

Aus dem Robert Koch-Institut Berlin

Die Prävalenz und Inzidenz von *West-Nil-Virus* in Deutschland

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des Doktors
der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

vorgelegt von Sonja Linke, Diplom-Biologin aus Berlin

Februar 2007

Eingereicht am Fachbereich der Biologie, Chemie und Pharmazie
der Freien Universität Berlin

Gutachter: 1. Prof. Dr. Georg Pauli, Robert Koch-Institut Berlin
2. Prof. Dr. Rupert Mutzel, Freie Universität Berlin

Disputation am: 31.05.2007

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	1
Abkürzungsverzeichnis.....	6
1 Einleitung.....	10
1.1 Herkunft und Taxonomie von <i>West-Nil-Virus</i> , WNV.....	10
1.2 Molekulare Klassifikation von WNV.....	12
1.3 Virologische Grundlagen.....	14
1.3.1 Morphologie von WNV.....	14
1.3.2 Organisation des viralen Genoms.....	15
1.3.3 Replikationszyklus des Virus.....	15
1.1.4 Virale Proteine.....	17
1.4 Transmission von WNV.....	20
1.4.1 WNV-Infektionen bei Stechmücken und Zecken.....	21
1.4.2 WNV-Infektionen bei Vögeln.....	24
1.4.3 WNV-Infektionen bei Menschen.....	25
1.4.4 WNV-Infektionen bei Pferden.....	28
1.4.5 WNV-Infektionen bei weiteren Vertebraten.....	28
1.5 Das <i>Usutu-Virus</i> , USUV.....	30
1.6 Diagnostische Nachweismethoden von WNV.....	31
1.6.1 Diagnostischer Virusnachweis, direkter Nachweis.....	31
1.6.2 Serologische Diagnostik, indirekter Nachweis.....	31
1.7 Behandlung, Vakzine und Vektorbekämpfung.....	32
1.8 Epidemiologie von WNV.....	34
1.8.1 Verbreitung von WNV auf dem amerikanischen Kontinent.....	34
1.8.2 Verbreitung von WNV in Europa, Asien und Australien.....	35
1.9 Ziel der Arbeit.....	38
2 Material und Methoden.....	39
2.1 Chemikalien.....	39
2.2 Antikörper.....	40
2.3 Kits.....	40

2.4	Nährmedien.....	41
2.5	Puffer und Lösungen.....	42
2.5.1	Anticoagulant Preservation Solution, APS-Puffer.....	42
2.5.2	PCR-Puffer.....	42
2.5.3	Agarose-Gelelektrophorese.....	42
2.5.4	Zellkulturlösungen und Medien.....	43
2.5.5	Desinfektionsmittel.....	44
2.6	Virusstämme.....	44
2.7	Technische Geräte und sonstige Laborgeräte.....	45
2.8	Verbrauchsmaterialien.....	46
2.9	Software, Datenbanken.....	48
2.10	Enzyme und Nukleinsäuren.....	48
2.11	Oligonukleotidprimer.....	48
2.12	Eukaryotische Zelllinien.....	50
2.13	Untersuchungsmaterial.....	51
2.14	Probengewinnung.....	51
2.14.1	Blutentnahme bei Vögeln.....	51
2.14.2	Sektion von Vogelkadavern.....	52
2.15	Isolation von Nukleinsäuren, RNA-Extraktion.....	52
2.15.1	Extraktion der Gesamt-RNA aus Vollblut (PAXgene).....	52
2.15.2	Extraktion der Gesamt-RNA aus Zellkulturüberständen.....	53
2.15.3	Extraktion der Gesamt-RNA aus EDTA-Vollblut.....	53
2.1.4	Extraktion der Gesamt-RNA aus Cerebrospinalflüssigkeit.....	53
2.1.5	Extraktion der Gesamt-RNA aus Gewebe.....	54
2.1.6	Extraktion der Gesamt-RNA aus getropftem getrockneten Blut.....	54
2.1.7	Ethanol-fällung von RNA.....	54
2.1.8	Photometrische Konzentrationsbestimmung.....	55
2.16	Polymerase-Ketten-Reaktionen (PCR).....	55
2.16.1	Reverse-Transkriptase (RT)-PCR.....	55
2.16.2	Polymerase-Ketten-Reaktion.....	57
2.16.3	Gelelektrophorese zur Identifizierung von PCR-Produkten.....	58
2.16.4	Real-Time-PCR: TaqMan-PCR.....	59
2.1.5	PCR-Produktaufreinigung.....	60

2.1.6	Gelextraktion	60
2.17	Klonierung	61
2.17.1	Klonierung von PCR-Produkten.....	61
2.1.2	Präparation von kompetenten Zellen.....	62
2.1.3	Kolonien-PCR	62
2.1.4	Präparation von rekombinanten Bakterienkulturen	63
2.1.5	Plasmidisolierung	64
2.1.6	Plasmidverdünnung für die Real-Time-PCR.....	64
2.18	Sequenzierung von DNA	64
2.19	Serologische Diagnostikmethoden.....	66
2.19.1	Enzyme-linked-immuno-sorbent-assay (ELISA)	66
2.19.2	Indirekter Immunfluoreszenztest (IFT)	67
2.1.3	Virusneutralisationstests	68
2.1.4	Antikörpergewinnung aus getropftem getrockneten Blut.....	71
2.20	Virologische Methoden	71
2.20.1	Virusanzucht.....	71
2.20.2	Virustiterbestimmung von Flaviviren	72
2.20.3	Inaktivierung von Viren.....	73
2.21	Zellkultur	73
2.21.1	Auftau- und Einfrierprozess	73
2.21.2	Kultivierung von Zellen	74
2.21.3	Mykoplasmen-PCR	75
2.22	Statistische Auswertungen	76
3	Ergebnisse.....	77
3.1	Etablierung und Validierung von Untersuchungsmethoden für den Nachweis von WNV	77
3.1.1	Nukleinsäurenachweissysteme (PCR) für WNV	77
3.1.1.1	Entwicklung von Primern für die generische TaqMan-PCR zum Nachweis von WNV Genotyp 1 und 2	79
3.1.1.2	Etablierung einer TaqMan-PCR zum Nachweis von WNV Genotyp 1 und 2	80
3.1.1.3	Sensitivität der TaqMan-PCR und Probit-Analyse	81
3.1.1.4	Spezifität der TaqMan-PCR zum Nachweis von WNV Genotyp 1 und 2	83

3.1.1.5	Etablierung von PCR-Systemen zum Nachweis von WNV, USUV und Squirrel-Monkey-Retrovirus, SMRV	85
3.1.2	Externe Qualitätssicherheitsstudie zum molekularbiologischen Nachweis von WNV	87
3.2	Stabilität von WNV in Plasma	87
3.3	Optimale Probenvorbereitung von Blutproben für den Nachweis von WNV	88
3.4	Sensitivität der TaqMan-PCR bei WNV-gespiktem Vogelplasma	90
3.5	Interne Kontrolle der Probenaufbereitung	91
3.6	Etablierung von serologischen Nachweismethoden.....	94
3.6.1	Etablierung eines indirekten Immunfluoreszenztests (IFT) für den Antikörpernachweis gegen WNV	94
3.6.2	Etablierung eines Virusneutralisationstestsystems zum Nachweis von Antikörpern gegen WNV	95
3.6.3	Etablierung eines Virusneutralisationstestsystems zum Nachweis von Antikörpern gegen USUV.....	96
3.7	Nachweis von WNV in Proben verschiedenen Ursprungs.....	97
3.7.1	Vögel	97
3.7.1.1	Nukleinsäurenachweis für WNV in Vögeln	101
3.7.1.2	Seroprävalenz von Vögeln im WNV-Immunfluoreszenztest.....	102
3.7.1.3	Seroprävalenz von Vögeln im WNV-Virusneutralisationstest.....	105
3.7.1.4	Vergleich der Seroprävalenzen von Vögeln im WNV-IFT und WNV-NT.....	106
3.7.1.5	Seroprävalenz in adulten und juvenilen Vögeln gegen WNV	106
3.7.1.6	Seroprävalenz von Vögeln im USUV-Neutralisationstest	109
3.7.1.7	WNV-Seroprävalenz von Weißstörchen bei Nestgeschwistern	110
3.7.1.8	WNV-Seroprävalenz von Vögeln in den Bundesländern der Bundesrepublik Deutschland..	110
3.7.1.9	WNV-Seroprävalenz von Weißstörchen in Bezug auf die Migrationsrouten	111
3.7.1.10	Seroprävalenz von Vögeln gegen WNV in Bezug auf ihr Zugverhalten	112
3.7.2	Pferde mit ZNS-Symptomatik	114
3.7.2.1	Nukleinsäurenachweis von WNV in Pferden	114
3.7.2.2	WNV-Seroprävalenz in Pferden	114
3.7.3	Menschen	114
3.7.3.1	Patienten mit neurologischen Symptomen unklarer Genese	115
3.7.3.2	WNV-Verdacht bei Personen aus Rumänien	116
3.7.3.3	Serologische Untersuchungen bei Vogelberingern aus Deutschland und Österreich.....	117

4	Diskussion	123
4.1	Etablierung von direkten Nachweismethoden für WNV	123
4.1.1	Externe Qualitätssicherheitsstudie zum molekularbiologischen Nachweis von WNV	125
4.2	Etablierung von indirekten Nachweismethoden für WNV	125
4.2.1	Etablierung eines Immunfluoreszenztests für den Antikörpernachweis gegen WNV	125
4.2.2	Etablierung eines Virusneutralisationstestsystems zum Nachweis von neutralisierenden Antikörpern gegen WNV und USUV	126
4.2.3	Einschätzung von serologischen Diagnostikverfahren	127
4.3	Nachweis von WNV in Proben verschiedenen Ursprungs	130
4.3.1	WNV-Infektionen bei Vögeln	130
4.3.2	WNV-Infektionen bei Pferden	136
4.3.3	WNV-Infektionen bei Menschen	137
4.4	Einschätzung der Gefahr von WNV-Infektionen in Deutschland	140
5	Zusammenfassung	145
6	Summary	147
7	Literaturverzeichnis	148
	Lebenslauf	169
	Publikationen und Vorträge	170
	Danksagung	172
	Selbstständigkeitserklärung	174
	Anhang	

Abkürzungsverzeichnis

Viren

BCRV	<i>Buggy-Creek-Virus</i>
CMV	<i>Humanes Cytomegalovirus</i>
CPCV	<i>Cacipacore-Virus</i>
EBV	<i>Epstein-Barr-Virus</i>
EEEV	<i>Eastern-Equine-Enzephalitis-Virus</i>
FSMEV	<i>Frühsommer-Meningoenzephalitis-Virus</i>
JEV	<i>Japan-Enzephalitis-Virus</i>
KOUV	<i>Koutango-Virus</i>
KUNV	<i>Kunjin-Virus</i>
MVEV	<i>Murray-Valley-Enzephalitis-Virus</i>
ITV	<i>Israel-Meningoenzephalitis-Virus</i>
SLEV	<i>St.-Louis-Enzephalitis-Virus</i>
SMRV	<i>Squirrel-Monkey-Retrovirus</i>
USUV	<i>Usutu-Virus</i>
WEEV	<i>Western-Equine-Enzephalitis-Virus</i>
WNV	<i>West-Nil-Virus</i>
YAOV	<i>Yaounde-Virus</i>

Genomabschnitte

UTR	Untranslatierte Region
ProC	Capsid-Protein
prM	Prämembran-Protein
M	Membran-Protein
ProE	Envelope-Protein
NS1	Nichtstruktur-Protein 1
NS2	Nichtstruktur-Protein 2
NS3	Nichtstruktur-Protein 3

NS4	Nichtstruktur-Protein 4
NS5	Nichtstruktur-Protein 5

Sonstige Abkürzungen

TAMRA	Carboxytetramethylrhodamin
°C	Grad Celsius
%	Prozent
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
A	Absorption
Å	Ångström
AFP	acute flaccid paralysis
ATCC	American Type Culture Collection
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
cDNA	complementary DNA, komplementäre DNA
CMC	Carboxymethylcellulose
CO ₂	Kohlendioxid
d	Durchmesser
ddNTP	Didesoxynukletidphosphat
dest.	destilliert
D-MEM	Dulbecco modifiziertes Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynucleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme-linked-immuno-sorbent-assay
ER	Endoplasmatisches Retikulum

et al.	et alteri
FAM	6`carboxyfluorescein
FKS	fötales Kälberserum
gr	Gramm
g	Gravitationskonstante
h	Stunde (n)
H ⁺	Wasserstoff
Hex-6	Random Hexanukleotid Primer
IgA	Immunglobulin A
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IgY	Immunglobulin Y
IPTG	Isopropyl-Thio-β-D-Galactopyranosid
JOE	2,7-Dimethoxy-4,5-dichloro-6-carboxyfluorescein
kb	Kilobasen
kDa	Kilo Dalton
km	Kilometer
l	Liter
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
M	Molar
mm ³	Kubikmillimeter
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
Min	Minute
ml	Milliliter
Nr.	Nummer
nt	Nukleotid
OD	Optische Dichte
PBS	phosphate buffered saline, Phospat-gepufferte-Kochsalzlösung
PCR	polymerase chain reaction, Polymerase-Kettenreaktion
PEI	Paul-Ehrlich-Institut

PFU	plaque forming unit, Plaquesbildende-Einheiten
PRNT	Plaque-Reduktionsneutralisationstest
RNA	Ribonukleinsäure
RKI	Robert Koch-Institut
rpm	rounds per minute, Rotationsgeschwindigkeit
RT	Reverse Transkriptase
Sek	Sekunden
SPF	Spezifisch pathogen-frei
TCID ₅₀	tissue culture infectious dose 50 %, Kulturinfektiöse Dosis 50
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol
t-RNA	Transfer-Ribonukleinsäure
U	Unit
u.a.	unter anderem
UDG	Uracil-DNA Glycosylase
UV	ultraviolett
V	Volt
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galaktosid
ZNS	zentrales Nervensystem

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht..

Publikationen und Vorträge

PUBLIKATIONEN

1. **Linke, S.**, Niedrig, M., Kaiser, A., Ellerbrok, H., Müller, K., Müller, T., Conraths, F.J., Mühle, R.U., Schmidt, D., Köppen, U., Bairlein, F., Berthold, P., Pauli, G. Serological evidence of West Nile virus infections in wild birds captured in Germany. Am J Trop Med Hyg, eingereicht Januar 2007.
2. **Linke, S.**, Ellerbrok, H., Niedrig, M., Pauli, G. Detection of West Nile virus lineage 1 and 2 by real-time PCR. J Virol Methods, eingereicht Januar 2007
3. Müller, H., Johne, R., Schusser, G., Giese, M., **Linke, S.**, Pauli, G. 2006. Übersichtsartikel: West-Nil-Virus - Ursache einer Zoonose mit zunehmender Bedeutung? DTW (German Veterinary Journal) 113: 435-439.
4. Niedrig, M., **Linke, S.**, Zeller, H. und Drosten, C. 2006. First International Proficiency Study on West Nile Virus Molecular Detection. Clin Chem 52: 1851-1854.

SONSTIGE PUBLIKATIONEN

1. Müller, K., Schettler, E., Gerlach, H., Brunnberg, L., Hafez, H., Hattermann, K., Johne, R., Kollmann, R., Krone, O., Lierz, M., **Linke, S.**, Lueschow, D., Mankertz, A., Müller, H., Prusas, C., Raue, R., Soike, D., Speck, S., Wolf, P., Frölich, K. Investigations on the aetiology of the pinching off syndrome in four white-tailed sea eagles (Haliaeetus albicilla) from Germany. Avian Path, eingereicht Dezember 2006
2. Klee S.R., Tyczka J., Ellerbrok H., Franz T., **Linke S.**, Baljer G., Appel B. Highly sensitive Real-Time-PCR for specific detection and quantification of Coxiella burnetii. BMC Microbiol 2006 Jan 19; 6: 2.

POSTER

München 2006: Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie:

Linke, S., Ellerbrok, H., Kaiser, A., Müller, K., Hagen, N., Müller, T., Fiedler, W., Bairlein, F., Köppen, U., Grund, C., Mühle, R.U., Conraths, F.J., Will, H., Sonnenberg, K., Niedrig, M., Pauli, G. Seroprevalence of West Nile virus in migrating birds in Germany.

Hamburg 2005: 8. Kongress für Infektionskrankheiten und Tropenmedizin:

Muehlen, M., **Linke, S.**, Niedrig, M., Ellerbrok, H., Fiedler, W., Kaiser, A., Stark, K., Pauli, G. Risk of West Nile virus infection due to bird ringing activity in southern Germany.

Tübingen 2004: Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie, Joint meeting with “Società Italiana di Virologia”:

Linke, S., Ellerbrok, H., Kaiser, A., Müller, K., Hagen, N., Berthold, P., Conraths, F.J., Bairlein, F., Köppen, U., Niedrig, M., Pauli, G. Prevalence and Incidence of West Nile virus in Germany.

SONSTIGE POSTER

Berlin 2003: Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie:

Ellerbrok, H. Nitsche, A., **Linke, S.**, Pauli, G. Real-Time Based Orthopoxvirus Diagnostic.

VORTRÄGE

Insel Riems 2006: Einladung zum Institutsseminar am Friedrich Loeffler Institut (FLI), Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit:

Die Prävalenz und Inzidenz von West-Nil-Virus in Deutschland.

Jena 2005: VII International Potsdam Symposium On Tick-Borne Diseases:

Linke, S., Ellerbrok, H., Kaiser, A., Hagen, N., Fiedler, W., Müller, T., Conraths, F.J., Bairlein, F., Köppen, U., Borchers, K., Grund, C., Sonnenberg, K., Schusser, G., Müller, H., Reuter, I., Mühle, R.U., Niedrig, M., Pauli, G. Prevalence of West Nile virus in birds and horses in Germany.

Genf 2005: 8th Annual Meeting of the European Society for Clinical Virology:

Linke, S., Ellerbrok, H., Kaiser, A., Hagen, N., Fiedler, W., Conraths, F.J., Bairlein, F., Köppen, U., Borchers, K., Grund, C., Sonnenberg, K., Schusser, G., Müller, H., Reuter, I., Mühle, R.U., Niedrig, M., Pauli, G. Prevalence and Incidence of West Nile virus in Germany.

SONSTIGE VORTRÄGE

München 2006: Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie:

Ernst, N., Rödiger, J., **Linke, S.**, Stefas, E., Veas, F., Ellerbrok, H. Capture and enrichment of orthopox virus with ApoH coated magnetic beads for sensitive detection.

Uppsala 2004: 6th Conference of the European Wildlife Disease Association:

Müller, T., Werner, O., Globig, A., Schirmeier, H., Conraths, F.J., Mühle, R.U., Wallschläger, D., **Linke, S.**, Pauli, G., Niedrig, M., Ellerbrok, H., Hlinak, A., Kruckenberg, H., Degen, A., Buss, M., Seeger, J.J. A virological and serological survey in migrating waders and waterfowl in Germany.

Danksagung

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. Georg Pauli, Herrn PD Dr. Matthias Niedrig und Herrn Dr. H. Ellerbrok für Bereitstellung des Themas und die Betreuung der Arbeit. Vielen Dank für die vielen fruchtbaren Diskussionen, Anregungen und die Möglichkeit die Ergebnisse dieser Studie bei verschiedenen Kongressen vorzustellen. Herrn Prof. Dr. Rupert Mutzel danke ich für die Unterstützung der Arbeit am Fachbereich Biologie, Chemie und Pharmazie der Freien Universität Berlin.

Für die Hilfe bei den praktischen Untersuchungen bedanke ich mich ganz herzlich bei Inga Nehlmeier. Mein Dank gilt ebenfalls Anette Teichmann und Petra Kreher für ihre Hilfsbereitschaft im Labor.

Die Untersuchung der vielen Proben wäre nicht möglich gewesen, wenn wir für diese Studie nicht eine Vielzahl an Kooperationspartnern gewonnen hätten, die uns mit Proben, Testsystemen, Informationen und vielem mehr unterstützen. Ich möchte daher allen aufgezählten Personen ganz besonders danken, denn ohne sie wäre dieses Projekt nicht möglich gewesen: Dr. Andreas Kaiser, Dr. Ulrich Köppen, Prof. Dr. Franz Bairlein, Dr. Wolfgang Fiedler, Prof. Dr. Peter Berthold, Nils Hagen, Dr. Michael Lierz, Prof. Dr. Hafez Mohamed Hafez, Ina Reuter, Prof. Dr. Lothar H. Wieler, Prof. Dr. Kerstin Borchers, Dr. Thomas Müller, PD Dr. Franz-Josef Conraths, PD Dr. Christian Grund, Dr. Ralf-Udo Mühle, Prof. Dr. Gerald Fritz Schusser, Prof. Dr. Hermann Müller, Prof. Dr. Dieter Neumann-Haefelin, Dr. Thomas Schenk, Prof. Dr. Hans Will und Karen Sonnenberg.

Ich bedanke mich bei all den Vogelberingern, die an diesem Projekt teilgenommen haben und uns sehr freundschaftlich aufgenommen haben. Vielen lieben Dank für die Möglichkeit, in die Welt der Vogelberingung eintauchen zu dürfen: H. Eggers, P. Gottschalk, U. Hilfers, M. Hug, Dr. M. & Dr. M. Kaatz, D. Kasper, Dr. S. Martens, B. Metzger, R. Neumann, U. Querner, F. Schulz, T. Suckow, I. Todte, H. Trapp, J. v. Rönn und B. Wuntke.

Dr. Eckhard Schreier, Dr. Sabine Diedrich und Heidrun Linke unterstützten mich mit der Bereitstellung von Proben verschiedener AFP-Patienten. In Zusammenarbeit mit Marion

Muehlen, MD, DTMPH und Prof. Dr. Klaus Stark konnten wir eine Studie zum Risiko von WNV-Infektionen bei Vogelberingern durchführen. Bernd Reinhardt half uns, die vielen Probanden in eine Access-Datenbank zu überführen, ohne die wir im Chaos versunken wären. Ursula Erikli hat viele Publikationen und Poster Korrektur gelesen und Dr. Andreas Nitsche half mir beim Primerdesign und der Probit-Analyse. Herzlichen Dank für all die Kooperation und die Hilfe.

Danke allen lieben Mitarbeitern von ZBS1 (dritte und vierte Etage) und P11 inklusive der Laborfeen für die schöne Zeit und die gute Arbeitsatmosphäre, besonders Conni, Maren, Janine und Hanno für die motivierenden Gespräche zwischendurch.

Ohne meine Familie und meinen Freund Roland wäre das Unterfangen Doktorarbeit nicht möglich gewesen und ich bin sehr glücklich, dass Ihr alle für mich da seid.

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Berlin, den

Sonja Linke