

INHALTSVERZEICHNIS

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

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