

## Aviäre Influenza: Wildvogelmonitoring in der Schweiz zwischen 2003–2006

C. Rutz<sup>1</sup>, S. Dalessi<sup>1</sup>, A. Baumer<sup>1</sup>, M. Kestenholz<sup>3</sup>, M. Engels<sup>2</sup>, R. Hoop<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institut für Veterinärbakteriologie, Abteilung für Geflügelkrankheiten und <sup>2</sup>Institut für Virologie der Universität Zürich, <sup>3</sup>Schweizerische Vogelwarte Sempach

### Zusammenfassung

Mittels real-time Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (PCR) wurden mehr als 3500 Kloakentupfer und Organproben von wildlebenden Sing- und Wasservögeln sowie Nutzgeflügel aus Freilandhaltung im Rahmen verschiedener Überwachungsprogramme auf das Vorkommen von aviärem Influenza-Virus untersucht. Zwischen Herbst 2003 und Frühling 2005 führte die Schweiz das erste nationale Monitoring auf AIV durch. 1053 Proben verschiedener Wildvögel, überwiegend Finkenvögel (Ordnung Passeriformes), wurden getestet. In zwei Fällen wurden niedrig pathogene Influenza A-Stämme (LPAI) gefunden. Ein zweites intensiviertes Überwachungsprogramm startete im Oktober 2005 zusammen mit der ersten Stallpflicht des Schweizer Nutz- und Ziergeflügels. Bis Ende April 2006 wurden 2455 Kloakentupferproben verendeter Wildvögel, vor allem Wasservogelarten, untersucht. Ende Februar konnte der Subtyp H5N1 in der Schweiz erstmals nachgewiesen werden. Bis Ende März wurden insgesamt 32 Wasservögel positiv auf H5N1 getestet. 146 untersuchte Geflügelbetriebe mit der Ausnahmegewilligung zur Freilandhaltung erwiesen sich als AI negativ.

**Schlüsselwörter:** Aviäre Influenza, real time RT-PCR, Wildvögel, Nutzgeflügel

### Avian influenza: Wildbird monitoring in Switzerland between 2003–2006

During various surveillance programs more than 3500 cloacal swabs and organ samples from songbirds, waterbirds and poultry have been tested for avian influenza using real time RT-PCR. Switzerland carried out the first wildbird monitoring between autumn 2003 and spring 2005. 1053 samples, mostly from songbirds, were tested. LPAI-strains were found in two cases. A second intensified surveillance program started in October 2005 along with the first ban on free range poultry farming. Until the end of April 2006 2455 cloacal swabs from dead wildbirds have been analysed. By the end of february H5N1 was for the first time detected in Switzerland and by the end of march 32 waterbirds have been found positive for H5N1. 146 poultry flocks with a special permission for free range management proved to be AI negative.

**Keywords:** avian influenza, real time RT-PCR, wild birds, poultry

### Einleitung

Hochpathogene Formen der aviären Influenza (HPAI), der klassischen Geflügelpest, führen immer wieder zu gravierenden Verlusten in der Geflügelindustrie. Erreger sind Influenzaviren des Typs A aus der Familie der Orthomyxoviridae. Diese werden anhand der Oberflächenproteine Hämagglutinin und Neuraminidase in 16- bzw. 9 Subtypen eingeteilt. Durch Punktmutationen (antigenetic drift) innerhalb oder durch Genaustausch (antigenetic shift) zwischen diesen Subtypen gelingt die schrittweise Anpassung an den Wirt oder die Überschreitung der Speziesbarriere. Als Reservoir gelten Wildvögel (Alexander, 2000), vor allem Wasser- und Küstenvögel. Sie sind in

der Regel symptomlose Träger, scheiden das Virus aber via Nasensekrete und Fäces entlang ihrer Zugrouten aus (Werner und Globig, 2004) und können es über weite Distanzen verbreiten. Entlang der Nord- und Ostseeküste wurden aus rund 2000 Kloaken- und Rachtupfer verschiedener Wasservögel 21 AIV-Isolate gewonnen (Globig et al., 2004). Sie stammten bis auf wenige Ausnahmen von Stock- und Krickenten (*Anas platyrhynchos*, *A. crecca*) und repräsentierten 8 verschiedene Hämagglutinin-Subtypen. Aviäre Influenza-Viren können aufgrund ihrer Pathogenität in zwei verschiedene Gruppen eingeteilt werden. HPAI, welche häufig perakut verläuft und in Ge-

flügelbeständen zu einer Mortalität von bis zu 100% führen kann, ist bisher ausschliesslich durch H5- oder H7-Subtypen hervorgerufen worden. Hohe Mortalitätsraten wurden bis vor wenigen Jahren nur in Hühnervogelbeständen beobachtet bis im Herbst 2002 in Ostasien erstmals hochpathogene Formen von H5N1 bei Wildvögeln auftraten (Ellis et al., 2004). Diese kommen in Wildvogelpopulationen normalerweise nicht vor, sondern entstehen, wenn niedrig pathogene (LPAI) H5- oder H7-Subtypen während längerer Zeit innerhalb von Nutzgeflügelpopulationen zirkulieren und die Mutationsrate ansteigt (Garcia et al., 1996; Perdue et al., 1998). Alle anderen H-Subtypen (LPAI) aviärer Influenza-Viren besitzen nur eine geringe Virulenz und bleiben auf Respirations- und Verdauungstrakt beschränkt. Die Virulenzunterschiede innerhalb der H5- und H7-Subtypen werden unter anderem durch Aminosäuren an der Spaltstelle des Hämagglutinin bedingt. Hoch pathogene Viren besitzen multiple basische Aminosäuren. Die Spaltung des Vorläufer-Hämagglutinins kann dann durch Proteasen in allen Körperzellen erfolgen und zu einer generalisierten Infektion führen (Werner, 2000).

Ende November 2002 wurden bei südostasiatischen H5N1-Isolaten verschiedene Genotypen gefunden, darunter der Genotyp «Z» (Chen et al., 2006), welcher unter anderem mehr als 250 Todesfälle beim Menschen verursacht hat. Bis 2005 begrenzten sich Ausbrüche von H5N1 auf verschiedene ostasiatische Länder darunter Indonesien, Vietnam, Thailand und China (Webster et al., 2005). Obwohl in einer ersten Phase nur Ausbrüche beim Nutzgeflügel gemeldet wurden, führte dieser Subtyp zu einer ungewöhnlich hohen Mortalität bei Wildvögeln (Sturm-Ramirez et al., 2005). Im Laufe des Jahres kam es im Westen Chinas zu einem Ausbruch bei Wildvögeln. Mehr als 5000 Wasservögel, vor allem Gänse, starben (Krauss et al., 2004). Die phylo-genetische Analyse zeigte eine hohe Diversifikation der isolierten Stämme. Es wird angenommen, dass dies die ständige Zirkulation der Viren durch Geflügeltransporte widerspiegelt und Südchina das Epizentrum auftretender Epidemien darstellt (Chen et al., 2006). Chen und Mitarbeiter (2006) vermuten, dass die Ausbreitung nach Europa in erster Linie durch überlappende Vogelzugrouten erfolgte. Bisher wurde jedoch kein hochpathogener H5N1-Subtyp aus einem lebenden, klinisch gesunden Wildvogel isoliert (Fiedler et al., 2005). Weltweiter Geflügelhandel sowie illegaler Handel mit Käfigvögeln haben zusätzlich das Potential, hoch pathogene aviäre Influenza zu verbreiten.

Die Ausbrüche klassischer Geflügelpest in Italien (1999) und den Niederlanden (2003), der laufende Seuchenzug von H5N1 Genotyp „Z“ im südostasiatischen Raum und das Auftreten von H5N1 in Europa und Afrika seit Oktober 2005 zeigen, dass die Überwachung von Zugvögeln zur Früherkennung

der Einschleppung von H5- oder H7-Subtypen in die Schweiz notwendig ist. Bis heute wurden aus mehr als 40 Ländern H5N1-Ausbrüche bei Wildvögeln und Nutzgeflügel gemeldet. Der AIV-Nachweis bei Vögeln erfolgt über Abstriche aus Kloake oder Choane, bei verendeten Tieren auch über Organproben. In den letzten Jahren sind, neben Virusnachweis über embryonierte Hühnereier oder Zellkultur, molekularbiologische Nachweismethoden validiert worden. Diese werden aufgrund der grossen anfallenden Probenmengen in den meisten Ländern durchgeführt. Für den Antikörnernachweis werden serologische Verfahren wie Agargel-Immendiffusion, Hämagglutinationshemmung und ELISA verwendet (OIE Manual, 2000). Sie werden vor allem zum Nachweis von LPAI-Infektionen in Geflügelherden eingesetzt.

## Tiere, Material und Methoden

### Probenmaterial

Während des ersten Monitorings von Wildvögeln wurden von Herbst 2003 bis Frühjahr 2005 1053 Kloakentupfer und Organproben mittels PCR untersucht. Die Proben stammten aus laufenden Forschungsprojekten der Vogelwarte Sempach, bei denen Wildvögel zwecks Beringung gefangen werden sowie von Abschussaktionen der Jagdverwaltungen verschiedener Kantone, von Vogelpflegestationen und aus dem Sektionsgut des Nationalen Referenzzentrums für Geflügel- und Kaninchenseuchen (NRGK) der Universität Zürich. Im Rahmen der zweiten Überwachungsphase von Oktober 2005 bis Ende April 2006 wurden drei Gruppen von Wildvögeln untersucht:

- Zugvögel (n = 967), von denen 524 Singvögel auf der Beringungsstation Ulmethöchi (BL) und 443 Wasservögel in der Entenreue von Oberkirch (LU) am Sempachersee gefangen wurden.
- Wasservögel (n = 305), die im Rahmen der regulären Jagd in 7 Kantonen abgeschossen wurden.
- Wildvögel (n = 1183), die an Stellen mit mehr als 5 toten Tieren an einem Fundort eingesammelt und untersucht wurden. Nach den ersten Meldungen H5N1-positiver Schwäne Mitte Februar 2006 aus Westeuropa ([www.promedmail.org](http://www.promedmail.org)) wurde die Überwachung durch tägliches Einsammeln verendeter Wasservögel intensiviert.

Insgesamt wurden 3508 Proben von Wildvögeln (knapp 60% Wasservögel) in einem Zeitraum von 2.5 Jahren untersucht, rund 2500 seit letztem Herbst im Rahmen des zweiten Wildvogelmonitorings (Abb. 1 und 2). 146 Hobbygeflügelbetriebe (v.a. Enten, Gänse und Straussenartige), welche während der Stallpflicht vom 20. Februar bis 30. April 2006 eine Ausnahme-

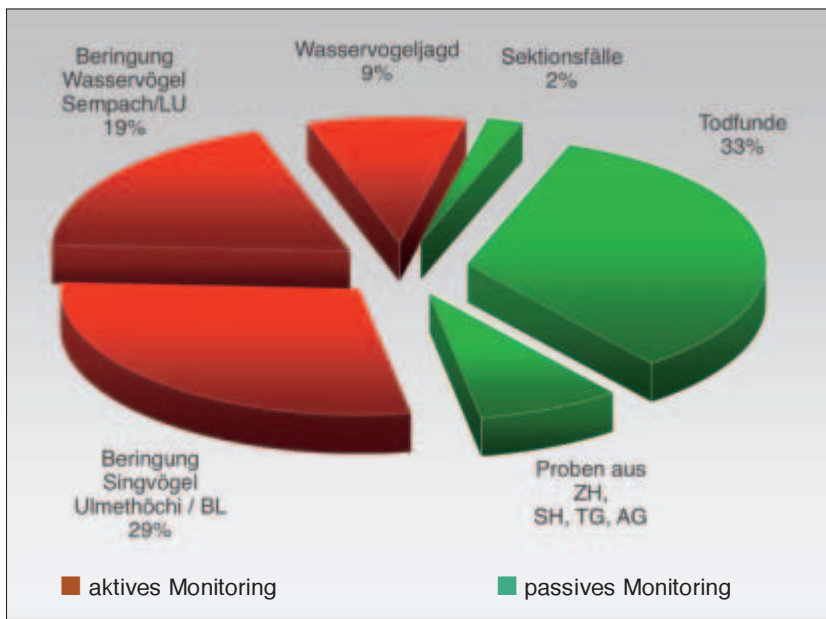


Abbildung 1: Verteilung des Probenmaterials aus aktivem und passivem Monitoring.

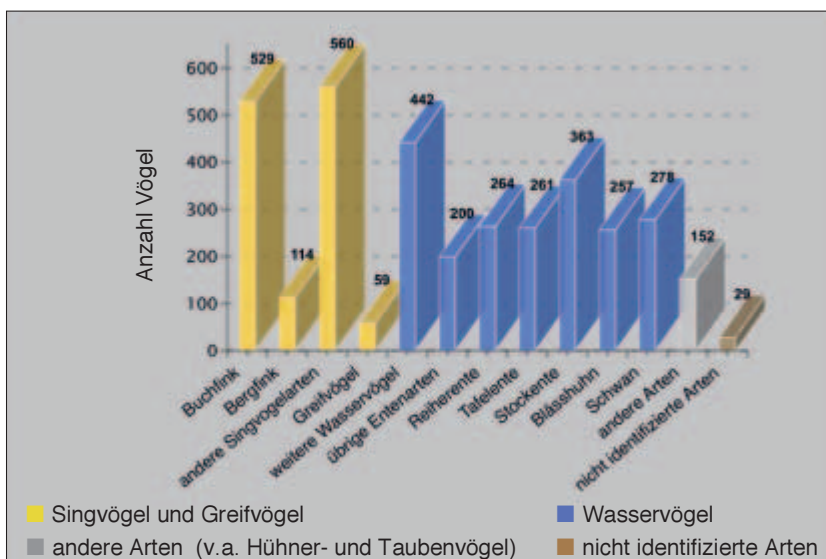


Abbildung 2: Untersuchte Vogelarten.

bewilligung zur Freilandhaltung erhielten, wurden zweimal innerhalb von 6 Wochen getestet.

### RNA Extraktion

Proben aus der Kloake wurden mittels kommerziell erhältlicher Tupfer von Ornithologen, Jägern und Tierärzten entnommen und innerhalb von 24 Stunden an das NRGK gesandt. Die Mehrzahl der Proben wurde sofort verarbeitet, andernfalls bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Nach Verbringung in 1.5ml phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) wurde die RNA der ersten 989 Proben mittels des Ultraspec™ RNA Isolation System Kit (AMS Biotechnology) extrahiert und anschliessend in mit DEPC (Diethylpyrocarbonat) behandeltem Wasser gelöst. Alle nachfolgenden Tupferproben wurden mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen AG, Schweiz) nach Angaben des Herstellers verarbeitet und die erhaltenen Extrakte während 5 Minuten bei

$94^{\circ}\text{C}$  gekocht. Organproben der in der Kloake positiv getesteten Tiere wurden vor der Extraktion unter Zugabe von Lysis-Puffer homogenisiert (Precellys 28, LabForce, Switzerland).

### Real time RT-PCR

Während beider Überwachungsphasen wurden nacheinander zwei verschiedene PCR-Methoden eingesetzt. Mittels der ersten Methode wurde ein Matrixproteingen (M) nachgewiesen, welches bei allen Influenza A-Viren vorkommt. Die zweite, ab Februar 2006 eingesetzte Methode wies zusätzlich das Gen des Membranproteins Hämagglutinin H5 nach.

*Methode 1 (nach Baumer, 2005):* Die Proben wurden mittels einer one-step real time RT-PCR amplifiziert (iCycler™ thermal cycler, Bio Rad Laboratories, Hercules, USA). Die verwendeten Primer (Van Elden et

al., 2001) kodieren für konservierte Regionen des Matrixproteingens (M). Anstelle einer spezifischen Sonde wurde SYBR® Green eingesetzt. Zur definitiven Auswertung diente die Schmelzkurven-Analyse unter Angabe der spezifischen Schmelztemperatur der Produkte im Reaktionsansatz. Als positiv wurden Proben bewertet, deren Schmelzpunkt bei 84°C lag, als negativ solche mit einem Peak bei 77°C. Resultate zwischen diesen Werten wurden als fraglich eingestuft und in einer klassischen RT-PCR mit nachfolgender nested PCR (Starick et al., 2000) untersucht. Die PCR-Amplifikate wurden mit dem QUIAquick® Gel Extraction Kit (QIAGEN Inc. Valencia, CA, USA) aus

dem Agarosegel aufgereinigt und direkt für die DNA-Sequenzierung verwendet (Firma GATC, Konstanz, Deutschland). Die erhaltenen Nukleotidsequenzen wurden mit entsprechenden Sequenzen in der Datenbank des NCBI verglichen. Als Referenzstämme dienten A/turk/Mass/65 (H6N2), A/turk/Wis/66 (H9N2), A/duck/Cz/56 (H4N6), welche vom FLI in Deutschland zur Verfügung gestellt wurden.

*Methode 2 (nach Dalessi, 2006):* Mit einer TaqMan™ one step real-time RT-PCR mittels des 7500 Fast Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems, USA) wurden alle Proben auf Matrixprotein- (M) und H5-Gen

Tabelle 1: Sequenzhomologien der LPAI-positiven Organproben

		Blässhuhn Zürich	Blässhuhn Zug
A/pintail/Alberta/113/85	H6N2	92%	-
A/ruddy turnstone/Delaware/244/91	H5N2	-	94%
A/mallard/Alberta/297/77	H10N7	-	94%
A/ruddy turnstone/Delaware/142/99	H3N2	-	94%
A/mallard/Alberta/211/98	H1N1	-	94%

Tabelle 2: H5N1-positive Fälle des Monitorings 2005/2006

Gattung / Art	Lat. Bezeichnung	Fundort	Kanton	Funddatum
Höckerschwan	Cygnus olor	Schaffhausen	SH	23. Feb 2006
Gänsesäger	Mergus merganser	Genf	GE	25. Feb 2006
Singschwan	Cygnus cygnus	Kreuzlingen	TG	28. Feb 2006
Ente	Fam. Anatinae	Ramsen	SH	1. Mär 2006
Blässhuhn	Fulica atra	Stein	SH	2. Mär 2006
Blässhuhn	Fulica atra	Diessenhofen	TG	3. Mär 2006
Tafelente	Aythya ferina	Steckborn	TG	3. Mär 2006
Reiherente	Aythya fuligula	Steckborn	TG	3. Mär 2006
Blässhuhn	Fulica atra	Langwiesen	ZH	4. Mär 2006
Zwergtaucher	Tachybaptus ruficollis	Schaffhausen	SH	6. Mär 2006
Ente	Fam. Anatinae	Schaffhausen	SH	9. Mär 2006
Ente	Fam. Anatinae	Feuerthalen	ZH	10. Mär 2006
Ente	Fam. Anatinae	Feuerthalen	ZH	10. Mär 2006
Ente	Fam. Anatinae	Dörflingen	SH	11. Mär 2006
Ente	Fam. Anatinae	Schaffhausen	SH	11. Mär 2006
Ente	Fam. Anatinae	Schaffhausen	SH	11. Mär 2006
Tafelente	Aythya ferina	Romanshorn	TG	13. Mär 2006
Blässhuhn	Fulica atra	Flurlingen	ZH	13. Mär 2006
Tafelente	Aythya ferina	Neuhausen	SH	14. Mär 2006
Reiherente	Aythya fuligula	Langwiesen	ZH	18. Mär 2006
Ente	Fam. Anatinae	Feuerthalen	ZH	18. Mär 2006
Ente	Fam. Anatinae	Langwiesen	ZH	18. Mär 2006
Tafelente	Aythya ferina	Romanshorn	TG	19. Mär 2006
Reiherente	Aythya fuligula	Büsingen	SH	19. Mär 2006
Ente	Fam. Anatinae	Uhwiesen	ZH	19. Mär 2006
Tafelente	Aythya ferina	-	TG	22. Mär 2006
Zwergtaucher	Tachybaptus ruficollis	Neuhausen	SH	22. Mär 2006
Reiherente	Aythya fuligula	Büsingen	SH	22. Mär 2006
Reiherente	Aythya fuligula	Neuhausen	SH	22. Mär 2006
Ente	Fam. Anatinae	Diessenhofen	TG	23. Mär 2006
Haubentaucher	Podiceps cristatus	Schaffhausen	SH	26. Mär 2006
Stockente	Anas platyrhynchos	Steckborn	TG	30. Mär 2006

untersucht. Primer und Fluoreszenz-Sonde für beide Gensequenzen wurden nach Spackman und Mitarbeitern (2002) ausgewählt und nach Anweisungen der Veterinary Laboratory Agency (VLA, England) und des Institutes für Viruskrankheiten und Immunprophylaxe (IVI, Schweiz) modifiziert. Der Referenzstamm A/turkey/Turkey (Türkiye)/05 (H5N1) diente als Positivkontrolle. PCR-Läufe wurden jeweils nach 55 Zyklen gestoppt. Extraktionsprodukte positiver Proben wurden zur Bestätigung sowie zur Neuraminidase-Subtypisierung an das EU-Referenzlabor in Weybridge (England) geschickt. Die entsprechenden Tierkörper wurden zur Sektion an das NRGK gesandt.

## Ergebnisse

Mittels Methode 1 wurden Organproben zweier Blässhühner aus dem Sektionsmaterial des NRGK in der klassischen RT-PCR (Starick et al., 2000) positiv auf das M-Gen getestet. Es handelte sich dabei um zwei Erpel aus den Kantonen Zug und Zürich, die aufgrund von Verletzungen durch den Wildhüter abgeschossen wurden. Die Sequenzierung und anschließende BLAST-Analyse (Altschul et al., 1997) ergab Sequenzhomologien von 92% bzw. 94% mit kanadischen LPAI-Stämmen (Tab. 1). 32 weitere Kloakentupferproben von Totfunden im Zeitraum Februar/März 2006 testeten mittels Methode 2 positiv für M- und H5-Gen (Tab. 2). Die geographische Verteilung dieser Fälle ist in Abbildung 3 dargestellt. Sämtliche 146 getesteten Hobbygeflügelbetriebe, welche eine Ausnahmebewilligung zur Freilandhaltung beantragt hatten, waren frei von aviärer Influenza.

## Diskussion

Bei lebenden Wildvögeln erwies sich die Beprobung mittels Kloakentupfern als einfach und effizient. Auch bei toten Vögeln wurde die Entnahme von Kloakentupferproben im Feld der Untersuchung ganzer Vogelkadaver vorgezogen. Nur im Falle positiver Resultate in der Tupferprobe wurden die entsprechenden Tierkörper mittels Spezialkurier zur Sektion eingesandt. Dadurch wurde das Risiko einer Verschleppung von infektiösem Material auf ein Minimum reduziert und das NRGK war in der Lage, grosse Probenzahlen innerhalb von 24 Stunden zu verarbeiten.

Die real-time RT-PCR, welche in der Humanmedizin bereits seit längerem etabliert ist, stellt einen ersten Schritt zur Harmonisierung der Testverfahren im Zuge des schweizerischen Influenza-Netzwerks dar. Die während der ersten Phase der Überwachung verwendete PCR nutzt Primersequenzen, die an konservierte Regionen des Matrixproteingens binden und damit ein breites Spektrum an Influenza A-Subtypen erfassen. Der Fluoreszenzfarbstoff SYBR<sup>®</sup> Green bindet unspezifisch an DNA-Doppelstränge, was zu sequenzunabhängigen Signalen führt. Das detektierte Spektrum wird dadurch grösser. Eine direkte Unterscheidung von negativen und positiven Resultaten ist ohne Schmelzkurven-Analyse allerdings unmöglich. Die klassische RT-PCR wurde als Bestätigungstest gewählt, da sie mittels einer nested PCR die Sensitivität des Nachweises erhöht und insbesondere den Nachweis von LPAI-Viren verbessert (Starick und Werner, 2003). Mit dem Matrixgen (M) als Zielsequenz können jedoch keine Subtypen bestimmt werden. Deshalb wurden während der zweiten Überwachungsphase zusätzlich Primer zum Nachweis des Hämagglutinins H5 eingesetzt. Zudem wurden für

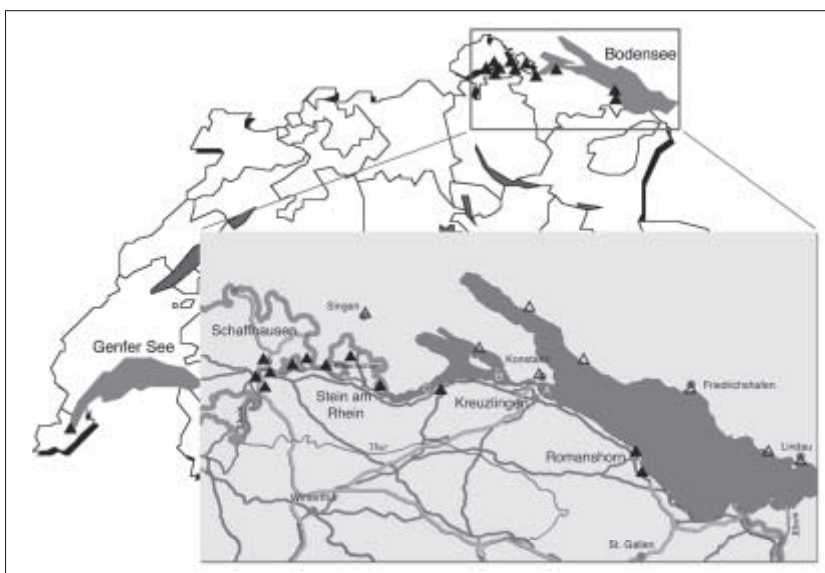


Abbildung 3: Geographische Verteilung der H5N1-Fälle in der Schweiz (▲, Fundorte in der Schweiz; △, Fundorte in Deutschland).

beide real-time PCRs (M- und H5-Gen) spezifische Sonden eingesetzt. Diese Sonden sind mit einem Farbstoff versehen, welcher bei der Amplifikation spezifischer PCR-Produkte freigesetzt wird und fluoresziert. Die Messung der zunehmenden Fluoreszenzintensität ist spezifischer als die Schmelzkurven-Analyse. Im Gegensatz zu klassischen PCR-Methoden liegen bei der real time RT-PCR bereits nach wenigen Stunden auswertbare Resultate vor.

Die Schweiz ist seit 1930 offiziell frei von Klassischer Geflügelpest (HPAI) ([www.bvet.admin.ch/tiergesundheit](http://www.bvet.admin.ch/tiergesundheit)). Während der letzten Jahre wurden Fälle mit unüblich hoher Mortalitätsrate in Geflügelherden und bei Wildvögeln mittels Bruteikulturen untersucht. 220 Anzuchtversuche zwischen 2000 und 2003 lieferten negative Resultate (Hoop, persönliche Mitteilung, 2006). Die Gensequenzen, die während der ersten Überwachungsphase im Februar 2004 aus zwei Blässhühnern (*Fulica atra*) isoliert wurden, wiesen mit 92% bzw. 94% eine niedrige Homologie zu kanadischen Influenza A-Stämmen auf. Es handelt sich dabei um niedrig pathogene Subtypen isoliert aus verschiedenen Entenarten und Schnepfenvögeln in Kanada. Da unter anderem H10-Subtypen bereits aus Wildvögeln und Straussen in Südafrika sowie aus Mastgeflügel in England isoliert wurden (Alexander, 2003), wird diesen Resultaten keine grosse Bedeutung beigemessen. Die negativen Resultate der untersuchten Singvogelarten bestätigen die These, dass diese Arten in der Regel keine Träger von Influenza A-Viren sind. Zu diesem Ergebnis kamen auch Ryll und Mitarbeiter (2003), die bei der Untersuchung von über 500 Vögeln, darunter ein Drittel Singvögel, auf Helgoland kein aviäres Influenza-Virus nachweisen konnten. In der Schweiz wurde bis Mitte Februar 2006 in mehr als 1300 Wildvögeln kein AI-Virus nachgewiesen. Obwohl 60% der Proben von Wasservögeln stammten, unterschied sich die niedrige Prävalenz gegenüber Daten aus den Nachbarländern mit signifikant höherem Vorkommen niedrig pathogener aviärer Influenzaviren bei Wasservögeln (Globig et al., 2006). Am 25. Februar 2006 wurde der erste H5N1-positive Wildvögel nahe des Jet d'eau in Genf aufgefunden. Es handelte sich um einen weiblichen Gänseäger (*Mergus merganser*). Kurz zuvor meldete Frankreich eine positiv getestete Ente aus dem Département Ain, nahe der Schweizer Grenze. Der Gänseäger blieb ein isolierter Fall am Genfersee. Die Gründe dafür sind unklar. Bis Ende April wurden weitere 31 Kloakentupfer verendeter Wasservögel positiv auf H5N1 getestet. Es handelte sich ausschliesslich um Tiere aus den Familien der Entenvögel, der Rallen und der Lappentaucher (Tab. 1). Mit Ausnahme des Gänseägers wurden alle positiven Tiere entlang des Bodenseeuferes und des Hochrheins bis zum Rheinflall aufgefunden (Abb. 3). Die hohe Dichte von Fällen im Raum Schaffhausen könnte durch die Strömungsver-

hältnisse am Hochrhein bedingt sein, welche die Kadaver der Wasservögel Richtung Rheinflall treibt. Ein Faktor, der die geographische Verteilung der Fälle beeinflusst. Zusätzlich intensiviert sich die Suche in Gebieten, in denen bereits zu einem früheren Zeitpunkt der Überwachung positive Tiere gefunden wurden. Der erste positive Fall im Gebiet des Bodensees war ein Singschwan (*Cygnus cygnus*). Singschwäne sind im Gegensatz zu Höckerschwänen (*Cygnus olor*) nur in kleiner Zahl vertreten. Im Winterhalbjahr werden nur ca. 100 Individuen gezählt (Burkhardt und Keller, 2003). Im Rahmen des Forschungsprojektes «Constance» sollen Infektionsversuche an Schwänen Aufschluss über die Pathogenese von H5N1 bei Wasservögeln geben. Der Bodensee ist der wichtigste Überwinterungsplatz für Wasservögel innerhalb des Europäischen Binnenlandes. Die Konstanzer Bucht, das Ermatinger Becken sowie das Untersee-Ende inklusive Hochrhein bis Bibernmühle sind Wasservogelgebiete von internationaler Bedeutung (Marti und Schifferli, 1987). Während der Wintermonate findet man in dieser Region mit knapp 40% (ca. 180'000 Tiere) den grössten Wasservogelbestand der Schweiz. Sie verfügt über grosse Flachwassergebiete, auf denen vor allem Reiher- und Tafelenten (*Aythya fuligula*, *A. ferina*) sowie Blässhühner (*Fulica atra*) den Seegrund nach Wandermuscheln absuchen. Das Nahrungsangebot wie auch die Wetterbedingungen bestimmen im Verlaufe des Winters die Verteilung der Vögel. Beobachtungen mittels Radar am Sempachersee zeigten, dass Tauchenten während der Nacht die Gewässer wechseln (Kestenholz, 1995). Bei fallenden Temperaturen fliegen sie südwestwärts, bei warmem Wetter Richtung Nordosten. Bis Ende April verringert sich die Zahl der Zugvögel auf rund 50000, da die meisten Wasservögel zu ihren nördlich gelegenen Brutplätzen zurückfliegen. In diesem ausgedünnten Frühlingsbestand wird die Verbreitung von Viren zunehmend erschwert. Trotzdem stellen die Singvögel, die im Frühling aus ihren Überwinterungsgebieten in Afrika zurückkehren, ein Risiko für die Wiedereinschleppung des Virus dar ([www.birdlife.ch](http://www.birdlife.ch)). Ein Monitoring dieser Langstreckenzieher wurde im April 2006 in den Bolle di Magadino im Kanton Tessin gestartet. Das Feuchtgebiet ist mit seinen Schilfbereichen und Auenwäldern ein idealer Rastplatz für Zugvögel (Ufficio del Veterinario cantonale, TI, 2006). 233 Tupferproben verschiedener Singvogelarten, vor allem Rauchschnalben (70%), wurden am IVI untersucht. Alle Proben waren negativ.

Die Gefahr einer Streuung von H5N1 in Geflügelhaltungen, vor allem in Gewässernähe, ist auch nach dem Abzug der Wintergäste als «natürliche» Wirte noch vorhanden. Eine Verschleppung durch aassfressende Vögel wie Krähen, Möwen und Greifvögel ist aufgrund ihrer grösseren Aktionsradien möglich. Bei Möwen sind Ortswechsel von mehreren Kilometern

zwischen Schlafplätzen und Nahrungsgründen bekannt, beide liegen in Gewässernähe. Zusätzliche Risikofaktoren sind gemischte Betriebe mit Wasserziergeflügel und Freilandhaltung (Zanella et al., 2001). In einer früheren Befragung von Geflügelhaltern in der Schweiz wurden häufig Sperlinge, Krähen und Greifvögel in der näheren Umgebung von Hühnern beobachtet (Gohm et al., 1999). Die mögliche Zirkulation niedrig pathogener Subtypen in Geflügelpopulationen (Garcia et al., 1996; Perdue et al., 1998) zeigt die Notwendigkeit der serologischen Überwachung von Geflügelbeständen. Eine im Mai 2006 durchgeführte serologische Untersuchung von 34 Legehennenherden in der Schweiz wies keine zirkulierenden Antikörper gegen aviäre Influzaviren auf (IVI, persönliche Mitteilung, 2006). Bei einer Durchseuchung mit LPAI-Viren wäre, vor allem bei alternativen Haltungssystemen, mit einer weit höheren Durchseuchungsrate zu rechnen (Ortrud Werner, persönliche Mitteilung, 2005). Die Möglichkeit der Viruszirkulation in Nutzgeflügelbeständen in Mitteleuropa ist klein, da infizierte Bestände sofort an Ort und Stelle gekeult werden. Das Verbot von Geflügeltransporten und -ausstellungen in betroffenen Gebieten und die Tatsache, dass in der Schweiz sowie in den nördlichen und östlichen Nachbarländern keine Lebendgeflügelmärkte stattfinden verhindern eine längere Persistenz. Eine grössere Gefahr stellen illegale Importe von Bruteiern oder geimpften Tieren dar (Gohm et al., 1999).

Die Beteiligung von Haustieren bei der Verbreitung von H5N1 ist weitgehend ungeklärt (Kuiken et al., 2004). Hauskatzen können nach experimenteller Infektion erkranken, das Virus über Fäces und Atemsekrete ausscheiden und Artgenossen infizieren (Kuiken et al., 2004; Rimmelzwaan et al., 2006). In unserer Studie wurden zwei der H5N1-positiven Vogelkada-

ver durch Hauskatzen nach Hause gebracht. Die nachfolgende Untersuchung von Nasopharyngealabstrichen der betroffenen Katzen war negativ. Deutschland und Österreich hingegen meldeten H5N1-positive Katzen nach Kontakt mit infizierten Vögeln ([www.cdc.gov](http://www.cdc.gov)). Die Tiere, die auf der Insel Rügen (Deutschland) gefunden wurden, hielten sich alle im Gebiet mit der höchsten Viruslast in Wildvögeln auf. Anfang März wurde auf der Insel Rügen ein Steinmarder (*Martes foina*), der klinische Symptome zeigte, positiv auf H5N1 getestet ([www.fli.bund.de](http://www.fli.bund.de)), obwohl bisher ausschliesslich experimentelle Infektionen bei Marderartigen beschrieben sind (Maines et al., 2006). In einer nicht publizierten Studie des National Institute of Animal Health in Thailand (Damongwatanapokin et al., 2006) wurden mehr als 600 Strassenhunde in Bangkok serologisch untersucht, wovon 160 Tiere Antikörper gegen H5N1 aufwiesen.

## Schlussfolgerung

Die real time RT-PCR erwies sich als effektive Nachweismethode zur Untersuchung grosser Probenmengen. Während der Monate Februar und März konnten bis zu 80 Proben täglich bearbeitet werden. Die geographische Verteilung der positiven Tiere entlang der Hauptüberwinterungsplätze Bodensee, Hochrhein und Genfersee zeigte, dass die Schweiz über klar definierte Risikogebiete verfügt. Die Übertragung aviärer Influzaviren auf Hauskatzen scheint selbst bei engem Kontakt mit infizierten Vögeln gering zu sein. Eine Untersuchung ist angezeigt bei mit Fieber einhergehenden Erkrankungen des unteren Respirationstraktes und nachweislich erfolgtem Kontakt mit infizierten Vögeln.

### Influenza aviaire : monitoring des oiseaux sauvages en Suisse entre 2003 et 2006

Plus de 3500 écouvillons cloacaux et échantillons d'organes provenant d'oiseaux chanteurs et d'oiseaux d'eau sauvages ainsi que de volaille détenue en plein air ont été examinés au moyen d'une PCR quant à la présence du virus de l'influenza aviaire. La Suisse a réalisé son premier monitoring de l'influenza aviaire entre l'automne 2003 et le printemps 2005. 1053 échantillons provenant de divers oiseaux sauvages, principalement des passereaux, ont été testés. Dans 2 cas, des souches faiblement pathogènes ont été découvertes. Un deuxième programme de surveillance intensive a débuté en octobre 2005 parallèlement à la première obligation

### Influenza aviaria: monitoraggio degli uccelli selvatici in Svizzera dal 2003 al 2006

Sono stati esaminati tramite real-time Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (PCR) più di 3500 tamponi cloacali e campioni di organi di passerii e uccelli acquatici selvatici vivi e di pollame da reddito da allevamenti all'aria aperta nel quadro di vari programmi di sorveglianza per la presenza del virus dell'influenza aviaria. Tra l'autunno 2003 e la primavera 2005 la Svizzera ha effettuato il primo monitoraggio nazionale sul virus dell'influenza aviaria. Sono stati testati 1053 campioni di diversi uccelli selvatici in prevalenza fringillidi (ordine dei Passeriformi). In due casi sono stati rilevati dei ceppi di Influenza A (LPAI) debol-

de confinement des oiseaux de rente et d'ornement en Suisse. Jusqu'à la fin avril 2006, 2455 écouvillons cloacaux provenant d'oiseaux sauvages péris, en particulier d'oiseaux d'eau, ont été examinés. A la fin février, le sous-type H5N1 a été mis en évidence pour la première fois en Suisse. Jusqu'à la fin mars, 32 oiseaux d'eau ont été testés positifs quant au H5N1. 146 exploitations avicoles exemptées de confinement se sont toutes montrées négatives quant à l'influenza aviaire.

mente patogeni. Un secondo programma di sorveglianza intensivo è cominciato nell'ottobre 2005 in concomitanza al primo obbligo della tenuta in stalla del pollame di allevamento e da reddito svizzero. Fino alla fine di aprile 2006 sono stati esaminati 2455 campioni di tamponi cloacali di uccelli selvatici morti principalmente appartenenti alle specie di uccelli acquatici. Alla fine di febbraio si è potuto provare per la prima volta in Svizzera la presenza di un sottotipo di H5N1. Fino a fine marzo sono stati testati positivamente al H5N1, 32 uccelli acquatici. Le 146 aziende di pollame con un permesso speciale per l'allevamento all'aria aperta sono risultate negative all'influenza aviaria.

## Literatur

Alexander D. J.: The history of avian influenza in poultry. World Poultry Special Edition 2000, Nov., 7–8.

Alexander D. J.: Report on avian influenza in the eastern hemisphere during 1997–2002. Avian Dis. 2003, 47: 792–797.

Altschul S. F., Madden T. L., Schäffer A. A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D. J.: Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Research 1997, 25: 3389–3402.

Anonym: Auf Rügen gefundener Steinmarder mit H5N1 infiziert. Pressemitteilung März 2006, Friedrich-Löffler-Institut, www.fli.bund.de.

Anonym: Center for disease control and prevention: H5N1 infection in domestic cats and a stone marten – Europe, www.cdc.gov/flu/avian/outbreaks/mar13cats.htm.

Anonym: Highly Pathogenic Avian Influenza. In: OIE Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines, edited by OIE Standard Commission, Fourth Edition 2000, 212–220.

Anonym: Schweizerischer Vogelschutz SVS: Rauchschnäbel und Vogelgrippe. Medienmitteilung 22.03.2006, www.birdlife.ch/d/pm06\_03\_22.html, 2006.

Baumer A.: Aviäre Influenza: molekularbiologische Untersuchung von Wildvögeln und Seroscreening von Wirtschaftsgeflügel in der Schweiz. Dissertation, Universität Zürich, 2005.

Burkhardt M., Keller V.: Vogel am Wasser. In: Bericht 2003. Schweizerische Vogelwarte Sempach.

Capua I., Alexander D. J.: Avian influenza: recent developments. Avian Pathol. 2004, 33: 393–404.

Chen H., Smith G. J. D., Li K. S., Wang J., Fan X. F., Rayner J. M., Vijaykrishna D., Zhang J. X., Zhang L. J., Guo C. T., Cheung C. L., Xu K. M., Duan L., Huang K., Qin K., Leung Y. H. C., Wu W. L., Lu H. R., Chen Y., Xia N. S., Naipospos T. S. P., Yuen K. Y., Hassan S. S., Bahri S., Nguyen T. D., Webster R. G., Peiris J. S. M., Guan Y.: Establishment of multiple sublineages of H5N1 influenza virus in Asia: Implications for pandemic control. Proc. Natl. Acad. Sci. 2006, 103: 2845–2850.

Dalessi S., Hoop R., Engels M.: The 2005/2006 Avian Influenza Monitoring of wild birds and commercial poultry in Switzerland. Avian Diseases 2006, Article in press.

Damrongwatanapokin I.: Thai dogs carry bird-flu virus, but will they spread it? Nature 2006, 439: 773.

Ellis T. M., Bousfield R. B., Bissett L. A., Dyrting K. C., Luk G. S. M., Tsim S. T., Sturm-Ramirez K., Webster R. G., Guan Y., Peiris J. S. M.: Investigations of outbreaks of highly pathogenic H5N1 avian influenza in waterfowl and wild birds in Hong Kong in late 2002. Avian Pathol. 2004, 33: 492–505.

Fiedler W., Bosch S., Globig A., Bairlein F.: Hintergrundinformationen zur Vogelgrippe und Hinweise für Vogelkundler. Vogelwarte 2005, 43: 249–260.

Garcia M., Crawford J. M., Latimer J. W., Rivera-Cruz E., Perdue M. L.: Heterogeneity in the haemagglutinin gene and emergence of the highly pathogenic phenotype among recent H5N2 avian influenza viruses from Mexico. J. Gen. Virol. 1996, 77: 1493–504.

Globig A., Starick E., Werner O.: Isolation of avian influenza from migratory waterfowl in Germany: results of a two year study. Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr. 2006, 119: 132–9.

Globig A., Starick E., Werner O.: Untersuchung von Wildvögeln auf aviäre Influenza- und Paramyxoviren. In: Referatsammlung 67. Fachgespräch der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft, Fachgruppe «Geflügelkrankheiten», Verlag der DVG e.V. 2005, 73–82.

Gohm D., Schelling E., Audigé L., Thür, B.: Newcastle Krankheit- seroepidemiologische Untersuchung einer hochansteckenden Tierseuche beim Geflügel und bei Wildvögeln in der Schweiz. Schweiz. Arch. Tierheilk. 1999, 141: 549–588.

Kestenholz M.: Movements and roosting behaviour of diving ducks (*Aythya fuligula* and *A. farina*) wintering in Switzerland. Dissertation, Universität Basel, 1995.

Krauss S., Walker D., Pryor S. P., Niles L., Chenhong L., Hishaw V. S., Webster R. G.: Influenza A viruses of migrating wild



aquatic birds in North America. *Vector Borne and Zoon. Dis.* 2004, 4: 177–189.

Kuiken T., Rimmelzwaan G., van Riel D., van Amerongen G., Baars M., Fouchier R., Osterhaus A.: Avian H5N1 influenza in cats. *Science* 2004, 306: 241.

Maines T.R., Chen L.-M., Matsuoka Y., Chen H., Rowe T., Ortin J., Falcon A., Hien N.T., Mai L. Q., Sedyaningsih E. R., Harun S., Tumpey T.M., Donis R. O., Cox N.J., Subbarao K., Katz J. M.: Lack of transmission of H5N1 avian-human reassortant influenza viruses in a ferret model. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2006, 103: 12121–12126.

Marti C., Schifferli L.: Inventar der Schweizer Wasservogelgebiete von inter-nationaler Bedeutung – Erste Revision 1986. *Ornithologischer Beobachter* 1987, 84: 11–47.

Perdue M. L., Swayne D. E.: Public Health Risk from Avian Influenza Viruses. *Avian Dis.* 2005, 49: 317–327.

Perkins L. E. and Swayne D. E.: Susceptibility of laughing gulls (*Larus atricilla*) to H5N1 and H5N3 HPAI viruses. *Avian Dis.* 2002, 46: 877–885.

Rimmelzwaan G. F., van Riel D., Baars M., Bestebroer T. M., van Amerongen G., Fouchier R. A., Osterhaus A. D., Kuiken T.: Influenza A virus (H5N1) infection in cats causes systemic disease with potential novel routes of virus spread within and between hosts. *Am. J. Pathol.* 2006, 168: 176–183.

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.: Development of a real-time reverse transcriptase PCR assay for type A influenza virus and the avian H5 and H7 hemagglutinin subtypes. *J. Clin. Microbiol.* 2002, 40: 3256–3260.

Starick E., Römer-Oberdörfer A., Werner O.: Type- and subtype-specific RT-PCR assays for avian influenza A viruses. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health* 2000, 47: 295–301.

Starick E., Werner O.: Detection of H7 avian influenza virus directly from poultry specimens. *Avian Dis.* 2003, 47: 1187–1189.

Sturm-Ramirez, K. M., Hulse-Post D. J., Govorkova E. A., Humberd J., Seiler P., Puthavathana P., Buranathai C., Nguyen T. D., Chaisingh A., Long H.T., Naipospos T. S. P., Chen H., Ellis T.M., Guan Y., Peiris J. S. M., Webster R. G.: Are ducks contributing to the endemicity of highly pathogenic avian influenza virus in Asia? *J. Virol.* 2005, 79: 11269–11279.

Van Elden L. J. R., Nijhuis M., Schipper P., Schuurmann R., Van Loon A. M.: Simultaneous detection of influenza viruses A and B using real-time quantitative PCR. *J. Clin. Microbiol.* 2001, 39: 196–200.

Webster R. G., Bean W. J., Gorman O.T., Chambers T. M., Kawaoka Y.: Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiol. Rev.* 1992, 56: 152–179.

Webster R. G., Guan Y., Poon L., Krauss S., Webby R., Govorkova E., Peiris M.: The spread of the H5N1 bird flu epidemic in Asia in 2004. *Arch. Virol.* 2005, 19: 117–129.

Werner O., Globig A.: Zum Vorkommen von aviären Influenza Viren bei Geflügel in verschiedenen Haltungsformen in Deutschland. Tagung der Fachgruppe Geflügelkrankheiten, 67. Fachgespräch, Hannover 2004.

Werner, O.: Aviäre Influenza – Eine permanente Bedrohung des Nutzgeflügels und des Menschen. In: Referatesammlung 59. Fachgespräch der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft, Fachgruppe «Geflügelkrankheiten», Verlag der DVG e.V. 2005, 34–48.

Zanella A., Dall'Ara P., Martino P.A.: Avian influenza epidemic in Italy due to serovar H7N1, *Avian Dis.* 2001, 45: 257–261.

## Korrespondenzadresse

Dr. med. vet. Corinne Rutz, Institut für Veterinärbakteriologie, Abteilung für Geflügel- und Kaninchenkrankheiten, Vetsuisse-Fakultät, Universität Zürich, Winterthurerstr. 270, CH-8057 Zürich, Tel. +41 (0) 44 635 86 31, Fax +41 (0) 44 635 89 14, E-Mail: corinne.rutz@vetbakt.unizh.ch

Manuskripteingang: 19. Januar 2007

Angenommen: 1. Juni 2007