkontrolle abweichenden Schmelzkurven (Abbildung 28) durch kleine Unterschiede im Genom bei Wildvögeln zustande [LEI *et al.*, 2010; PEREIRA & BAKER, 2006a und 2006b]. So ist trotz gleicher Amplifikatlänge keine Aussage über die Spezifität des PCR-Produkts anhand einer Schmelzkurvenanalyse möglich.

1.4 Überprüfung der Sensitivität

Die Überprüfung der Sensitivität, also der Wahrscheinlichkeit der richtig-positiven Ergebnisse des vogelspezifischen Sequenzabschnitts des mitochondrialen Cytochrom *b*, wurde anhand der in Tabelle 3 aufgelisteten Vogelarten durchgeführt. Diese Untersuchung sollte kontrollieren, ob mit der gewählten Nachweismethode ein möglichst breites Vogelspektrum erfasst wird.

Abbildung 32 zeigt beispielhaft die Amplifikationskurven der Proben von Wanderfalke, Mäusebussard, Buntspecht, Rebhuhn, Turmfalke, Sakerfalke und Hyazinthara, wobei bei allen genannten Vogelarten die DNA sowohl aus Kot als auch aus Federn getrennt voneinander mit dem PowerSoil™ DNA Isolation Kit isoliert wurde.

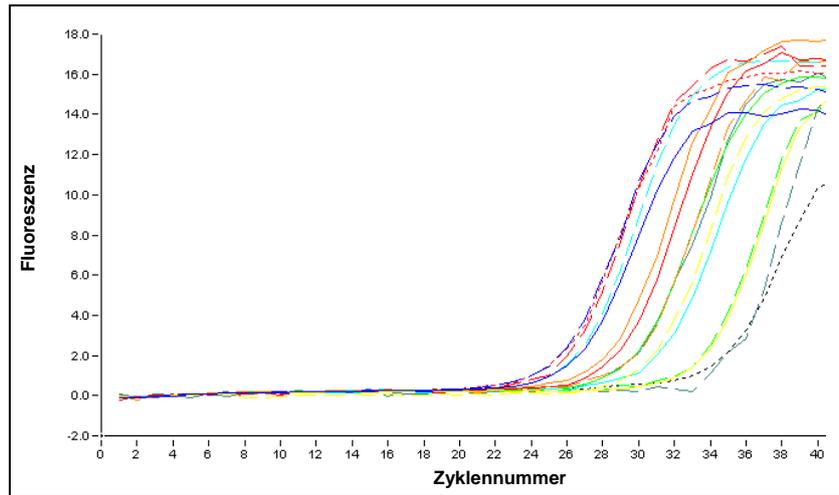


Abbildung 32: PCR-Amplifikationskurven von DNA-Isolaten diverser Vogelarten mit dem mitochondrialen Cytochrom *b* als Zielsequenz

————— Kot
 Negativkontrolle
 - - - - - Federn
 Positivkontrolle
 blau: Wanderfalke; gelb: Mäusebussard; orange: Buntspecht; rot: Rebhuhn;
 hellblau: Turmfalke; grün: Sakerfalke; grau: Hyazinthara

Alle in die real-time PCR eingesetzten DNA-Extrakte weisen ein positives Ergebnis auf. Es konnte also aus allen Proben erfolgreich die gesuchte DNA isoliert werden. Die Negativkontrolle zeigt ebenfalls eine positive Amplifikationskurve, allerdings erfolgt der Anstieg erst ab Zyklus 34 und liegt somit hinter den Kurven der untersuchten Proben. Die anschließend durchgeführte Schmelzkurvenanalyse zeigte, dass der Anstieg der Negativkontrolle auf die Bildung von Primer-Dimeren zurückzuführen ist (Abbildung 28). Bei nachfolgenden PCR-Läufen, in denen die restlichen in Tabelle 3 aufgelisteten Vogelarten auf ihre Erfassbarkeit geprüft wurden, ergab die Auswertung für alle ein positives Resultat.

1.5 Testung der Methodik an Feldproben

Die Anwendbarkeit der entwickelten und validierten Methode wurde anhand von 20 am Standort Wang für Vorversuche gewonnenen Feldproben getestet. Abbildung 33 zeigt die durch die real-time PCR entstandenen Amplifizierungskurven dieser Proben.

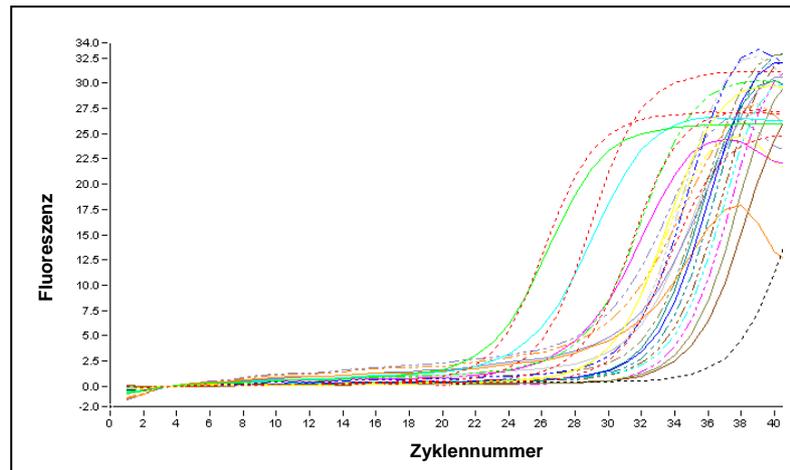


Abbildung 33: PCR-Amplifikationskurven von am Standort Wang für Vorversuche gewonnenen Feldproben; als Zielsequenz diente ein Abschnitt des mitochondrialen Cytochrom *b*

..... Positivkontrolle Negativkontrolle
 ————— geschütztes Areal - - - ungeschütztes Areal
 gelb: Probe 0; hellgrün: Probe 1; hellblau: Probe 2; blau: Probe 3, orange: Probe 4;
 olivgrün: Probe 5; lavendel: Probe 6; hellgrau: Probe 7; blaugrün: Probe 8;
 braun: Probe 9; pink: Probe 10

Alle Kurven der Feldproben weisen einen Fluoreszenzanstieg zwischen Zyklus 21 und 31 auf. Dies deutet darauf hin, dass in jeder untersuchten Probe die Ziel-DNA mittels der verwendeten Primer in der real-time PCR vervielfältigt werden konnte. Die bei Zyklus 21 ansteigende Positivkontrolle bestätigt das Funktionieren der real-time PCR. Der Anstieg der Negativkontrolle bei Zyklus 35 beginnt deutlich nach den Feldproben und ist unter Berücksichtigung der Schmelzkurvenanalyse (Abbildung 34) auf die Bildung von Primer-Dimeren zurückzuführen. Den frühesten Anstieg der Amplifikationskurve zeigen die Proben 1 (Zyklus 21) und 2 (Zyklus 22) der geschützten Areale. Bei allen anderen Proben beginnt der Kurvenanstieg zwischen Zyklus 27 und 31.

Das Ergebnis der nachfolgend durchgeführten Schmelzkurvenanalyse der am Standort Wang gewonnenen Proben wird in Abbildung 34 dargestellt.

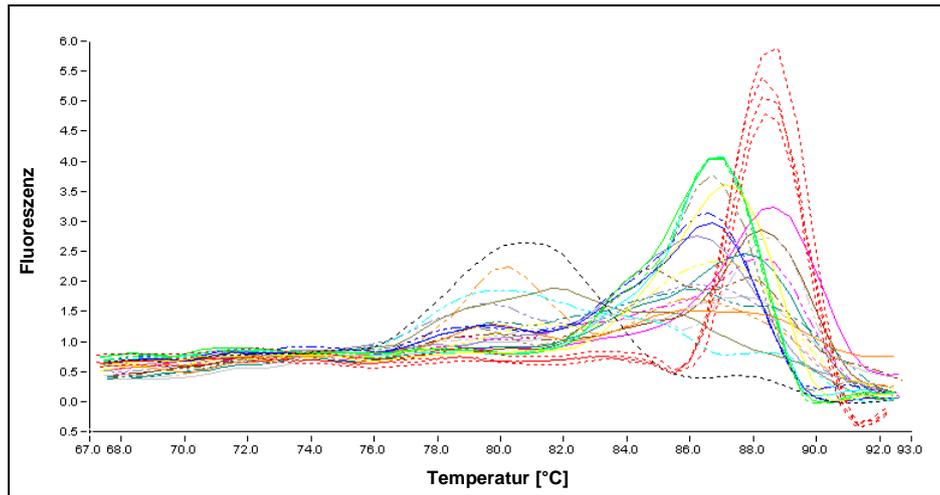


Abbildung 34: Schmelzkurvenanalyse von DNA-Amplifikaten von am Standort Wang für Vorversuche gewonnenen Feldproben; als Zielsequenz diente ein Abschnitt des mitochondrialen Cytochrom *b*

..... Positivkontrolle Negativkontrolle
 — geschütztes Areal - - - ungeschütztes Areal
 gelb: Probe 0; hellgrün: Probe 1; hellblau: Probe 2; blau: Probe 3, orange: Probe 4;
 olivgrün: Probe 5; lavendel: Probe 6; hellgrau: Probe 7; blaugrün: Probe 8;
 braun: Probe 9; pink: Probe 10

Die Schmelzkurvenanalyse zeigt, dass die Peaks der Schmelzkurven der Positivkontrollen bei 88,3 °C liegen. Nur die Amplifikate der Probe 9 des geschützten Areals sowie die der beiden Areale der Probe 10 schmelzen bei derselben Temperatur wie die Positivkontrolle auf. Alle anderen Peaks der Schmelzkurven der in Wang gewonnenen Feldproben weisen dagegen zur Positivkontrolle abweichende Schmelzpunkte auf. So befindet sich der Peak der Schmelzkurve der Probe 8 des geschützten Areals bei 87,8 °C, der Probe 0 beider Areale bei 87,2 °C, der Probe 1 und 3 beider Areale sowie der Probe 2 des geschützten Areals bei 86,8 °C. Die Schmelzkurve der Probe 9 des ungeschützten Areals besitzt zwei Peaks, wobei sich der erste bei ca. 84,8 °C, der zweite bei ca. 88,0 °C befindet. Die Negativkontrolle weist, ebenso wie die Probe 4 sowie die Probe 2 des ungeschützten Areals, einen Peak bei ca. 80 °C auf. Da diese sehr weit links liegen, lassen sie sich auf die Bildung von Primer-Dimeren zurückführen und sind somit von den anderen Peaks gut zu unterscheiden.

Durch die vorhergehende Sequenzanalyse wurden innerhalb der Klasse *Aves* Unterschiede in dem gewählten Sequenzabschnitt festgestellt. Aus diesem Grund binden Sonden nicht innerhalb dieses DNA-Abschnitts und es ist somit nicht möglich, die Spezifität durch den Einsatz von Sonden zu verbessern. Deshalb diente die nachfolgend durchgeführte Agarosegelelektrophorese der Überprüfung der Amplifikate (Abbildung 35).

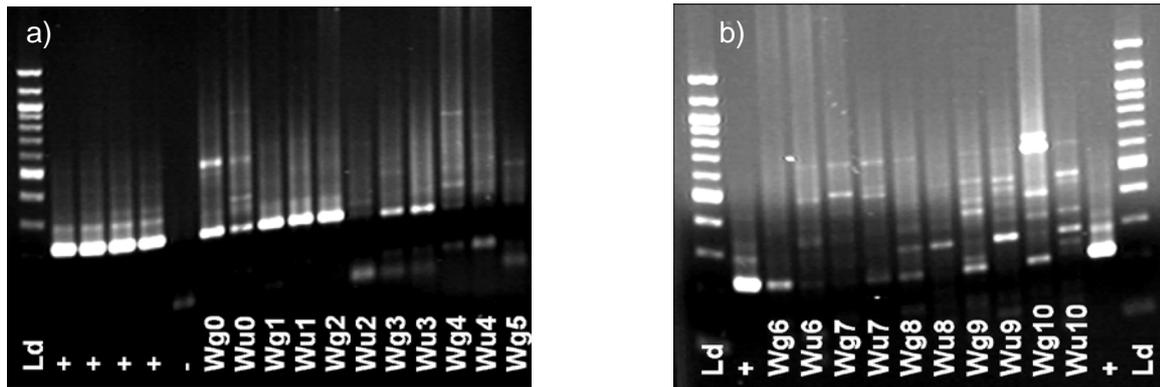


Abbildung 35: Gelelektrophoretische Trennung von DNA-Amplifikaten von am Standort Wang gewonnenen Feldproben; als Zielsequenz diente ein Abschnitt des mitochondrialen Cytochrom *b*

a) Proben 0-5

b) Proben 6-10

Ld: DNA Ladder; +: Positivkontrolle; -: Negativkontrolle; W: Wang; g: geschütztes Areal; u: ungeschütztes Areal; 0-10: Probennummern

Wie Abbildung 35 zeigt, sind bei vielen Feldproben nicht nur Banden auf einer Höhe von 227 bp, welches das Ziel-DNA-Fragment darstellt, zu erkennen, sondern auch viele unspezifische Produkte von unterschiedlichem Molekulargewicht. So sind beispielsweise in der Probe Wg9 6 Banden deutlich zu erkennen. Die Probe Wg10 hingegen weist eine dicke Bande auf einer Höhe von ca. 630 bp auf. Solche unspezifischen Produkte, die mit den gewählten Primern in den Feldproben entstanden sind, verhindern eine Quantifizierung mittels real-time PCR [DENMAN & MCSWEENEY, 2005; HARBERS & KAHL, 2012]. Des Weiteren führen diese unspezifischen Produkte durch den Fluoreszenzanstieg in der real-time PCR zu falsch-positiven Ergebnissen [SLOOTS, 2010]. Aus diesem Grund erfolgte die Untersuchung der Feldproben mittels Endpunkt-PCR und anschließender Agarosegelelektrophorese.

1.6 Endpunkt-PCR

Bei der Umstellung der real-time PCR auf eine Endpunkt-PCR war eine Anpassung der PCR-Bedingungen nötig. Hierbei wurden die Annealingtemperatur mit Temperaturen von 55 °C, 60 °C und 65 °C, die Anzahl der durchgeführten Zyklen mit 30 als auch 50 sowie die eingesetzte Menge an Template in die PCR-Reaktion mit 1 µl bzw. 5 µl variiert (siehe Tabelle 11 und Tabelle 12) und anschließend mittels Agarosegelelektrophorese ausgewertet. Dabei zeigte sich, dass eine Zieltemperatur von 65 °C, eine Zyklenzahl von 50 und eine Menge von 1 µl Template im Gegensatz zu 5 µl Template die besten Ergebnisse hinsichtlich der Bandendicke und –scharfe erzielten.

1.7 Entwicklung der kompetitiven internen Amplifikationskontrolle

Um falsch-negative Ergebnisse, welche durch PCR-inhibierende Matrixkomponenten, Fehlfunktion des Thermocyclers, fehlerhaften PCR-Mix oder geringe Aktivität der DNA-Polymerase hervorgerufen werden können, auszuschließen, wurde für den Nachweis des mitochondrialen Cytochrom *b* zusätzlich eine kompetitive IAC entwickelt. Die Größe des Amplifikats sowie die optimale Konzentration der einzusetzenden IAC wurden mittels Agarosegelelektrophorese überprüft bzw. ermittelt. Die Auswertung der Agarosegele zeigte, dass das in der Endpunkt-PCR amplifizierte DNA-Fragment eine Länge von 456 pb besaß und somit der erwarteten Größe entsprach. Des Weiteren erwies sich bei der Bewertung der dezimalen Verdünnungsreihe der pUC19-DNA mit den Verdünnungsstufen von 10^{-3} bis 10^{-12} die Verdünnungsstufe 10^{-9} als diejenige, bei der die Ziel-DNA ohne Beeinträchtigung durch das Vorhandensein der internen Amplifikationskontrolle vervielfältigt wurde (Abbildung 36). Da mit dem NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer eine Ausgangskonzentration der pUC19-DNA von 25,0 ng/µl ermittelt wurde und sich die Verdünnungsstufe 10^{-9} als optimal herausstellte, ergab sich eine endgültige DNA-Konzentration der in die Endpunkt-PCR einzusetzenden IAC von $2,5 \times 10^{-10}$ ng/µl.

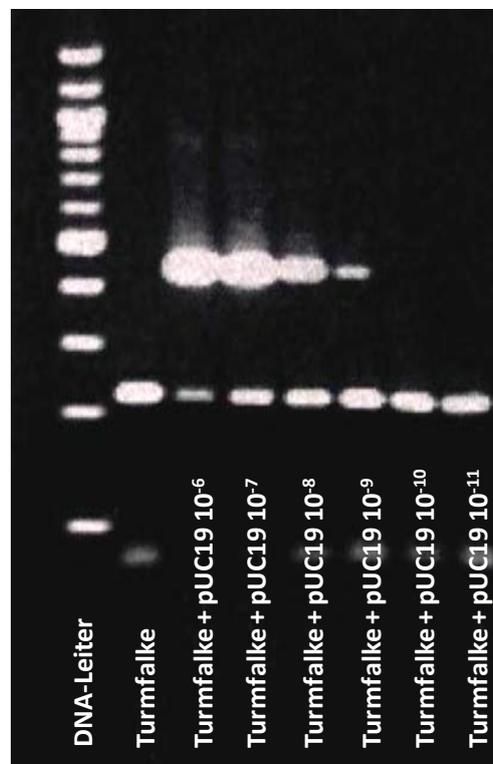


Abbildung 36: Gelelektrophoretische Trennung von DNA-Amplifikaten von Turmfalke sowie der IAC in den Verdünnungsstufen 10^{-6} bis 10^{-11} ; als Zielsequenz diente ein Abschnitt des mitochondrialen Cytochrom *b*

2 Versuche zum Nachweis von Influenza-A-RNA

Für die RNA-Isolierung aus den Bodenstaubproben wurden unterschiedliche Verfahren getestet. Diese waren der RNA PowerSoil™ Total RNA Isolation Kit von MoBio Laboratories Inc., der QIAamp® Viral RNA Mini Kit von Qiagen, der INSTANT Virus RNA Kit von AJ Innuscreen sowie ein Flüssig-Flüssig-Verfahren mit dem PeqGOLD TriFast™ von Peqlab. Um die Eignung der Kits für diese Probenmatrix zu überprüfen, wurden die Proben vor der Isolierung der RNA sowohl mit einem RNA-Extrakt des Influenzavirus H8N4 als auch mit der INTYPE IC-RNA, einer heterologen Kontroll-RNA, die zur Amplifikationskontrolle oder als Positivkontrolle für die RNA-Extraktion eingesetzt werden kann, artifiziell kontaminiert. Zusätzlich wurden jeweils virale RNA und IC-RNA in Abwesenheit der Staubprobe als Extraktionskontrolle mitgeführt. Die mit Hilfe der unterschiedlichen Verfahren entstandenen RNA-Extrakte wurden anschließend in die real-time RT-PCR eingesetzt und auf das Vorkommen der jeweiligen RNA-Abschnitte untersucht. Die Amplifikate der IC-RNA können mit einer Wellenlänge von 553 nm bis 580 nm gemessen werden, die Amplifikate der in cDNA umgeschriebenen viralen RNA mit einer Wellenlänge von 465 nm bis 510 nm. Es zeigte sich, dass mit der Flüssig-Flüssig-Extraktion mit peqGOLD TriFast™ die IC-RNA in keiner Probe (Abbildung 37), die in cDNA umgeschriebene virale RNA, lediglich in der Extraktionskontrolle ohne Bodenstaub amplifiziert werden konnte (Abbildung 38).

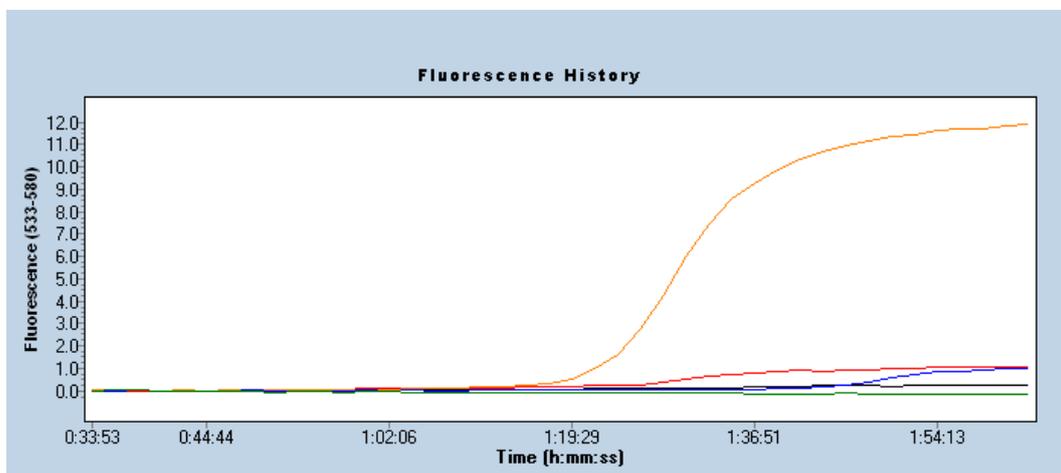


Abbildung 37: PCR-Amplifikationskurven der mit PeqGOLD TriFast™ isolierten RNA; die als Zielsequenz diente die IC-RNA (DYXL-Sonde)

orange: IC-RNA Amplifikationskontrolle; rot: RNA-Extrakt des Influenzavirus H8N4; schwarz: Negativkontrolle; blau: Extraktionskontrolle ohne Staub; grün: Extraktionskontrolle mit Staub

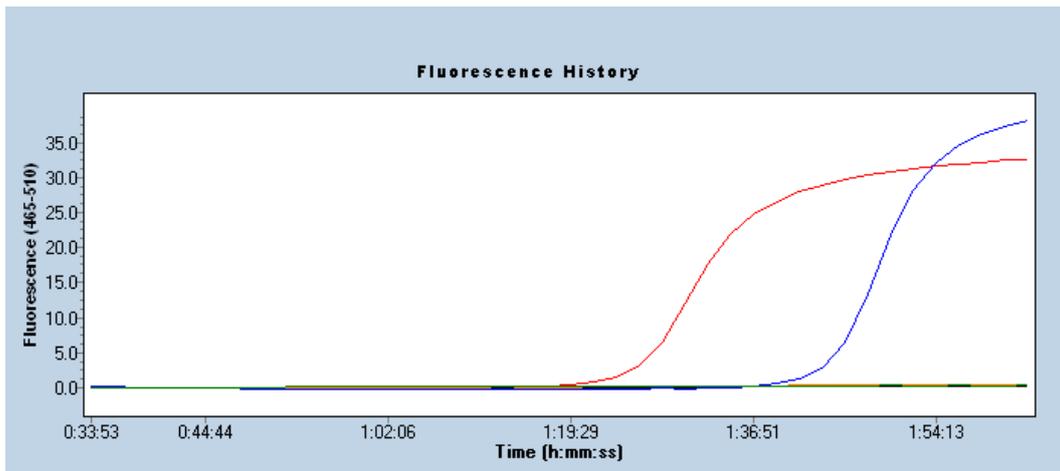


Abbildung 38: PCR-Amplifikationskurven der mit PeqGOLD TriFast™ isolierten RNA; als Zielsequenz diente die virale RNA (FAM-Sonde)

orange: IC-RNA Amplifikationskontrolle; rot: RNA-Extrakt des Influenzavirus H8N4; schwarz: Negativkontrolle; blau: Extraktionskontrolle ohne Staub; grün: Extraktionskontrolle mit Staub

Bei dem anschließend durchgeführten Extraktionsversuch mit Hilfe des QIAamp® Viral RNA Mini Kits von Qiagen entstand bei der real-time RT-PCR bei beiden Extraktionskontrollen mit viraler RNA und IC-RNA eine Amplifikationskurve. Die gezielt kontaminierten Staubproben blieben jedoch negativ (Abbildung 39 und Abbildung 40).

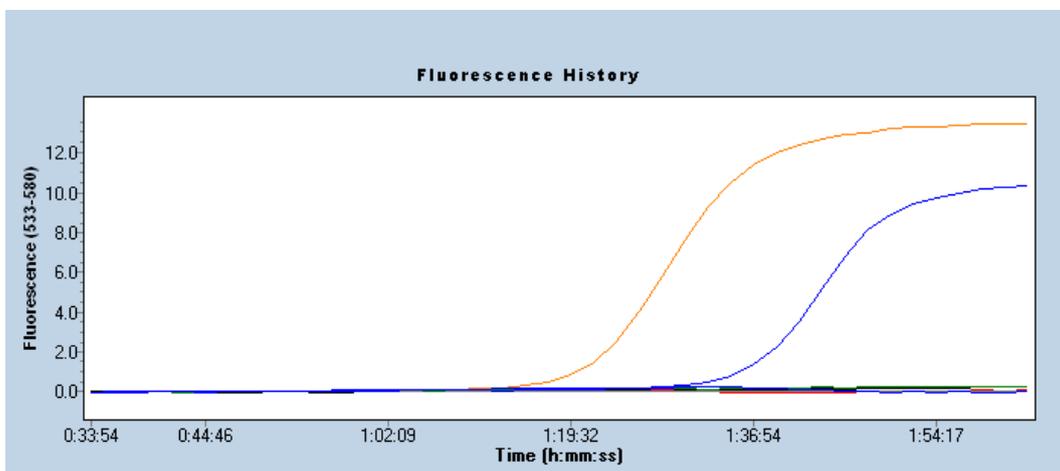


Abbildung 39: PCR-Amplifikationskurven der mit dem QIAamp® Viral RNA Mini Kit isolierten RNA; die als Zielsequenz diente die IC-RNA (DYXL-Sonde)

orange: IC-RNA Amplifikationskontrolle; rot: RNA-Extrakt des Influenzavirus H8N4; schwarz: Negativkontrolle; blau: Extraktionskontrolle ohne Staub; grün: Extraktionskontrolle mit Staub

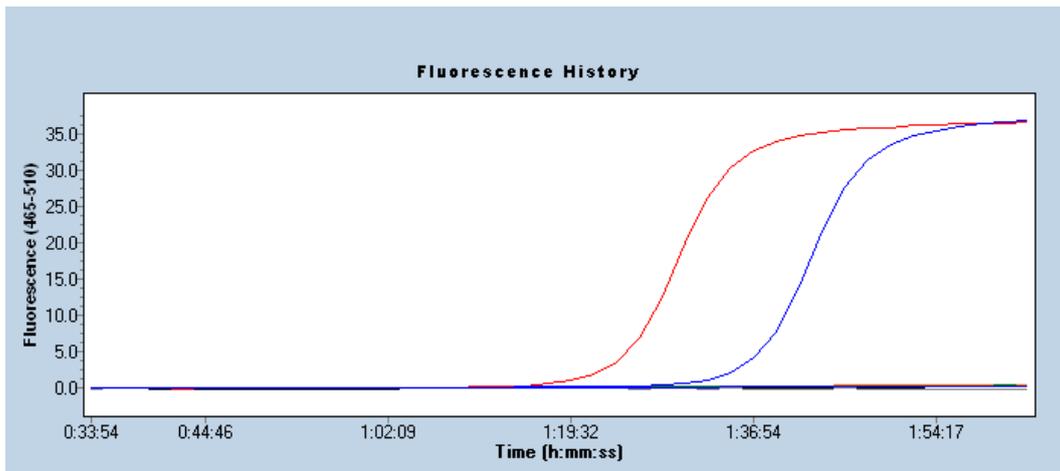


Abbildung 40: PCR-Amplifikationskurven der mit dem QIAamp® Viral RNA Mini Kit isolierten RNA; als Zielsequenz diente die virale RNA (FAM-Sonde)

orange: IC-RNA Amplifikationskontrolle; rot: RNA-Extrakt des Influenzavirus H8N4; schwarz: Negativkontrolle; blau: Extraktionskontrolle ohne Staub; grün: Extraktionskontrolle mit Staub

Weitere Versuche zur Isolierung der RNA wurden mit dem RNA PowerSoil™ Total RNA Isolation Kit von MoBio Laboratories Inc. und mit dem INSTANT Virus RNA Kit von AJ Innuscreen durchgeführt. Hierbei gelang mittels der real-time RT-PCR der Nachweis der viralen RNA bei den gezielt kontaminierten Bodenstaubproben (Abbildung 41). Allerdings ist das erreichte Fluoreszenzplateau niedrig. Die IC-RNA konnte in der real-time RT-PCR lediglich bei den Extraktionskontrollen ohne Bodenstaub amplifiziert werden (Abbildung 42).

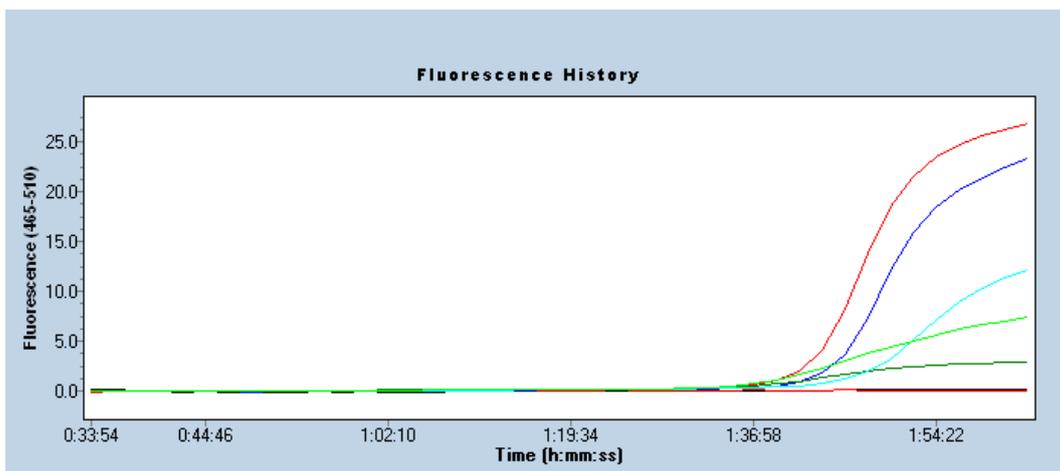


Abbildung 41: PCR-Amplifikationskurven der mit dem RNA PowerSoil™ Total RNA Isolation Kit und dem INSTANT Virus RNA Kit isolierten RNA; als Zielsequenz diente die virale RNA (FAM-Sonde)

orange: IC-RNA Amplifikationskontrolle; rot: RNA-Extrakt des Influenzavirus H8N4; schwarz: Negativkontrolle; blau: Extraktionskontrolle ohne Staub (PowerSoil™ RNA Isolation Kit); grün: Extraktionskontrolle mit Staub (PowerSoil™ RNA Isolation Kit); hellblau: Extraktionskontrolle ohne Staub (INSTANT Virus RNA Kit); hellgrün: Extraktionskontrolle mit Staub (INSTANT Virus RNA Kit)

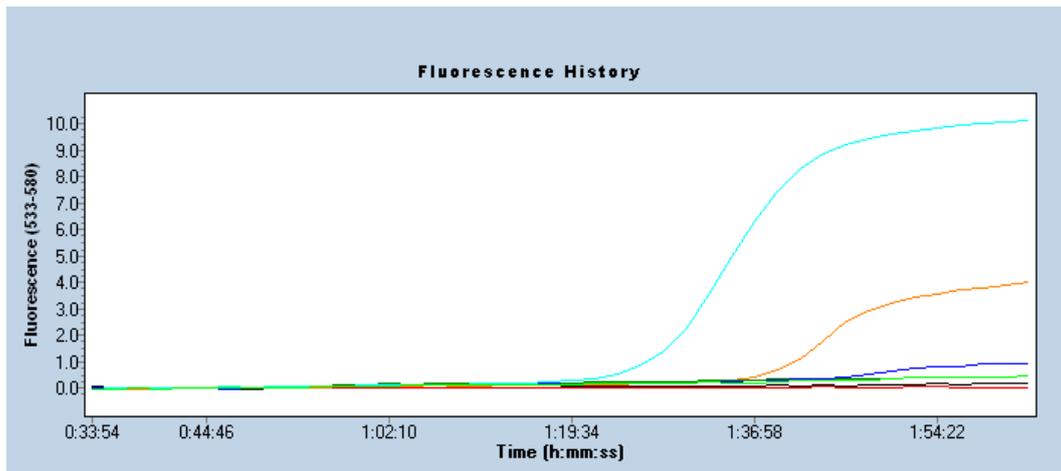


Abbildung 42: PCR-Amplifikationskurven der mit dem RNA PowerSoil™ Total RNA Isolation Kit und dem INSTANT Virus RNA Kit isolierten RNA; die als Zielsequenz diente die IC-RNA (DYXL-Sonde)

orange: IC-RNA Amplifikationskontrolle; **rot:** RNA-Extrakt des Influenzavirus H8N4;
schwarz: Negativkontrolle; **blau:** Extraktionskontrolle ohne Staub (PowerSoil™ RNA Isolation Kit);
grün: Extraktionskontrolle mit Staub (PowerSoil™ RNA Isolation Kit);
hellblau: Extraktionskontrolle ohne Staub (INSTANT Virus RNA Kit);
hellgrün: Extraktionskontrolle mit Staub (INSTANT Virus RNA Kit)

Die real-time RT-PCR mit einer negativen RNA-Isolierungskontrolle gilt allerdings nur bei einer gleichzeitig negativen Influenza-A-Virus-spezifischen Amplifizierung als nicht auswertbar. Bei den darauffolgenden Wiederholungen dieses Versuches konnten allerdings keine zuverlässigen Ergebnisse erzielt werden, da bei einigen gezielt kontaminierten Staubproben keine virale RNA detektierbar war. Da also dieses Verfahren mit einer zu großen Unsicherheit behaftet ist, wurde es zur Untersuchung der Feldproben nicht eingesetzt.

3 Vergleich der netzgeschützten und ungeschützten Areale

Die von der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft entwickelte Testvoliere diente dazu, erste Untersuchungen zur Überprüfung ihrer Abwehrfunktion gegenüber Wildtieren durchzuführen. Bei den visuellen Kontrollen, die mehrmals wöchentlich durch in Augenscheinnahme des Barriersystems getätigt wurden, konnten keinerlei Anzeichen für Eindringversuche von jeglichen Wildtieren in das geschützte Gehege erkannt werden. Allerdings nutzten Vögel die zum Aufbau sowie zur Stabilisierung des Barriersystems nötigen Rundhölzer als erhöhte Sitzgelegenheit. Infolgedessen wurden auf die nachfolgend aufgebauten Volieren kegelförmige Schutzhauben aus Aluminium auf die Rundhölzer montiert, welche das Absetzen der Vögel und den daraus resultierenden erhöhten Koteintrag verhinderte. Die Beurteilung der Barrierefunktion der baugleichen, 60 m x 60 m große Großvoliere erfolgte ebenfalls anhand direkter regelmäßiger visueller Begutachtungen der Voliere selbst sowie deren Umgebung. Hierbei zeigten sich deutliche Spuren von Wildtieren in Form von Fährten und Faeces in unmittelbarer Nähe des geschützten Geheges. Innerhalb der Voliere fehlten jegliche Zeichen von Wildtieren sowie Wildvögeln.

Zur Beurteilung des Infektionsschutzes durch das speziell entwickelte Barriersystem wurde der aviäre Eintrag sowohl in den netzgeschützten als auch in den ungeschützten Arealen mit den Hühnerattrappen ermittelt. Der parallel durchgeführte Versuch mit Sentinelherden diente neben bakteriologischen und virologischen Untersuchungen der Erfassung von Legeleistung und Verlusten beider Gehegeformen, um ebenfalls Rückschlüsse auf die Tiergesundheit bzw. den Schutz vor Raubtieren sowie Greifvögeln ziehen zu können.

3.1 Ermittlung des aviären Eintrags

Die Ermittlung des aviären Eintrags erfolgte sowohl mittels einer molekularbiologischen Methode, der Endpunkt-PCR, als auch durch eine optische Bewertung der Areale bezüglich makroskopisch sichtbarer aviärer Bestandteile wie Vogelkot und Federn, die auf den Versuchsfeldern vorzufinden waren. Bei der Endpunkt-PCR stellte ein für Vögel spezifischer Sequenzabschnitt des mitochondrialen Cytochrom *b* sowie eine für diesen Zweck entwickelte kompetitive IAC die Ziel-DNA dar. Hierzu wurden die gewonnenen Proben zuerst lyophilisiert, zerkleinert sowie homogenisiert. Anschließend wurden, um die Stichprobenanzahl zu erhöhen, 2 Aliquots je Probe, im Folgenden als „I“- und „II“-Aliquots bezeichnet, entnommen, die DNA isoliert und mittels Endpunkt-PCR untersucht. Der Doppelansatz diente hier nicht der Bestätigung eines Ergebnisses durch eine zweite

Untersuchung sondern der umfassenderen Untersuchung insbesondere bei einem großen Probenvolumen. Zusätzlich wurde dadurch eine verbesserte Qualität der statistischen Aussage gewährleistet.

3.1.1 Areal auf dem Gelände von E.ON am Ismaninger Speichersee

Das Gewicht der Proben variierte sehr stark. So lag es bei den Proben des geschützten Areals zwischen 5,03 g und 900,00 g mit einem Mittelwert von 116,21 g, einer Standardabweichung von 150,11 und einer Varianz von 22531,74. Die Messung des Probengewichts nach dem Gefriertrocknen ergab Werte zwischen 4,22 g und 306,38 g, wobei hier der Mittelwert bei 73,84 g, die Standardabweichung bei 67,35 und die Varianz bei 4536,30 lagen. Im ungeschützten Areal erzielte die leichteste Probe im Originalzustand ein Gewicht von 0,99 g, die schwerste 850,00 g. Das durchschnittliche Probengewicht lag bei 128,87 g mit einer Standardabweichung von 151,09 und einer Varianz von 22826,85. Nach dem Lyophilisieren waren der Mittelwert 90,74 g, die Standardabweichung 90,65 und die Varianz 8216,83. Auch verschob sich das Gewicht der leichtesten sowie der schwersten Probe auf 0,91 g bzw. 584,40 g.

Eine erste Beurteilung der Ergebnisse der Endpunkt-PCR zeigte, dass von den insgesamt 184 untersuchten Proben 1 Probe der I-Aliquots und 3 Proben der II-Aliquots des geschützten Areals sowie 2 Proben der I-Aliquots und 2 Proben der II-Aliquots des ungeschützten Areals nicht auswertbar waren, da jeweils eine Amplifikation der IAC ausblieb. Die übrigen 176 Proben zeigten eine deutliche Bande für die IAC. Ebenso wurde ein positiver PCR-Verlauf hinsichtlich des vogelspezifischen Gens bei 5 I- und 5 II-Aliquots des geschützten Areals, sowie bei 5 I- und 7 II-Aliquots des ungeschützten Areals nachgewiesen. Dabei handelte es sich sowohl im geschützten als auch im ungeschützten Areal jeweils um I- und II-Aliquots verschiedenen Datums.

Die zusätzliche optische Beurteilung des aviären Eintrags bei jeder Probennahme erbrachte für die geschützte Fläche 10 und für die ungeschützte Fläche 12 eindeutig positive Resultate. Das bedeutet, dass makroskopisch ein aviärer Eintrag in Form von Vogelkot sowie Vogelfedern sichtbar war. Der bereits so optisch festgestellte aviäre Eintrag wurde bei 3 I- und II-Aliquots des geschützten sowie gleichfalls bei 3 I- und II-Aliquots des ungeschützten Areals molekularbiologisch bestätigt. Am 02.09.2009 wurde im geschützten Areal eine Kohlmeise entdeckt und aus der Voliere befreit. Der Vogel konnte vermutlich durch das oben aufliegende Netz eindringen, aber nicht von alleine wieder durch dieses hinausfliegen. Tabelle 26 zeigt eine detaillierte Übersicht der auf dem Areal auf dem Gelände von E.ON gewonnenen Proben.

Die statistische Auswertung mit Hilfe des χ^2 -Unabhängigkeitstests ergab, für I-Aliquots, II-Aliquots und den makroskopisch sichtbaren aviären Eintrag zusammen, einen χ^2 -Wert von 0,69, welcher deutlich unter dem kritischen Entscheidungswert von 3,841 liegt. So besteht zwischen den Merkmalen positiv bzw. negativ bezüglich des aviären Eintrags und geschütztes bzw. ungeschütztes Areal kein signifikanter Unterschied.

Tabelle 26: Ergebnisse der Beprobung des Versuchsareals auf dem Gelände von E.ON

E.ON		geschütztes Areal					ungeschütztes Areal				
Probe	Datum der Probenahme	Probengewicht [g]		Auswertung PCR		makroskopisch sichtbarer aviärer Eintrag	Probengewicht [g]		Auswertung PCR		makroskopisch sichtbarer aviärer Eintrag
		Rohmaterial	lyophilisiert	Aliquot I	Aliquot II		Rohmaterial	lyophilisiert	Aliquot I	Aliquot II	
0	11.12.2008	6,20	6,10	/	-		0,99	0,91	-	+	
1	23.12.2008	5,03	4,81	-	-		19,77	18,82	-	-	
2	12.03.2009	16,13	13,36	-	-		23,45	21,08	-	-	
3	19.03.2009	18,95	16,02	-	-		23,47	19,99	-	-	
4	26.03.2009	900,00	4,22	-	-		850,00	3,74	-	-	
5	08.04.2009	30,09	27,19	-	-		28,58	26,38	/	-	
6	16.04.2009	46,62	45,78	-	-		44,38	43,49	-	-	
7	08.05.2009	357,83	306,38	-	-		646,85	584,40	+	-	
8	13.05.2009	197,68	141,94	-	-		215,29	174,02	-	-	
9	20.05.2009	151,54	130,43	+	-		170,18	135,74	-	-	
10	28.05.2009	198,92	131,20	-	-		187,65	149,67	-	-	
11	09.06.2009	129,54	102,68	-	-		129,33	105,41	-	-	
12	16.06.2009	82,73	53,56	-	-		79,46	50,71	-	-	
13	29.06.2009	189,60	151,80	-	-		152,56	133,54	-	-	
14	07.07.2009	145,00	123,13	+	-		89,07	78,05	-	-	
15	14.07.2009	86,08	75,69	-	-	3 F	121,03	107,18	-	-	
16	20.07.2009	49,20	43,20	-	-		70,22	62,10	-	+	
17	27.07.2009	50,92	43,84	-	/		89,07	78,05	-	-	
18	06.08.2009	39,08	34,77	-	-		56,41	50,18	-	-	
19	12.08.2009	27,02	22,77	-	-		57,89	51,89	-	+	
20	19.08.2009	147,09	130,69	-	-	4 F	158,68	144,80	-	-	3 F
21	25.08.2009	60,58	52,43	+	-		114,35	100,00	-	+	
22	02.09.2009	56,34	48,80	-	+	1 F / Vogel	55,92	49,19	-	-	2 F
23	08.09.2009	52,89	46,70	-	-		139,80	125,80	+	-	
24	22.09.2009	43,17	35,11	-	+	2 F	122,00	106,80	+	/	4 F
25	30.09.2009	65,00	58,42	-	/		88,10	76,00	+	/	3 F
26	19.10.2009	98,13	54,14	-	-		93,15	57,82	-	-	
27	27.10.2009	52,14	40,03	-	-		61,20	51,27	-	-	
28	04.11.2009	153,37	113,97	-	-		209,02	161,36	-	+	
29	10.11.2009	162,64	109,04	-	/		176,98	129,44	-	+	
30	17.11.2009	95,69	70,91	-	+		108,10	84,25	-	+	
31	25.11.2009	78,80	64,05	-	-		94,50	77,14	-	-	
32	02.12.2009	55,56	25,55	-	-		35,37	18,09	-	-	
33	09.12.2009	15,30	10,16	-	-		22,74	17,89	-	-	
34	23.03.2010	90,38	76,04	-	-		111,03	99,43	-	-	
35	30.03.2010	42,71	37,80	-	-	3 F	43,81	40,03	-	-	
36	06.04.2010	27,12	22,50	-	-		34,10	29,20	-	-	1 F
37	15.04.2010	17,06	13,12	+	-	2 F; 1 K	29,48	25,07	+	-	1 F
38	21.04.2010	24,70	21,54	-	-	3 K	37,20	34,28	-	-	2 F; 4 K
39	29.04.2010	25,10	22,32	-	-	2 F; 4 K	34,32	30,82	/	-	5 K
40	12.05.2010	451,04	281,03	-	-	1 F; 3 K	300,98	200,92	-	-	2 K
41	25.05.2010	248,76	214,68	-	-	2 F	202,01	176,84	-	-	1 F
42	09.06.2010	260,97	142,73	+	-		231,88	137,47	-	-	
43	18.06.2010	145,69	95,71	-	+		162,73	116,09	-	-	
44	24.06.2010	60,93	54,77	-	+		68,77	62,27	-	-	2 K
45	29.06.2010	86,30	75,62	-	-		136,02	126,40	-	-	1 F
Mittelwert		116,21	73,84				128,87	90,74			
Standardabweichung		150,11	67,35				151,09	90,65			
Varianz		22531,74	4536,30				22826,85	8216,83			

+++ : stark positiv ■■■ ++ : positiv ■ + : schwach positiv □ - : negativ / : negative IAC (nicht auswertbar)
 F: Feder K: Vogelkot

3.1.2 Areal auf dem Gelände der Stadtwerke München in Wang

Das Probengewicht schwankte im geschützten Areal zwischen 3,81 g und 229,70 g mit einem durchschnittlichen Wert von 22,80 g, einer Standardabweichung von 43,92 und einer Varianz von 1929,33, im ungeschützten zwischen 5,34 g und 127,34 g mit einem Durchschnittsgewicht von 29,23 g, einer Standardabweichung von 31,85 und einer Varianz von 1014,29. Nach dem Lyophilisieren betrug das durchschnittliche Gewicht der Proben des geschützten Areals 15,50 g, wobei Werte von 2,75 g bis 109,39 g gemessen wurden. Die Standardabweichung lag bei 21,20 und die Varianz bei 449,45. Die Proben des ungeschützten Areals wogen zwischen 4,39 g und 78,51 g mit einem Mittelwert von 21,64 g, einer Standardabweichung von 20,95 und einer Varianz von 438,86.

Sechs Proben, 2 I-Aliquots und 2 II-Aliquots des geschützten Areals sowie ein I- und ein II-Aliquot des ungeschützten Areals, blieben sowohl bezüglich der gesuchten Gensequenz als auch bezüglich der IAC negativ und wurden somit nicht in der Auswertung berücksichtigt. Bei Probe 19 des geschützten Areals blieb bei den I- und den II-Aliquots eine Amplifizierung der IAC aus. Bei der weiteren Beurteilung der Endpunkt-PCR-Ergebnisse zeigten sich lediglich ein Aliquot I sowie ein Aliquot II des geschützten Areals positiv. Von den Aliquots des ungeschützten Areals waren insgesamt 5 als positiv zu werten, wobei es sich dabei um 3 I-Aliquots und 2 II-Aliquots handelte.

Zusätzlich wurde bei 6 Beprobungen im geschützten Areal sowie an 7 Tagen der Probennahme im ungeschützten Areal optisch ein aviärer Eintrag festgestellt. Der Eintrag im geschützten Areal bestand hauptsächlich aus Federn, wohingegen im ungeschützten Areal überwiegend Vogelkot vorzufinden war. Von den Proben 14 und 21 des ungeschützten Areals, die bereits makroskopisch positiv auf aviären Eintrag bewertet werden konnten, erwies sich in der Endpunkt-PCR jeweils das Aliquot I ebenfalls als positiv. Eine detaillierte Übersicht der Proben sowie die Auswertungen der Endpunkt-PCR werden in Tabelle 27 aufgezeigt.

Die statistische Auswertung mit Hilfe des χ^2 -Unabhängigkeitstests ergab, für I-Aliquots, II-Aliquots und den makroskopisch sichtbaren aviären Eintrag zusammen, einen χ^2 -Wert von 0,80. Somit weisen die geschützten und ungeschützten Areale bezüglich des aviären Eintrags keinen signifikanten Unterschied auf.

Tabelle 27: Ergebnisse der Beprobung des Versuchsareals auf dem Gelände der Stadtwerke München

Stadtwerke München		geschütztes Areal					ungeschütztes Areal				
Probe	Datum der Probenahme	Probengewicht [g]		Auswertung PCR		makroskopisch sichtbarer aviärer Eintrag	Probengewicht [g]		Auswertung PCR		makroskopisch sichtbarer aviärer Eintrag
		Rohmaterial	lyophilisiert	Aliquot I	Aliquot II		Rohmaterial	lyophilisiert	Aliquot I	Aliquot II	
0	30.07.2009	5,52	4,86	-	-		7,99	7,09	-	-	
1	13.08.2009	4,58	4,13	-	-		10,76	9,33	-	-	
2	20.08.2009	4,50	3,47	-	-		6,34	4,98	-	-	
3	26.08.2009	3,81	2,75	-	-		6,43	4,46	+	-	
4	02.09.2009	5,61	4,35	-	-	1 F	6,40	5,90	-	-	
5	10.09.2009	5,74	5,08	+	/		5,96	5,11	-	-	
6	24.09.2009	9,94	9,10	-	-		21,42	18,96	-	-	
7	01.10.2009	12,52	11,00	/	-		10,41	9,70	-	-	
8	07.10.2009	7,91	6,90	-	-		5,34	5,20	-	-	1 F
9	20.10.2009	11,51	7,66	-	-		15,84	10,81	-	-	
10	29.10.2009	8,56	5,76	-	-		6,16	4,39	-	-	
11	13.11.2009	229,70	109,39	-	-		92,20	47,45	-	-	
12	27.11.2009	20,55	16,10	-	-		47,25	35,26	-	+	
13	03.12.2009	13,00	7,10	-	-		73,91	40,28	-	/	
14	25.03.2010	22,71	20,88	-	-	1 F	58,48	49,44	+	-	1 F
15	31.03.2010	10,43	10,12	-	-		19,12	16,89	-	-	1 F; 2 K
16	08.04.2010	9,20	8,50	-	-		15,86	14,30	-	-	1 K
17	16.04.2010	11,20	8,43	-	-		24,84	17,82	-	-	
18	22.04.2010	30,40	27,15	-	-	1 F	28,30	25,59	-	-	
19	30.04.2010	42,99	38,30	/	/	2 K	81,50	75,51	/	-	1 F; 2 K
20	21.05.2010	57,04	34,84	-	-		127,34	78,51	-	-	3 K
21	04.06.2010	14,11	12,07	-	-	1 F; 2 K	28,99	25,30	+	-	1 K
22	10.06.2010	13,94	12,38	-	-		23,25	21,24	-	-	
23	17.06.2010	13,27	10,33	-	-	5 F	13,92	9,52	-	-	
24	24.06.2010	13,55	12,72	-	++		14,39	13,36	-	-	
25	01.07.2010	10,63	9,73	-	-		7,55	6,28	-	+	
Mittelwert		22,80	15,50				29,23	21,64			
Standardabweichung		43,92	21,20				31,85	20,95			
Varianz		1929,33	449,45				1014,29	438,86			

+++ : stark positiv ■■■ ++ : positiv ■■ + : schwach positiv ■ - : negativ / : negative IAC (nicht auswertbar)
 F: Feder K: Vogelkot

3.1.3 Areal bei der Kläranlage in Wang

Die Proben des geschützten Areals hatten im Originalzustand ein Durchschnittsgewicht von 8,42 g, wobei das niedrigste Gewicht 1,69 g und das höchste 57,97 g betrug. Hier lagen die Standardabweichung bei 9,77 und die Varianz bei 95,41. Gefriergetrocknet wog die leichteste Probe 0,98 g und die schwerste 52,28 g. Der Mittelwert des Gewichts aller Proben lag bei 6,94 g mit einer Standardabweichung von 8,76 und einer Varianz von 76,68. Im ungeschützten Areal wurden Proben zwischen 2,61 g und 50,85 g gewonnen, wodurch sich ein Durchschnittsgewicht von 11,10 g, einer Standardabweichung von 10,67 und einer Varianz von 113,94 errechnete. Nach dem Lyophilisieren maßen die Proben durchschnittlich 8,95 g, mit einer Standardabweichung von 7,33 und einer Varianz von 53,69, und lagen dabei zwischen 2,00 g und 40,20 g.

Insgesamt waren von den 148 auf das mitochondriale Cytochrom *b* untersuchten Proben 144 auswertbar. Vier Aliquots, 2 II-Aliquots des geschützten Areals sowie je ein Aliquot I und ein

Aliquot II des ungeschützten Areals, flossen nicht in die Beurteilung ein. Bei diesen Proben unterblieb die Amplifikation der IAC. Das geschützte Areal wies 12 positive I-Aliquots, von denen sich eine stark positiv, 2 positiv und 9 schwach positiv abzeichneten, auf. Zusätzlich waren 5 II-Aliquots als positiv zu bewerten. Bei Probe 11 erwies sich sowohl Aliquot I als auch Aliquot II als positiv.

Von Beginn der Probennahme Ende Mai 2009 bis hin zum März 2010 war optisch kein aviärer Eintrag zu erkennen. Erst am 25.03.2010 waren auch Spuren von Vögeln in dem geschützten Areal deutlich sichtbar. Ab diesem Zeitpunkt konnte an 6 Tagen der Probennahme ein aviärer Eintrag, der mehrheitlich aus Vogelkot bestand, mit bloßem Auge bestätigt werden. Die Proben 26 und 30, bei denen 1 bzw. 2 Vogelkotflecken auf dem Kunstrasen gefunden wurden, erzielten ebenfalls in der Endpunkt-PCR ein positives Ergebnis. Die Auswertung der Endpunkt-PCR des ungeschützten Areals ergab bei den I-Aliquots 11, bei den II-Aliquots lediglich ein positives Ergebnis. Optisch zeigte sich an 14 Tagen ein aviärer Eintrag, der auch hier größtenteils aus Vogelkot und weniger aus Federn bestand. Die Proben 28, 30, 31 und 32 kennzeichneten neben dem positiven optischen aviären Eintrag ein ebenso positives Aliquot I. Eine Auflistung aller Proben, die auf dem Areal bei der Kläranlage in Wang gewonnen wurden, und deren Auswertung befindet sich in nachfolgender Tabelle (Tabelle 28).

Für I-Aliquots, II-Aliquots und den makroskopisch sichtbaren aviären Eintrag zusammen, ergab die statistische Auswertung mit Hilfe des χ^2 -Unabhängigkeitstests einen χ^2 -Wert von 0,24. So konnte insgesamt zwischen den geschützten und ungeschützten Arealen bezüglich des Eintrags organischen Materials aviären Ursprungs kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

Tabelle 28: Ergebnisse der Beprobung des Versuchsareals bei der Kläranlage in Wang

Kläranlage/Wang		geschütztes Areal					ungeschütztes Areal				
Probe	Datum der Probennahme	Probengewicht [g]		Auswertung PCR		makroskopisch sichtbarer aviärer Eintrag	Probengewicht [g]		Auswertung PCR		makroskopisch sichtbarer aviärer Eintrag
		Rohmaterial	lyophilisiert	Aliquot I	Aliquot II		Rohmaterial	lyophilisiert	Aliquot I	Aliquot II	
0	27.05.2009	57,97	52,28	+	-		50,12	40,20	+	-	
1	08.06.2009	14,44	12,77	-	-		11,74	10,10	-	+	
2	17.06.2009	12,16	10,48	-	-		15,82	14,06	++	-	
3	27.06.2009	4,57	3,97	-	-		4,92	4,16	+	-	
4	01.07.2009	8,93	7,67	-	+		7,50	6,67	-	-	
5	09.07.2009	4,87	3,75	-	-		4,25	3,82	-	-	
6	14.07.2009	2,90	2,80	+	-		4,80	4,23	+	-	
7	20.07.2009	2,62	2,35	-	-		4,36	3,66	-	-	
8	27.07.2009	2,78	2,03	-	+		3,89	3,23	-	-	
9	06.08.2009	2,39	2,24	-	-		4,77	4,03	+	-	
10	13.08.2009	2,40	2,38	-	/		6,09	5,71	-	-	
11	20.08.2009	4,79	3,90	+	+		6,23	5,16	-	-	
12	26.08.2009	5,20	4,34	-	++		3,16	2,60	-	/	
13	02.09.2009	6,16	5,00	-	+		6,71	6,30	-	-	1 F
14	10.09.2009	9,85	8,87	-	-		6,61	5,38	-	-	
15	24.09.2009	6,00	5,40	-	-		10,11	9,41	-	-	1 F
16	01.10.2009	6,61	5,70	+	/		9,96	8,50	+	-	
17	07.10.2009	6,94	5,20	-	-		2,91	2,00	-	-	
18	20.10.2009	2,24	2,15	-	-		4,21	3,79	-	-	
19	29.10.2009	1,74	1,30	-	-		2,61	2,46	-	-	
20	06.11.2009	12,95	5,34	+	-		50,85	26,34	-	-	
21	13.11.2009	6,08	4,27	+++	-		19,46	16,01	-	-	
22	20.11.2009	5,30	3,45	++	-		23,29	17,09	++	-	
23	27.11.2009	20,60	15,58	++	-		14,66	12,08	-	-	
24	03.12.2009	12,50	6,70	-	-		7,90	5,90	/	-	
25	25.03.2010	21,98	19,97	-	-	1 F; 1 K	15,63	15,00	-	-	2 F; 1 K
26	31.03.2010	12,89	11,79	+	-	1 K	9,68	8,87	-	-	1 F; 1 K
27	08.04.2010	12,76	11,20	-	-		10,30	9,50	-	-	2 K
28	16.04.2010	6,52	5,10	-	-	1 F; 1 K	11,81	10,17	+	-	1 K
29	22.04.2010	6,70	5,82	+	-		8,90	7,62	-	-	1 F; 2 K
30	30.04.2010	8,14	7,61	+	-	2 K	8,83	8,11	+	-	2 F; 6 K
31	21.05.2010	2,23	1,30	-	-	10 K	11,74	7,9	+	-	12 K
32	04.06.2010	2,10	0,98	-	-		7,92	6,86	+	-	2 K
33	10.06.2010	5,96	5,15	+	-		14,95	13,98	-	-	1 F
34	17.06.2010	1,69	1,06	-	-		5,11	2,94	-	-	1 F
35	24.06.2010	5,50	4,98	-	-	3 K	12,70	11,73	-	-	2 K
36	01.07.2010	2,10	1,82	-	-		6,38	5,54	-	-	3 K
Mittelwert		8,42	6,94				11,10	8,95			
Standardabweichung		9,77	8,76				10,67	7,33			
Varianz		95,41	76,68				113,94	53,69			

+++ : stark positiv ++ : positiv + : schwach positiv - : negativ / : negative IAC (nicht auswertbar)
 F: Feder K: Vogelkot

3.1.4 Areal auf dem Versuchsgut Grünschaige

Das Gewicht der Proben lag beim geschützten Areal zwischen 0,75 g und 80,80 g, wobei der Durchschnitt 16,57 g, die Standardabweichung 19,10 und die Varianz 364,82 betragen, beim ungeschützten zwischen 0,79 g und 64,21 g mit einem Durchschnitt von 17,47 g, einer Standardabweichung von 19,71 und einer Varianz von 388,44. Durch das Lyophilisieren verringerte sich das Gewicht aller Proben, wobei das geringste Gewicht des geschützten

Areals schließlich 0,60 g und das höchste 57,75 g betrug. Nach dem Wasserentzug zeigten die Proben des ungeschützten Areals Gewichte zwischen 0,64 g und 49,40 g. Die durchschnittliche Trockenmasse der Proben des geschützten und ungeschützten Areals ist mit 13,65 g und 13,90 g nahezu identisch. Ähnlich verhält es sich mit der Standardabweichung mit 15,16 und 15,19 sowie der Varianz mit 229,69 und 230,81.

Von den insgesamt 52 Proben, deren DNA im Doppelansatz isoliert und mittels Endpunkt-PCR untersucht wurden, waren 2 Aliquots, ein Aliquot I des geschützten Areals sowie ein Aliquot II des ungeschützten Areals, aufgrund einer negativen IAC nicht auswertbar. Die weitere Beurteilung der Ergebnisse zeigte 5 positive I-Aliquots sowie 2 positive II-Aliquots des geschützten Areals, wobei die positiven II-Aliquots nicht mit dem Datum der Probennahme der positiven I-Aliquots übereinstimmten. Sechs I-Aliquots des ungeschützten Areals waren als positiv zu werten, wohingegen die II-Aliquots ausnahmslos negativ blieben.

Die zusätzliche optische Bewertung von aviärem Eintrag in die Areale zeigte, dass an 8 Tagen der Probennahme im geschützten Areal und an 9 Tagen im ungeschützten Areal Federn und/oder Kot vorzufinden waren, wobei es sich überwiegend um kleine Federn bzw. Daunen handelte. Dabei zeigten die Proben 6 und 7 des geschützten Areals, welche in der Endpunkt-PCR ein positives Aliquot I aufwiesen, ebenfalls einen positiven optischen aviären Eintrag. Beim ungeschützten Areal waren die Proben 4, 5, 7 und 19 sowohl in der Endpunkt-PCR als auch bezüglich des optischen aviären Eintrags als positiv zu beurteilen. In den Monaten von Oktober bis März wurde optisch kein aviärer Eintrag festgestellt. Auch im Schnee, der im Januar und Februar durchgängig lag, zeigten sich keine Spuren von Vögeln. Eine genaue Übersicht der Proben des geschützten sowie des ungeschützten Areals zeigt Tabelle 29.

Die statistische Auswertung mit Hilfe des χ^2 -Unabhängigkeitstests ergab, für I-Aliquoten, II-Aliquoten und den makroskopisch sichtbaren aviären Eintrag zusammen, einen χ^2 -Wert von 0,00. Dies zeigt, dass zwischen den Merkmalen positiv bzw. negativ bezüglich des aviären Eintrags und geschütztes bzw. ungeschütztes Areal kein signifikanter Unterschied besteht.

Tabelle 29: Ergebnisse der Beprobung des Versuchsareals auf dem Versuchsgut Grünschwäige

Grünschwäige		geschütztes Areal					ungeschütztes Areal				
Probe	Datum der Probennahme	Probengewicht [g]		Auswertung PCR		makroskopisch sichtbarer aviärer Eintrag	Probengewicht [g]		Auswertung PCR		makroskopisch sichtbarer aviärer Eintrag
		Rohmaterial	lyophilisiert	Aliquot I	Aliquot II		Rohmaterial	lyophilisiert	Aliquot I	Aliquot II	
0	23.07.2009	1,82	1,56	-	-		0,82	0,78	-	-	
1	29.07.2009	9,02	7,99	-	-		5,00	4,39	-	-	
2	05.08.2009	2,49	2,09	/	-	3 F	1,25	1,04	-	-	3 F
3	12.08.2009	4,20	3,93	-	-	4 F	4,06	3,72	-	-	
4	19.08.2009	4,03	2,93	-	-	4 F	3,15	2,65	+	-	3 F
5	25.08.2009	6,34	5,29	++	-		10,35	8,84	+	-	1 F
6	01.09.2009	7,12	6,51	+	-	1 F	4,69	3,63	-	-	
7	23.09.2009	5,29	4,88	+	-	9 F	9,36	8,29	+	-	3 F
8	29.09.2009	12,40	10,71	-	-		8,28	7,23	+	-	
9	08.10.2009	6,32	4,90	-	-		4,70	4,30	-	-	
10	21.10.2009	24,02	19,40	+	-		12,22	9,70	-	-	
11	28.10.2009	10,14	8,54	-	-		9,74	7,83	+	-	
12	03.11.2009	80,80	53,70	+	-		59,30	33,80	-	-	
13	13.11.2009	12,86	10,88	-	+		16,90	11,49	-	-	
14	20.11.2009	3,70	2,39	-	-		6,60	4,45	-	-	
15	27.11.2009	7,30	5,80	-	-		3,70	3,40	-	-	
16	03.12.2009	3,70	2,65	-	-		0,81	0,64	-	-	
17	09.12.2009	0,75	0,60	-	+		0,79	0,67	-	-	
18	25.03.2010	63,22	57,75	-	-		50,96	47,12	-	-	6 F
19	31.03.2010	20,19	18,57	-	-		12,28	11,27	+	/	4 F; 1 K
20	08.04.2010	31,32	28,70	-	-	2 F	23,16	21,00	-	-	1 F; 1 K
21	15.04.2010	15,05	8,72	-	-		64,21	41,30	-	-	4 K
22	20.04.2010	36,90	33,56	-	-	3 F; 2 K	55,00	49,40	-	-	1 F
23	28.04.2010	29,16	26,64	-	-		41,08	38,37	-	-	
24	05.05.2010	18,50	14,16	-	-	4 F	25,36	18,86	-	-	
25	11.05.2010	14,25	12,17	-	-		20,35	17,22	-	-	
Mittelwert		16,57	13,65				17,47	13,90			
Standardabweichung		19,10	15,16				19,71	15,19			
Varianz		364,82	229,69				388,44	230,81			

+++ : stark positiv ++ : positiv + : schwach positiv - : negativ / : negative IAC (nicht auswertbar)
 F: Feder K: Vogelkot

3.1.5 Areal auf der Versuchsstation Viehhausen

Das Gewicht der gewonnenen Proben differierte stark. Direkt nach der Probennahme lag es im geschützten Areal zwischen 3,64 g und 115,73 g, im ungeschützten zwischen 4,69 g und 42,50 g. Der errechnete Mittelwert aller Proben betrug im geschützten Areal 19,44 g, mit einer Standardabweichung von 20,54 und einer Varianz von 421,96, und im ungeschützten Areal 13,99 g, mit einer Standardabweichung von 9,18 und einer Varianz von 84,20. Nach dem Gefriertrocknen lag dieser Wert bei 15,77 g, mit einer Standardabweichung von 18,09 und einer Varianz von 327,43, bzw. 11,24 g, mit einer Standardabweichung von 7,44 und einer Varianz von 55,32, wobei im geschützten Areal die leichteste Probe 1,32 g und die schwerste 100,55 g wog, im ungeschützten Areal maß das geringste Gewicht 2,11 g und das höchste 35,96 g.

Von insgesamt 168 mittels Endpunkt-PCR auf das Vorkommen des mitochondrialen Cytochrom *b* getesteten Proben, erwies sich lediglich eine Probe aufgrund einer negativ gebliebenen IAC als nicht auswertbar. Hierbei handelte es sich um das Aliquot I der Probe 2 des geschützten Areals. Des Weiteren zeigten 3 I-Aliquots und 5 II-Aliquots des geschützten Areals einen positiven PCR-Verlauf hinsichtlich des gesuchten Genabschnitts. Ebenso konnte an 11 Beprobungstagen das Vorhandensein von Federn und/oder Kot auf dieser Fläche verzeichnet werden. Davon wiederum wurden 3 Aliquots, das Aliquot II der Probe 15 sowie die I-Aliquots der Proben 30 und 35 ebenfalls mittels Endpunkt-PCR positiv getestet. Der Fund eines Vogelbeins am 26.06.2009 in diesem Areal stellte ein außergewöhnliches Ereignis dar. Dieses Vogelbein war ca. 3 cm groß und stammte somit von einem kleinen Vogel, welcher möglicherweise ein Opfer eines Raubvogels geworden ist. Die Auswertung der Endpunkt-PCRs des ungeschützten Areals verhält sich ähnlich zu der des geschützten Areals. So wurden insgesamt 9 Aliquots, 5 I-Aliquots und 4 II-Aliquots, positiv auf das mitochondriale Cytochrom *b* getestet. Mit Ausnahme der Probe 38, bei der sowohl Aliquot I als auch Aliquot II ein positives Ergebnis erzielte, handelte es sich stets um Proben unterschiedlichen Datums. Der optische aviäre Eintrag, welcher an 10 Tagen der Probennahme verzeichnet wurde, bestand hier ausschließlich aus Faeces. Zwei dieser Proben, die an diesen 10 Tagen genommen wurden, nämlich die Aliquots I der Proben 32 und 37, erzielten auch in der Endpunkt-PCR bezüglich des vogelspezifischen Gens ein positives Ergebnis.

Im Winter, wenn keine Probennahme aufgrund der Wetterlage möglich war, konnten im liegengebliebenen Schnee um beide Versuchsflächen Spuren von diversen Tieren, vor allem aber von Hasen und Rehen entdeckt werden. Hin und wieder gab es auch innerhalb des Freigeheges Spuren, welche allerdings sehr undeutlich und somit keiner Tierart eindeutig zuzuordnen waren. Am 29.09.2009 saß bei der Ankunft auf dem Gelände im ungeschützten Areal ein Feldhase. Eine Aufstellung aller auf dem Areal der Versuchsstation Viehhausen gewonnenen Proben sowie deren Auswertung zeigt Tabelle 30.

Für I-Aliquots, II-Aliquots und den makroskopisch sichtbaren aviären Eintrag zusammen, ergab die statistische Auswertung mit Hilfe des χ^2 -Unabhängigkeitstests einen χ^2 -Wert von 0,04. So konnte insgesamt zwischen den geschützten und ungeschützten Arealen bezüglich des Eintrags organischen Materials aviären Ursprungs kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

Tabelle 30: Ergebnisse der Beprobung des Versuchsareals auf der Versuchsstation Viehhausen

Viehhausen		geschütztes Areal					ungeschütztes Areal				
Probe	Datum der Probennahme	Probengewicht [g]		Auswertung PCR		makroskopisch sichtbarer aviärer Eintrag	Probengewicht [g]		Auswertung PCR		makroskopisch sichtbarer aviärer Eintrag
		Rohmaterial	lyophilisiert	Aliquot I	Aliquot II		Rohmaterial	lyophilisiert	Aliquot I	Aliquot II	
0	31.03.2009	7,80	7,66	+	-		7,59	7,37	-	-	
1	07.04.2009	6,95	6,80	-	-	2 K	6,62	6,42	-	+	
2	14.04.2009	7,98	7,82	/	-		7,07	6,87	-	-	
3	21.04.2009	25,51	25,05	-	+		36,46	35,96	-	+	
4	06.05.2009	28,15	27,72	-	-		27,86	27,17	-	-	
5	18.05.2009	11,02	9,79	-	-		17,28	13,87	-	-	
6	28.05.2009	9,98	8,75	-	-		8,67	7,62	-	-	
7	09.06.2009	4,96	4,30	-	-		6,55	5,14	++	-	
8	26.06.2009	7,11	3,60	-	-	Vogelbein	4,71	3,32	-	-	
9	01.07.2009	3,64	3,18	-	-		6,15	5,46	-	-	
10	10.07.2009	7,00	5,71	-	-		5,07	4,19	++	-	
11	17.07.2009	5,04	3,71	-	-		3,79	3,53	-	-	
12	24.07.2009	8,93	7,90	-	-		22,07	19,03	-	-	
13	30.07.2009	20,91	18,16	-	-		20,56	17,19	-	-	
14	05.08.2009	7,59	6,64	-	-		8,79	7,90	-	-	
15	11.08.2009	9,12	8,38	-	+	2 F	7,75	6,87	-	-	
16	18.08.2009	9,35	8,17	-	-		7,20	6,32	-	-	
17	24.08.2009	15,58	12,99	-	-	1 F	12,69	11,33	-	-	
18	01.09.2009	11,27	10,58	-	-		16,81	15,34	-	-	
19	07.09.2009	13,82	12,51	-	-		26,23	23,72	-	-	
20	21.09.2009	11,87	10,90	-	+		16,30	14,46	-	-	
21	29.09.2009	64,30	55,90	-	-		14,28	13,03	-	-	
22	15.10.2009	5,84	3,63	-	-		8,11	6,71	-	-	6 K
23	21.10.2009	16,77	13,99	-	+		10,94	8,97	-	-	
24	03.11.2009	5,12	1,80	-	-		5,81	3,12	-	-	
25	10.11.2009	14,50	7,15	-	-		24,35	17,09	-	-	
26	17.11.2009	16,86	10,14	-	-		20,50	16,10	-	-	
27	23.11.2009	33,87	27,06	-	-		24,51	20,91	-	-	
28	02.12.2009	16,00	6,90	-	+		19,22	10,61	-	-	
29	08.12.2009	39,35	1,32	-	-		42,50	2,11	-	-	
30	23.03.2010	115,73	100,55	+	-	1 F	30,49	26,75	-	+	
31	30.03.2010	37,12	32,83	-	-	1 F	12,44	10,92	-	-	
32	06.04.2010	32,03	29,00	-	-		12,15	11,00	+	-	2 K
33	15.04.2010	28,41	24,22	-	-	1 F; 1 K	10,03	8,66	-	-	1 K
34	22.04.2010	44,57	39,31	-	-	2 K	17,16	15,10	-	-	4 K
35	29.04.2010	49,12	43,49	+	-	1 F; 3 K	13,43	11,62	-	-	5 K
36	11.05.2010	13,09	11,25	-	-		4,69	4,33	-	-	4 K
37	19.05.2010	7,25	6,09	-	-	1 K	5,12	4,17	+	-	3 K
38	25.05.2010	19,84	17,19	-	-		12,32	11,31	+	+	
39	08.06.2010	8,31	7,08	-	-		7,41	6,33	-	-	5 K
40	23.06.2010	7,31	6,59	-	-	1 K	9,02	7,98	-	-	6 K
41	29.06.2010	7,35	6,65	-	-	1 K	6,97	6,24	-	-	1 K
Mittelwert		19,44	15,77				13,99	11,24			
Standardabweichung		20,54	18,09				9,18	7,44			
Varianz		421,96	327,43				84,20	55,32			

+++ : stark positiv ■■■ ++ : positiv ■■■ + : schwach positiv ■■■ - : negativ / : negative IAC (nicht auswertbar)
 F: Feder K: Vogelkot

Eine zusammenfassende Aufstellung der durchgeführten Untersuchungen und deren Ergebnisse wird in Tabelle 31 dargestellt.

Tabelle 31: Zusammenfassende Übersicht der Ergebnisse des Nachweises des mitochondrialen Cytochrom *b* mittels Endpunkt-PCR sowie der makroskopischen Untersuchungen an allen 5 Standorten

	E.ON		SWM		Grünschwaige		Wang/Klärwerk		Viehhausen		gesamt	
Beginn der Probennahme	11.12.2008		30.07.2009		23.07.2009		27.07.2009		31.03.2009			
Ende der Probennahme	30.06.2010		30.06.2010		11.05.2010		30.06.2010		30.06.2010			
Probenanzahl	92		52		52		74		84		354	
Cytochrom B - Aliquot I	g	u	g	u	g	u	g	u	g	u	g	u
auswertbar	89		49		51		73		83		345	
positiv	5	5	1	3	5	6	12	11	3	5	26	30
negativ	40	39	23	22	20	20	25	25	38	37	146	143
Cytochrom B - Aliquot II												
auswertbar	87		49		51		71		84		342	
positiv	5	7	1	2	6	0	5	1	5	4	22	14
negativ	38	37	23	23	20	25	30	35	37	38	148	158
makroskopisch sichtbarer aviärer Eintrag												
positiv	10	12	6	7	8	9	6	14	12	10	42	52
negativ	36	34	20	19	18	17	31	23	31	32	136	125

g : geschütztes Areal **u** : ungeschütztes Areal

Wie der Tabelle 31 zu entnehmen ist, wurden bei der Untersuchung der Proben auf das mitochondriale Cytochrom *b* mittels Endpunkt-PCR bei den I-Aliquots insgesamt mehr Proben des ungeschützten Areals (8,7 %) als Proben des geschützten Areals (7,5 %) als positiv nachgewiesen. Dagegen zeigen die Untersuchungen der II-Aliquots mehr Proben des geschützten Areals (6,4 %) als Proben des ungeschützten Areals (4,1 %) ein positives PCR-Ergebnis. Die Beurteilung des makroskopisch sichtbaren aviären Eintrags zeigt, dass im ungeschützten Areal mehr Material aviären Ursprungs vorzufinden war als im geschützten Areal. Die Ergebnisse der I- und der II-Aliquots, des optischen aviären Eintrags sowie die Gesamtheit aller Ergebnisse wurden mit Hilfe des χ^2 -Unabhängigkeitstests analysiert. Die so errechneten χ^2 -Werte lagen mit 0,31 für die I-Aliquots, 2,09 für die II-Aliquots, 1,52 für den makroskopisch sichtbaren aviären Eintrag sowie mit 0,21 für alle Ergebnisse zusammen deutlich unter dem kritischen Entscheidungswert von 3,841. So besteht zwischen den Merkmalen positiv bzw. negativ bezüglich des aviären Eintrags und geschütztes bzw. ungeschütztes Areal kein signifikanter Unterschied.

3.2 Tiergesundheit und Überlebensrate

Die vom Institut für Biologische Sicherheitsforschung GmbH sowie dem Institut der Medizinischen Mikrobiologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg durchgeführten mikrobiologischen Untersuchungen, welche ebenfalls der Überprüfung der Infektionssicherheit dienten, zeigten keine wesentlichen Unterschiede zwischen den geschützten und ungeschützten Arealen. Dagegen ließen sich durch die Erfassung von

Legeleistung und Verlusten relevante Aspekte der Tiergesundheit sowie des Schutzes vor Raubtieren und Greifvögeln darstellen.

3.2.1 Legeleistung

Als wichtiger Parameter für die Beurteilung der Tiergesundheit diente die Legeleistung der Hühner, welche über 40 Wochen erfasst wurde. An den Standorten Wässerndorf bei Kitzingen und Geflügelhof Halder in Hoßkirch war es allerdings aus technischen Gründen nur für 34 bzw. 25 Wochen möglich, diese Daten zu sammeln. Eine detaillierte Aufstellung dieser Daten befindet sich im Anhang (I3).

Am Geflügelhof Halder in Hoßkirch zeigte sich über einen Beobachtungszeitraum von 25 Wochen im geschützten Gehege eine durchschnittliche Legeleistung von 5,42 Eiern pro Huhn und Woche, wobei der Tiefstwert bei 2,04 und der Höchstwert bei 7,12 lag. Im Freigehege schwankte die wöchentliche Legeleistung zwischen 2,17 und 6,65 Eiern pro Huhn und Woche und wies einen Mittelwert von 4,83 auf. Der deutliche Abfall der Legeleistung in beiden Haltungssystemen (Abbildung 43) ab der 13. Experimentwoche begann Mitte Oktober.

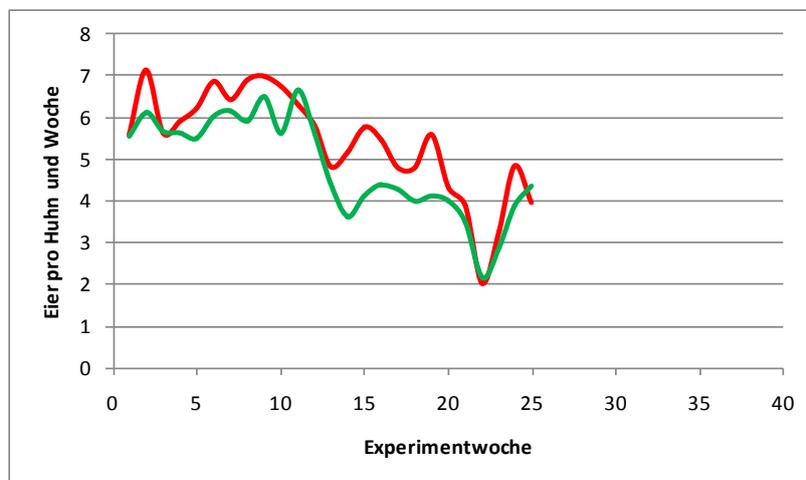


Abbildung 43: Legeleistung am Geflügelhof Halder in Hoßkirch

— geschützt — ungeschützt

Eine geringfügig bessere durchschnittliche Legeleistung wiesen am Gut Weyern bei Düren die Tiere im ungeschützten Areal mit 5,67 Eiern pro Huhn und Woche im Vergleich zu den Hühnern in der Volierenhaltung mit 5,23 Eiern pro Huhn und Woche auf. Die wöchentliche Legeleistung pro Huhn variierte im Barrieregehege von 3,50 bis 6,96, im Freigehege von 4,24 bis 6,57 Eiern (Abbildung 44).

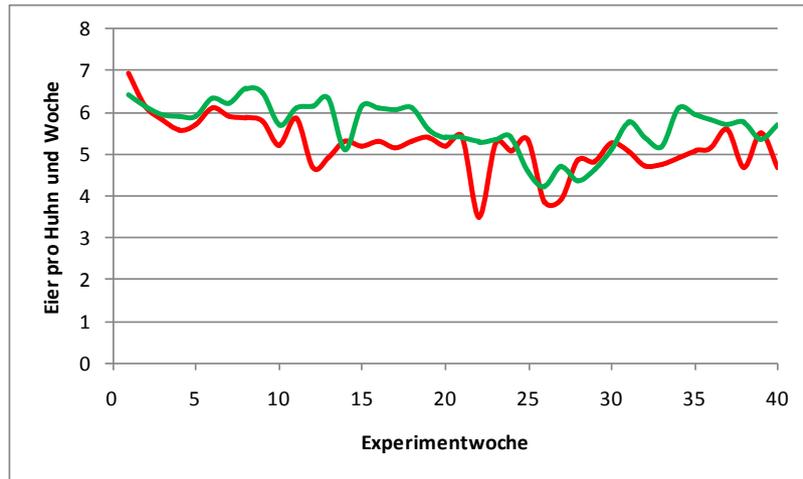


Abbildung 44: Legeleistung am Gut Weyern bei Düren

— geschützt — ungeschützt

Am Laeisenhof in Ferschweiler legte ein Tier im Barrieregehege wöchentlich zwischen 2,88 und 6,48 Eier. Über den gesamten Beobachtungszeitraum von 40 Wochen hinweg lag die mittlere Legeleistung in dieser Gehegeform bei 5,23 Eiern pro Huhn und Woche, im Freigehege bei 5,02. Hier reichte die durchschnittliche wöchentliche Leistung pro Huhn und Woche von 2,14 bis 6,43 Eiern (Abbildung 45). Einhergehend mit einem plötzlich starken Abfall der Lufttemperatur trug sich Anfang November, in der 16. Experimentwoche im ungeschützten Areal sowie in der 17. Experimentwoche im geschützten Areal, ein Einbruch der Legeleistung zu.

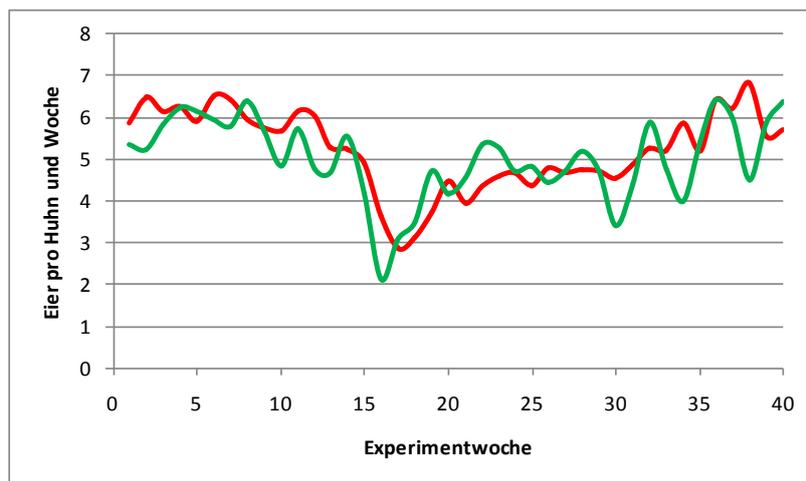


Abbildung 45: Legeleistung am Laeisenhof in Ferschweiler

— geschützt — ungeschützt

Ebenso wie am Gut Weyern bei Düren zeigten die Tiere auf der Versuchsstation Viehhausen im Freigehege eine geringfügig bessere durchschnittliche Legeleistung. Diese lag bei 5,90 Eiern pro Huhn und Woche, wobei die niedrigste wöchentliche Legeleistung pro Huhn und

Woche 4,68 Eier, die höchste 7,00 Eier betrug. Im Vergleich dazu legten die Hühner im geschützten Areal durchschnittlich 5,22 Eier pro Woche mit wöchentlichen Leistungen zwischen 4,24 und 6,40 Eiern pro Tier (Abbildung 46).

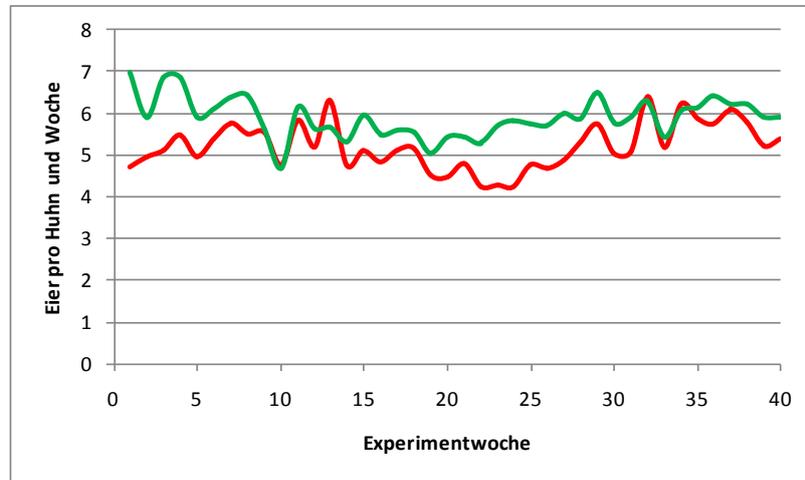


Abbildung 46: Legeleistung auf der Versuchsstation Viehhausen

— geschützt — ungeschützt

Mit Ausnahme der ersten Woche zeigte die gesamte durchschnittliche Legeleistung der Hühner beider Gehegeformen in Wässerndorf bei Kitzingen kaum einen Unterschied. So lag diese im geschützten Areal bei 5,52, im Freigehege bei 5,36 Eiern pro Huhn und Woche. Wöchentlich schwankten die Leistungen in Volierenhaltung von 3,38 bis 6,57 Eiern, im ungeschützten Areal von 4,47 bis 6,50 Eiern pro Tier (Abbildung 47).

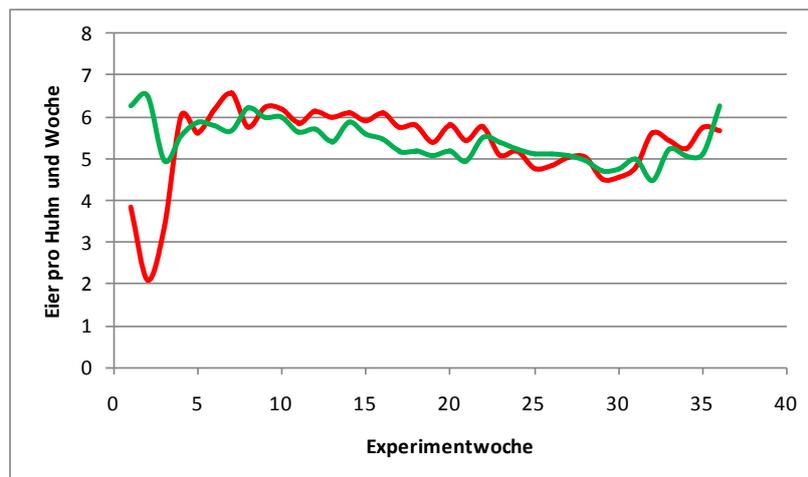


Abbildung 47: Legeleistung in Wässerndorf bei Kitzingen

— geschützt — ungeschützt

Insgesamt zeichnet sich ein Trend ($p = 0,089$) zu einer besseren Legeleistung pro Tier und Woche in den ungeschützten Arealen ab.

3.2.2 Verlustraten

Der Tierbestand wurde in den geschützten und ungeschützten Arealen 40 Wochen lang an allen 5 Standorten erfasst. Eine detaillierte Aufstellung der Verlustraten befindet sich im Anhang (I2). Dabei zeigte sich, dass insbesondere in den ungeschützten Arealen im Laufe des Beobachtungszeitraums an allen Standorten deutliche Tierverluste zu verzeichnen waren (Abbildung 48 bis Abbildung 52). Die häufigste Abgangsursache bestand im gewaltsamen Tod durch Raubtiere, was allerdings nur für das Freigehege zutrifft. Hierbei wurden Raubvögel meist direkt bei ihrem Zugriff beobachtet oder Spuren eines Kampfes, welche sich durch vermehrte Federn auf dem Boden auszeichneten, und das Fehlen eines Huhns festgestellt. Weitere Gründe für tote Tiere in beiden Haltungformen stellten, nach Angaben der Betriebsleiter und tierärztlichen Untersuchungen, insbesondere bakterielle Durchfallerkrankungen, Verletzungen der Ständer sowie Kannibalismus dar.

Auf dem Geflügelhof Halder in Hoßkirch nahm der Tierbestand im geschützten Areal lediglich um 4 % ab, wohingegen im ungeschützten Areal ein Verlust von 32 % zu verzeichnen war (Abbildung 48).

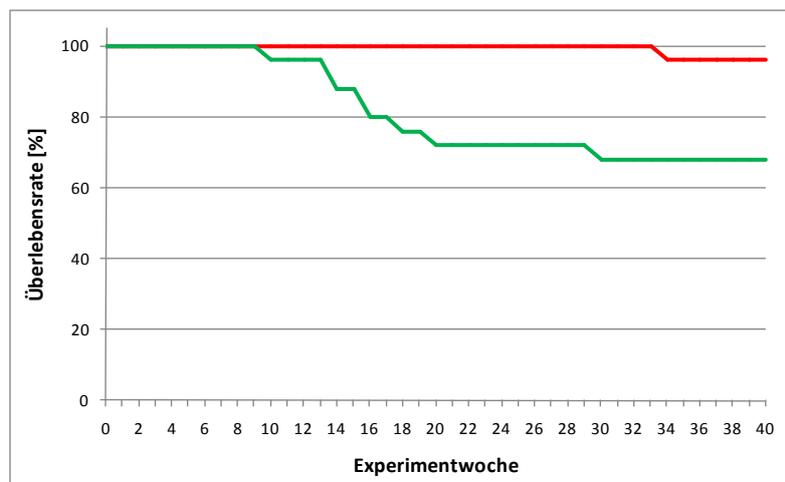


Abbildung 48: Entwicklung der Tierpopulation in den Versuchsarealen am Geflügelhof Halder in Hoßkirch

— geschützt — ungeschützt

Das geschützte Areal am Gut Weyern in Düren wies einen Bestandsrückgang von 12 % auf. Dieser begründete sich hauptsächlich durch eine Colienterotoxämie der Tiere. Allerdings war die Todesursache nicht immer eindeutig zu klären und wurde auch auf Stress zurückgeführt. Der Tierbestand im Freigehege lag am Ende des Beobachtungszeitraums bei 68 % des Anfangsbestands (Abbildung 49).

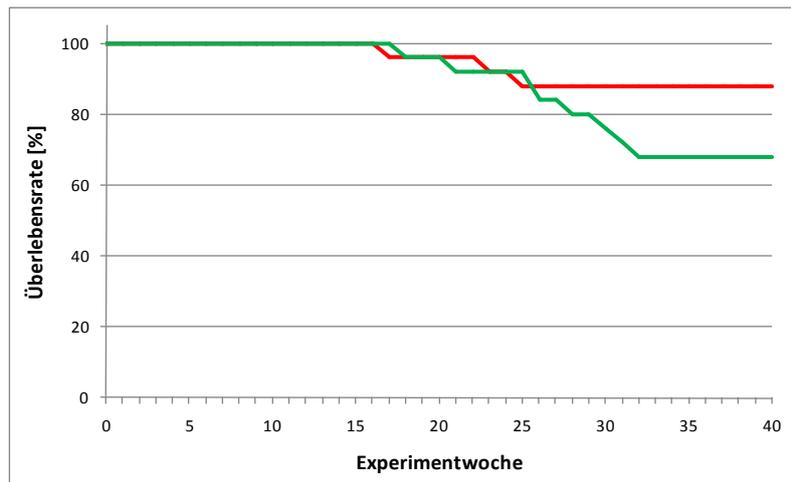


Abbildung 49: Entwicklung der Tierpopulation in den Versuchsarealen am Gut Weyern bei Düren

— geschützt — ungeschützt

Die meisten Verluste im Freigehege verzeichnete der Laeisenhof in Ferschweiler. Dafür verantwortlich waren insbesondere Raubtiere, die den Bestand auf knapp ein Viertel der anfangs eingestellten Hühner dezimierten. Allerdings sind auch Tiere an einer Colenterotoxämie gestorben. Der Tierbestand im geschützten Areal ging innerhalb der 40 Wochen auf 76 % zurück (Abbildung 50). Durch eine Sektion von in diesem Gehege verendeten Tieren wurden als Todesursache die Einwirkung eines stumpfen Traumas und die dadurch hervorgerufenen Blutungen in die Leibeshöhle bzw. Leberrisse festgestellt.

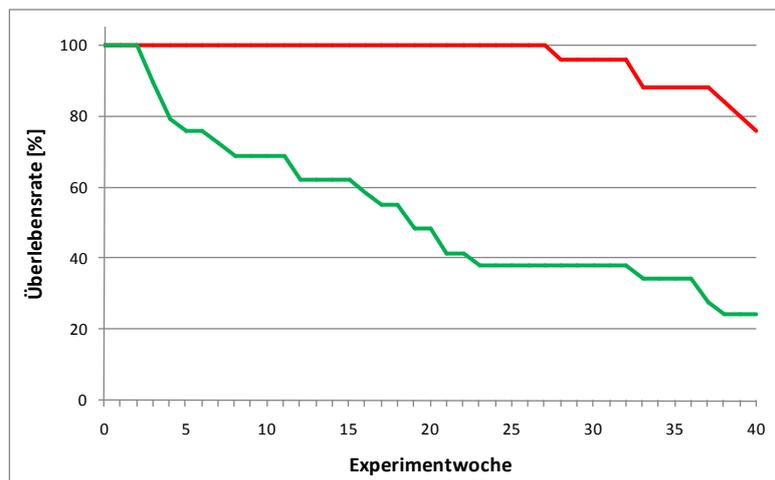


Abbildung 50: Entwicklung der Tierpopulation in den Versuchsarealen am Laeisenhof in Ferschweiler

— geschützt — ungeschützt

Wie aus Abbildung 51 hervorgeht, starb auf der Versuchsstation Viehhausen im geschützten Areal während des Beobachtungszeitraums kein einziges Tier. Dagegen lag der Tierverlust im ungeschützten Areal, ebenso wie auf dem Gut Weyern in Düren und dem Geflügelhof in

Hoßkirch, am Ende der 40 Wochen bei 32 %. Die pathologische Untersuchung der Tiere ergab, dass sie an der Folge einer Clostridiose und Kokzidiose verstarben.

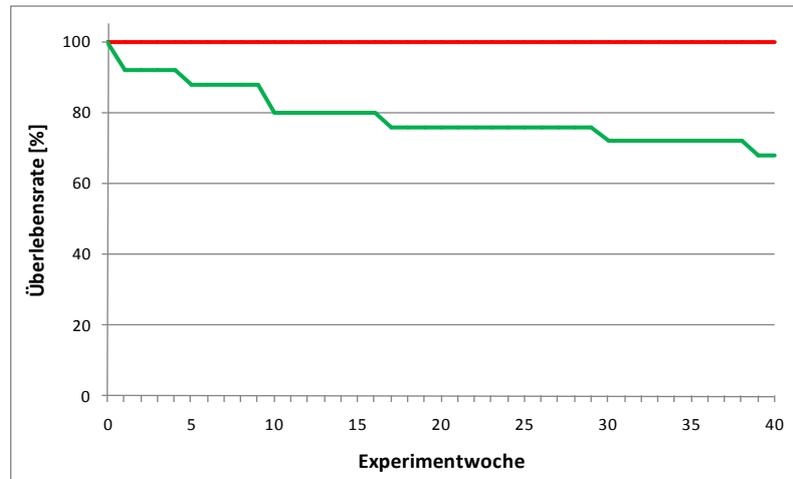


Abbildung 51: Entwicklung der Tierpopulation in den Versuchsarealen auf der Versuchsstation Viehhausen

— geschützt — ungeschützt

In Wässerndorf bei Kitzingen nahm der Tierbestand im geschützten Areal um 16 % ab. Auch hier war für den Tierverlust vermutlich eine Clostridiose und Kokzidiose verantwortlich. Im Freigehege betrug der Verlust an Hühnern das Doppelte und lag somit bei 32 % (Abbildung 52).

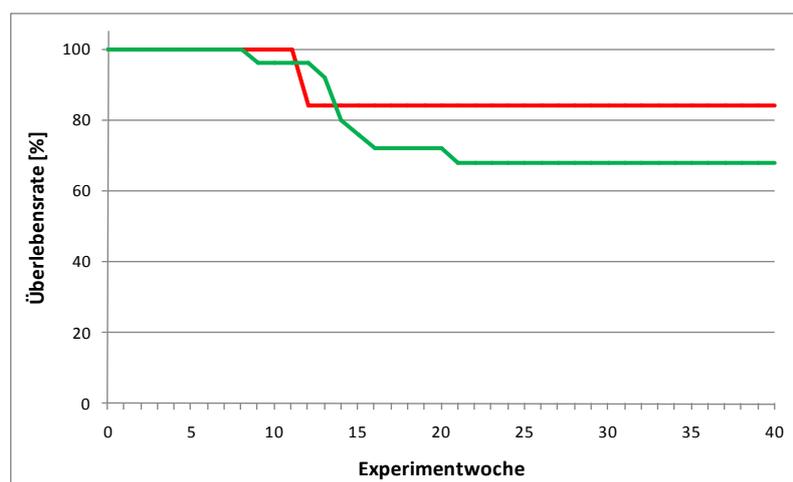


Abbildung 52: Entwicklung der Tierpopulation in den Versuchsarealen in Wässerndorf bei Kitzingen

— geschützt — ungeschützt

Zusammenfassend zeigt Tabelle 32 die statistische Auswertung aller gewonnenen Daten von Legeleistung und Tierbestand.

Tabelle 32: Zusammenfassende statistische Auswertung bezogen auf Legeleistung und Überlebensrate aller 5 Standorte

	Mittelwert[Standardabweichung/Varianz]	
	geschützt	ungeschützt
Legeleistung [n]	5,31[0,84/0,67]	5,40[0,84/0,71]
Überlebensrate [%]	96*[6/41]	76*[19/357]

* Signifikanz im t-Test ($p = < 0,001$)

Es ließ sich bezüglich der Legeleistung kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den geschützten und den ungeschützten Arealen erkennen, wobei sich ein Trend zu einer besseren Legeleistung der Tiere in den ungeschützten Arealen abzeichnete ($p = 0,089$). Bei Betrachtung der einzelnen Standorte erwies sich die höhere Legeleistung in den ungeschützten Arealen an den Standorten Düren und Viehhausen als höchst signifikant ($p = < 0,001$). Die Tierverluste hingegen waren in den geschützten Arealen höchst signifikant ($p = < 0,001$) geringer. Auch die Beurteilung der einzelnen Standorte zeigte diesen deutlichen Unterschied beider Gehegeformen mit Ausnahme des Standorts Gut Weyern bei Düren, bei welchem kein signifikanter Unterschied festgestellt werden konnte.

E Diskussion

Bei Auftreten anzeigepflichtiger Krankheiten in Nutztierbeständen ist gesetzlich geregelt, welche Maßnahmen zu ergreifen sind. So besteht unter anderem laut GeflPestSchV im Falle der Aviären Influenza eine Aufstallungspflicht, welche eine Infektion der Nutztiere durch Wildtiere verhindern soll. Dies hat allerdings zur Folge, dass die Tiere oft auf nicht artgerechte Weise gehalten werden. Zudem steht die Aufstallungspflicht konträr zur ökologischen Tierhaltung, bei welcher der Zugang zum Freilauf sogar gesetzlich geregelt wird [VERORDNUNG (EG) NR. 1804/1999].

Das Ziel dieser Arbeit war es daher, unter Feldbedingungen zu beurteilen, inwieweit speziell entwickelte netzgeschützte Flächen, die den direkten Kontakt zwischen Wildvögeln und Hausgeflügel verhindern, im Vergleich zur Freilandhaltung einen allgemeinen Infektionsschutz für Geflügel bieten und somit im Fall einer Aufstallungspflicht eine tiergerechte Haltung ermöglichen. Als Marker für eine objektive Einschätzung des Infektionsschutzes diente das vogelspezifische Gen Cytochrom *b*. Der in Zusammenarbeit mit dem Institut für Biologische Sicherheitsforschung GmbH sowie dem Institut für Medizinische Mikrobiologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg durchgeführte Parallelversuch mit Sentinelherden diente ebenfalls der Überprüfung der Infektionssicherheit anhand bakteriologischer und virologischer Untersuchungen. Die zusätzliche Erfassung von Legeleistung und Verlustaten beider Gehegeformen ermöglichte Rückschlüsse auf Tiergesundheit und Schutz vor Raubtieren und Greifvögeln.

1 Methodenentwicklung

Für die Abschätzung des allgemeinen Infektionsschutzes für Geflügel durch die speziell entwickelten netzgeschützten Flächen wurde eine molekularbiologische Methode entwickelt, welche die Erfassung des gesamten aviären Eintrags auf diese netzgeschützten sowie auf entsprechend ungeschützte Referenzflächen ermöglichte. Der direkte Nachweis von Infektionserregern zur Abschätzung des allgemeinen Infektionsrisikos erscheint zunächst naheliegender. Bei einem geringen Infektionsdruck wären allerdings die untersuchten Proben negativ und es wäre keine Aussage über den Infektionsschutz durch das Barriersystem möglich. Aus diesem Grund wurde als unabhängiger Marker der aviäre Eintrag gewählt, der mittels eines spezifischen Abschnitts des mitochondrialen Cytochrom *b* in der Endpunkt-PCR gemessen werden kann.

1.1 Aufbereitung der Proben

Die optimale Probenaufbereitung wurde anhand einer Staubprobe aus einem Hühnerstall, deren Aliquots im 4x-Ansatz sowohl im Originalzustand als auch mit Hilfe von Flüssigstickstoff, einer Schlagmühle oder dem TissueLyser II der Firma Qiagen zerkleinert in die DNA-Extraktion sowie der anschließenden real-time PCR eingesetzt wurden, getestet. Die Probenaufbereitung diente der optimalen Zerkleinerung und Homogenisierung der heterogenen Probenmatrix, wodurch nach RÅDSTRÖM *et al.* [2004] eine hohe Reproduzierbarkeit der PCR-Ergebnisse gewährleistet wird. Der späte Anstieg der Amplifikationskurven und somit auch der hohe Mittelwert der „crossing points“ (Cp) der nicht homogenisierten Hühnerstallstaubproben (Cp-Wert = 29,91) sowie der unter Flüssigstickstoff zermörserten Proben (Cp-Wert = 29,16) weist auf einen geringen Zellaufschluss während der DNA-Extraktion hin. Darüber hinaus lassen die weit auseinander liegenden Amplifikationskurven (Abbildung 24) mit der damit einhergehenden hohen Standardabweichung der Mittelwerte der Cps (Tabelle 23) auf eine unterschiedliche Menge an DNA in den einzelnen Proben schließen. Dies wiederum ist entweder Folge der inhomogenen Verteilung im Ausgangsmaterial, welche bei der nicht homogenisierten Probe deutlich stärker ausgeprägt ist als bei der unter Flüssigstickstoff zermörserten Probe, oder einer unterschiedlich guten Ausbeute an DNA aufgrund der Extraktionsmethode. Vergleicht man die Proben, die unter Flüssigstickstoff zermörsert wurden, mit den mittels TissueLyser II homogenisierten Proben, erzielten letztere ein deutlich höheres Fluoreszenzplateau. Dies bestätigt die Ergebnisse aus den Untersuchungen von KABIR *et al.* [2003] zur Isolierung bakterieller DNA jeweils aus Boden- und Umweltproben mit Hilfe verschiedener Verfahren, unter anderem mittels Flüssigstickstoff sowie einer Kugelmühle. Der nahezu gleichzeitige Anstieg der Amplifikationskurven der mit der Schlagmühle und dem TissueLyser II homogenisierten Proben ist auf einen ähnlich guten physikalischen Zellaufschluss durch diese beiden Verfahren zurückzuführen. Zudem erzielten die mit diesen beiden Verfahren aufbereiteten Proben einen statistisch signifikant niedrigeren Cp-Wert als die Proben, die nicht bzw. mittels Flüssigstickstoff homogenisiert wurden. Für das niedrigere Fluoreszenzplateau bei den Proben des TissueLyser II könnte eine Destruktion der Matrizen-DNA während der Zerkleinerung verantwortlich sein. So haben diverse Untersuchungen ergeben, dass die Anwendung von Perl- bzw. Kugelmühlen zwar zu einer effektiven Extraktion führt, allerdings gleichzeitig die Matrizen-DNA zerstört [KUSKE *et al.*, 1998; MORÉ *et al.*, 1994; VAN ELSAS *et al.*, 1997]. Da sowohl eine möglichst hohe Reproduzierbarkeit sowie ein optimaler Zellaufschluss durch die Probenaufbereitung angestrebt wurden, eignete sich für die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen die Homogenisierung mittels Schlagmühle am besten.

1.2 DNA-Extraktion

Die DNA-Extraktion stellt einen äußerst wichtigen Punkt für ein funktionierendes Untersuchungsverfahren mittels PCR dar. Vor allem bei der direkten DNA-Isolierung aus Bodenproben, welche eine ähnliche Zusammensetzung wie die in dieser Arbeit vorliegenden Proben besitzen, haben sich Kontaminanten im DNA-Extrakt, welche die PCR-Amplifikation inhibieren, sowie Verluste von DNA durch Degradation und Adsorption als größte limitierende Faktoren erwiesen [VOLOSSIOUK *et al.*, 1995]. Um für die durchzuführenden Untersuchungen eine geeignete Methode anwenden zu können, wurden drei unterschiedliche DNA-Isolierungsverfahren getestet. Diese waren der PowerSoil™ DNA Isolation Kit von MoBio Laboratories Inc., der QIAamp® DNA Stool Mini Kit der Firma Qiagen und die CTAB-Extraktion nach KORTHALS *et al.* [2008a] mit Modifikationen.

Der PowerSoil™ DNA Isolation Kit ist für die Anwendung bei Bodenproben, der QIAamp® DNA Stool Mini Kit für die Anwendung bei Stuhlproben entwickelt worden. Die DNA-Isolierung aus Federn mit diesen beiden Verfahren wurde in der Literatur bisher nicht explizit beschrieben. Dagegen finden sich unterschiedliche Varianten der CTAB-Extraktion für die Isolierung genomischer DNA aus Vogelfedern [BENSON, 2002; BOŠÉ *et al.*, 2007; EBERHARD & BERMINGHAM, 2004; LE GOUAR *et al.*, 2008]. In dieser Arbeit wurde mit der CTAB-Extraktion der früheste Anstieg der Amplifikationskurven erzielt, was sich bereits durch die Ergebnisse der Messung der DNA-Konzentrationen abzeichnete. Der hingegen niedrige Plateauwert, der mit dieser Extraktionsmethode erreicht wurde, weist auf eine geringe Bildung des Ziel-Produkts und einer damit einhergehenden geringen Effizienz hin. Dies könnte durch im Extrakt vorhandene Inhibitoren sowie durch die Fluoreszenzmessung störende Substanzen verursacht werden [LARIONOV *et al.*, 2005]. Im Vergleich zum QIAamp® DNA Stool Mini Kit erzielte der PowerSoil™ DNA Isolation Kit bei der DNA-Isolierung sowohl höhere DNA-Konzentrationen als auch bei der real-time PCR meist ein höheres Fluoreszenzplateau sowie einen früheren Anstieg der Amplifikationskurven. Dies lässt darauf schließen, dass die Kombination aus mechanischer Zerstörung der Zellen mit chemischer sowie enzymatischer Lyse, die beim PowerSoil™ DNA Isolation Kit eingesetzt wird, effektiver ist [MÜLLER *et al.*, 1998].

Bei Vogelkotproben zeigt die Auswertung der real-time PCRs, dass nur aus den Faeces des Waldrapps mit Hilfe der CTAB-Extraktion ein positiver Nachweis erbracht werden konnte. Alle weiteren Proben blieben, trotz DNA-Konzentrationen von 0,57 ng/µl bis 113,49 ng/µl im Extrakt und des daher erwarteten positiven PCR-Ergebnisses, negativ. Dies ist auf eine mangelhafte Beseitigung der PCR-Inhibitoren zurückzuführen. Auch MORGEN *et al.* [2009] kamen bei ihren Untersuchungen zu dem Resultat, dass bei einer DNA-Isolierung mittels CTAB-Protokoll die Beseitigung von PCR-inhibierenden Komponenten in Hühnerkot fehlschlug. BRAID *et al.* [2003] beschreiben die CTAB-Extraktionsmethode ebenfalls als

unzuverlässig für die Entfernung von Inhibitoren bei einer weiten Vielfalt von Bodenproben. Demnach ist dieses DNA-Isolierungsverfahren für Vogelkot nicht optimal. Generell stellt die Isolierung von amplifizierbarer DNA aus Faeces eine große Herausforderung dar. Dies liegt an der Aufsummierung vorliegender DNA, dem potenziellen Gemisch an exogenen und endogenen Nukleasen und PCR-Inhibitoren [KOHN *et al.*, 1995] sowie, bei Raubvögeln, der möglichen Amplifikation von nah verwandten Beutetieren im Kot [IDAGHDOUR *et al.*, 2003]. Bei einem Vergleich der DNA-Isolierung mittels PowerSoil™ DNA Isolation Kit und QIAamp® DNA Stool Mini Kit erzielte der QIAamp® DNA Stool Mini Kit höhere DNA-Konzentrationen im Extrakt. Bei der real-time PCR zeigten hingegen beide Verfahren ähnliche Ergebnisse. Allerdings erwies sich, nach einer Ausweitung der Untersuchungen auf weitere Vogelarten, der PowerSoil™ DNA Isolation Kit dem QIAamp® DNA Stool Mini Kit als überlegen, da mit Hilfe des PowerSoil™ DNA Isolation Kit, im Gegensatz zum QIAamp® DNA Stool Mini Kit, DNA aus sämtlichen Proben aller getesteten Vogelarten isoliert werden konnte. Auch PONTIROLI *et al.* [2011], die in ihren Untersuchungen unterschiedliche Isolierungsverfahren für Bakterien-DNA aus verschiedenen Bodenarten sowie Rindergülle und Dachsfeces getestet haben, erhielten mit dem PowerSoil™ DNA Isolation Kit, verglichen mit dem QIAamp® DNA Stool Mini Kit, bessere Resultate. Ebenso erwies sich hierbei der PowerSoil™ DNA Isolation Kit bezüglich der Beseitigung von PCR-inhibierenden Substanzen als überlegen. Dagegen zeigten WU *et al.* [2010] bei einem Vergleich der beiden Kits zur Untersuchung der menschlichen Darmflora einen Vorteil des QIAamp® DNA Stool Mini Kit, weil die DNA-Ausbeute mittels PowerSoil™ DNA Isolation Kit nahezu 10-fach geringer war. Da jede Methode zur DNA-Isolierung bei unterschiedlichen Anwendungsgebieten verschiedene Ergebnisse erzielt, ist es erforderlich, für die zu untersuchende Probenmatrix diesbezüglich Vorversuche durchzuführen.

1.3 Überprüfung der Spezifität

Zur molekularbiologischen Erfassung des gesamten aviären Eintrags auf die netzgeschützten sowie auf die entsprechend ungeschützten Referenzflächen sollte eine Gensequenz dienen, die über das gesamte Vogelspektrum verbreitet, aber bei keiner anderen taxonomischen Klasse vorhanden ist. Eine Vorauswahl hierfür fiel auf das Federkeratogen bzw. das mitochondriale Cytochrom *b*.

1.3.1 Federkeratingen

In der Vogelhaut existiert eine Vielzahl an Keratinproteinen, wobei sich die in Federn von denen der Schuppen unterscheiden [KEMP & ROGERS, 1972]. So vermuten WALKER & ROGERS [1976], dass es mindestens 22 verschiedene Federkeratine gibt, von denen die meisten nah miteinander verwandt sind. Diese Tatsache setzt die Anwesenheit einer Familie von ähnlichen, aber separaten Feder- β -Keratingenen oder Genkopien voraus [GLENN *et al.*, 2008]. Studien von GREGG & ROGERS [1986] deuten darauf hin, dass bei Hühnern rund 20 Gene innerhalb der Federkeratinfamilie existieren.

In der vorliegenden Arbeit wurde mit allen ausgewählten Primerpaaren nicht nur der gesuchte Abschnitt des Federkeratingens des Huhns amplifiziert, sondern auch bestimmte Abschnitte des Pferde- und Schweinegenoms. Es wäre denkbar, dass die Primer an einem Sequenzabschnitt, der für das α -Keratin codiert, binden. Dieses kommt, im Gegensatz zu den β -Keratingenen, welche nur Sauropsiden (Reptilien und Vögel) besitzen, in allen Säugetieren vor [O'GUIN *et al.*, 1982; SAWYER & KNAPP, 2003]. Durch den Einsatz des mit TIB MOLBIOL gemeinsam entwickelten Sondensystems wurden zwar die unspezifischen Fragmente bei Proben, die nicht aviärer Herkunft waren, nicht detektiert, gleichzeitig führte dies jedoch dazu, dass einige der ohne das Sondensystem detektierbaren Vogelspezies nicht mehr nachzuweisen waren. Dies lässt darauf schließen, dass der Sequenzabschnitt, an dem die Sonde bindet, zwischen den verschiedenen Vogelarten derart differiert, dass es nur bei wenigen Spezies zur Anlagerung der Sonde und somit zur Detektierbarkeit des Gens kommt. Dies wird durch Untersuchungen von GLENN *et al.* [2008] bestätigt. Diese verfolgten unter anderem das Ziel, mit dem Einsatz neuer PCR-Primer Feder- β -Keratingene von so vielen Vogelarten wie möglich zu amplifizieren, wobei zudem möglichst viele Ordnungen repräsentiert werden sollten. Mit Primern, die speziell für die hoch konservierten Regionen der DNA-Sequenz der Feder- β -Keratingene des Huhns designt wurden, scheiterte die Amplifizierung eines DNA-Fragments bei vielen der getesteten Vogelarten. Dies zeigt, dass das Feder- β -Keratingen signifikant zwischen den Vogelklassen variiert. Zudem sind in der Gendatenbank NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/) neben der Sequenz des Feder- β -Keratingens des Huhns lediglich die analogen Sequenzen des Zebrafinks, des Waldstorchs und des Truthahngieiers hinterlegt. Da schon innerhalb dieser vier Vogelarten einige Differenzen in der Sequenz dieses Gens bestehen, ist es derzeit kaum möglich, eine PCR auf Basis des Feder- β -Keratingens, die alle Vogelklassen erfasst, zu entwickeln und bedarf noch weiterer Untersuchungen.

1.3.2 Mitochondriales Cytochrom *b*-Gen

Cytochrom *b*, das durch mitochondriale DNA kodiert wird, gehört zu den Cytochromen, die am Elektronentransport der mitochondrialen Atmungskette beteiligt sind [DEGLI ESPOSTI *et al.*, 1993]. Zudem ist es eines der am umfassendsten sequenzierten Gene quer durch alle Vertebraten [LYDEARD & ROE, 1997; MOORE & DEFILIPPIS, 1997]. Ebenso sind seine evolutionäre Dynamik sowie die Biochemie des Proteinprodukts besser beschrieben als die meisten anderen molekularen Systeme [DEGLI ESPOSTI *et al.*, 1993]. Bei Betrachtung der genetischen Divergenz von benachbarten Arten, Artverwandten und cofamilialen Gattungen liefert das Cytochrom *b* Gen in der Regel nützliche phylogenetische Informationen. Auch ist die Wahrscheinlichkeit, dass das Gen durch Sättigungseffekte mit überlagerten Nukleotidsubstitutionen beeinträchtigt ist, sehr gering [JOHNS & AVISE, 1998; MEYER, 1994; MORITZ *et al.*, 1987]. JOHNS & AVISE [1998] berechneten und verglichen in ihren Untersuchungen den Grad der genetischen Distanz zwischen benachbarten Arten, Artverwandten und cofamilialen Gattungen innerhalb und quer durch die größten taxonomischen Wirbeltierklassen mit Hilfe von nahezu 2000 Cytochrom *b* Gensequenzen von GenBank. Dabei zeigten insbesondere die in die Analysen einbezogenen Vogeltaxa im Schnitt signifikant weniger genetische Abweichungen als andere untersuchte Wirbeltiergruppen derselben taxonomischen Stufe, vor allem bei Amphibien und Reptilien. Diese geringe genetische Divergenz der Vogeltaxa wird durch die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit bestätigt, da mittels der hier durchgeführten real-time PCR alle getesteten Vogelarten nachgewiesen werden konnten. Dies ist nur dann möglich, wenn der gewählte Sequenzabschnitt, an dem die Primer binden, innerhalb der Klasse der Vögel nicht oder nur geringfügig variiert. Gäbe es größere Abweichungen in diesem Bereich, könnten die Primer sich nicht an die Matrizen-DNA anlagern und eine Amplifikation bliebe infolgedessen aus [SIPOS *et al.*, 2007; QU *et al.*, 1997]. MATSUNAGA *et al.* [1999] hingegen nutzten die phylogenetische Divergenz im Cytochrom *b* für die Identifizierung von verschiedenen Fleischsorten (Rind, Schwein, Huhn, Schaf, Ziege und Pferd) mit Hilfe einer Multiplex-PCR. Dazu designten sie einen Forward-Primer in einem konservierten Sequenzbereich des mitochondrialen Cytochrom *b* sowie Reverse-Primer an der für die jeweilige Spezies spezifischen DNA-Sequenz. Die phylogenetische Divergenz im Cytochrom *b* Gen wird auch in dieser Arbeit belegt. So erzielten alle hier getesteten taxonomischen Klassen, mit Ausnahme der Vögel, bei einer vogelspezifischen PCR negative Ergebnisse. Da auch trotz der nahen Verwandtschaft von Reptilien und Vögeln [NICKEL *et al.*, 1992; SAWYER & KNAPP, 2003; STORCH & WELSCH, 2005] keine falsch-positiven Ergebnisse entstanden, bestätigen vorliegende Untersuchungen ebenfalls die Eignung des mitochondrialen Cytochrom *b* Gens für phylogenetische Untersuchungen bzw. zum Nachweis einer bestimmten Spezies mittels PCR.

Schmelzkurvenanalyse

Eine real-time PCR mit SYBR Green I besitzt zwar eine hohe Sensitivität, allerdings ist die Spezifität geringer als mit der Sondentechnik. Es ist aber anhand einer am Ende des real-time PCR-Laufs durchgeführten Schmelzkurvenanalyse möglich, die Spezifität des PCR-Produkts zu überprüfen [HOLZAPFEL & WICKERT, 2007; RIRIE *et al.*, 1997]. Da die Schmelzkurve eines PCR-Produkts vom GC-Gehalt, der Länge sowie der Sequenz abhängt, ergibt sich für jedes Produkt eine spezifische Schmelzkurve, wodurch das gewünschte PCR-Produkt verifiziert und von unerwünschten, wie Primer-Dimeren, unterschieden werden kann [RIRIE *et al.*, 1997]. Die Peaks der Schmelzkurven der von Wanderfalke, Mäusebussard, Turmfalke sowie Sakerfalke gewonnenen Proben befinden sich auf derselben Höhe. Dies lässt den Schluss zu, dass die Sequenz der entstandenen Amplifikate dieser Vogelarten identisch und für diese spezifisch ist. Dagegen weisen die Schmelzkurven der Proben von Buntspecht, Rebhuhn und Hyazinthara jeweils eine deutliche Abweichung zu denen von Wanderfalke, Mäusebussard, Turmfalke und auch Sakerfalke auf. Ein Grund für die Verschiebung der Schmelzkurven könnte eine veränderte Basenabfolge [HOLZAPFEL & WICKERT, 2007] innerhalb dieses Genabschnitts sein, die im Laufe der Entwicklung der einzelnen Vogelart durch Mutation entstanden sein und sich dann manifestiert haben könnte. Ebenso wäre eine Insertion oder Deletion einer oder mehrerer Basen in diesem Bereich bei den verschiedenen Vogelarten denkbar, was eine Änderung der Amplifikatlänge sowie eventuell des GC-Gehalts und somit der Schmelztemperatur zur Folge hätte. Das Auftreten des Doppelpeaks beim Hyazinthara könnte darauf zurückzuführen sein, dass der nachzuweisende Sequenzabschnitt bei diesem Tier selbst oder bei der Vogelart eine bzw. mehrere Mutationen aufweist. Dadurch entstehen zwei unterschiedliche PCR-Produkte, die bei verschiedenen Temperaturen aufschmelzen. Der Peak der Negativkontrolle, der durch seinen frühen Schmelzpunkt leicht von den spezifischen Produkten unterschieden werden kann, wird durch Primer-Dimere verursacht, welche bei einer hohen Anzahl von Zyklen in Proben mit sehr wenig oder keiner Ziel-DNA erzeugt werden [SIMPSON *et al.*, 2000]. Primer-Dimere entstehen auch, wenn die Primer, insbesondere an ihrem 3'-Ende, komplementär zueinander sind und dadurch selbst amplifiziert werden [DIEFFENBACH *et al.*, 1993]. Dies kann in dieser Arbeit allerdings ausgeschlossen werden. Ebenso zeigt die Schmelzkurve der Federprobe des Hyazintharas die Bildung von Primer-Dimeren. Aus diesem Grund ist davon auszugehen, dass sich in dieser Probe entweder nur wenig DNA im Ausgangsmaterial befand oder diese nicht ausreichend aufgeschlossen werden konnte. Die bei den diversen Vögeln auftretenden Unterschiede innerhalb des gewählten mitochondrialen Cytochrom *b*-Abschnitts und die daraus resultierende Verschiebung der Schmelzkurven, weisen darauf hin, dass das Cytochrom *b* für phylogenetische Untersuchungen auch innerhalb der taxonomischen Klasse Vögel, wie diese z.B. von

PEREIRA & BAKER [2006a und 2006b] oder LEI *et al.* [2010] durchgeführt wurden, geeignet ist. Für die vorliegende Arbeit war allerdings nicht die phylogenetische Untersuchung, sondern die Erfassung möglichst der gesamten Vogeltaxa von primärer Bedeutung. So war aufgrund des Versuchsaufbaus davon auszugehen, dass die hier gewonnenen Proben DNA von mehreren unterschiedlichen Vogelarten enthalten, die unter Umständen wiederum aufgrund unterschiedlicher Sequenzen differierende Schmelzkurven aufweisen. Befinden sich solche Sequenzvariationen in den amplifizierten PCR-Fragmenten, kann dies zu einer veränderten Form der DNA-Schmelzkurve führen, wodurch eine eindeutige Zuordnung und somit Verifizierung der PCR-Produkte nicht möglich wäre. Dies hat zur Folge, dass die Amplifikatlänge und somit die Spezifität nach jedem real-time PCR-Lauf mittels Agarosegelelektrophorese zu überprüfen ist.

Agarosegelelektrophorese und Sequenzierung

Die Auswertung des Agarosegels zeigt, dass die PCR-Produkte des Cytochrom *b*-Abschnitts von Wanderfalke, Mäusebussard, Stockente, Turmfalke, Kolkrabe sowie Amsel eine Größe von 227 bp aufweisen. Zusätzlich zeigte die Sequenzierung der PCR-Produkte dieser Vogelarten, mit Ausnahme der von Stockente und Amsel, eine identische Basenabfolge. Dadurch konnte die Spezifität der entstandenen Amplifikate bestätigt werden. Die durch die Sequenzierung aufgezeigten Basenunterschiede des gewählten Sequenzabschnitts der Amsel im Vergleich zu Wanderfalke, Mäusebussard, Turmfalke und Kolkrabe erklärt die abweichenden Peaks der Schmelzkurven. Die im Agarosegel unterhalb der Positivkontrolle liegende Bande des DNA-Extrakts der Probe des Spatzes, welche sich zusätzlich bei der Sequenzierung als ein um 9 Basen kürzeres PCR-Produkt bestätigte, spiegelt Untersuchungen von ALLENDE *et al.* [2001] wider. Diese zeigten, dass bei bestimmten Spatzenarten, darunter auch dem hier getesteten *Passer domesticus*, im mitochondrialen Cytochrom *b* eine Deletion von Basen vorliegt. Die Sequenzierung des PCR-Produkts editierte allerdings zwei nicht auswertbare Mischsequenzen. Eine Ursache für das Auftreten der Mischsequenzen könnte eine fehlgeschlagene oder unzureichende Aufreinigung des PCR-Produkts sein, da bereits ein 5%-iger Anteil an Primerrückständen dieses Phänomen verursacht. Auch das Vorhandensein unspezifischer PCR-Produkte führt zu Mischsequenzen, da sich die Primer mit großer Wahrscheinlichkeit sowohl am spezifischen als auch am unspezifischen Produkt anlagern [www.eurofindna.com]. Bei den hier vorliegenden Untersuchungen wäre es auch denkbar, dass die Mischsequenzen aufgrund von Teildeletionen auftreten [www.sequiserve.de]. Ebenso werden bei der Probe der Stockente neben dem gesuchten DNA-Fragment weitere DNA-Fragmente mit sowohl höherem als auch eine mit geringerem Molekulargewicht sichtbar. Hier ist anzunehmen, dass sich die Primer im gesamten Genom der Stockente an mehreren Stellen anlagern

können, wodurch die zusätzlichen unspezifischen Produkte entstehen. Die punktuellen Unterschiede, also das Vorkommen von Mischbasen, die sich aus der Sequenzierung der auf der Höhe von 227 bp liegenden Bande ergeben, lassen darauf schließen, dass in diesem Sequenzabschnitt vereinzelt Mutationen aufgetreten sind. Diese hier aufgezeigten Mutationen und Deletionen, aber auch eventuell bei anderen Vogelarten auftretenden Insertionen, sind für die Differenzen in der Schmelzkurvenanalyse verantwortlich.

1.4 Überprüfung der Sensitivität

In der vorliegenden Arbeit kann die angewandte Methode als umso sensitiver betrachtet werden, je mehr Vogelarten positiv auf den untersuchten vogelspezifischen Sequenzabschnitt des mitochondrialen Cytochrom *b* getestet werden. Aus den Ergebnissen der hier geprüften Vogelarten ergibt sich somit eine 100 %ige Sensitivität. Da allerdings die Klasse der Vögel mit nahezu 10.000 Arten [ROTH, 2010; WINK, 2011], die in 28 Ordnungen unterteilt werden, die zweitgrößte Gruppe der Wirbeltiere darstellt [ROTH, 2010], ist zu berücksichtigen, dass mit Vertretern der Ordnungen *Anseriformes*, *Ciconiiformes*, *Columbiformes*, *Falconiformes*, *Galliformes*, *Gruiformes*, *Passeriformes*, *Piciformes*, *Psittaciformes* und *Strigiformes* nur ein sehr geringer Teil der Klasse *Aves* im Rahmen dieser Untersuchungen überprüft wurde. Bei den Greifvögeln konnten aber mit Mäusebussard, Turmfalke und Sperber die am häufigsten in Bayern sowie in Deutschland vertretenen Arten innerhalb dieser Ordnung abgedeckt werden [INTERESSENGEMEINSCHAFT SPERBER, 2008; MAMMEN & STUBBE, 2005]. Da zudem noch alle weiteren überprüften Greifvogelarten positiv getestet werden konnten, erscheint die Erfassung der gesamten Ordnung mit dieser Methode sehr wahrscheinlich. Das war deshalb von Bedeutung, da Greifvögel zum Teil sehr hohe Verluste in der Freilandgeflügelhaltung verursachen [OTTO, 1980] und beim Schlagen der Beute als eventuelle Überträger für diverse Krankheitserreger fungieren können. Weiterhin sind mit Amsel, Buntspecht, Elster, Grünfink, Haussperling, Kolkrabe, Mönchsgrasmücke, Ringeltaube sowie Wintergoldhähnchen ebenfalls Vertreter der häufigsten Vogelarten in Deutschland [MITSCHKE *et al.*, 2010] positiv auf das mitochondriale Cytochrom *b* getestet worden. Da diese Vögel unterschiedlichen Ordnungen (*Passeriformes*, *Piciformes* und *Columbiformes*) angehören und dennoch einen positiven Nachweis erbrachten, könnte dies darauf hindeuten, dass eine Ausweitung der Untersuchungen auf andere Arten dieser Ordnungen ebenfalls zu positiven Ergebnissen führen. Der positive Nachweis von Blässhuhn, Höckerschwan, Kanadagans, Löffelente, Rothalsgans, Stockente sowie Witwenpfeifergans erweiterte die Überprüfung der Sensitivität des Tests auf die Ordnungen *Gruiformes* und *Anseriformes*. Hierbei war vor allem die Erfassung der *Anseriformes* von großer Wichtigkeit, da diese Ordnung neben der Ordnung

Charadriiformes als das größte natürliche Reservoir von Influenza-A-Viren gilt [OLSEN, 2006]. Aufgrund dessen lag auf dem Nachweis der von diesen Ordnungen stammende aviäre Eintrag ein besonderes Augenmerk. Da außerdem der Ismaninger Speichersee unter anderem für Reiherente, Tafelente, Schnatterente, Stockente, Blässhuhn, Höckerschwan und Kolbenente zur Mauser benötigt wird [SIERING, 2010], und ein Versuchsareal in unmittelbarer Nähe zu diesem Teichgebiet lag, konnte mit der Erfassung der *Anseriformes* ein großes Eintragungspotential erfasst werden. Allerdings konnten dort seit 1929 insgesamt 308 Vogelarten aus der ganzen Welt beobachtet werden [SIERING, 2010]. Somit wäre es auch denkbar, dass nicht alle mit diesem Test nachgewiesen werden können. Aber auch wenn möglicherweise nicht jede Vogelart nachgewiesen werden kann, ist dennoch davon auszugehen, dass ein breites Spektrum erfasst wird.

1.5 Testung der Methodik an Feldproben

Die entwickelte und validierte Methode wurde anhand von 20 am Standort Wang gewonnenen Proben auf ihre Anwendbarkeit bei Feldproben getestet. Hierbei zeigten die Ergebnisse der real-time PCR für alle Proben einen Fluoreszenzanstieg zwischen Zyklus 21 und 31. Daraus lässt sich schließen, dass in jeder untersuchten Probe eine Amplifikation der Ziel-DNA erfolgte. Die Auswertung der anschließend erstellten Agarosegele zeigte allerdings in den meisten Proben zu der spezifischen Bande auf einer Höhe von 227 bp zusätzliche Banden auf unterschiedlichen Höhen (Abbildung 35). Dies bedeutet, dass nicht nur das gesuchte DNA-Fragment mit den eingesetzten Primern amplifiziert wurde, sondern ebenso unspezifische PCR-Produkte entstanden sind. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass es sich bei den untersuchten Proben um Umweltproben bzw. Bodenproben handelt, welche zahlreiche unterschiedliche Bodenmikroorganismen, Pflanzen und Tiere (v. a. Insekten, Regenwürmer und Schnecken) enthalten. Von diesen Organismen besitzen sehr viele ebenfalls das mitochondriale Cytochrom *b*. So werden allein bei der Genbank NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/) 9742 Treffer für dieses Gen angezeigt, welche vom Tierreich über das Pflanzenreich bis hin zu den Mikroorganismen wie Pilzen und Bakterien reichen. Da weiterhin für Böden bekannt ist, dass sowohl die Anzahl der sich darin befindenden Einzelorganismen sowie die biologische Diversität sehr hoch sind, wobei sich z.B. in organischen Böden bis zu 10^{12} Bakterien, 10^4 Protozoen, 10^4 Nematoden und sehr viele Pilze finden [YOUNG & CRAWFORD, 2004], ist davon auszugehen, dass auch viele dieser Organismen Sequenzabschnitte aufweisen, an denen das gewählte Primerpaar bindet und bei der PCR zur Amplifikation unspezifischer Produkte führt. Diese unspezifischen Produkte führen dazu, dass eine absolute Quantifizierung mittels real-time PCR nicht möglich ist, da die Fluoreszenz ohne Berücksichtigung der Spezifität der PCR-Produkte gemessen und das

genaue Ergebnis infolgedessen beeinträchtigt wird [UNTERSEHER & SCHAMBONY, 2004; VANDESOMPELE *et al.*, 2002]. Die Bildung unspezifischer PCR-Produkte könnte durch den Einsatz von fluoreszenzmarkierten Sonden, die innerhalb des gesuchten PCR-Fragments binden, verhindert werden [BECKER-FOLLMANN & BAAS, 2004]. Da allerdings bereits innerhalb der Klasse *Aves* in dem gesuchten Genabschnitt des mitochondrialen Cytochrom *b* Sequenzunterschiede bestehen, würden durch den Einsatz einer Sonde zwar unspezifische Produkte möglicherweise eliminiert werden, aber gleichzeitig könnte sich eventuell auch die Anzahl der erfassbaren Vogelarten reduzieren. Sowohl aufgrund dieser Variationen innerhalb des zu amplifizierenden Sequenzabschnitts von 227 bp und der daraus folgenden Unsicherheit der Verifizierung in der Schmelzkurvenanalyse, als auch der Tatsache, dass eine Quantifizierung mittels real-time PCR durch das Vorhandensein unspezifischer Produkte nicht möglich ist, wurde die Methode auf Endpunkt-PCR umgestellt. Hierbei kann zudem das Zielfragment von unspezifischen Produkten klar differenziert werden.

1.6 Versuche zum Nachweis von Influenza-A-RNA

Die Quantifizierung von Pathogenen in Böden mit Hilfe molekularer Techniken, wie der real-time PCR, ist aufgrund von inhibierenden Substanzen, z.B. Huminstoffen, schwierig. Diese Substanzen beeinträchtigen die Effizienz der Genomextraktion sowie der enzymatischen Genomamplifikation [MIURA *et al.*, 2011; TEBBE & VAHJEN, 1993; WATSON & BLACKWELL, 2000]. Die Isolierung viraler RNA aus Umweltproben stellt sich noch schwieriger dar, da sich die viralen Partikel nicht gänzlich von solchen inhibitorischen Substanzen bezüglich ihrer physikalisch-chemischen Eigenschaften, wie Molekulargewicht und isoelektronischem Punkt, unterscheiden und deshalb oft mit der RNA mitaufgereinigt werden [DONG *et al.*, 2006; MIURA *et al.*, 2011]. Weiterhin entsteht leicht ein Verlust viraler RNA infolge von Adsorption an Bodenpartikel sowie Degradation durch RNase [MIURA *et al.*, 2011]. Dies kann zu falsch-negativen Ergebnissen führen [DREIER *et al.*, 2005], was sich ebenfalls in den Ergebnissen der hier durchgeführten Versuche zeigte. So blieben die gezielt kontaminierten Staubproben, die mit Hilfe des QIAamp[®] Viral RNA Mini Kits von Qiagen extrahiert wurden, bei der real-time RT-PCR negativ. Auch die Isolierung der viralen sowie der Kontroll-RNA bei artifiziell kontaminierten Bodenstaubproben gelang sowohl mit dem RNA PowerSoil[™] Total RNA Isolation Kit von MoBio Laboratories Inc. als auch mit dem INSTANT Virus RNA Kit von AJ Innuscreen mittels real-time RT-PCR nur teilweise. DINEEN *et al.* [2010] zeigten gleichfalls in ihren Untersuchungen, dass die mit dem RNA PowerSoil[™] Total RNA Isolation Kit aus Bodenproben gewonnenen Extrakte verglichen mit anderen Extraktionsverfahren die höchste Inhibierung in der RT-PCR aufweisen. Generell variieren die Kits in ihrer Fähigkeit, aus Bodenmatrices gereinigte RNA zu extrahieren und

Huminsäuren sowie andere PCR-inhibierende Substanzen zu entfernen [DINEEN *et al.*, 2010]. Der Einsatz einer veränderten Taq- oder Klentaq-Polymerase, welche von KERMEKCHIEV *et al.* [2009] entdeckt wurde und eine Resistenz gegenüber PCR-Inhibitoren zeigt, könnte die Detektion und Identifikation von Mikroorganismen in einer Umweltprobe signifikant verbessern [DINEEN *et al.*, 2010]. Da allerdings das Risiko des Eintrags von Influenza-A-Viren durch Wildvögel in Hausgeflügelbestände zum Zeitpunkt der Beprobung als gering eingeschätzt wurde [FLI, 2010b], wurde auch die Wahrscheinlichkeit eines positiven Nachweises des Erregers in die speziell geschützten sowie ungeschützten Flächen des vorliegenden Versuchs als sehr niedrig bewertet. Zusätzlich vermindert die geringe Sensitivität des Nachweises von Influenza-A-Viren in Bodenstaubproben die Aussicht auf einen erfolgreichen Erregernachweis. Aus diesem Grund wurde auf den Nachweis von Influenza-A-RNA verzichtet und ein erregernunabhängiger Marker, das mitochondriale Cytochrom *b*, eingesetzt.

2 Vergleich der netzgeschützten und ungeschützten Areale

Da bei Freilandhaltung von Hausgeflügel gegenüber der Stallhaltung ein erhöhtes Infektionsrisiko insbesondere durch Wildvögel [CONRATHS *et al.*, 2005; WERNER *et al.*, 2004] besteht, wurden speziell entwickelte netzgeschützte Flächen, die den direkten Kontakt zwischen Wildvögeln und Hausgeflügel verhindern, im Vergleich zur Freilandhaltung auf ihren allgemeinen Infektionsschutz hin untersucht.

2.1 Ermittlung des aviären Eintrags

2.1.1 Methodik

Weltweit treten immer wieder Infektionskrankheiten in Nutztierbeständen auf. Das Vorkommen von anzeigepflichtigen Tierseuchen zieht sogar oftmals die Durchführung staatlicher Maßnahmen nach sich, um eine Weiterverbreitung der Tierseuche zu verhindern [BMELV, 2011b]. Für die Geflügelhaltung sind Infektionen mit dem West-Nil-Virus, die Newcastle Disease, die niedrigpathogene aviäre Influenza bei einem gehaltenen Vogel und die Geflügelpest bedeutend [TierSeuchAnzV], welche zudem als Zoonose gelten [www.oie.de; WANG *et al.*, 2008]. Eine gesetzliche Konsequenz mit besonderer tierschutzrechtlicher Relevanz stellt die Aufstallungspflicht von Geflügel bei Auftreten der Aviären Influenza dar, welche in der Geflügelpest-Verordnung vorgeschrieben wird. Da allerdings eine Aufstallung von Geflügel, vor allem bei Betrieben, die nicht auf eine

dauerhafte Aufstallung ausgerichtet ist, die Entwicklung und Ausbreitung von Krankheiten innerhalb eines Bestandes durch Stress und Schwächung des Immunsystems der Tiere begünstigt [BICKHARDT, 1992; GROSS & SIEGEL, 1983], ist die Entwicklung einer tierschutzkonformen Alternative wünschenswert. Wäre es also möglich, mit der in dieser Studie speziell entwickelten Volierenkonstruktion das Infektionsrisiko von Wirtschaftsgeflügel deutlich zu minimieren, könnte die Aufstallungspflicht gelockert bzw. eventuell sogar gänzlich abgeschafft werden.

Organisches Material aviärer Herkunft als „Marker“ zur objektiven Einschätzung des allgemeinen Infektionsrisikos für Nutzgeflügel durch Wildvögel stellt einen neuen Versuchsansatz dar. Alle bisherigen Untersuchungen stützten sich auf den direkten bzw. indirekten Nachweis des AIV selbst, so auch in einem Forschungsprojekt, in welchem sich WERNER *et al.* [2004] bereits ebenfalls mit einer Abschätzung des Infektionsrisikos von Hausgeflügel in Freilandhaltung mit Aviärer Influenza durch Wildvögel befassten. Weiterhin wurden im Zuge von Wildvogelmonitoringprogrammen, welche nicht nur in Deutschland [PANNWITZ *et al.*, 2009; RABL *et al.*, 2009; STARICK *et al.*, 2008; WILKING *et al.*, 2009], sondern auch in den verschiedensten Ländern der ganzen Welt, so z.B. in Italien [CAPUA *et al.*, 2000; DE MARCO *et al.*, 2003], der Schweiz [DALESSI *et al.*, 2007], in Taiwan [CHENG *et al.*, 2010], im Iran [FEREIDOUNI *et al.*, 2010], in Japan [UCHIDA *et al.*, 2011], der Mongolei [SPACKMAN *et al.*, 2009], in China [KOU *et al.*, 2009] und vielen anderen Ländern, durchgeführt wurden, diverse Arten von Wildvögeln, insbesondere aber Wasservögel, auf das Vorkommen von sowohl LPAIV als auch HPAIV untersucht. Auch auf Märkten für Lebensmittel und für Lebendgeflügel, welche vor allem in den asiatischen Ländern weit verbreitet sind und von denen eine erhöhte Ansteckungsgefahr für den Menschen durch den engen Kontakt mit eventuell infizierten Tieren ausgeht [ZHOU *et al.*, 2009], wurden Untersuchungen durchgeführt, um einen Überblick über das von diesen Märkten ausgehende Risiko zu erhalten [AMONSIN *et al.*, 2008; CHOI *et al.*, 2005; NGUYEN *et al.*, 2005]. Eine weitere effektive Ergänzung zum aktiven Wildvogelmonitoring stellt, nach SINNECKER *et al.* [1982] sowie GLOBIG *et al.* [2009], die Nutzung von Sentinel-Enten, das sind „Wächtertiere“, welche Kontakt zu Wildvögeln haben sowie regelmäßig beprobt und auf Antikörper untersucht werden, in Regionen mit erheblichen Aufkommen von Wildvogelpopulationen dar. Neben den eben genannten Monitoringprogrammen wurden auch die Tests auf Aviäre Influenza bei Wirtschaftsgeflügel intensiviert [DALESSI *et al.*, 2007; LEE *et al.*, 2008; SPACKMAN *et al.*, 2009]. Anhand von in Deutschland gewonnenen Daten zeigten WILKING *et al.* [2009] durch die Evaluierung des Wildvogelmonitorings zur Risikoabschätzung bezüglich der Ausbreitung von HPAIV H5N1 in neue Regionen oder Geflügelhaltungen nach deren Einschleppung in die Wildvogelpopulation die Möglichkeiten

und Grenzen der Durchführung von Wildvogelmonitoringprogrammen auf. So können nur die extensive Übertragung des Virus sowie eine hohe Prävalenz zu einigen Zeitpunkten, für einige Spezies und einige Regionen, in denen kein HPAIV H5N1 auftrat, ausgeschlossen werden. Aufgrund der geringen Probenanzahl und der zum Teil ungezielten Beprobung ist die Wahrscheinlichkeit, infizierte Tiere zu erfassen, niedrig. Folglich ist nach WILKING *et al.* [2009] das aktive Monitoring nicht dazu geeignet, eine Übertragung zu detektieren bzw. auszuschließen. So müssten in Deutschland 318 Proben pro Tag, also 116.070 pro Jahr, getestet werden, um eine Prävalenz von HPAIV H5N1 in Wildvögeln von mehr als 1 % zu ermitteln. Tatsächlich wurden aber im Jahr 2006 lediglich 16.554 und im Jahr 2007 25.545 Tiere auf HPAIV H5N1 untersucht. Demnach bleibt der Einsatz eines zuverlässigen Monitoringsystems über einen langen Zeitraum mit begrenzten Ressourcen eine große Herausforderung [WILKING *et al.*, 2009].

Mikroorganismen und somit potenzielle Infektionserreger, wie das Aviäre Influenzavirus, kommen insbesondere an Staub gebunden vor (HARTUNG, 1986), wobei die Tiere selbst die Quelle sind (HARTUNG & WHYTE, 1994). Verlieren die Tiere also Exkrete, Hautschuppen oder Federn, stellen diese eine mögliche Trägersubstanz für Mikroorganismen dar. Gebunden an solche Partikel können sie über die Luft weiter verbreitet werden. Durch die Messung des organischen aviären Eintrags mittels molekularbiologischer Methoden kann infolgedessen eine Risikoeinschätzung abgegeben werden. Die in dieser Arbeit durchgeführte Risikobewertung erfolgte unter realitätsnahen Bedingungen, wobei lebendes Geflügel durch Hühnerattrappen ersetzt wurde. Diese Maßnahme stellte die Erfassung des nur von außen eingetragenen organischen Materials aviären Ursprungs sicher. Für die Durchführung desselben Versuchsansatzes mit Lebendgeflügel wäre eine Weiterentwicklung der PCR nötig, um die zusätzliche Erfassung der von der gehaltenen Geflügelart stammenden DNA zu vermeiden. Eine Möglichkeit hierfür wäre die Entwicklung eines Sondensystems, mit welchem alle relevanten Vogelarten mit Ausnahme der gehaltenen Geflügelart erfasst werden. Durch die geringe genetische Divergenz des mitochondrialen Cytochrom *b* innerhalb der Vogeltaxa [JOHNS & AVISE, 1998] erscheint dieses Gen auch für eine artenübergreifende Sonde geeignet. Die Wahl des Sequenzabschnitts, an dem die Sonde binden sollte, würde nach einem Alignment von Sequenzen diverser Vogelarten erfolgen [DOOLEY *et al.*, 2004]. Der Einsatz eines Sondensystems würde zusätzlich eine Quantifizierung ermöglichen [DOOLEY *et al.*, 2004; LÓPEZ-ANDREO *et al.*, 2005; ZHANG *et al.*, 2007]. Dadurch könnte bezüglich der Menge des aviären Eintrags eine genauere Aussage getätigt werden. Da allerdings, wie die Ergebnisse der Sequenzierung bereits gezeigt haben, innerhalb des gewählten Sequenzabschnitts des mitochondrialen Cytochrom *b* einige Unterschiede in der Sequenz

vorhanden sind, könnten bei dem Einsatz eines Sondensystems nicht mehr alle Vogelarten erfasst werden, was wiederum die Ergebnisse verfälschen würde.

Die Beprobung der Areale erfolgte mit Hilfe des Nass-/Trockensaugers A2701 der Firma Kärcher. Die Probennahme von Umweltproben mit einem Staubsauger fand bereits in anderen diversen Studien Verwendung. Hierbei wurde zumeist Hausstaub auf das Vorkommen unterschiedlicher Mikroorganismen mittels PCR untersucht (JARADAT *et al.*, 2009; KORTHALS *et al.*, 2008b; LIGNELL *et al.*, 2008; PITKÄRANTA *et al.*, 2008). Der Einsatz je eines Sets an Schläuchen und passender Turbobürste für jeweils ein Areal verhinderte eine Verschleppung von Material von einem Gehege in ein anderes. Es wäre zwar denkbar, dass nicht das gesamte Material, das bei einer Probennahme durch den Staubsaugerschlauch gesaugt wurde, bis in die Filtertüte gelangte, weil es sich in den Rillen des Schlauches festgesetzt hat. Dieses Material würde eventuell erst bei der nächsten Probennahme erfasst werden. Allerdings erfolgte diese mögliche Art der Verschleppung von Material innerhalb eines Areals. Somit ergäbe sich keine Fehlerquelle bei dem Vergleich der geschützten sowie ungeschützten Areale. Zudem handelte es sich in Anbetracht der insgesamt gewonnenen Menge je Probe um einen sehr geringen Anteil an Material und konnte somit als irrelevant betrachtet werden.

Umweltbedingungen wie Wind, Temperatur, Niederschlag und Sonnenschein beeinflussten die Probennahme sowie möglicherweise die Nachweisbarkeit des eingetragenen Materials aviären Ursprungs mittels PCR. So war bei Regen und Schnee die Beprobung der Areale nicht möglich und wurde auf den nächstmöglichen Zeitpunkt verschoben. Es ist denkbar, dass das bereits eingetragene organische aviäre Material durch Regen von der zu beprobenden Fläche wieder herausgewaschen wurde. Dies könnte vermieden werden, indem auch der Niederschlag, welcher auf die Versuchsflächen auftrifft, aufgefangen und in die Untersuchungen mit einbezogen wird. Allerdings wäre der bauliche sowie finanzielle Aufwand enorm. Des Weiteren wären am Beispiel von Viehhausen bei einem durchschnittlichen monatlichen Niederschlag von 60,63 l/m² [www.wetter-viehhausen.de] im Jahr 2010 bei zwei Flächen von jeweils 100 m² gewaltige Wassermengen für die nachfolgenden Analysen aufzubereiten. Die Einbeziehung des Niederschlags in die Untersuchungen stellt sich infolgedessen als nicht praktikabel dar. Die Wetterbedingungen konnten zwar von Standort zu Standort variieren, für die netzgeschützten sowie ungeschützten Areale innerhalb eines Standortes waren diese Faktoren allerdings identisch, weshalb sie für den Vergleich zwischen den beiden Arealen als vernachlässigbar anzusehen sind.

Bei insgesamt 177 Beobachtungen bei der Probennahme, sowie weiteren Beobachtungen im Winter, als keine Probennahme möglich war, die Barrieregehege dennoch auf ihre Intaktheit geprüft wurden, war nur ein einziges Mal ein Vogel im netzgeschützten Gehege auf dem Areal von E.ON vorzufinden. Andere Wildtiere wurden bei keiner Kontrolle innerhalb des netzgeschützten Systems an allen Standorten gesichtet. Dagegen konnten innerhalb der Freigehege hin und wieder das Vorkommen von Spuren, welche allerdings sehr undeutlich und somit keiner Tierart eindeutig zuzuordnen waren, verzeichnet werden. Am Versuchsstandort Viehhausen befand sich bei der Ankunft ein Feldhase im ungeschützten Areal. Diese Beobachtungen bestätigen die Funktionalität der Netze als Barriere gegenüber Wildtieren, insbesondere gegenüber Wildvögeln. Ein Netz mit einer kleineren Maschenweite als des hier genutzten Netzes mit einer Maschenweite von 2 cm x 2 cm, könnte das bereits sehr geringe Risiko eines eindringenden Vogels weiterhin minimieren. Ein Problem stellt dabei allerdings die Statik des Barriersystems dar, da sich die Kräfte, die bei Wind sowie Niederschlägen in Form von Regen oder Schnee auf das Netz wirken, durch die geringere Maschenweite verstärkt würden [WETZELL, 1981]. Zudem wäre der Investitionsbedarf sehr hoch und die spätere praktische Umsetzbarkeit im Hinblick auf die ökonomischen Gesichtspunkte erheblich beeinträchtigt.

Die positiv erzielten Ergebnisse des Cytochrom *b* Nachweises bestätigen die Stabilität der aviären genomischen DNA innerhalb der Zellen von Haut und Federn sowie in Faeces. So konnten unter anderem COOPER [1994] und PRINZINGER *et al.* [1997] von bis zu über 100 Jahre lang konservierten Vogelexemplaren aus Museen mitochondriale DNA aus Haut sowie Federn gewinnen. Allerdings unterliegt die DNA auch Prozessen der Degradation, welche stark von äußeren Faktoren abhängig ist. So führen hohe Temperaturen, viel Feuchtigkeit, saure bzw. stark alkalische pH-Werte sowie die Präsenz von Huminsäuren und Mikroorganismen zu einem schnelleren Abbau der DNA [BURGER *et al.*, 1999]. REGNAUT *et al.* [2006] untersuchten in ihren Studien die DNA-Degradation bei Kotproben aviären Ursprungs. Hierbei zeigte sich, dass bei feuchten Bedingungen enzymatische und biotische Faktoren die Hauptgründe für einen rasanten Abbau der DNA innerhalb von 24 Stunden darstellen. Dagegen bleibt die DNA-Qualität bei hydrolytischer und mikrobieller Behandlung auch nach 7 Tagen noch hoch. Aufgrund der in dieser Studie gewonnenen Ergebnisse geben REGNAUT *et al.* [2006] die Empfehlung, die gewonnenen Proben schnell nach deren Entnehmen zu trocknen, um dadurch eine nukleolytische Aktivität zu vermeiden. So ist es durchaus denkbar, dass bei ungünstigen Witterungsverhältnissen, insbesondere in den in die Versuchsareale eingetragenen Vogelfaeces, die genomische aviäre DNA degradiert, dadurch nicht mehr nachweisbar ist und infolgedessen zu falsch-negativen Ergebnissen führt. Durch einen kürzeren Abstand zwischen den einzelnen Probennahmen der jeweiligen

Areale könnte diese Fehlerquelle minimiert werden. Da aber Faeces nur ein Teil des aviären Eintrags ausmachen, die DNA-Qualität bei günstigen Verhältnissen über einen längeren Zeitraum hoch bleibt und die Durchführung der Beprobungen mit kürzeren Abständen aufgrund vollständig ausgelasteter Zeit- sowie Personalkapazitäten nicht möglich wäre, lässt sich der gewählte Probennahmezyklus von einer Woche nicht verkürzen. Wie bereits erwähnt, sollen die gewonnenen Proben, um eine Degradation der DNA zu vermeiden, schnell getrocknet werden [REGNAUT *et al.*, 2006]. Dies wurde in der vorliegenden Studie durch die sofortige Lyophilisierung des Probenmaterials gewährleistet. Die Eignung dieser Methode zur schonenden Trocknung unter gleichzeitigem Erhalt der DNA bestätigen Untersuchungen von SAHA *et al.* [1997]. Darin zeigten sie, dass trotz Gefriertrocknung eine hohe Konzentration von genomischer DNA gewonnen werden konnte. Dagegen führt die Lyophilisierung bei RNA zur kompletten Degradation [SAHA *et al.*, 1997]. Dies bestätigt die Instabilität von RNA gegenüber DNA, was wiederum den Ansatz der Risikobewertung durch Messung aviären Eintrags anhand des mitochondrialen Cytochrom *b* mit Hilfe molekularbiologischer Methoden im Gegensatz zum Nachweis der RNA von Influenza-A-Viren bestärkt. Weiterhin zeigten Untersuchungen von MITCHELL *et al.* [1968] einen Zerfall von Aviären Influenza-A-Stämmen innerhalb von 24 bis 36 Stunden, wenn diese als Aerosol vorliegen. Dagegen erfolgt der Zerfall humaner, porciner sowie equiner Influenza-A-Stämme zwischen 9 und 30 Stunden [MITCHELL & GUERIN, 1972]. Im Gegensatz zu den Ergebnissen von MITCHELL *et al.* [1968] gelingt bei SEDLMAIER *et al.* [2009] ein Nachweis von Influenza-A-Viren in Feinstaub auch noch nach 4 Tagen. Ebenso bleibt das Virus in Wasser und in feuchten Faeces bis zu 6 Tagen bei 37 °C detektierbar [WHO, 2004]. In unterschiedlichen Umweltproben konnte virale RNA auch noch bis zu 12 Tagen nach einem AI-Ausbruch in einer Geflügelhaltung nachgewiesen werden [VONG *et al.*, 2008].

Die starken Gewichts- und Volumenschwankungen der gewonnenen Proben innerhalb der einzelnen Areale an allen Standorten lassen sich z.B. durch Wind eingetragenes Material wie Blätter, Blütenstaub und Pflanzensamen sowie auf dem Kunstrasen aufzufindende Insekten, Käfer und Regenwürmer, aber auch durch die durch Regen bzw. Luftfeuchtigkeit stark schwankenden Wassergehalte dieser Substanzen erklären. Je größer der Umfang der Probe, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit, dass sich in dieser PCR-inhibierende Substanzen wie Huminsäuren aus dem Boden [TEBBE & VAHJEN, 1993] bzw. Polysaccharide aus Pflanzen [DEMEKE & ADAMS, 1992] befinden. Trotz des vermutlich hohen Gehalts an PCR-Inhibitoren blieb bei lediglich 3 % der insgesamt 708 untersuchten Proben die Amplifikation der IAC auch nach einem wiederholten Versuch aus. Das Nicht-Funktionieren in diesen Fällen könnte darauf zurückzuführen sein, dass bei der

DNA-Extraktion die Beseitigung von Huminsäuren und anderen Kontaminanten mit inhibitorischer Wirkung für die Durchführung der PCR nicht ausreichend funktioniert hat. Das negative Ergebnis der IAC sowohl bei dem Aliquot I als auch bei dem Aliquot II des geschützten Areals am Standort auf dem Gelände der Stadtwerke München vom 30.04.2010 könnte darauf zurückzuführen sein, dass bei beiden Stichproben durch die DNA-Extraktion die PCR-Inhibitoren nicht beseitigt werden konnten. Denkbar wäre allerdings auch, dass die gesamte Probe überaus viele Inhibitoren bzw. Substanzen, welche zu einer Degradation von DNA führen, enthält. Die zum Teil abweichenden Ergebnisse der beiden Stichproben innerhalb einer Probe könnten ebenfalls sowohl auf die Probengröße als auch auf deren Inhomogenität trotz gründlicher Pulverisierung und Vermischung der Feststoffe zurückzuführen sein. Diese zwei Faktoren könnten auch dafür verantwortlich sein, dass der optische aviäre Eintrag nur in 27 % der Fälle molekularbiologisch mit einem positiven PCR-Ergebnis bestätigt werden konnte. Ein Grund dafür könnte sein, dass aus der Probe nur ein sehr geringer Teil für die DNA-Extraktion entnommen wurde und deshalb das Ergebnis der darauffolgenden PCR von den sich zufällig in der entnommenen Stichprobe befindenden Partikeln abhängig ist. Für Analysen bereiten nach KLOCKENKÄMPER [1977] Pulvergemische bei der Probennahme die größten Probleme, da diese immer eine gewisse Inhomogenität aufweisen. Eine erhöhte Stichprobenzahl je Probe oder eine noch feinere Pulverisierung könnte die Repräsentanz der inhomogenen Analyseproben verbessern [KLOCKENKÄMPER, 1977].

Die Anwendung des molekularbiologischen Nachweises eines vogelspezifischen Gens könnte auch in anderen Forschungsgebieten eingesetzt werden. Interessant wäre unter anderem die Messung von Emissionen, insbesondere der luftgetragenen Feinstäube, aus Geflügelhaltungen. Diese Stäube werden überwiegend im Stall gebildet und bestehen aus unbelebten sowie belebten (z.B. Bakterien, Viren, Milben und Bestandteile biogenen Ursprungs wie Hautschuppen) Partikeln, welche in erheblichem Umfang mit der Abluft in die Stallumgebung geraten [HARTUNG, 1991; HILLIGER, 1991]. Solche luftgetragenen Feinstäube stehen im Verdacht, dass sie die Prävalenz gesundheitlicher Störungen, insbesondere der Atemwege und allergische Erkrankungen, erhöhen. Diverse Untersuchungen bestätigen eine nachbarschaftliche Exposition von Stallluftimmissionen, allerdings konnten bisher keine direkten nachteiligen Effekte auf die Gesundheit der Anwohner wissenschaftlich bestätigt werden [HINZ, 2005]. Um Konflikte zwischen den Anwohnern und den Betriebsleitern vorzubeugen bzw. beizulegen, könnte der quantitative molekularbiologische Nachweis eines vogelspezifischen Gens klären, inwieweit die Immissionen direkt aus dem benachbarten Betrieb stammen bzw. bis zu welchen Entfernungen die Anwohner möglicherweise betroffen sind. Bei Verwendung eines anderen

Genabschnittes des mitochondrialen Cytochrom *b*, z.B. einen für Schweine oder für Rinder spezifischen Genabschnitt, könnte die Anwendung dieser Methode für die Messung von Emissionen aus der Nutztierhaltung auch auf andere Produktionsrichtungen übertragen werden.

2.1.2 Dummyversuch

Wie die mit Hilfe des χ^2 -Unabhängigkeitstests durchgeführte statistische Auswertung der an allen Standorten gewonnenen Daten zeigt, besteht zwischen den geschützten und ungeschützten Arealen kein signifikanter Unterschied bezüglich des Eintrags organischen Materials aviären Ursprungs. Dass generell bei beiden Arealen an allen fünf Standorten ein gewisser Kontakt mit Wildvögeln stattgefunden hat, zeigen die positiven Ergebnisse sowohl der molekularbiologischen Methode als auch der makroskopischen Beurteilung der Flächen. So könnte der Eintrag von Hautschuppen, Federn oder Faeces in beide Versuchsflächen beim Überfliegen der Areale erfolgt sein. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass Vögel direkt in die Referenzflächen eingeflogen sind, um dort nach Futter, wie Regenwürmer oder Insekten, zu suchen. Im Gegensatz dazu könnten die Vögel auf den netzgeschützten Arealen das gespannte Netz als Sitzgelegenheit genutzt haben, so dass die aviären Partikel durch dieses auf den Kunstrasen gelangt sind. Weiterhin ist es denkbar, dass Wind organisches Material von Vögeln, welche sich in der Nähe der Versuchsareale befanden, in diese hineingeweht hat. Wie bereits erwähnt, könnte durch eine Erhöhung der Anzahl an Stichproben die Repräsentanz der inhomogenen Analyseproben optimiert werden [KLOCKENKÄMPER, 1977]. Da allerdings der errechnete χ^2 -Wert für alle Proben zusammen mit 0,21 deutlich geringer ist als die χ^2 -Werte der I-Aliquots, II-Aliquots, sowie für den optischen aviären Eintrag im Einzelnen, ist davon auszugehen, dass der χ^2 -Wert für eine höhere Stichprobenzahl tendenziell weiter gegen Null strebt.

2.2 Tiergesundheit und Überlebensrate

Die Legeleistung ist neben der Beurteilung des Allgemeinzustands des Tieres ein guter Parameter für die Gesundheit von Legehennen. Hierbei ist allerdings zu beachten, dass die Legeleistung nicht nur vom Gesundheitszustand des Tieres, sondern auch von weiteren Faktoren wie Futter- und Tränkwasserversorgung, Futtermittel, Rasse sowie dem jeweiligen Haltungssystem beeinflusst wird [HÖRNING, 2008, LEYDENDECKER *et al.*, 2001; REDMANN & LÜDERS, 2005]. In der vorliegenden Arbeit spielen diese Faktoren aber keine Rolle, da sie, mit Ausnahme des Wetters, an allen Standorten identisch waren. Auch der Einfluss des Wetters kann hier vernachlässigt werden, da an den jeweiligen Standorten

beide Gehegeformen denselben Wetterbedingungen ausgesetzt waren. Dies ermöglicht einen objektiven Vergleich der zwei getesteten Haltungssysteme.

Die Legeleistung von Hühnern in Freilandhaltung ist häufig niedriger als die von Tieren in Käfighaltung [LEYDENDECKER *et al.*, 2001; WEIß *et al.*, 2005]. Dies könnte an einer erhöhten Bewegungsaktivität der Hühner in Freilandhaltung und dem damit einhergehenden Energieverlust für die Eiproduktion liegen. Weitere Gründe hierfür stellen nach TÜLLER *et al.* [1999] auch eine bessere Herdengesundheit sowie eine Optimierung von Hygiene und Stallklima in konventioneller Käfighaltung dar. In der vorliegenden Arbeit konnte ein Trend zu einer besseren Legeleistung von Tieren in Freilandhaltung gegenüber Tieren in Volierenhaltung aufgezeigt werden. Dies könnte durch eine geringere Bewegungsaktivität der Hühner in Freilandhaltung aufgrund des nicht vorhandenen Schutzes vor Raubtieren verursacht worden sein, wodurch mehr Energie für die Eiproduktion zur Verfügung stand. So haben Beobachtungen in dieser Studie gezeigt, dass sich die Hühner in Volierenhaltung öfter weiter von ihrem Stall entfernten. Die Hühner im ungeschützten Gehege dagegen befanden sich zumeist im Stall oder direkt am Schlupfloch des Stalls. Auch ein Vergleich von ökologischen Betrieben mit konventionellen Betrieben mit alternativen Haltungssystemen zeigt eine deutlich geringere Legeleistung bei ökologischer Bewirtschaftung [HÖRNING & AIGNER, 2003]. Dies könnte durch eine erschwerte Abdeckung des Aminosäurebedarfs anhand der nur wenigen zugelassenen Eiweißkomponenten mitbedingt sein [ACHILLES, 2009; HÖRNING & AIGNER, 2003]. Dadurch erklären sich auch die zu den Angaben der Firma Lohmann Tierzucht GmbH etwas abweichenden Ergebnisse bezüglich der Legeleistung. So gibt die Firma Lohmann Tierzucht GmbH für die hier verwendete Legehennenrasse LSL (White Leghorn) eine Legeleistung von ca. 6 Eiern pro Tier und Woche in alternativer Haltung an (www.ltz.de). In der vorliegenden Arbeit dagegen wurde eine etwas geringere Leistung von 5,28 Eiern pro Huhn und Woche in Volierenhaltung und 5,41 Eiern pro Huhn und Woche in Freilandhaltung erreicht. Zwischenzeitlich sinkende Leistungen, wie sie unter anderem am Geflügelhof Halder in Hoßkirch ab der 13. Experimentwoche und am Laeisenhof in Ferschweiler in der 16. Experimentwoche vorzufinden waren, sind wahrscheinlich von äußeren Faktoren, insbesondere wetterbedingt, hervorgerufen worden. Diese Vermutung wird dadurch bekräftigt, dass die Leistung in beiden Gehegeformen zur selben Zeit abnahm. Zudem war ein plötzlicher starker Abfall der Lufttemperatur zu verzeichnen, welcher zu Einbrüchen der Legeleistung führen kann [BRADE *et al.*, 2008; SAHIN *et al.*, 2002]. So maß die Wetterstation Leutkirch-Herlazhofen (ca. 50 km von Hoßkirch entfernt) am 7.10.2009 eine Temperatur von 24 °C, wohingegen am 15.10.2009 nur noch 3 °C gemessen werden konnten. Nicht ganz so große, dennoch deutliche Temperaturunterschiede wurden von der Wetterstation Spangdahlem (ca. 25 km von Ferschweiler entfernt) aufgezeichnet. So betrug die Höchsttemperatur am 28.10.2009

noch 13 °C, am 11.11.2009 nur noch 4 °C (www.wetteronline.de). Schwankungen in der Legeleistung an allen Standorten könnten auch durch andere Faktoren verursacht worden sein. So traten in beiden Haltungsformen bakterielle Durchfallerkrankungen, Verletzungen der Ständer sowie Kannibalismus auf, welche ebenfalls zu einer reduzierten Legeleistung führen können [HOLLE *et al.*, 2008; NIEBHUR *et al.*, 2006]. Sind solche Gesundheitsprobleme stark ausgeprägt, können auch Tierverluste die Folge sein. In Studien von HOLLER *et al.* [2008] werden als häufigste Abgangsursachen Erdrücken und Kannibalismus genannt. Auch GAYER *et al.* [2004] geben in alternativen Haltungssystemen Tierverluste von 3,3 % bis 36,8 % an. Die Hauptursachen stellten dort Infektionskrankheiten und Kannibalismus dar, wobei insbesondere in Freilandhaltung vermehrt Tiere mit Darmparasiten und bakteriellen Erkrankungen auftraten. Zusätzliche Verluste entstanden im Freiland durch Raubwild. Ein ähnliches Ergebnis lieferten die in dieser Arbeit gewonnenen Untersuchungen. Die größten Verluste waren hier, trotz Unterschlupfmöglichkeiten für die Hühner, durch gewaltsamen Tod durch Raubtiere, in den ungeschützten Arealen zu verzeichnen. Insbesondere am Laeisenhof in Ferschweiler wird dies durch die sehr hohen Tierverluste von 76 % des Ausgangsbestands deutlich, welche ausschließlich durch Raubtiere verursacht worden waren. Im Vergleich dazu ging der Tierbestand innerhalb des Untersuchungszeitraums im geschützten Areal lediglich um 24 % zurück.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass die speziell entwickelten netzgeschützten Flächen den direkten Kontakt zwischen Wildtieren, insbesondere Wildvögeln, und Hausgeflügel nahezu verhindern. Dies wird vor allem durch die Tierverluste durch Greifvögel in den Freigehegen ersichtlich. Unter Berücksichtigung des Jagderfolgs unterschiedlicher europäischer Greifvögel von etwa 5 % bei Habicht, 11 % bei Sperber sowie Wanderfalke bis hin zu 20 % bei Fischadler [HANTGE, 1980] wird deutlich, dass weit mehr Kontakte zwischen Hausgeflügel und Wildvögeln stattgefunden haben muss, als durch die Tierverluste zu erkennen sind. Da Wildvögel als mögliche Vektoren oder Reservoir für nutztierrelevante Infektionskrankheiten, z.B. Chlamydiose, infektiöse Bursitis sowie Aviäre Influenza, gelten [ZIEDLER *et al.*, 1995], diese Infektionsquelle aber durch die Unterbindung des direkten Kontakts weitestgehend ausgeschaltet wird, sinkt infolgedessen das Infektionsrisiko für Hausgeflügel. Der organische Eintrag wird erwartungsgemäß nicht vermindert. Ungeachtet dessen scheint im Bezug auf die Aviäre Influenza nach WERNER *et al.* [2004] die Eintragung von Influenza-A-Viren durch Wildvögel in Bestände mit Freilandhaltung ein eher seltenes Ereignis zu sein, wobei hühnerhaltende Betriebe weniger gefährdet sind als Betriebe mit Enten- bzw. Gänsehaltung. Grund hierfür ist das höhere Erkrankungsrisiko von Enten und Gänsen gegenüber Hühnern. Auch das FLI schätzt in seiner Bewertung vom Oktober 2011 das Risiko des Eintrags von HPAIV durch Wildvögel in Hausgeflügelbestände

als gering ein [FLI, 2011b]. Nach einem Ausbruch der niedrig pathogenen Form der Aviären Influenza mit dem Subtyp H5N2 in Limburg, Niederlande, im März 2012, wurde allerdings die Stallhaltung von Geflügel im grenznahen Raum von dem Kreisveterinäramt Viersen, Nordrhein-Westfalen, nahe der Grenze zur Niederlande, empfohlen [www.aho.de; www.oie.int]. Ein weiterer positiver Effekt des Einsatzes eines Barriersystems sind die deutlich minimierten Tierverluste durch Raubtiere, wodurch zusätzlich der ökonomische Schaden eines Betriebs reduziert wird.

F Zusammenfassung

Die hochpathogene Form der Aviären Influenza ist weltweit für die Keulung unzähliger Tiere und die damit einhergehenden enormen wirtschaftlichen Verluste in der Geflügelindustrie verantwortlich. Infolge des seit 2003 kursierenden, durch das HPAIV H5N1 verursachten, massiven Seuchengeschehens wurde die Freilandhaltung für Geflügel vorübergehend verboten, um eine mögliche Infektion der Nutztiere durch Wildtiere zu verhindern. Dieses Verbot führte häufig zu einer oft artwidrigen Tierhaltung, welche die Tiere stresst, ihr Immunsystem schwächt und somit die Entstehung und Ausbreitung von Krankheiten innerhalb eines Bestandes begünstigt. Weiterhin ist die Aufstallungspflicht nicht nur tierschutzrechtlich in Frage zu stellen, sondern in der ökologischen Geflügelproduktion auch zusätzlich für einen Imageverlust verantwortlich. Um das Infektionsrisiko von Hausgeflügel durch Wildtiere, insbesondere durch Wildvögel, zu objektivieren, sollte in der vorliegenden Arbeit unter Feldbedingungen beurteilt werden, inwieweit speziell entwickelte netzgeschützte Flächen im Vergleich zur Freilandhaltung einen allgemeinen Infektionsschutz für Geflügel bieten.

Eine objektive Einschätzung des bestehenden Infektionsrisikos erfolgte durch die Erfassung des gesamten aviären Eintrags in netzgeschützte und entsprechende ungeschützte Referenzflächen mit einer Größe von je 10 m x 10 m mittels Endpunkt-PCR. Diese waren mit Kunstrasen ausgelegt, mit Hühnerattrappen ausgestattet und befanden sich an fünf verschiedenen, von Vögeln intensiv genutzten Standorten in Bayern. Die Beprobung fand wöchentlich statt. Zusätzlich wurde eine optische Bewertung der Areale bezüglich makroskopisch sichtbarer aviärer Bestandteile wie Vogelfaeces und Federn durchgeführt. Anschließend erfolgte die statistisch vergleichende Auswertung der gewonnenen Ergebnisse. Begleitend dazu wurde, in Zusammenarbeit mit dem Institut für Biologische Sicherheitsforschung GmbH sowie dem Institut für Medizinische Mikrobiologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, ein Parallelversuch mit Sentinelherden durchgeführt. Dieser diente ebenfalls der Überprüfung der Infektionssicherheit. Die Erfassung von Legeleistung und Verlustraten beider Gehegeformen sollte Rückschlüsse auf Tiergesundheit und Schutz vor Raubtieren sowie Greifvögeln ermöglichen.

Organisches Material aviärer Herkunft als Marker zur objektiven Einschätzung des allgemeinen Infektionsrisikos für Nutzgeflügel durch Wildvögel stellt einen neuen Versuchsansatz dar. Mittels real-time PCR wurden unterschiedliche Sequenzabschnitte des Federkeratins sowie ein Sequenzabschnitt des mitochondrialen Cytochrom *b* auf die Spezifität für Vögel getestet. Aufgrund der daraus gewonnenen Ergebnisse wurde mit dem Sequenzabschnitt des mitochondrialen Cytochrom *b* weitergearbeitet. Allerdings stellte sich

der Einsatz einer real-time PCR als ungeeignet dar. Ein Grund hierfür sind kleine Differenzen im Genom von Wildvögeln, welche zu unterschiedlichen Schmelzkurven führen und die Verifizierung des gesuchten PCR-Produkts anhand der Schmelzkurvenanalyse verhindern. Weiterhin entstehen bei der Anwendung bei Feldproben unspezifische Produkte, welche sowohl eine Quantifizierung verhindern als auch durch Fluoreszenzanstieg zu falsch-positiven Ergebnissen führen. Aus diesem Grund wurden für die Erfassung des aviären Eintrags die insgesamt 354 gewonnenen Proben im Doppelansatz mittels Endpunkt-PCR auf das Vorkommen des vogelspezifischen Sequenzabschnitts des mitochondrialen Cytochrom *b* untersucht. Die zusätzlich entwickelte kompetitive IAC gewährleistete den Ausschluss von falsch-negativen Ergebnissen.

Die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen und mit Hilfe des χ^2 -Tests analysierten Ergebnisse zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den geschützten und ungeschützten Arealen im Bezug auf den aviären Eintrag. Dagegen konnte ein Trend zu einer besseren Legeleistung der Tiere in den ungeschützten Arealen beobachtet werden. Auch wenn der organische aviäre Eintrag durch die speziell entwickelten netzgeschützten Flächen nicht signifikant vermindert wird, wird dennoch der direkte Kontakt zwischen Wildtieren, insbesondere Wildvögeln, und Hausgeflügel nahezu verhindert. Da Wildvögel als mögliche Vektoren oder Reservoirs für nutztierrelevante Infektionserreger gelten, diese Infektionsquelle aber durch die Unterbindung des direkten Kontakts weitestgehend ausgeschaltet wird, sinkt infolgedessen das Infektionsrisiko für Hausgeflügel. Zudem führt dieses Barriersystem zu deutlich minimierten Tierverlusten durch Raubtiere. Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass Volierenhaltung das Infektionsrisiko minimiert und zusätzlich einen bedeutenden Beitrag hinsichtlich des Schutzes vor Raubtieren und Greifvögeln leistet.

G Summary

The highly pathogenic form of avian influenza is responsible for the global culling of countless animals and, as a consequence, of huge economic losses in the poultry industry. Due to the massive pestilential occurrence of the HPAIV H5N1 since 2003, the free-range living of poultry was prohibited temporarily in order to prevent an infection of livestock by wild animals. This prohibition often led to an inappropriate animal husbandry because it stresses the animals, weakens their immune system and thus promotes the development and spread of diseases within a population. Furthermore, the obligation to keep all poultry inside is not only a question of the animal protection law but also responsible for an image loss in organic poultry production. To objectify the risk of infection of poultry by wild animals, especially by wild birds, the present study aimed to evaluate to what extent specially protected areas offer a general infection protection for poultry compared to free-range husbandry under field conditions.

An objective assessment of the current risk of infection was made by detection of the entire avian input into areas protected by nets and into unprotected reference areas with a size of 10 m x 10 m by using endpoint PCR. These areas were covered with artificial turf and equipped with chicken dummies. They were located at five different sites intensively frequented by birds in Bavaria, Germany. The sampling was conducted weekly from December 2008 until June 2010. In addition, the areas were visually checked for macroscopically visible avian components such as feces and feathers. The results were statistically compared. Concomitantly, a parallel experiment with sentinel herds was conducted in collaboration with the Institute of Biosafety Research GmbH and the Institute of Medical Medicine of the Martin-Luther-University Halle-Wittenberg. This research also served to verify the infection protection. Egg production and loss rates of both aviary systems were recorded to draw conclusions about animal health and protection against predators and birds of prey.

Using organic material of avian origin as a marker is a new approach for the objective assessment of the general risk of infection for farmed poultry by wild birds. Via real-time PCR different segments of sequences of feather keratin gene as well as a segment of sequence of mitochondrial cytochrome *b* were tested for avian specificity. Because of the obtained results the segment of sequence of mitochondrial cytochrome *b* was used for the further investigations. However, the use of real-time PCR was inappropriate. One reason is that small differences are present in the genome of wild birds, which lead to various melting curves and render the verification of the desired PCR product based on the melting curve analysis impossible. Furthermore, the application in field samples results in unspecific

products, which either prevents the quantification or leads to false-positive results because of the increase of fluorescence. For this reason, for the detection of the avian input a total of 354 samples was analyzed in duplicates via endpoint PCR screening for the presence of a bird-specific sequence of the mitochondrial cytochrome *b*. A competitive intern amplification control was developed to exclude false-negative results.

The results of this study, which were analyzed by the χ^2 -test, exhibited no significant differences between protected and unprotected areas considering the avian input. In contrast, a trend to a better laying performance of the animals was observed in the unprotected reference areas. Even if the input of organic avian material is not significantly reduced by the specially developed net protected areas, the direct contact between wild animals, especially between wild birds and poultry, is still almost prevented. Wild birds are considered to be potential vectors or reservoirs for infectious agents however, this source of infection is mostly abrogated by the prevention of direct contact. Thus, the risk of infection for poultry is reduced. Moreover, this barrier system leads to clearly minimized animal losses by predators. These results indicate that aviaries reduce the risk of infection and make an important contribution in terms of protection against predators and birds of prey.

H Literaturverzeichnis

Aaij C. & Borst P. (1972):

The gel electrophoresis of DNA
Biochimica et Biophysica Acta 269: 192–200

Abdulmawjood A., Roth S. & Bülte M. (2002):

Two methods for construction of internal amplification controls for the detection of *Escherichia coli* O157 by polymerase chain reaction
Molecular and Cellular Probes 16: 335-339

Achilles W. (2009):

Legehennen in Bodenhaltung - Erfahrungen aus der Praxis
<http://www.ktbl.de/index.php?id=551> (Stand: 04.01.2012)

Achilles W., Hörning B., Höfner M., Trei G. & Fölsch D. (2002):

Auslaufhaltung von Legehennen
KTBL-Arbeitspapier 279
Kuratorium für Technik und Bauwesen in der Landwirtschaft e.V., Darmstadt: 68

Alexander D. J. (2000):

A review of avian influenza in different bird species
Veterinary Microbiology 74: 3-13

Alexander D. J. (2007):

An overview of the epidemiology of avian influenza
Vaccine 25: 5637–5644

Alexander D. J. & Brown I. H. (2009):

History of highly pathogenic avian influenza
Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics) 28(1): 19-38

Al Faress S., Cartet G., Ferraris O., Norder H., Valette M. & Lina B. (2005):

Divergent genetic evolution of hemagglutinin in influenza A H1N1 and A H1N2 subtypes isolated in the south-France since the winter of 2001–2002
Journal of Clinical Virology 33: 230–236

Ali S. M. (2010):

Fleisch aus der Perspektive der Welternährung
Books on Demand, Norderstedt, 1. Auflage

Allende L. M., Rubio I., Ruís-del-Valle V., Guillén J., Martínez-Laso J., Lowy E., Varela P., Zamora J. & Arnaiz-Villena A. (2001):

The old world sparrows (genus *Passer*) phylogeography and their relative abundance of nuclear mtDNA pseudogenes
Journal of Molecular Evolution 53: 144–154

Amonsin A., Choatrakol C., Lapkuntod J., Tantilertcharoen R., Thanawongnuwech R., Suradhat S., Suwannakarn K., Theamboonlers A. & Poovorawan Y. (2008):

Influenza virus (H5N1) in live bird markets and food markets, Thailand
Emerging Infectious Diseases 14(11): 1739-1742

Assaad F. A., Brès P., Chi-Ming C., Dowdle W. R., Kendal A. P., Kilbourne E. D., Lam Sai Kit, Milouchine V., Nejmi S., Noble G., Oya A., Palese P., Schild G. C., Scholtissek G., Skehel J. J., Webster R. G. & Yakhno M. (1980):

A revision of the system of nomenclature for influenza viruses: a WHO memorandum
Bulletin of the World Health Organization 58(4): 585-591

Aymard M., Ferraris O., Gerentes L., Jolly J. & Kessler N. (2003):

Neuraminidase assays
Developments in Biologicals 115: 75-83

Beach R. H. & Zhen C. (2009):

Consumer purchasing behavior in response to media coverage of avian influenza
http://ageconsearch.umn.edu/bitstream/51742/2/Beach-Zhen_IAAE_Consumer%20Response%20HPAI.pdf (Stand: 06.07.2011)

Becker-Follmann J. & Baas D. (2004):

PCR – Eine Methode, drei Schritte
BIOspektrum 1: 1-4

Beer M., Depner K., Haas B., Harder T., Schirrmeier H., Starick E., Staubach C., Teifke J. P., Werner O. & Ziller M. (2006):

Institut für Virusdiagnostik: Ringtests zur Labordiagnose anzeigepflichtiger Tierseuchen
Friedrich-Loeffler-Institut; Bundesforschungsinsitut für Tiergesundheit; Jahresbericht 2005: 33-39
http://www.fli.bund.de/fileadmin/dam_uploads/Jahresberichte/2005/de/FLI-Jahresbericht_2005.pdf (Stand: 12.09.2011)

Bender R. & Lange S. (2001):

Die Vierfeldertafel
Deutsche Medizinische Wochenschrift 126(15): T 36–T 38

Bengis R. G., Leighton F. A., Fischer J. R., Artois M., Mörner T. & Tate C. M. (2004):

The role of wildlife in emerging and re-emerging zoonoses
Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics) 23(2): 497-511

Benson D. P. (2002):

Low extra-pair paternity in white-tailed ptarmigan
The Condor 104(1): 192–197

Bickhardt K. (1992):

Kompendium der Allgemeinen Inneren Medizin und Pathophysiologie für Tierärzte
Verlag Parey, Berlin, Hamburg, S. 97-100

BLE (2011):

Warenzeichen der Verbände
<http://www.oekolandbau.de/verbraucher/wissen/einsteigerfragen/wie-erkenne-ich-biolebensmittel/warenzeichen-der-verbaende/#> (Stand: 12.09.2011)

BMELV (2007):

Richtlinie des Bundesministeriums für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz über Mittel und Verfahren für die Durchführung der Desinfektion bei anzeigepflichtigen Tierseuchen (323-35130/0001, Stand Februar 2007); (Desinfektionsrichtlinie)

BMELV (2011a):

Meldepflichtige Tierkrankheiten

<http://www.bmelv.de/SharedDocs/Standardartikel/Landwirtschaft/Tier/Tiergesundheit/MeldepflichtigeTierseuchen.html> (Stand: 08.03.2012)

BMELV (2011b):

Anzeigepflichtige Tierseuchen

<http://www.bmelv.de/SharedDocs/Standardartikel/Landwirtschaft/Tier/Tiergesundheit/AnzeigepflichtigeTierseuchen.html> (Stand: 08.03.2012)

BMELV (2012):

Pressemitteilung Nr. 93 vom 29.03.12: 86 Prozent aller Legehennen in Boden-, Freiland- und Öko-Haltung

<http://www.bmelv.de/SharedDocs/Pressemitteilungen/2012/93-Legehennen.html>

Böhm R. (2002):

Grundlagen der Reinigung und Desinfektion

In: STRAUCH D. & BÖHM R. (Hrsg.): Reinigung und Desinfektion in der Nutztierhaltung und Veredelungswirtschaft

Enke-Verlag, Stuttgart, 2. Auflage

Borst P. (2005):

Ethidium DNA agarose gel electrophoresis: how it started

IUBMB Life 57(11): 745–747

Bosé M., Le Gouar P., Arthur C., Lambourdière J., Choisy J. P., Henriquet S., Lecuyer P., Richard M., Tessier C. & Sarrazin F. (2007):

Does sex matter in reintroduction of griffon vultures *Gyps fulvus*?

Oryx 41(4): 503-508

Brade W., Flachowsky G. & Schrader L. (2008):

Legehuhnzucht und Eierzeugung; Empfehlungen für die Praxis

Johann Heinrich von Thünen-Institut; Bundesforschungsinstitut für Ländliche Räume, Wald und Fischerei (vTI); Sonderheft 322

Braid M. D., Daniels L. M. & Kitts C. L. (2003):

Removal of PCR inhibitors from soil DNA by chemical flocculation

Journal of Microbiological Methods 52: 389–393

Brown J. D., Goekjian G., Poulson R., Valeika S. & Stallknecht D. E. (2009):

Avian influenza virus in water: infectivity is dependent on pH, salinity and temperature

Veterinary Microbiology 136: 20–26

Brush A. H. (1996):

On the origin of feathers

Journal of Evolutionary Biology 9(2): 131-142

Burger J., Hummel S., Herrmann B. & Henke W. (1999):

DNA preservation: A microsatellite-DNA study on ancient skeletal remains

Electrophoresis 20(8): 1722–1728

Bustin S. A., Benes V., Garson J. A., Hellemans J., Huggett J., Kubista M., Mueller R., Nolan T., Pfaffl M. W., Shipley G. L., Vandesompele J. & Wittwer C. T. (2009):

The MIQE Guidelines: Minimum Information for publication of Quantitative real-time PCR Experiments

Clinical Chemistry 55(4): 611–622

- Capua I., Grossele B., Bertoli E. & Cordioli P. (2000):**
Monitoring for highly pathogenic avian influenza in wild birds in Italy
Veterinary Record 147(22): 640
- Capua I. & Marangon S. (2006):**
Control of avian influenza in poultry
Emerging Infectious Diseases 12(8): 1319–1324
- Capua I. & Mutinelli F. (2001):**
Low pathogenicity (LPAI) and highly pathogenic (HPAI) avian influenza in turkeys and chicken
In: CAPUA I. & MUTINELLI F. (Hrsg.): *A Colour Atlas and Text on Avian Influenza*
Papi Editore, Bologna: 13-20
- Centanni E. & Savonuzzi E. (1901):**
La peste aviara
La Clinica Veterinaria (Milano) 24: 292-326
- Chen W., Calvo P. A., Malide D., Gibbs J., Schubert U., Bacik I., Basta S., O'Neill R., Schickli J., Palese P., Henklein P., Bennink J. R. & Yewdell J. W. (2001):**
A novel influenza A virus mitochondrial protein that induces cell death
Nature Medicine 7(12): 1306-1312
- Chen H., Smith G. J. D., Zhang S. Y., Qin K., Wang J., Li K. S., Webster R. G., Peiris J. S. M. & Guan Y. (2005):**
H5N1 virus outbreak in migratory waterfowl
Nature 436: 191-192
- Cheng M. C., Lee M. S., Ho Y. H., Chyi W. L. & Wang C. H. (2010):**
Avian influenza monitoring in migrating birds in Taiwan during 1998–2007
Avian Diseases 54(1): 109-114
- Choi Y. K., Seo S. H., Kim J. A., Webby R. J. & Webster R. G. (2005):**
Avian influenza viruses in Korean live poultry markets and their pathogenic potential
Virology 332(2): 529–537
- Clavijo A., Tresnan D. B., Jolie R. & Zhou E.-M. (2002):**
Comparison of embryonated chicken eggs with MDCK cell culture for the isolation of swine influenza virus
The Canadian Journal of Veterinary Research 66: 117-121
- Conraths F. J., Werner O., Methner U., Geue L., Schulze F., Hänel I., Sachse K., Hotzel H., Schubert E., Melzer F. & Mettenleiter T. C. (2005):**
Konventionelle und alternative Haltungssysteme für Geflügel – Infektionsmedizinische Gesichtspunkte –
Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift 118(5/6): 186-204
- Cooper A. (1994):**
Ancient DNA sequences reveal unsuspected phylogenetic relationships within New Zealand wrens (*Acanthisittidae*)
Experientia 50: 558-563
- Dalessi S., Hoop R. & Engels M. (2007):**
The 2005/2006 avian influenza monitoring of wild birds and commercial poultry in Switzerland
Avian Diseases 51(s1): 355–358

Damme K. (2006):

Beratungsempfehlungen zum Aufstellungsgebot von Geflügel
http://www.stmelf.bayern.de/landwirtschaft/tier/14349/linkurl_1_19_0_1.pdf
(Stand: 06.07.2011)

Denman S. & McSweeney C. (2005):

Quantitative (real-time) PCR
In: MAKKAR H. & MCSWEENEY C. (Hrsg.): Methods in Gut Microbial Ecology for Ruminants
Springer, Niederlande: 105-115

Danuser B. (2000):

Respiratorische Gesundheitsrisiken bei Arbeiten mit Hühnern
Pneumologie 54: 37–42

Degli Esposti M., De Vries S., Crimi M., Ghelli A., Patarnello T. & Meyer A. (1993):

Mitochondrial cytochrome b: evolution and structure of the protein
Biochimica et Biophysica Acta 1143: 243–271

De Marco M. A., Foni E., Campitelli L., Raffini E., Delogu M. & Donatelli I. (2003):

Long-term monitoring for avian influenza viruses in wild bird species in Italy
Veterinary Research Communications 27 Suppl. 1: 107–114

Demeke T. & Adams R. P. (1992):

The effects of plant polysaccharides and buffer additives on PCR
Biotechniques 12: 332–334

Destatis (2011):

Land- und Forstwirtschaft, Fischerei; Geflügel 2010; Fachserie 3 Reihe 4.2.3
<http://www.destatis.de/jetspeed/portal/cms/Sites/destatis/Internet/DE/Content/Publikationen/Fachveroeffentlichungen/LandForstwirtschaft/ViehbestandTierischeErzeugung/Gefluegel2030423107004,property=file.pdf> (Stand: 30.05.2011)

Dieffenbach C. W., Lowe T. M. & Dveksler G. S. (1993):

General concepts for PCR primer design
Genome Research 3: S30-S37

Dineen S. M., Aranda IV R., Dietz M. E., Anders D. L. & Robertson J. M. (2010):

Evaluation of commercial RNA extraction kits for the isolation of viral MS2 RNA from soil
Journal of Virological Methods 168: 44–50

Dong D., Yan A., Liu H., Zhang X. & Xu, Y.: (2006):

Removal of humic substances from soil DNA using aluminium sulfate
Journal of Microbiological Methods 66: 217–222

Dooley J. J., Paine K. E., Garrett S. D. & Brown H. M. (2004):

Detection of meat species using TaqMan real-time PCR assays
Meat Science 68(3): 431–438

Dreier J., Stormer M. & Kleesiek K. (2005):

Use of bacteriophage MS2 as an internal control in viral reverse transcription-PCR assays
Journal of Clinical Microbiology 43: 4551–4557

Dybkaer K., Munch M., Handberg K. J. & Jørgensen P. H. (2004):

Application and evaluation of RT-PCR–ELISA for the nucleoprotein and RT-PCR for detection of low-pathogenic H5 and H7 subtypes of avian influenza virus
Journal of Veterinary Diagnostic Investigation 16: 51–56

Eberhard J. R. & Bermingham E. (2004):

Phylogeny and biogeography of the *Amazona Ochrocephala* (Aves: *Psittacidae*) complex
The Auk 121(2): 318-332

Elbers A. R. W., Koch G. & Bouma A. (2005):

Performance of clinical signs in poultry for the detection of outbreaks during the avian influenza A (H7N7) epidemic in the Netherlands in 2003
Avian Pathology 34(3): 181-187

FAO (2011):

H5N1 highly pathogenic avian influenza - monthly global overview
<http://www.fao.org/docrep/014/al860e/al860e00.pdf> (Stand: 29.06.2011)

Fereidouni S. R., Starick E., Grund C., Globig A., Mettenleiter T. C., Beer M. & Harder T. (2009):

Rapid molecular subtyping by reverse transcription polymerase chain reaction of the neuraminidase gene of avian influenza A viruses
Veterinary Microbiology 135(3-4): 253–260

Fereidouni S. R., Werner O., Starick E., Beer M., Harder T. C., Aghakhan M., Modirrousta H., Amini H., Moghaddam M. K., Bozorghmehrifard M. H., Akhavadegan M. A., Gaidet N., Newman S. H., Hammoumi S., Cattoli G., Globig A., Hoffmann B., Sehati M. E., Masoodi S., Dodman T., Hagemeyer W., Mousakhani S. & Mettenleiter T. C. (2010):

Avian influenza virus monitoring in wintering waterbirds in Iran, 2003-2007
Virology Journal 7:43 doi:10.1186/1743-422X-7-43
<http://www.virologyj.com/content/7/1/43> (Stand: 26.05.2011)

FLI (2005):

Klassische Geflügelpest (Hochpathogene Form der Aviären Influenza)
http://www.bmelv.de/SharedDocs/Downloads/Landwirtschaft/Tier/Tiergesundheit/Tierseuchen/Vogelgrippe/InformationsblattGefluegelhalterFLI.pdf;jsessionid=8CD9F82B5F1A7815228E200D249539C1.2_cid238?__blob=publicationFile (Stand: 19.04.2012)

FLI (2010a):

Amtliche Methodensammlung, Stand: Juli 2010
http://www.fli.bund.de/fileadmin/dam_uploads/Publikationen/Methodensammlung_2010-07-07.pdf (Stand: 30.12.2010)

FLI (2010b):

Bewertung des Risikos zur neuerlichen Einschleppung sowie zum Auftreten von hochpathogenem aviären Influenzavirus (HPAIV H5N1) in Hausgeflügelbestände in der Bundesrepublik Deutschland
http://www.fli.bund.de/fileadmin/dam_uploads/tierseuchen/Rb_AI_100202.pdf (Stand: 11.02.2010)

FLI (2011a):

LPAl-Geschehen; Ausbruch der niedrigpathogenen aviären Influenza (LPAl) in Nordrhein-Westfalen

http://www.fli.bund.de/no_cache/de/startseite/aktuelles/tierseuchengeschehen/lpai-geschehen.html (Stand: 28.06.2011)

FLI (2011b):

Bewertung des Risikos der Einschleppung sowie des Auftretens von hochpathogenem aviären Influenzavirus des Subtyps H5N1 (HPAIV H5N1) in Geflügelbeständen in der Bundesrepublik Deutschland

http://www.fli.bund.de/fileadmin/dam_uploads/tierseuchen/Gefluegelpest/HPAI_H5N1_Qualitative_Risk_Assessment20111006.pdf (Stand: 23.04.2012)

Fouchier R. A. M., Munster V., Wallensten A., Bestebroer T. M., Herfst S., Smith D., Rimmelzwaan G. F., Olsen B. & Osterhaus A. D. M. E. (2005):

Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls

Journal of Virology 79(5): 2814-2822

Gallaher W. R. (2009):

Towards a sane and rational approach to management of influenza H1N1 2009

Virology Journal 6:51 doi:10.1186/1743-422X-6-51

<http://www.virologyj.com/content/6/1/51> (Stand: 26.05.2011)

Gayer P., Damme K., Hildebrand R.-A., Lippmann J. & Reichardt W. (2004):

Alternative Legehennenhaltung

Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft (LfL), 1. Auflage

Giese M., Harder T. C., Teifke J. P., Klopffleisch R., Breithaupt A., Mettenleiter T. C. & Vahlenkamp T. W. (2008):

Experimental infection and natural contact exposure of dogs with avian influenza virus (H5N1)

Emerging Infectious Diseases 14(2): 308-310

Glenn T. C., French J. O., Heincelman T. J., Jones K. L. & Sawyer R. H. (2008):

Evolutionary relationships among copies of feather beta (β) keratin genes from several avian orders

Integrative and Comparative Biology 48(4): 463-475

Globig A., Baumer A., Revilla-Fernández S., Beer M., Wodak E., Fink M., Greber N., Harder T. C., Wilking H., Brunhart I., Matthes D., Kraatz U., Strunk P., Fiedler W., Fereidouni S. R., Staubach C., Conraths F. J., Griot C., Mettenleiter T. C. & Stärk K. D. C. (2009):

Ducks as sentinels for avian influenza in wild birds

Emerging Infectious Diseases 15(10): 1633-1636

Goldhammer F. & Hartig J. (2008):

Interpretation von Testresultaten und Testeichung

In: MOOSBRUGGER H. & KALETA A. (Hrsg.): Testtheorie und Fragebogenkonstruktion

Springer Medizin Verlag, Heidelberg: 165-192

Gregg K. & Rogers G. E. (1986):

Feather keratin: composition, structure and biogenesis

In: BEREITER-HAHN J., MALTLLOTSY A. G. & RICHARDS K. S. (Hrsg.): Biology of the integument, Vol. 2. Vertebrates

Springer-Verlag, New York: 666-694

Gross W. B. & Siegel H. S. (1983):

Evaluation of the heterophil lymphocyte ratio as a measure of stress in chickens
Avian Dis. 27, 972-979

Grund C. & Küblböck R. (2011):

Newcastle Disease – Kolloquium in Dresden
Der LabLöffler 5: 21-22

Haas W. (2009):

Influenza – Prävention, Diagnostik, Therapie und öffentliche Gesundheit
Urban & Fischer Verlag, München, 1. Auflage

Hampson A. W. & Mackenzie J. S. (2006):

The influenza viruses
The Medical Journal of Australia 185(10): 39-43

Hantge E. (1980):

Untersuchungen über den Jagderfolg mehrerer europäischer Greifvögel
Journal für Ornithologie 121(2): 200-207

Harbers M. & Kahl G. (2012):

Tag-based Next Generation Sequencing
Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 1. Auflage

Harder T., Globig A., Werner O., Unger F., Staubach C. & Kramer M. (2006):

Geflügelpest (Aviäre Influenza)
Friedrich-Loeffler-Institut; Tiergesundheitsjahresbericht 2005: 40-43
http://www.fli.bund.de/fileadmin/dam_uploads/Jahresberichte/TG-JB/TGJB_2005.pdf
(Stand: 28.06.2011)

Harder T. & Schoene C. (2010):

Aviäre Influenza - Avian influenza
Friedrich-Loeffler-Institut; Tiergesundheitsjahresbericht 2010: 38-42
http://www.fli.bund.de/fileadmin/dam_uploads/Jahresberichte/TG-JB/TGJB_2009.pdf
(Stand: 28.06.2011)

Harder T., Schoene C. U. R., Wilking H., Teuffert J., Beer M., Starick E., Grund C., Conraths F. J., Unger F., Gethmann J., Globig A. & Staubach C. (2008):

Geflügelpest (Hochpathogene Aviäre Influenza) – Highly pathogenic avian influenza
Friedrich-Loeffler-Institut; Tiergesundheitsjahresbericht 2007: 53-62
http://www.fli.bund.de/fileadmin/dam_uploads/Jahresberichte/TG-JB/TGJB_2007.pdf
(Stand: 28.06.2011)

Harder T. C., Teuffert J., Starick E., Gethmann J., Grund C., Fereidouni S., Durban M., Bogner K.-H., Neubauer-Juric A., Repper R., Hlinak A., Engelhardt A., Nöckler A., Smietanka K., Minta Z., Kramer M., Globig A., Mettenleiter T. C., Conraths F. J. & Beer M. (2009):

Highly pathogenic avian influenza virus (H5N1) in frozen duck carcasses, Germany, 2007
Emerging Infectious Diseases 15(2): 272-279

Hartung J. (1986):

Odour prevention and control of organic sludge and livestock farming
In: Nielsen V. C., Voorburg J. H. (Hrsg.): Odour prevention and control of organic sludge and livestock farming [Proceedings of a round-table seminar, Silsoe, UK, 15-19 April 1985] Elsevier, London: 321–32

Hartung J. (1991):

Luftverunreinigungen in der Nutztierhaltung
In: Aigner K. & Muhar F. (Hrsg.): Lunge und Landwirtschaft. Proc. 12. Workshop Lunge Umwelt Arbeitsmedizin, 1.-2. März 1991, Linz/Donau. Atemwegs- und Lungenkrh. 17 (1991); 1. Beiheft, B4-B8

Hartung J. & Whyte R. T. (1994):

Erfassung und Bewertung von Luftverunreinigungen in der Nutztierhaltung
Atemwegs- und Lungenkrankheiten 20: 17–25

Hebert P. D., Stoeckle M. Y., Zemlak T. S. & Francis C. M. (2004):

Identification of birds through DNA barcodes
PLoS Biology 2(10): e312

Hilliger H. G. (1991):

Emissionen von Staub und Keimen aus Ställen
Deutsche Tierärztliche Wochenschrift 98: 257-261

Hinz, T (2005):

Wechselbeziehung zwischen Nutztierhaltung und Umwelt
In: KTBL (Hrsg.): Luftgetragene biologische Belastungen und Infektionen am Arbeitsplatz Stall, Darmstadt: 151-156

Hörning B. & Aigner S. (2003):

Rinder- und Legehennenzucht: Status Quo im Bio-Landbau
Ökologie & Landbau 128(4): 14-17

Hörning B. (2008):

Auswirkungen der Zucht auf das Verhalten von Nutztieren
Kassel University Press, 1. Auflage: 37-40

Hoffmann B., Depner K., Schirrmeier H. & Beer M. (2006):

A universal heterologous internal control system for duplex real-time RT-PCR assays used in a detection system for pestiviruses
Journal of Virological Methods 136: 200-209

Holle R., Müller-Arnke I., Rahmann G., Oppermann R. & Schuhmacher U. (2008):

Tiergesundheitspläne in der Ökologischen Legehennenzucht
In: RAHMANN G. & SCHUHMACHER U. (Hrsg.): Praxis trifft Forschung: Neues aus der ökologischen Tierhaltung 2008
Johann Heinrich von Thünen-Institut; 1. Auflage: 143-162
<http://orgprints.org/17032/> (Stand: 04.01.2012)

Holzappel B. & Wickert L. (2007):

Die quantitative real-time-PCR (qRT-PCR). Methoden und Anwendungsgebiete
Biologie in unserer Zeit 37(2): 120-126

Hoorfar J., Malorny B., Abdulmawjood A., Cook N., Wagner M. & Fach P. (2004):

Practical considerations in design of internal amplification controls for diagnostic PCR assays
Journal of Clinical Microbiology 42(5): 1863-1868

Horimoto T. & Kawaoka Y. (2005):

Influenza: lessons from past pandemics, warnings from current incidents
Nature Reviews Microbiology 3(8): 591-600

ICTVdB MANAGEMENT (2006a):

00.046.0.01. Influenzavirus A

In: BÜCHEN-OSMOND C. (Hrsg.): ICTVdB - The Universal Virus Database
Columbia University, New York, USA, Version 4**ICTVdB Management (2006b):**

01.048.1. Paramyxovirinae

In: BÜCHEN-OSMOND C. (Hrsg.): ICTVdB - The Universal Virus Database
Columbia University, New York, USA, Version 4**Idaghdour Y., Broderick D. & Korrida A. (2003):**

Faeces as a source of DNA for molecular studies in a threatened population of great bustards

Conservation Genetics 4(6): 789–792

Interessengemeinschaft Sperber (IGS) (2008):

Der Sperber in Deutschland

Books on Demand GmbH, Norderstedt

Ito T., Okazaki K., Kawaoka Y., Takada A., Webster R. G. & Kida H. (1995):

Perpetuation of influenza A viruses in Alaskan waterfowl reservoirs

Archives of Virology 140: 1163–1172

Jaradat Z. W., Ababneh Q. O., Saadoun I. M., Nawal A Samara N. A. & Rashdan A. M. (2009):Isolation of *Cronobacter* spp. (formerly *Enterobacter sakazakii*) from infant food, herbs and environmental samples and the subsequent identification and confirmation of the isolates using biochemical, chromogenic assays, PCR and 16S rRNA sequencing
BMC Microbiology, 9:225; doi:10.1186/1471-2180-9-225**Jin X. W. & Mossad S. B. (2005):**

Avian influenza: an emerging pandemic threat

Cleveland Clinic Journal of Medicine 72(12): 1129-1134

Johns G. C. & Avise J. C. (1998):A comparative summary of genetic distances in the vertebrates from the mitochondrial cytochrome *b* gene

Molecular Biology and Evolution 15(11): 1481–1490

Kaaden O.-R. (2002):

Viruskrankheiten der Tiere

In: MAYR A. (Hrsg.): Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre
Enke Verlag, Stuttgart, 7. Auflage: 145-375**Kabir S., Rajendran N., Amemiya T. & Itoh K. (2003):**

Real-time quantitative PCR assay on bacterial DNA: in a model soil system and environmental samples

Journal of General and Applied Microbiology 49: 101-109

Kavanagh I., Jones G. & Nayab S. N. (2011):

Significance of controls and standard curves in pcr

In: KENNEDY S. & OSWALD N. (Hrsg.): PCR Troubleshooting and Optimization: The Essential Guide

Caister Academic Press, Norfolk, United Kingdom: 67-78

Kawaoka Y., Cox N. J., Haller O., Hongo S., Kaverin N., Klenk H.-D., Lamb R. A., McCauley J., Palese P., Rimstad E. & Webster R. G. (2005):

Orthomyxoviridae

In: FAUQUET C. M., MAYO M. A., MANILOFF J., DESSELBERGER U. & BALL L. A. (Hrsg.): 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

Kawasaki E. (1989):

Amplification of RNA sequences via complementary DNA (cDNA)
Amplifications 3: 4-6

Kemp D. J. & Rogers G. E. (1972):

Differentiation of avian keratinocytes: characterization and relationship of the keratin proteins of adult and embryonic feathers and scales
Biochemistry 11(6): 969–975

Klockenkämper R. (1977):

Über die Repräsentanz von inhomogenen Analysenproben
Fresenius' Journal of Analytical Chemistry 285(5): 345-352

Kohn M., Knauer F., Stoffella A., Schröder W. & Pääbo S. (1995):

Conservation genetics of the European brown bear – a study using excremental PCR of nuclear and mitochondrial sequences
Molecular Ecology 4: 95–103

Korthals M., Ege M., Lick S., Von Mutius E. & Bauer J. (2008):

Occurrence of *Listeria* spp. in mattress dust of farm children in Bavaria
Environmental Research 107: 299-304

Korthals M., Ege M. J., Tebbe C. C., von Mutius E. & Bauer J. (2008):

Application of PCR-SSCP for molecular epidemiological studies on the exposure of farm children to bacteria in environmental dust
Journal of Microbiological Methods 73: 49–56

Kou Z., Li Y., Yin Z., Guo S., Wang M., Gao X., Li P., Tang L., Jiang P., Luo Z., Xin Z., Ding C., He Y., Ren Z., Cui P., Zhao H., Zhang Z., Tang S., Yan B., Lei F. & Li T. (2009):

The survey of H5N1 flu virus in wild birds in 14 provinces of china from 2004 to 2007
PLoS ONE 4(9): e6926

Kruger D. H., Schneck P. & Gelderblom H. R. (2000):

Helmut Ruska and the visualisation of viruses
The Lancet 355(9216): 1713-1717

Kuske C. R., Banton K. L., Adorada D. L., Stark P. C., Hill K. K. & Jackson P. J. (1998):

Small-scale DNA sample preparation method for field PCR detection of microbial cells and spores in soil
Applied and Environmental Microbiology 64(7): 2463-2472

Larionov A., Krause A. & Miller W. (2005):

A standard curve based method for relative real time PCR data processing
BMC Bioinformatics 6:62; doi:10.1186/1471-2105-6-62

Lee Y.-J., Choi Y.-K., Kim Y.-J., Song M.-S., Jeong O.-M., Lee E.-K., Jeon W.-J., Jeong W., Joh S.-J., Choi K.-S., Her M., Kim M.-C., Kim A., Kim M.-J., Lee E. H., Oh T. G., Moon H.-J., Yoo D.-W., Kim J.-H., Sung M.-H., Poo H., Kwon J.-H. & Kim C.-J. (2008):

Highly pathogenic avian influenza virus (H5N1) in domestic poultry and relationship with migratory birds, South Korea
Emerging Infectious Diseases 14(3): 487-490

Lei X., Yin Z., Lian Z., Chen C., Dai C., Krištín A. & Lei F. (2010):

Phylogenetic relationships of some *Sylviidae* species based on complete mtDNA cyt b and partial COI sequence data
Chinese Birds 1(3): 175–187

Le Gouar P., Rigal F., Boisselier-Dubayle M. C., Sarrazin F., Arthur C., J. Choisy P., Hatzofe O., Henriquet S., Lécuyer P., Tessier C., Susic G. & Samadi S. (2008):

Genetic variation in a network of natural and reintroduced populations of Griffon vulture (*Gyps fulvus*) in Europe
Conservation Genetics 9(2): 349–359

Leschnik M., Weikel J., Möstl K., Revilla-Fernández S., Wodak E., Bagó Z., Vanek E., Benetka V., Hess M. & Thalhammer J. G. (2007):

Subclinical infection with avian influenza A (H5N1) virus in cats
Emerging Infectious Diseases 13(2): 243-247

Leyendecker M., Hamann H., Hartung J., Kamphues J., Ring C., Glünder G., Ahlers C., Sander I., Neumann U. & Distl O. (2001):

Analyse von Genotyp-Umwelt-Interaktionen zwischen Legehennenhybriden und Haltungssystemen in der Legeleistung, Eiqualität und Knochenfestigkeit. 1.Mitteilung: Legeleistungsmerkmale
Züchtungskunde 73: 290-307

Lignell U., Meklin T., Rintala H., Hyvärinen A., Vepsäläinen A., Pekkanen J. & Nevalainen A. (2008):

Evaluation of quantitative PCR and culture methods for detection of house dust fungi and streptomycetes in relation to moisture damage of the house
Letters in Applied Microbiology 47: 303–308

Lindh E., Huovilainen A., Ratti O., Ek-Kommonen C., Sironen T., Huhtamo E., Poysa H., Vaheri A. & Vapalahti O. (2008):

Orthomyxo-, paramyxo- and flavivirus infections in wild waterfowl in Finland
Virology Journal 5:35; doi:10.1186/1743-422X-5-35

López-Andreo M., Lugo L., Garrido-Pertierra A., Prieto M. I. & Puyet A. (2005):

Identification and quantitation of species in complex DNA mixtures by real-time polymerase chain reaction
Analytical Biochemistry 339(1): 73–82

Lydeard C. & Roe K. J. (1997):

The phylogenetic utility of the mitochondrial cytochrome *b* gene for inferring relationships among Actinopterygian fishes
In: KOCHER T. D. & STEPIEN C. A. (Hrsg.): Molecular systematics of fish
Academic Press, New York: 285–303

Mammen U. & Stubbe M. (2005):

Zur Lage der Greifvögel und Eulen in Deutschland 1999–2002
Vogelwelt 126: 53-65

Matrosovich M. N., Klenk H.-D. & Kawaoka Y. (2006):

Receptor specificity, host-range and pathogenicity of influenza viruses
In: KAWAOKA Y. (Hrsg.): Influenza virology: current topics
Caister Academic Press, Wymondham, England: 95-137

Matsunaga T., Chikuni K., Tanabe R., Muroya S., Shibata K., Yamada J. & Shinmura Y. (1999):

A quick and simple method for the identification of meat species and meat products by PCR assay
Meat Science 51(2): 143-148

Mettenleiter T. C. (2011):

Bewertung des Risikos zur neuerlichen Einschleppung sowie zum Auftreten von hochpathogenem aviären Influenzavirus (HPAIV H5N1) in Hausgeflügelbestände in der Bundesrepublik Deutschland
http://www.fli.bund.de/fileadmin/dam_uploads/tierseuchen/Risikobewertung%20H5N1%20Virus%20in%20deutschen%20Gefl%C3%BCgelbest%C3%A4nden%20vom%2017.02.2011.pdf (Stand: 29.06.2011)

Meyer A. (1994):

Shortcomings of the cytochrome *b* gene as a molecular marker
Trends in Ecology and Evolution 9: 278–280

Mishra N. (2011):

Emerging influenza A/H1N1: challenges and development
The Health 2(1): 16-22

Mitchell C. A. & Guerin L. F. (1972):

Influenza A of human, swine, equine and avian origin: comparison of survival in aerosol form
Canadian Journal of Comparative Medicine 36: 9–11

Mitchell C. A., Guerin L. F. & Robillard J. (1968):

Decay of influenza A viruses of human and avian origin
Canadian Journal of Comparative Medicine 32: 544–546.

Mitschke A., Flade M. & Schwarz J. (2010):

Bestandstrends häufiger Brutvögel in Deutschland 1990-2008
In: SUDFELDT C., DRÖSCHMEISTER R., LANGGEMACH T. & WAHL J. (Hrsg.): Vögel in Deutschland – 2010
DDA, BfN, LAG VSW, Münster: 40-41

Miura T., Masago Y., Sano D. & Omura T. (2011):

Development of an effective method for recovery of viral genomic RNA of environmental silty sediments for quantitative molecular detection
Applied and Environmental Microbiology 77(12): 3975-3981

Modrow S., Falke D. & Truyen U. (2003):

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

Moore W. S. & DeFilippis V. R. (1997):

The window of taxonomic resolution for phylogenies based on mitochondrial cytochrome *b*

In: MINDELL D. P. (Hrsg.): Avian molecular evolution and systematic
Academic Press, New York: 83–119

Moré M. I., Herrick J. B., Silva M. C., Ghiorse W. C. & Madsen E. L. (1994):

Quantitative cell lysis of indigenous microorganisms and rapid extraction of microbial DNA from sediment

Applied and Environmental Microbiology 60(5): 1572–1580

Moresco K. A., Stallknecht D. E. & Swayne D. E. (2009):

Evaluation and optimization of avian embryos and cell culture methods for efficient isolation and propagation of avian influenza viruses

International Symposium on Avian Influenza

<http://www.fao.org/docs/eims/upload/259677/ak101e00.pdf> (Stand: 10.02.2011)

Morgan J. A. T., Morris G. M., Wlodek B. M., Byrnes R., Jenner M., Constantinoiu C. C., Anderson G. R., Lew-Tabor A. E., Molloy J. B., Gasser R. B. & Jorgensen W. K. (2009):

Real-time polymerase chain reaction (PCR) assays for the specific detection and quantification of seven *Eimeria* species that cause coccidiosis in chickens

Molecular and Cellular Probes 23: 83–89

Moritz C., Dowling T. E. & Brown W. M. (1987):

Evolution of animal mitochondrial DNA: relevance for population biology and systematics
Annual Review of Ecology and Systematics 18: 269–292

Mu J. E., McCarl B. A., Wu X. & Gan L. (2011):

Climate change influences on the risk of avian influenza outbreaks and associated economic loss

Agricultural and Applied Economics Association; 2011 Annual Meeting, July 24-26, 2011, Pittsburgh, Pennsylvania

<http://purl.umn.edu/103637> (Stand: 15.06.2011)

Müller H. (2006):

Biologie der Influenzaviren

Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift 119(3/4): 91-100

Müller F.-M. C., Werner K. E., Kasai M., Francesconi A., Chanock S. J. & Walsh T. J. (1998):

Rapid extraction of genomic DNA from medically important yeasts and filamentous fungi by high-speed cell disruption

Journal of Clinical Microbiology 36(6): 1625-1629

Nguyen D. C., Uyeki T. M., Jadhao S., Maines T., Shaw M., Matsuoka Y., Smith C., Rowe T., Lu X., Hall H., Xu X., Balish A., Klimov A., Tumpey T. M., Swayne D. E., Huynh L. P. T., Nghiem H. K., Nguyen H. H. T., Hoang L. T., Cox N. J. & Katz J. M. (2005):

Isolation and characterization of avian influenza viruses, including highly pathogenic H5N1, from poultry in live bird markets in Hanoi, Vietnam, in 2001

Journal of Virology 79(7): 4201–4212

Nickel R., Schummer A. & Seifele E. (1992):

Lehrbuch der Anatomie der Haustiere, Band V, Anatomie der Vögel

Verlag Paul Parey, Berlin, Hamburg, 2. Auflage

Niebuhr K., Zaludik K., Gruber B., Thenmaier I., Lugmair A., Baumung R. & Troxler J. (2006):

Untersuchungen zum Auftreten von Kannibalismus und Federpicken in alternativen Legehennenhaltungen in Österreich -Empfehlungen für die Praxis
Ländlicher Raum; Online-Fachzeitschrift des Bundesministeriums für Land- und Forstwirtschaft, Umwelt und Wasserwirtschaft
<http://www.laendlicher-raum.at/filemanager/download/16807/> (Stand: 04.01.2012)

Noyce J. O., Michels H. & Keevil C. W. (2007):

Inactivation of influenza A virus on copper versus stainless steel surfaces
Applied and Environmental Microbiology 73(8): 2748–2750

O'Guin W. M., Knapp L. W. & Sawyer R. H. (1982):

Biochemical and immunohistochemical localization of alpha and beta keratin in avian scutate scales
The Journal of Experimental Zoology 220: 371-376

OIE (2002):

Disease card: highly pathogenic avian influenza
http://www.oie.int/eng/maladies/fiches/a_a150.htm (Stand: 31.12.2010)

OIE (2012):

General disease information sheets: West Nile Fever
http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Media_Center/docs/pdf/Disease_cards/WNV-EN.pdf (Stand: 08.03.2012)

Olsen B., Munster V. J., Wallensten A., Waldenström J., Osterhaus A. D. M. E. & Fouchier R. A. M. (2006):

Global patterns of influenza A virus in wild birds
Science 312: 384-388

Oppermann R., Rahmann G. & Schumacher U. (2009):

Wo steht der Ökologische Landbau heute mit Blick auf zentrale Forderungen der Tierschützer und den tierethischen Diskurs in unserer Gesellschaft?
In: RAHMANN G. & SCHUMACHER U. (Hrsg.): Neues aus der Ökologischen Tierhaltung 2009: 7-20

Otto C. (1980):

Zur Nutzung einer Auslauffläche durch Legehybriden
In: 6. Europäische Geflügelkonferenz, Hamburg, Band 6: 183-190

Pallen M. J., Puckey L. H. & Wren B. W. (1992):

A rapid, simple method for detecting PCR failure
PCR Methods and Applications 2: 91-92

Pannwitz G., Wolf C. & Harder T. (2009):

Active surveillance for avian influenza virus infection in wild birds by analysis of avian fecal samples from the environment
Journal of Wildlife Diseases 45(2): 512–518

Pasick J., Handel K., Robinson J., Copps J., Ridd D., Hills K., Kehler H., Cottam-Birt C., Neufeld J., Berhane Y. & Czub S. (2005):

Intersegmental recombination between the haemagglutinin and matrix genes was responsible for the emergence of a highly pathogenic H7N3 avian influenza virus in British Columbia
Journal of General Virology 86: 727-731

Pereira S. L. & Baker A. J. (2006a):

A molecular timescale for galliform birds accounting for uncertainty in time estimates and heterogeneity of rates of DNA substitutions across lineages and sites
Molecular Phylogenetics and Evolution 38(2): 499–509

Pereira S. L. & Baker A. J. (2006b):

A mitogenomic timescale for birds detects variable phylogenetic rates of molecular evolution and refutes the standard molecular clock
Molecular Biology and Evolution 23(9): 1731–1740

Pérez L. J., Díaz de Arce H., Cilloni F., Salviato A., Marciano S., Perera C. L., Salomoni A., Beato M. S., Romero A., Capua I. & Cattoli G. (2012):

An SYBR Green-based real-time RT-PCR assay for the detection of H5 hemagglutinin subtype avian influenza virus
Molecular and Cellular Probes, doi:10.1016/j.mcp.2012.02.001

Perroncito E. (1878):

Epizoozia tifoide nei gallinacei
Annali Accademia Agricoltura Torino 21: 87-126

Peter B. (2006):

Die Vogelgrippe bei Vögeln
<http://www.dr-bernhard-peter.de/Apotheke/Influenza/voegel.htm> (Stand: 20.03.2011)

Phipps L. P., Essen S. C. & Brown I. H. (2004):

Genetic subtyping of influenza A viruses using RT-PCR with a single set of primers based on conserved sequences within the HA2 coding region
Journal of Virological Methods 122(2): 119–122

Pitkäranta M., Meklin T., Hyvärinen A., Paulin L., Auvinen P., Nevalainen A. & Rintala H. (2008):

Analysis of fungal flora in indoor dust by ribosomal DNA sequence analysis, quantitative PCR and culture
Applied and Environmental Microbiology 74(1): 233–244

Poland G. A., Jacobson R. M. & Targonski P. V. (2007):

Avian and pandemic influenza: an overview
Vaccine 25: 3057–3061

Pontiroli A., Travis E. R., Sweeney F. P., Porter D., Gaze W. H., Mason S., Hibberd V., Holden J., Courtenay O. & Wellington E. M. H. (2011):

Pathogen quantitation in complex matrices: a multi-operator comparison of DNA extraction methods with a novel assessment of PCR inhibition
PLoS ONE 6(3) e17916

Prinzinger R., Kleim J. P., Schroth W. & Schierwater B. (1997):

DNA sequence analysis of mitochondrial cyt-b and the species status of *Laniarius dubiosus* (Rchw. 1899)
Journal für Ornithologie 138: 291-296.

Proença-Módena J. L., Macedo I. S. & Arruda E. (2007):

H5N1 avian influenza virus: an overview
The Brazilian Journal of Infectious Diseases 11(1): 125-133

- Qu W., Jiang G., Cruz Y., Chang C. J., HO G. Y. F., Klein R. S., & Burk R. D. (1997):**
PCR detection of human papillomavirus: comparison between MY09/MY11 and GP51/GP61 primer systems
Journal of Clinical Microbiology 35(6): 1304–1310
- Rabl S., Rinder M., Neubauer-Juric A., Bogner K. H., Korbel R. & Büttner M. (2009):**
Surveillance of wild birds for avian influenza A virus (AIV) in Bavaria in the years 2007 and 2008
Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift 122(11/12): 486-493
- Rådström P., Knutsson R., Wolffs P., Lövenklev M. & Löfström C. (2004):**
Pre-PCR processing - strategies to generate PCR-compatible samples
Molecular Biotechnology 26(2): 133-146
- Rådström P., Löfström C., Lövenklev M., Knutsson R. & Wolffs P. (2003):**
Strategies for overcoming PCR inhibition
In: DIEFENBACH C. W. & DVEKSLER (Hrsg.): PCR primer: a laboratory manual
Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA: 149-161
- Redmann T. & Lüders H. (2005):**
Managementfehler
In: SIEGMANN O. & NEUMANN U. (Hrsg.): Kompendium der Geflügelkrankheiten
Schlütersche Verlagsgesellschaft mbH & Co. KG, 6., aktualisierte und erweiterte Ausgabe, Hannover: 335-338
- Regnaut S., Lucas F. S. & Fumagalli L. (2006):**
DNA degradation in avian faecal samples and feasibility of non-invasive genetic studies of threatened capercaillie populations
Conservation Genetics 7: 449–453
- Ririe K. M., Rasmussen R. P. & Wittwer C. T. (1997):**
Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction
Analytical Biochemistry 245(2): 154–160
- Rodriguez-Lecompte J. C., Sekhar S. & Joseph T. (2011):**
Zoonotic implications of avian and swine influenza
In: KRAUSE D. & HENDRICK S. (Hrsg.): Zoonotic Pathogens in the Food Chain
Cab Intl; 1. Auflage: 182-196
- Roth G. (2010):**
Der Weg zu den Wirbeltieren
In: ROTH G. (Hrsg.): Wie einzigartig ist der Mensch?
Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
- Sachadyn P. & Kur J. (1998):**
The construction and use of a PCR internal control
Molecular and Cellular Probes 12: 259-262
- Saha S., Callahan F. E., Dollar D. A. & Creech J. B. (1997):**
Cotton improvement - Effect of lyophilization of cotton tissue on quality of extractable DNA, RNA and protein
Journal of Cotton Science 1: 10-14

Sahin N., Onderci M. & Sahin K. (2002):

Effects of dietary chromium and zinc on egg production, egg quality, and some blood metabolites of laying hens reared under low ambient temperature
Biological Trace Element Research 85: 47-58

Salzborn C. (2007):

Panik statt Vorsorge: Der Umgang mit dem Risiko „Vogelgrippe“ und die Auswirkungen auf die Tiere
In: FINK-KESSLER A., SCHNEIDER M. & STODIEK F. (Hrsg.): Landwirtschaft 2007. Der kritische Agrarbericht: Schwerpunkt Agro-Gentechnik
ABL Bauernblatt Verlag, München: 206-210

Sawyer R. H. & Knapp L. W. (2003):

Avian skin development and the evolutionary origin of feathers
Journal of Experimental Zoology (Molecular and Developmental Evolution) 298B: 57–72

Saxena S. K., Mishra N., Saxena R., Swamy M. L. A., Sahgal P., Saxena S., Tiwari S., Mathur A. & Nair M. P. (2010):

Structural and antigenic variance between novel influenza A/H1N1/2009 and influenza A/H1N1/2008 viruses
Journal of Infection in Developing Countries 4(1): 1-6

Schäfer W. (1955):

Vergleichende sero-immunologische Untersuchungen über die Viren der Influenza und klassischen Geflügelpest
Zeitschrift für Naturforschung 10(b): 81–91

Schoene C., Harder T., Wilking H., Staubach C., Kramer M., Teuffert J. & Beer M. (2009):

Aviäre Influenza – Avian influenza
Friedrich-Loeffler-Institut; Tiergesundheitsjahresbericht 2008: 34-38
http://www.fli.bund.de/fileadmin/dam_uploads/Jahresberichte/TG-JB/TGJB_2008.pdf
(Stand: 28.06.2011)

Scholtissek C. (1985):

Stability of infectious influenza A viruses to treatment at low pH and heating
Archives of Virology 85: 1-11

Schumacher U. (2001):

Rechtliche Rahmenbedingungen
In: BAUMANN W., SCHUHMACHER U. & DEERBERG F. (Hrsg.): Ökologische Hühnerhaltung – Stallbaukonzepte
Bioland Verlags GmbH, Mainz: 14-29

Schwabenbauer K. (2006):

Die Vogelgrippe – bedroht sie die Welt?
Entwicklung & Ländlicher Raum 5: 5-7

Sedlmaier N., Hoppenheidt K., Krist H., Lehmann S., Lang H. & Büttner M. (2009):

Generation of avian influenza virus (AIV) contaminated fecal fine particulate matter (PM_{2.5}): Genome and infectivity detection and calculation of immission
Veterinary Microbiology 139: 156–164

Senne D. A., Panigrahy B., Kawaoka Y., Pearson J. E. Suss J., Lipkind M., Kida H. & Webster R.G. (1996):

Survey of haemagglutinin (HA) cleavage site sequence of H5 and H7 avian influenza viruses: amino acid at the HA cleavage site as a marker of pathogenicity potential
Avian Diseases 40: 425–437

Siebert P. D. & Larrick J. W. (1992):

Competitive PCR
Nature 359: 557-558

Siering M. (2010):

Ein Vogelparadies vor den Toren Münchens - 80 Jahre Ismaninger Speichersee und Fischteiche

NaturschutzReport 28(53): 2-4

Simpson D. A. C., Feeney S., Boyle C. & Stitt A. W. (2000):

Retinal VEGF mRNA measured by SYBR Green I fluorescence: a versatile approach to quantitative PCR

Molecular Vision 6: 178-183

Sims L. D. (2008):

Risks associated with poultry production systems

http://www.fao.org/Ag/againfo/home/events/bangkok2007/docs/part2/2_1.pdf

(Stand: 11.06.2011)

Sinnecker H., Sinnecker R., Zilske E. & Koehler D. (1982):

Detection of influenza A viruses and influenza epidemics in wild pelagic birds by sentinels and population studies

Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene (Reihe A) 253: 297–304

Sipos R., Székely A. J., Palatinszky M., Révész S., Márialigeti K. & Nikolausz M. (2007):

Effect of primer mismatch, annealing temperature and PCR cycle number on 16S rRNA gene-targeting bacterial community analysis

FEMS Microbiology Ecology 60: 341–350

Sloots T. P. (2010):

Real-time PCR

In: CARTER I. W. J., SCHULLER M., JAMES G. S., SLOOTS T. P. & HALLIDAY C. L.

(Hrsg.): PCR for Clinical Microbiology: An Australian and International Perspective

Springer Netherlands, 1. Auflage: 22-27

Skehel J. J. & Wiley D. C. (2000):

Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin

Annual Reviews of Biochemistry 69: 531-569

Songserm T., Amonsin A., Jam-On R., Sae-Heng N., Meemak N., Pariyothron N., Payungporn S., Theamboonlers A. & Poovorawan Y. (2006a):

Avian influenza H5N1 in naturally infected domestic cat

Emerging Infectious Diseases 12(4): 681-683

Songserm T., Amonsin A., Jam-On R., Sae-Heng N., Pariyothorn N., Payungporn S., Theamboonlers A., Chutinimitkul S., Thanawongnuwech R. & Poovorawan Y. (2006b):

Fatal avian influenza A H5N1 in a dog

Emerging Infectious Diseases 12(11): 1744-1747

Spackman E., Pantin-Jackwood M. J., Swayne D. E. & Suarez D. L. (2009):

An evaluation of avian influenza diagnostic methods with domestic duck specimens
Avian Diseases 53(2): 276–280

Spackman E., Senne D. A., Myers T. J., Bulaga L. L., Garber L. P., Perdue M. L., Lohman K., Daum L. T. & Suarez D. L. (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(9): 3256–3260

Spackman E., Suarez D. L. & Senne D. A. (2008):

Avian influenza diagnostic and surveillance methods
In: SWAYNE D. (Hrsg.): *Avian influenza*
Wiley-Blackwell, Ames, IA, 299–308

Spackman E., Swayne D. E., Gilbert M., Joly D. O., Karesh W. B., Suarez D. L., Sodnomdarjaa R., Dulam P. & Cardona C. (2009):

Characterization of low pathogenicity avian influenza viruses isolated from wild birds in Mongolia 2005 through 2007
Virology Journal 6:190 doi: 10.1186/1743-422X-6-190
<http://www.virologyj.com/content/6/1/190> (Stand: 26.05.2011)

Spickler A. R. (2009):

Influenza
Center for Food Security and Public Health, Iowa State University
<http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/influenza.pdf> (Stand: 22.06.2011)

Stallknecht D. E., Kearney M. T., Shane S. M. & Zwank P. J. (1990a):

Effects of pH, temperature and salinity on persistence of avian influenza viruses in water
Avian Diseases 34(2): 412-418

Stallknecht D. E., Shane S. M., Kearney M. T. & Zwank P. J. (1990b):

Persistence of avian influenza viruses in water
Avian Diseases 34(2): 406-411

Starick E., Beer M., Hoffmann B., Staubach C., Werner O., Globig A., Strebelow G., Grund C., Durban M., Conraths F. J., Mettenleiter T. & Harder T. (2008):

Phylogenetic analyses of highly pathogenic avian influenza virus isolates from Germany in 2006 and 2007 suggest at least three separate introductions of H5N1 virus
Veterinary Microbiology 128: 243–252

Stegeman A., Bouma A., Elbers A. R. W., De Jong M. C. M., Nodelijk G., De Klerk F., Koch G. & Van Boven M. (2004):

Avian influenza A virus (H7N7) epidemic in the Netherlands in 2003: course of the epidemic and effectiveness of control measures
Journal of Infectious Diseases 190: 2088–2095

Storch V. & Welsch U. (2005):

Kurzes Lehrbuch der Zoologie
Spektrum Akademischer Verlag, München, 8., neu bearbeitete Auflage

Swayne D. E. & Halvorson D. A. (2008):

Influenza
In: SAIF Y. M., FADLY A. M., GLISSON J. R., MC DOUGALD L. R., NOLAN L. K. & SWAYNE D. E. (Hrsg.): *Diseases of Poultry*
Blackwell Publishing, Ames, USA, 12. Auflage: 153-184

Swayne D. E. & Suarez D. L. (2000):

Highly pathogenic avian influenza
Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics) 19(2): 463-482

Tebbe C. C. & Vahjen W. (1993):

Interference of humic acids and DNA extracted directly from soil in detection and transformation of recombinant DNA from bacteria and yeast
Applied Environmental Microbiology 59(8): 2657-2665

Teifke J. P., Klopffleisch R., Globig A., Starick E., Hoffmann B., Wolf P. U., Beer M., Mettenleiter T. C. & Harder T. C. (2007):

Pathology of natural infections by H5N1 highly pathogenic avian influenza virus in mute (Cygnus olor) and whooper (Cygnus cygnus) swans
Veterinary Pathology 44(2): 137-143

Thieman W. J. & Palladino M. A. (2007):

Biotechnologie
Pearson Studium, München, 1. Auflage: 99

Thomas J. K. & Noppenberger J. (2007):

Avian influenza: a review
American Journal of Health-System Pharmacy 64: 149-165

Tiwari A., Patnayak D. P., Chander Y., Parsad M. & Goyal S. M. (2006):

Survival of two avian respiratory viruses on porous and nonporous surfaces
Avian Diseases 50(2): 284-287

Tüller R. (1999):

Alternativen in der Geflügelhaltung
Eugen Ulmer GmbH & Co., Stuttgart (Hohenheim), Deutschland

Turner A. J. (2004):

The role of wild aquatic birds in the epidemiology of avian influenza in Australia
Australian Veterinary Journal 82(11): 713

Uchida Y., Kanehira K., Mase M., Takemae N., Watanabe C., Usui T., Fujimoto Y., Ito T., Igarashi M., Ito K., Takada A., Sakoda Y., Okamoto M., Yamamoto Y., Nakamura K., Kida H., Hiromoto Y., Tsuda T. & Saito T. (2011):

Genetic characterization and susceptibility on poultry and mammal of H7N6 subtype avian influenza virus isolated in Japan in 2009
Veterinary Microbiology 147: 1-10

Unger F., Globig A., Werner O., Staubach C., Kramer M., Conraths F., Beer M., Teifke J. & Harder T. (2007):

Geflügelpest (Aviäre Influenza)
Friedrich-Loeffler-Institut; Tiergesundheitsjahresbericht 2006: 59-70
http://www.fli.bund.de/fileadmin/dam_uploads/Jahresberichte/TG-JB/TGJB_2006.pdf
(Stand: 28.06.2011)

Unterseher F. & Schambony A. (2004):

Wnt-Signale bewegen Zellen
BIOspektrum 1: 96-98

Vahlenkamp T. W., Harder T. C., Giese M., Lin F., Teifke J. P., Klopfleisch R., Hoffmann R., Tarpey I., Beer M. & Mettenleiter T. C. (2008):

Protection of cats against lethal influenza H5N1 challenge infection
Journal of General Virology 89: 968-974

Vandendriessche Y., Gellynck X., Saatkamp H., Dewulf J., Van Steenwinkel S., Vermeire B. & Viaene J. (2010):

Economic evaluation of strategies to control high pathogenic avian influenza in Belgium
Lucrari stiintifice. Seria Zootehnie - Universitatea de Stiinte Agricole si Medicina Veterinara Ion Ionescu de la Brad 53(15): 216-225

Vandesompele J., De Paepe A. & Speleman F. (2002):

Elimination of primer-dimer artifacts and genomic coamplification using a two-step SYBR Green I real-time RT-PCR
Analytical Biochemistry 303(1): 95-98

Van Elsas J. D., Mäntynen V. & Wolters A. C. (1997):

Soil DNA extraction and assessment of the fate of Mycobacterium chlorophenicum strain PCP-1 in different soils by 16S ribosomal RNA gene sequence based most-probable-number PCR and immunofluorescence
Biology and Fertility of Soils 24(2): 188-195

Van Pelt-Verkuil E., Van Belkum A. & Hays J. P. (2008):

Principles and Technical Aspects of PCR Amplification
Springer Netherlands; 1. Auflage

Vey M., Orlich M., Adler S., Klenk H.-D., Rott R. & Garten W. (1992):

Hemagglutinin activation of pathogenic avian influenza viruses of serotype H7 requires the protease recognition motif R-XK/ R-R
Virology 188: 408-413

Volossiuk T., Robb E. J. & Nazar R. N. (1995):

Direct DNA extraction for PCR-mediated assays of soil organisms
Applied and Environmental Microbiology 61(11): 3972-3976

Von Haeseler A. & Liebers D. (2003):

Molekulare Evolution
Fischer Taschenbuchverlag, Frankfurt, 1. Auflage: 96

Vong S., Ly S., Mardy S., Holl D. & Buchy P. (2008):

Environmental contamination during influenza A virus (H5N1) outbreaks, Cambodia, 2006
Emerging Infectious Diseases 14(8): 1303-1305

Wacker M. J. & Godard M. P. (2005):

Analysis of one-step and two-step real-time RT-PCR using SuperScript III
Journal of Biomolecular Techniques 16: 266-271

Walker I. D. & Rogers G. E. (1976):

Differentiation in avian keratinocytes: the properties of the proteins of the chick down feather
European Journal of Biochemistry 69(2): 329-339

Wang L.-C., Pan C.-H., Severinghaus L. L., Liu L.-Y., Chen C.-T., Pu C.-E., Huang D., Lir J.-T., Chin S.-C., Cheng M.-C., Lee S.-H. & Wang C.-H. (2008):

Simultaneous detection and differentiation of newcastle disease and avian influenza viruses using oligonucleotide microarrays
Veterinary Microbiology 127 (3–4): Pages 217–226

Watson R. J. & Blackwell B. (2000):

Purification and characterization of a common soil component which inhibits the polymerase chain reaction
Canadian Journal of Microbiology 46: 633–642.

Weber S., Harder T., Starick E., Beer M., Werner O., Hoffmann B., Mettenleiter T. C. & Mundt E. (2007):

Molecular analysis of highly pathogenic avian influenza virus of subtype H5N1 isolated from wild birds and mammals in northern Germany
Journal of General Virology 88: 554–558

Webster R. G., Bean W. J., Gorman O. T., Chambers T. M. & Kawaoka Y. (1992):

Evolution and ecology of influenza A viruses
Microbiological Reviews 56(1): 152-179

Webster R. G., Hinshaw V. S. & Laver W. G. (1982):

Selection and analysis of antigenic variants of the neuraminidase of N2 influenza viruses with monoclonal antibodies
Virology 117(1): 93-104

Webster R. G., Peiris M., Chen H. & Guan Y. (2006):

H5N1 outbreaks and enzootic influenza
Emerging Infectious Diseases 12(1): 3-8

Webster R. G., Yakhno M., Hinshaw V. S., Bean W. J., & Murti K. G. (1978):

Intestinal influenza: replication and characterization of influenza viruses in ducks
Virology 84: 268-278

Wei J., Pabst W., Strack K. E. & Granz S. (2005):

Tierproduktion
Parey bei MVS, 13., überarbeitete Auflage

Werle E., Schneider C., Renner M., Völker M. & Fiehn W. (1994):

Convenient single-step, one tube purification of PCR products for direct sequencing
Nucleic Acids Research 22(20): 4354-4355

Werner O. (2004):

Geflügelpest
Bundesministerium für Verbraucherschutz, Ernährung und Landwirtschaft gemeinsam mit dem Friedrich-Loeffler-Institut; Tiergesundheitsjahresbericht 2003: 26-33
http://www.fli.bund.de/fileadmin/dam_uploads/Jahresberichte/TG-JB/TGJB_2003.pdf
(Stand: 28.06.2011)

Werner O. (2005):

Geflügelpest – Highly pathogenic avian influenza (HPAI)
Friedrich-Loeffler-Institut; Tiergesundheitsjahresbericht 2004: 61-63
http://www.fli.bund.de/fileadmin/dam_uploads/Jahresberichte/TG-JB/TGJB_2004.pdf
(Stand: 28.06.2011)

Werner O. (2006):

Klassische Geflügelpest – Eine Übersicht
Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift 119(3): 140-150

Werner O. & Harder T. C. (2006a):

Avian Influenza
In: KAMPS B. S., HOFFMANN C. & PREISER W. (Hrsg.): Influenza Report 2006
Flying Publisher, Paris Cagliari Wuppertal Sevilla
<http://www.influenzareport.com> (Stand: 30.12.2010)

Werner O. & Harder T. C. (2006b):

Bekämpfungsstrategie bei Klassischer Geflügelpest in Deutschland und der Europäischen Union
Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift 119(3/4): 151–159

Werner O., Globig A. & Starick E. (2004):

Analyse des Influenzastatus von Hausgeflügel in Freilandhaltung unter besonderer Berücksichtigung der Infektionsgefährdung durch Wildvögel
<http://orgprints.org/13295/1/13295-02OE464-fli-werner-2004-influenzaviren.pdf>
(Stand: 24.05.2011)

Werner O. & Kaleta E. F. (2005):

Orthomyxoviridae
In: SIEGMANN O. & NEUMANN U. (Hrsg.): Kompendium der Geflügelkrankheiten
Schlütersche Verlagsgesellschaft mbH & Co. KG, 6., aktualisierte und erweiterte Ausgabe, Hannover: 135-152

Wetzell O. W. (1981):

Lastannahmen
In: WETZELL O. W. (Hrsg.): Bautechnische Zahlentafeln
Teubner, 20., neubearb. u. erw. Auflage, Stuttgart: 105-135

WHO (2004):

Laboratory study of H5N1 viruses in domestic ducks: main findings
http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/labstudy_2004_10_29/en/
(Stand: 03.08.2011)

WHO (2006a):

Avian influenza ("bird flu")
http://www.who.int/mediacentre/factsheets/avian_influenza/en/print.html
(Stand: 30.12.2010)

WHO (2006b):

H5N1 avian influenza: timeline
http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/timeline.pdf (Stand: 29.06.2011)

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 (2011):

Cumulative Number of Confirmed Human Cases of Avian Influenza A/(H5N1) Reported to WHO

http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/country/cases_table_2011_08_09/en/index.html (Stand: 14.09.2011)

Wilking H., Ziller M., Staubach C., Globig A., Harder T. C. & Conraths F. J. (2009):

Chances and limitations of wild bird monitoring for the avian influenza virus H5N1 — detection of pathogens highly mobile in time and space

PLoS ONE 4(8): e6639. doi:10.1371/journal.pone.0006639

Wink M. (2011):

Evolution und Phylogenie der Vögel - Taxonomische Konsequenzen

Vogelwarte 49: 17-24

Wood G. W., McCauley J. W., Bashiruddin J. B. & Alexander D. J. (1993):

Deduced amino acid sequences at the haemagglutinin cleavage site of avian influenza A viruses of H5 and H7 subtypes

Archives of Virology 130: 209–217

Wu G. D., Lewis J. D., Hoffmann C., Chen Y.-Y., Knight R., Bittinger K., Hwang J., Chen J., Berkowsky R., Nessel L., Li H. & Bushman F. D. (2010):

Sampling and pyrosequencing methods for characterizing bacterial communities in the human gut using 16S sequence tags

BMC Microbiology 10(206): 1-14

Yilmaz A. & Kaleta E. F. (2004):

Zur Tenazität und Desinfektion von aviären Influenza A-Viren

Lohmann Information 3: 1-6

Young I. M. & Crawford J. W. (2004):

Interactions and self-organization in the soil-microbe complex

Science 304: 1634-1637

Zell R., Krumbholz A., Eitner A., Krieg R., Halbhuber K.-J. & Wutzler P. (2007):

Prevalence of PB1-F2 of influenza A viruses

Journal of General Virology 88: 536–546

Zhang C.-L., Fowler M. R., Scott N. W., Lawson G. & Slater A. (2007):

A TaqMan real-time PCR system for the identification and quantification of bovine DNA in meats, milks and cheeses

Food Control 18(9): 1149–1158

Zhang G., Shoham D., Gilichinsky D., Davydov S., Castello J. D. & Rogers S. O. (2006):

Evidence of influenza A virus RNA in Siberian lake ice

Journal of Virology 80(24): 12229–12235

Zhou L., Liao Q., Dong L., Huai Y., Bai T., Xiang N., Shu Y., Liu W., Wang S., Qin P., Wang M., Xing X., Lv J., Chen R. Y., Feng Z., Yang W., Uyeki T. M. & Yu H. (2009):

Risk factors for human illness with avian influenza A (H5N1) virus infection in China

The Journal of Infectious Diseases 199(12): 1726-1734

Ziedler K., Hlinak A., Raetz G., Werner O. & Ebner D. (1995):

Untersuchungen zum Antikörperstatus von Wild- und Zoovögeln gegen ausgewählte Nutztier-relevante Erreger

Journal of Veterinary Medicine, Series B 42(1-10): 321–330

Ziegler U., Eiden M., Keller M & Groschup M. H. (2011):
West Nil Virus – ein Virus auf dem Vormarsch
Der LabLöffler 5: 19-21

Gesetze und Verordnungen

Entscheidung der Kommission vom 4. August 2006 über die Genehmigung eines Handbuchs zur Diagnose der Aviären Influenza gemäß der Richtlinie 2005/94/EG des Rates (Bekannt gegeben unter Aktenzeichen K(2006) 3477) (**2006/437/EG**)
DE Amtsblatt der Europäischen Union 31.8.2006 L 237/1

Erste Verordnung zur Änderung der Tierschutz-Nutztierhaltungsverordnung vom 28. Februar 2002
Bundesgesetzblatt Jahrgang 2002 Teil I Nr. 16, ausgegeben zu Bonn am 12. März 2002

Geflügelpest-Verordnung vom 18. Oktober 2007 (BGBl. I S. 2348), die zuletzt durch Artikel 1 der Verordnung vom 18. Dezember 2009 (BGBl. I S. 3939) geändert worden ist
Diese Verordnung dient der Umsetzung der Richtlinie 2005/94/EG des Rates vom 20. Dezember 2005 mit Gemeinschaftsmaßnahmen zur Bekämpfung der Aviären Influenza und zur Aufhebung der Richtlinie 92/40/EWG
DE Amtsblatt der Europäischen Union 18.10.2007 L 10/16

Richtlinie 92/66/EWG des Rates vom 14. Juli 1992 über Gemeinschaftsmaßnahmen zur Bekämpfung der Newcastle-Krankheit
DE Amtsblatt der Europäischen Union 03.09.1992 L 066/1-27

Richtlinie 1999/74/EG des Rates vom 19. Juli 1999 zur Festlegung von Mindestanforderungen zum Schutz von Legehennen
DE Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften 3.8.1999 L 203/53

Richtlinie 2005/94/EG des Rates vom 20. Dezember 2005 mit Gemeinschaftsmaßnahmen zur Bekämpfung der Aviären Influenza und zur Aufhebung der Richtlinie 92/40/EWG
DE Amtsblatt der Europäischen Union 14.1.2006 L 10/16

Verordnung (EG) Nr. 1804/1999 des Rates vom 19. Juli 1999 zur Einbeziehung der tierischen Erzeugung in den Geltungsbereich der Verordnung (EWG) Nr. 2092/91 über den ökologischen Landbau und die entsprechende Kennzeichnung der landwirtschaftlichen Erzeugnisse und Lebensmittel
DE Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften 24.8.1999 L222/1

Verordnung (EG) Nr. 699/2006 der Kommission vom 5. Mai 2006 zur Änderung von Anhang I der Verordnung (EWG) Nr. 2092/91 des Rates hinsichtlich der Bedingungen für den Zugang von Geflügel zu Auslauf im Freien
DE Amtsblatt der Europäischen Union 6.5.2006 L 121/36

Verordnung über Schutzmaßnahmen beim Auftreten von Geflügelpest bei einem wildlebenden Vogel (Wildgeflügel-Geflügelpestschutzverordnung) vom 8. September 2006
eBAnz AT48 2006 V1

Verordnung über Schutzmaßnahmen beim Auftreten von Geflügelpest bei Nutzgeflügel (Nutzgeflügel-Geflügelpestschutzverordnung) vom 10. August 2006
eBAnz AT41 2006 V1

Verordnung zur Aufstallung des Geflügels zum Schutz vor der Klassischen Geflügelpest (Geflügel-Aufstallungsverordnung) vom 09.05.2006 (eBAnz AT28 2006 V1 vom 9.5.2006), geändert durch Art. 1 der Verordnung vom 10. Juli 2006 Bundesgesetzblatt 2006 Teil I Nr. 31, S. 1452 vom 13.07.2006, geändert durch Art. 2 der Verordnung vom 08.09.2006, eBAnz AT48 2006 V1 vom 08.09.2006 und zuletzt geändert durch Bundesanzeiger Nr. 40, S. 2063 vom 27. Februar 2007
Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz
eBAnz AT28 2006 V1

I Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
ABl.	Amtsblatt der Europäischen Union
ABl. EG	Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften
AIV	Aviäres Influenzavirus
Art.-Nr.	Artikelnummer
bidest. H ₂ O	bidestilliertes Wasser
Bio.	Billionen
BLAST	Basic Local Aligment Search Tool
BLE	Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung
BMELV	Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz
bp	Basenpaar
cDNA	complementary DNA (engl., komplementäre DNA)
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
Cyt <i>b</i>	Cytochrom <i>b</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DESTATIS	Statistisches Bundesamt Deutschland
DVG	Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetra-Acetat
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
<i>et al.</i>	et alteri (lat., und andere)
ESK	embryonic swine kidney
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
FLI	Friedrich-Loeffler-Institut
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
g	Gramm
GLB	Gel-Loading-Buffer
h	Stunde
H, HA	Hämagglutinin
HAH	Hämagglutinationshemmung
HCl	Chlorwasserstoff
HmLu-1	Hamsterlungenzellen
HPAI	Highly Pathogenic Avian Influenza
H ₂ O	Wasser

Hz	Hertz
IAC	interne Amplifikationskontrolle
IBS	Institut für Biologische Sicherheitsforschung
IfP	Institut für Produktqualität
IVPI	intravenöser Pathogenitätsindex
k	kilo-
l	Liter
LfL	Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft
LGL	Bayerischen Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit
LPAI	Low Pathogenic Avian Influenza
m, μ	milli-, mikro-
m	Meter
M	Molar
m ²	Quadratmeter
M _r	Molekulare Masse
MDCK	Madin-Darby canine kidney
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute
Mio.	Millionen
MLU	Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Mrd.	Milliarde
N, NA	Neuraminidase
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NEP	Nuklear Export Protein
NRL	Nationales Referenzlabor
O.I.E	Office International des Epizooties (World Organisation for Animal Health)
PCR	Polymerase-Chain-Reaction (engl., Polymerase-Ketten-Reaktion)
RNA	Ribonukleinsäure
RT-PCR	Reverse Transkription - Polymerase-Ketten-Reaktion
s	Sekunde
SPF	spezifiziert pathogenfrei
TBE	Tris-Borsäure-Puffer mit EDTA
TE	Tris-EDTA-Lösung
TKrMeldpfIV	Verordnung über meldepflichtige Tierkrankheiten
U	Unit (engl., Enzymeinheit)
UV	ultraviolett
V	Volt

WHO World Health Organization

J Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Struktur der Legehennenplätze in Deutschland 2010 [DESTATIS, 2011].....	4
Abbildung 2: Schematische Darstellung eines Influenzavirus [MODROW <i>et al.</i> , 2003].....	8
Abbildung 3: Infektionswege der Aviären Influenza nach PETER [2006] mit Modifikationen	14
Abbildung 4: 15 Tage alte Embryonen a) Negativkontrolle; b) Positivkontrolle mit AIV H3N8	16
Abbildung 5: Extraktion der DNA mit dem PowerSoil™ DNA Isolation Kit (MoBio Laboratories Inc.) nach Herstellerangaben	34
Abbildung 6: Extraktion der DNA mit dem QIAamp® DNA Stool Mini Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben.....	35
Abbildung 7: Extraktion der DNA mit CTAB nach Korthals <i>et al.</i> [2008a] mit Modifikationen.....	36
Abbildung 8: Sequenz des mit den Primern Federkeratin A for und Federkeratin A rev zu amplifizierenden Federkeratingenabschnitts (X17511) sowie Lage der Primer (türkis).....	38
Abbildung 9: Sequenz des mit den Primern Federkeratin C + flanks for und Federkeratin C + flanks rev zu amplifizierenden Federkeratingenabschnitts..... (J00847) sowie Lage der Primer (pink)	38
Abbildung 10: Sequenz des mit den Primern Federkeratin for und Federkeratin rev (grün), sowie dem SONDENSYSTEM, bestehend aus den Primern Keratin_F und..... Keratin_R (dunkelgrau) und der Sonde Keratin_TM (hellgrau) zu..... amplifizierenden Federkeratingenabschnitts (X00316) sowie Lage der..... Primer.....	39
Abbildung 11: Eluierung von Banden aus Agarosegelen mit dem QIAquick Gel..... Extraction Kit nach Herstellerangaben.....	43
Abbildung 12: Sequenz der IAC und Lage der zusammengesetzten Primer.....	47
Abbildung 13: Aufreinigung von PCR-Produkten mit dem GenElute™ PCR Clean-Up Kit....	48
Abbildung 14: Schema der Konstruktion der IAC mit der „composite primer technique“ nach SACHADYN & KUR [1998] mit Modifikationen.....	50
Abbildung 15: Standorte der Areale mit Hühnerattrappen	54
Abbildung 16: Skizze der Voliere a) Ansicht von schräg oben; b) Ansicht von schräg unten [STÜTZLEIN; 2008; LfL]	56
Abbildung 17: Geschütztes und ungeschütztes Areal auf dem Versuchsgut Grünschwaige.	57
Abbildung 18: Lage und Basensequenz der Primer Sim und Chicken (gelb) auf dem mitochondrialen Cytochrom <i>b</i> (X52392). Rot unterlegte Basen markieren	59
Abbildung 19: Standorte der Areale mit Sentinelhühnern (grüne Punkte)	62
Abbildung 20: Schematische Darstellung der Hygieneschleuse	63
[STÜTZLEIN & WEIL; 2008; LfL]	63
Abbildung 21: Hygieneschleuse a) unreiner Bereich; b) und c) reiner Bereich	64
[STÜTZLEIN & WEIL 2009; LfL]	64
Abbildung 22: Konstruktions- und Bauplan der Stalleinheiten [LfL; 2008].....	65

Abbildung 23: a) Volierenhaltung; b) ungeschütztes Gehege [STÜTZLEIN & WEIL; 2009; LfL]	66
Abbildung 24: PCR-Amplifikationskurven der unterschiedlichen Probenaufbereitungsmöglich-keiten; als Zielsequenz diente ein Abschnitt des mitochondrialen Cytochrom <i>b</i>	69
Abbildung 25: PCR-Amplifikationskurven der getesteten DNA-Extraktionsverfahren aus Federn unterschiedlicher Herkunft; als Zielsequenz diente ein Abschnitt des mitochondrialen Cytochrom <i>b</i>	71
Abbildung 26: PCR-Amplifikationskurven der getesteten DNA-Extraktionsverfahren aus Kot unterschiedlicher Herkunft; als Zielsequenz diente ein Abschnitt des mitochondrialen Cytochrom <i>b</i>	73
Abbildung 27: PCR-Amplifikationskurven von DNA-Isolaten von Huhn, Pferd und Schwein; als Zielsequenz diente ein Abschnitt des Federkeratins	74
Abbildung 28: Schmelzkurvenanalyse von DNA-Isolaten verschiedener Vogelarten mit dem mitochondrialen Cytochrom <i>b</i> als Zielsequenz	75
Abbildung 29: Gelelektrophoretische Trennung von DNA-Amplifikaten von Proben verschiedener Vogelarten mit dem mitochondrialen Cytochrom <i>b</i> als Zielsequenz	76
Abbildung 30: Vergleich des amplifizierten Sequenzabschnitts (mitochondriales Cytochrom <i>b</i>) der Proben von Huhn und Wanderfalke.....	77
Abbildung 31: Vergleich des amplifizierten Sequenzabschnitts (mitochondriales Cytochrom <i>b</i>) der Proben von Huhn und Amsel.....	78
Abbildung 32: PCR-Amplifikationskurven von DNA-Isolaten diverser Vogelarten mit dem mitochondrialen Cytochrom <i>b</i> als Zielsequenz.....	79
Abbildung 33: PCR-Amplifikationskurven von am Standort Wang für Vorversuche gewonnenen Feldproben; als Zielsequenz diente ein Abschnitt des mitochondrialen Cytochrom <i>b</i>	80
Abbildung 34: Schmelzkurvenanalyse von DNA-Amplifikaten von am Standort Wang für Vorversuche gewonnenen Feldproben; als Zielsequenz diente ein Abschnitt des mitochondrialen Cytochrom <i>b</i>	81
Abbildung 35: Gelelektrophoretische Trennung von DNA-Amplifikaten von am Standort Wang gewonnenen Feldproben; als Zielsequenz diente ein Abschnitt des mitochondrialen Cytochrom <i>b</i>	82
Abbildung 36: Gelelektrophoretische Trennung von DNA-Amplifikaten von Turmfalke sowie der IAC in den Verdünnungsstufen 10^{-6} bis 10^{-11} ; als Zielsequenz diente ein Abschnitt des mitochondrialen Cytochrom <i>b</i>	83
Abbildung 37: PCR-Amplifikationskurven der mit PeqGOLD TriFast™ isolierten RNA; die als Zielsequenz diente die IC-RNA (DYXL-Sonde).....	84
Abbildung 38: PCR-Amplifikationkurven der mit PeqGOLD TriFast™ isolierten RNA; als..... Zielsequenz diente die virale RNA (FAM-Sonde).....	85
Abbildung 39: PCR-Amplifikationskurven der mit dem QIAamp® Viral RNA Mini Kit isolierten RNA; die als Zielsequenz diente die IC-RNA (DYXL-Sonde).....	85
Abbildung 40: PCR-Amplifikationskurven der mit dem QIAamp® Viral RNA Mini Kit isolierten RNA; als Zielsequenz diente die virale RNA (FAM-Sonde).....	86
Abbildung 41: PCR-Amplifikationskurven der mit dem RNA PowerSoil™ Total RNA Isolation Kit und dem INSTANT Virus RNA Kit isolierten RNA; als Zielsequenz diente die virale RNA (FAM-Sonde).....	86

Abbildung 42: PCR-Amplifikationskurven der mit dem RNA PowerSoil™ Total RNA Isolation Kit und dem INSTANT Virus RNA Kit isolierten RNA; die als Zielsequenz diente die IC-RNA (DYXL-Sonde)	87
Abbildung 43: Legeleistung am Geflügelhof Halder in Hoßkirch	101
Abbildung 44: Legeleistung am Gut Weyern bei Düren	102
Abbildung 45: Legeleistung am Laeisenhof in Ferschweiler	102
Abbildung 46: Legeleistung auf der Versuchsstation Viehhausen	103
Abbildung 47: Legeleistung in Wässerndorf bei Kitzingen	103
Abbildung 48: Entwicklung der Tierpopulation in den Versuchsarealen am Geflügelhof Halder in Hoßkirch	104
Abbildung 49: Entwicklung der Tierpopulation in den Versuchsarealen am Gut Weyern bei Düren	105
Abbildung 50: Entwicklung der Tierpopulation in den Versuchsarealen am Laeisenhof in Ferschweiler	105
Abbildung 51: Entwicklung der Tierpopulation in den Versuchsarealen auf der Versuchsstation Viehhausen	106
Abbildung 52: Entwicklung der Tierpopulation in den Versuchsarealen in Wässerndorf bei Kitzingen	106

K Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Übersicht der Orthomyxoviridae nach MODROW et al. [2003] mit Modifikationen	7
Tabelle 2:	Berichtete HPAI-Erstausbrüche bei Geflügel seit 1959 modifiziert nach ALEXANDER & BROWN [2009] und RODRIGUEZ-LECOMPTE et al. [2011]	20
Tabelle 3:	Liste der auf den vogelspezifischen Genabschnitt getesteten Vogelarten und entnommenen Materials	29
Tabelle 4:	Liste weiterer auf den vogelspezifischen Genabschnitt getesteter Tierarten ..	30
Tabelle 5:	Reaktionsansatz zum Nachweis des Federkeratings mittels real-time PCR mit SYBR Green I.....	39
Tabelle 6:	Temperaturprofil am LightCycler® zum Nachweis des Federkeratings mit SYBR Green I.....	40
Tabelle 7:	Reaktionsansatz der real-time PCR zum Nachweis des Federkeratings mit Sonde	40
Tabelle 8:	Temperaturprofil am LightCycler® zum Nachweis des Federkeratings mit Sonde	41
Tabelle 9:	Reaktionsansatz der real-time PCR zum Nachweis des mitochondrialen Cyt <i>b</i> mit SYBR Green I.....	41
Tabelle 10:	Temperaturprofil am LightCycler® zum Nachweis des mitochondrialen Cyt <i>b</i> mit SYBR Green I.....	41
Tabelle 11:	Reaktionsansatz der Endpunkt-PCR zum Nachweis des mitochondrialen Cytochrom <i>b</i>	45
Tabelle 12:	Temperaturprofil der Endpunkt-PCR zum Nachweis des mitochondrialen Cytochrom <i>b</i>	45
Tabelle 13:	Reaktionsansatz zur Herstellung der IAC mittels konventioneller PCR	47
Tabelle 14:	Temperaturprofil zur Herstellung der IAC mittels konventioneller PCR	48
Tabelle 15:	Reaktionsansatz zur Ermittlung der optimalen IAC-Konzentration mittels Endpunkt-PCR.....	49
Tabelle 16:	Temperaturprofil zur Ermittlung der optimalen IAC-Konzentration mittels Endpunkt-PCR.....	49
Tabelle 17:	Primer-Sonden-Mix 1 (IVA-M1.1-Mix-FAM) zum Nachweis der viralen RNA mittels real-time RT-PCR	51
Tabelle 18:	Primer-Sonden-Mix 2 (EGFP-Mix 6 (Limit5)) zum Nachweis der RNA der internen Kontrolle mittels real-time RT-PCR	52
Tabelle 19:	Reaktionsansatz zum Nachweis der RNA von Influenza-A-Viren mittels real-time RT-PCR	52
Tabelle 20:	Temperaturprofil zum Nachweis der RNA von Influenza-A-Viren mittels real-time RT-PCR	52
Tabelle 21:	Reaktionsansatz zum Nachweis des mitochondrialen Cyt <i>b</i> mit IAC mittels Endpunkt-PCR.....	60
Tabelle 22:	Temperaturprofil zum Nachweis des mitochondrialen Cyt <i>b</i> mit IAC mittels Endpunkt-PCR.....	60

Tabelle 23:	Mittels unterschiedlicher Probenaufbereitungsverfahren mit der real-time PCR erzielte „crossing point“-Werte; Zielsequenz stellt das mitochondriale Cytochrom <i>b</i> dar	70
Tabelle 24:	Mittels unterschiedlicher DNA-Extraktionsverfahren erzielte DNA-Konzentrationen aus Federn verschiedener Herkunft.....	71
Tabelle 25:	Mittels unterschiedlicher DNA-Extraktionsverfahren erzielte DNA-Konzentrationen aus Kot verschiedener Herkunft	72
Tabelle 26:	Ergebnisse der Beprobung des Versuchsareals auf dem Gelände von E.ON.....	91
Tabelle 27:	Ergebnisse der Beprobung des Versuchsareals auf dem Gelände der Stadtwerke München.....	93
Tabelle 28:	Ergebnisse der Beprobung des Versuchsareals bei der Kläranlage in Wang	95
Tabelle 29:	Ergebnisse der Beprobung des Versuchsareals auf dem Versuchsgut Grünschwaipe.....	97
Tabelle 30:	Ergebnisse der Beprobung des Versuchsareals auf der Versuchsstation Viehhausen	99
Tabelle 31:	Zusammenfassende Übersicht der Ergebnisse des Nachweises des mitochondrialen Cytochrom <i>b</i> mittels Endpunkt-PCR sowie der makroskopischen Untersuchungen an allen 5 Standorten	100
Tabelle 32:	Zusammenfassende statistische Auswertung bezogen auf Legeleistung und Überlebensrate aller 5 Standorte	107

L Anhang

1 Sequenzierergebnisse

Wanderfalke:

GACCTCCCAGCTCCATCAAACATCTCATCTTGATGAAATTTCCGGCTCCCTATTAGCAGTC
TGCCTCATGACCCAAATCCTCACCGGCCTACTACTAGCCATGCACTACACAGCAGACAC
ATCCCTAGCCTTCTCCTCCGTAGCCCACACTTGCCGGAACGTACAATACGGCTGACTCA
TCCGGAATCTCCACGCAAACGGCGCCTCATTCTTCTTCATCTGTATCTT

Mäusebussard:

GACCTCCCAGCTCCATCAAACATCTCATCTTGATGAAATTTCCGGCTCCCTATTAGCAGTC
TGCCTCATGACCCAAATCCTCACCGGCCTACTACTAGCCATGCACTACACAGCAGACAC
ATCCCTAGCCTTCTCCTCCGTAGCCCACACTTGCCGGAACGTACAATACGGCTGACTCA
TCCGGAATCTCCACGCAAACGGCGCCTCATTCTTCTTCATCTGTATCTT

Stockente (a):

GACCTCCCAGCTCCATCAAACATCTCATCTTGATGAAACTTCCGGATCTCTGCTCGCCATC
TGCCTGGCCACACAAATCCTCACAGGCCTCCTACTGGCTATGCACTACACCGCAGACAC
ATCCCTTGCTTTCTCCTCAGTAGCCAACACATGCCGAAACGTCCAATATGGCTGACTCAT
CCGCAACCTCCACGCCAATGGCGCCTCATTCTTCTTCATCTGTATCTT

Stockente (b):

GACCTCCCAGCTCCATCAAACATCTCATCTTGATGAAACTTCCGGMTCYCTGCTSGCCAT
CTGCCTRGCCACRCAAATCCTMACAGGCCTMCTACTRGCYATGCACTACACCGCAGAC
ACMTCCCTTGCYTTCTCCTCAGTAGCCMACACATGCCGARACGTCCAATATGGCTGACT
CATCCGCAACCTCCACGCCAAYGGCGCCTCATTCTTCTTCATCTGTATCTT

Turmfalke:

GACCTCCCAGCTCCATCAAACATCTCATCTTGATGAAATTTCCGGCTCCCTATTAGCAGTC
TGCCTCATGACCCAAATCCTCACCGGCCTACTACTAGCCATGCACTACACAGCAGACAC
ATCCCTAGCCTTCTCCTCCGTAGCCCACACTTGCCGGAACGTACAATACGGCTGACTCA
TCCGGAATCTCCACGCAAACGGCGCCTCATTCTTCTTCATCTGTATCTT

Kolkrabe:

GACCTCCCAGCTCCATCAAACATCTCATCTTGATGAAATTTCCGGCTCCCTATTAGCAGTC
TGCCTCATGACCCAAATCCTCACCGGCCTACTACTAGCCATGCACTACACAGCAGACAC
ATCCCTAGCCTTCTCCTCCGTAGCCACACTTGCCGGAACGTACAATACGGCTGACTCA
TCCGGAATCTCCACGCAAACGGCGCCTCATTCTTCTTCATCTGTATCTT

Amsel:

GACCTCCCAGCTCCATCAAACATCTCATCTTGATGAAACTTTGGGTCACTACTAGGCATT
TGCTTAATTACACAAATTATCACAGGCTTACTACTAGCCACGCATTACACAGCAGACACC
TCCCTAGCCTTCAACTCAGTCGCCACATATGCCGAAATGTCCAATTTGGCTGACTAATC
CGCAACCTCCATGCAAACGGCGCCTCATTCTTCTTCATCTGTATCTT

2 Detaillierte Auflistung des Tierbestandes in Prozent der Anfangstierzahl

		Tierbestand in %									
		Hoßkirch		Düren		Ferschweiler		Viehausen		Wässerndorf	
		geschützt	ungeschützt	geschützt	ungeschützt	geschützt	ungeschützt	geschützt	ungeschützt	geschützt	ungeschützt
Experiment- woche	0	100	100	100	100	100	100*	100	100	100	100
	1	100	100	100	100	100	100	100	92	100	100
	2	100	100	100	100	100	100	100	92	100	100
	3	100	100	100	100	100	90	100	92	100	100
	4	100	100	100	100	100	79	100	92	100	100
	5	100	100	100	100	100	76	100	88	100	100
	6	100	100	100	100	100	76	100	88	100	100
	7	100	100	100	100	100	72	100	88	100	100
	8	100	100	100	100	100	69	100	88	100	100
	9	100	100	100	100	100	69	100	88	100	96
	10	100	96	100	100	100	69	100	80	100	96
	11	100	96	100	100	100	69	100	80	100	96
	12	100	96	100	100	100	62	100	80	84	96
	13	100	96	100	100	100	62	100	80	84	92
	14	100	88	100	100	100	62	100	80	84	80
	15	100	88	100	100	100	62	100	80	84	76
	16	100	80	100	100	100	59	100	80	84	72
	17	100	80	96	100	100	55	100	76	84	72
	18	100	76	96	96	100	55	100	76	84	72
	19	100	76	96	96	100	48	100	76	84	72
	20	100	72	96	96	100	48	100	76	84	72
	21	100	72	96	92	100	41	100	76	84	68
	22	100	72	96	92	100	41	100	76	84	68
	23	100	72	92	92	100	38	100	76	84	68
	24	100	72	92	92	100	38	100	76	84	68
	25	100	72	88	92	100	38	100	76	84	68
	26	100	72	88	84	100	38	100	76	84	68
	27	100	72	88	84	100	38	100	76	84	68
	28	100	72	88	80	96	38	100	76	84	68
	29	100	72	88	80	96	38	100	76	84	68
	30	100	68	88	76	96	38	100	72	84	68
	31	100	68	88	72	96	38	100	72	84	68
	32	100	68	88	68	96	38	100	72	84	68
	33	100	68	88	68	88	34	100	72	84	68
	34	96	68	88	68	88	34	100	72	84	68
	35	96	68	88	68	88	34	100	72	84	68
	36	96	68	88	68	88	34	100	72	84	68
	37	96	68	88	68	88	28	100	72	84	68
	38	96	68	88	68	84	24	100	72	84	68
	39	96	68	88	68	80	24	100	68	84	68
40	96	68	88	68	76	24	100	68	84	68	
Mittelwert		99	81	94	89	97	52	100	79	89	79
Standardabweichung		2	14	6	13	6	20	0	8	7	14
Varianz		2	183	30	175	39	419	0	58	54	199

Anfangstierzahl = 25 Tiere

* Abweichung von der Anfangstierzahl: im Betrieb Ferschweiler im ungeschützten Areal 29 Tiere

3 Detaillierte Auflistung der durchschnittlichen Legeleistung in Eier/Huhn/Woche

		Eier/Huhn/Woche im Durchschnitt									
		Wässerndorf		Viehhausen		Düren		Hoßkirch		Ferschweiler	
		geschützt	ungeschützt	geschützt	ungeschützt	geschützt	ungeschützt	geschützt	ungeschützt	geschützt	ungeschützt
Experiment- woche	1	3,38	4,95	4,72	7,00	6,96	6,44	5,60	5,56	5,88	5,35
	2	6,05	5,56	4,96	5,89	6,17	6,16	7,12	6,12	6,48	5,23
	3	5,62	5,89	5,12	6,84	5,83	5,96	5,64	5,68	6,16	5,82
	4	6,19	5,78	5,48	6,84	5,58	5,92	5,92	5,64	6,28	6,24
	5	6,57	5,67	4,96	5,89	5,71	5,92	6,24	5,50	5,92	6,15
	6	5,76	6,22	5,40	6,11	6,13	6,35	6,88	6,04	6,52	5,95
	7	6,24	6,00	5,76	6,37	5,92	6,22	6,44	6,17	6,44	5,80
	8	6,19	6,00	5,52	6,42	5,87	6,57	6,92	5,92	5,96	6,40
	9	5,86	5,65	5,56	5,63	5,78	6,48	7,00	6,50	5,76	5,67
	10	6,14	5,71	4,76	4,68	5,23	5,70	6,76	5,64	5,68	4,83
	11	6,00	5,41	5,84	6,16	5,86	6,10	6,32	6,65	6,16	5,72
	12	6,10	5,88	5,20	5,63	4,68	6,14	5,80	5,60	6,04	4,76
	13	5,90	5,59	6,32	5,67	4,91	6,35	4,84	4,42	5,28	4,69
	14	6,10	5,47	4,76	5,33	5,32	5,10	5,16	3,63	5,24	5,56
	15	5,76	5,18	5,12	5,94	5,18	6,16	5,76	4,11	4,92	4,21
	16	5,81	5,18	4,84	5,50	5,32	6,11	5,48	4,39	3,64	2,14
	17	5,38	5,06	5,12	5,61	5,14	6,06	4,80	4,28	2,88	3,08
	18	5,81	5,18	5,16	5,56	5,32	6,12	4,80	4,00	3,12	3,50
	19	5,43	4,94	4,52	5,06	5,41	5,59	5,60	4,11	3,72	4,73
	20	5,76	5,53	4,48	5,44	5,18	5,41	4,32	4,00	4,48	4,18
	21	5,10	5,41	4,80	5,44	5,41	5,41	3,88	3,50	3,96	4,55
	22	5,19	5,24	4,24	5,29	3,50	5,29	2,04	2,17	4,36	5,36
	23	4,76	5,12	4,28	5,71	5,27	5,35	3,28	2,88	4,60	5,27
	24	4,86	5,12	4,24	5,82	5,09	5,41	4,84	3,88	4,67	4,73
	25	5,05	5,06	4,76	5,76	5,36	4,59	3,96	4,35	4,38	4,82
	26	5,05	4,94	4,68	5,71	3,86	4,24			4,79	4,45
	27	4,52	4,71	4,88	6,00	3,91	4,71			4,67	4,73
	28	4,57	4,76	5,32	5,87	4,86	4,35			4,75	5,18
	29	4,81	5,00	5,76	6,50	4,82	4,65			4,73	4,70
	30	5,62	4,47	5,04	5,79	5,27	5,12			4,55	3,40
	31	5,43	5,24	5,08	5,93	5,09	5,76			4,86	4,40
	32	5,24	5,06	6,40	6,29	4,73	5,41			5,27	5,88
	33	5,76	5,12	5,20	5,43	4,77	5,18			5,23	4,75
	34	5,69	6,25	6,24	6,07	4,91	6,12			5,86	4,00
	35			5,88	6,14	5,09	5,94			5,20	5,43
	36			5,76	6,43	5,14	5,82			6,42	6,43
	37			6,08	6,21	5,59	5,71			6,21	6,00
	38			5,79	6,21	4,68	5,76			6,83	4,52
	39			5,23	5,93	5,50	5,35			5,56	5,88
	40			5,41	5,93	4,68	5,71			5,72	6,40
Mittelwert		5,38	5,42	5,22	5,90	5,23	5,67	5,42	4,83	5,23	5,02
Standardabweichung		0,88	0,49	0,56	0,48	0,64	0,59	1,26	1,19	0,97	0,96
Varianz		0,78	0,24	0,32	0,23	0,41	0,35	1,58	1,42	0,94	0,92

Herzlichen Dank...

...an meinen Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. vet. Dr. h. c. Johann Bauer, der es mir mit der Überlassung des interessanten und aktuellen Themas „Vergleichende Untersuchungen zum Infektionsrisiko von Geflügel in netzgeschützten und ungeschützten Auslaufflächen“ ermöglicht hat, bei ihm diese Doktorarbeit anfertigen zu können, für sein mir entgegengebrachtes Vertrauen und seine stete Bereitschaft, mich jederzeit bei meiner Arbeit zu beraten und zu unterstützen. Darüber hinaus möchte ich mich für die geselligen Stunden bei den leckeren Weihnachtsessen und den unvergesslich schönen Ausflug nach Bad Tölz und in den „nur für die Mutigen bezwingbaren“ Hochseilgarten am Blomberg bedanken.

...an Frau Dr. med. vet. Karin Schwaiger für ihre kompetente Hilfe und guten Tipps bei der Durchführung meiner Experimente sowie ihre Hilfsbereitschaft mir bei jeglichen Fragen und Problemen stets mit viel Geduld aufmunternd zur Seite zu stehen...und das alles mit ihrem unvergleichlichen Humor. Außerdem möchte ich mich auch für die kurzweiligen Stunden, die wir auf Projektfahrten miteinander im Auto verbracht haben, bedanken.

...an Herrn Prof. Dr. Mathias Büttner und Dr. Monika Rinder vom Bayerischen Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit in Oberschleißheim, die mir mit Hingabe ihr Wissen über den molekularbiologischen Nachweis von Inflenzaviren und dessen Durchführung weitervermittelt haben. Zusätzlich danke ich Herrn Prof. Dr. Mathias Büttner für die Bereitschaft sich als Zweitprüfer zur Verfügung zu stellen.

...an Herrn Prof. Dr. Rüdiger Korbelt von der Vogelklinik Oberschleißheim für seine Bereitschaft, Federn und Kotproben diverser Vögel für mich zu sammeln und mir für die Evaluierung meiner Methode zur Verfügung zu stellen. Ebenso danke ich Dr. Markus Baur für die Bereitstellung von Kotproben verschiedener Reptilien und ebenso von Proben diverser Insekten. Weiterhin möchte ich mich dafür bedanken, dass es mir ermöglicht wurde, im Tierpark Hellabrunn in München Federn und Kotproben von den unterschiedlichsten Vögeln zu sammeln.

...an alle jetzigen und ehemaligen Kollegen und Freunde vom Lehrstuhl für Tierhygiene für die angenehme und freundliche Arbeitsatmosphäre, in der man sich einfach wohlfühlen muss, die große Hilfsbereitschaft und die lustigen, aufbauenden, interessanten und von mir sehr geschätzten Gespräche beim Mittagessen, Kaffee trinken, beim Eis essen in der Sonne oder einfach nur zwischen Tür und Angel. Außerdem möchte ich mich für die schönen

gemeinsamen Stunden auch außerhalb des Labors bedanken, welche mir immer in bester Erinnerung bleiben werden!

...an Barbara Dörr, Cornelia Oehme, Andrea Klaus, Sonja Kattner, Christine Adldinger und René Mamet für die tatkräftige Unterstützung bei der Einrichtung der Volieren, für die Hilfe bei der praktischen Realisierung der Arbeit und die hilfreichen Anregungen zur Lösung von praktischen Problemen. Ganz besonders möchte ich mich bei Meike Petersen und Annika Bartuschat bedanken, die mich sowohl bei der Probennahme als auch im Labor fleißigst unterstützt haben.

...an Meike Bischoff, die nicht nur das Büro während dieser Zeit mit mir geteilt hat, sondern auch mit mir durch jegliche Höhen und Tiefen nicht nur im Bezug auf die Doktorarbeit gegangen ist, immer ein aufmunterndes Wort für mich bereit hatte, mich sogar während des Urlaubs ertragen hat und die ich als ganz besonderen Menschen kennen lernen durfte!

...an meine Eltern und Schwestern, die immer für mich da waren.

...an all meine Freunde, die immer an mich geglaubt haben.

...an Sebastian Bolduan, der mir in der Endphase der Doktorarbeit die nötige Motivation gegeben hat.

LEBENS LAUF

PERSÖNLICHE DATEN

Name	Carmen Fahn
Geburtsdaten	03.04.1981 in München
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch

SCHULBILDUNG UND BERUFS AUSBILDUNG

1987 – 1991	Grundschule, München
1991 – 2000	Dante-Gymnasium, München Abschluss: Allgemeine Hochschulreife
2000 – 2002	Ausbildung zur Tierarzhelferin in der Tierarztpraxis Dr. H. Schwarz und Dr. H. Winzinger, Planegg Abschluss: Tierarzhelferin mit Auszeichnung

UNIVERSITÄTSLAUFBAHN

10/2002 – 08/2007	TUM – Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt, Freising Studium der Agrarwissenschaften <u>Studienschwerpunkt:</u> <ul style="list-style-type: none">• Tierwissenschaften Abschluss: Diplom
-------------------	---

BERUF SERFAHRUNG

Seit 11/2007	TUM – Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt, Freising Promotion am Lehrstuhl für Tierhygiene (Prof. Dr. Dr. h.c. J. Bauer)
07/2011 – 10/2011	Stipendium im Rahmen der Exzellenzinitiative der TUM
11/2011 - heute	TUM – Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt, Freising Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Lehrstuhl für Tierernährung (Prof. Dr. W. Windisch)