

1 Einleitung

Eine Vielzahl von Infektionen und Erkrankungen werden von Tieren auf Menschen übertragen. Es sind über 200 Zoonosen beschrieben, die sowohl durch Bakterien, Parasiten, Viren und Prionen übertragen werden. Durch Ausbrüche von aviärer Influenza und des Schweren Akuten Atemwegssyndroms (severe acute respiratory syndrome: SARS) in jüngster Zeit zeigte sich, welches Potential Pathogene aus dem tierischen Reservoir haben, wenn sie auf den Menschen übertragen werden. Neuauftretende zoonotische Infektionen werden meist durch verschiedene Faktoren begünstigt. Dazu gehören die rasche Adaptation des Pathogens, Veränderungen der Umweltbedingungen wie Klima und Ökosysteme, Globalisierung der Landwirtschaft, veränderte Nahrungsmittelproduktionen sowie Veränderungen des Handels und des menschlichen Verhaltens mit vermehrter Reisetätigkeit und Interaktionen mit Wildtieren (Taylor et al. 2001, WHO et al. 2004).

Um neu auftretende zoonotische Erkrankungen besser zu verstehen und schnell Handlungsstrategien zu entwickeln, ist es notwendig, die komplexe Biologie der Erreger nachzuvollziehen und Fragestellungen bezüglich Surveillance-, Präventions-, Schutz- und Eliminierungsprogrammen zu beantworten (Marano und Papaioanou 2004). Das *West-Nil-Virus* gehört zu den Pathogenen, die bereits als Zoonose-Erreger bekannt sind. Die Einschleppung des Virus in die USA 1999 zeigte jedoch, wie rasch die Ausbreitung in einer neuen geographischen Region stattfinden kann, wenn kompetente Wirtssysteme und Vektoren vorhanden sind.

1.1 Herkunft und Taxonomie von *West-Nil-Virus*, WNV

Isoliert wurde das *West-Nil-Virus* (WNV) zum ersten Mal 1937 bei einer Frau in Uganda, die an einer Malaria-Studie teilnahm und über fiebriges Unwohlsein klagte (Smithburn 1940; Calisher et al. 1981). Systematisch gehört das *West-Nil-Virus* zu der Virusfamilie der *Flaviviridae*, die drei Genera umfasst:

- *Flavivirus* mit etwa 70 Viren (Kuno et al. 1998)
- *Pestivirus* mit 4 klassifizierten Spezies (ICTVdB 2006)
- *Hepacivirus* mit dem *Hepatitis-C-Virus* als bisher einzigen Vertreter (van Regenmortel et al. 2000).

Die Virusfamilie Flaviviridae erhielt ihren Namen *flavus* durch das *Gelbfieberevirus*, das beim Menschen Gelbsucht verursacht. Zu den humanpathogenen Vertretern der *Flaviviridae* gehören u.a. *West-Nil-Virus*, *Gelbfieberevirus*, *Denguevirus* Typ 1-4, *Japan-Enzephalitis-Virus*, *St.-Louis-Enzephalitis-Virus*, *Frühsommer-Menigoenzephalitis-Virus*, *Hepatitis-C-Virus*.

Die *Flaviviren* werden aufgrund von serologischen Kreuzreaktionen innerhalb der Spezies in acht verschiedene Serokomplexe unterteilt, die meist distinkte Verbreitungsgebiete haben. WNV gehört innerhalb der Flaviviren zu der Gruppe des Japan-Enzephalitis-Serokomplexes (Heinz et al. 2000), die durch Kreuzreaktivitäten des Hüllproteins (Envelope Proteins) gekennzeichnet (Kimura-Kuroda und Yasui 1986) sind (Tabelle 1).

Tabelle 1: Japan-Enzephalitis-Serokomplex: Verbreitung, Vektoren und Wirtssysteme (Petersen und Roehring 2001, Gould 2002, Pauli 2004)

Virus	Geographische Verbreitung	Wirtsbereich: Stechmückenarten	Wirtsbereich: Wirbeltiere
<i>Cacipacore-Virus</i> (CPCV)	Südamerika	unbekannt	Vögel, Nager, Fledermäuse, Menschen
<i>Koutango-Virus</i> (KOUV)	Afrika	<i>Aedes spec.</i>	Nager, Menschen
<i>Japan-Enzephalitis-Virus</i> (JEV)	Asien, Ozeanien, Australien	<i>Culex spec.</i> , <i>Aedes spec.</i> , <i>Anopheles spec.</i>	Schweine, Vögel, Pferde, Nager, Menschen
<i>Murray-Valley-Enzephalitis-Virus</i> (MVEV), <i>Alfuy-Virus</i>	Australien, Ozeanien	<i>Culex spec.</i>	Vögel, Hunde, Nager, Opposum, Pferde, Menschen
<i>St.-Louis-Enzephalitis-Virus</i> (SLEV)	Nord-Südamerika	<i>Culex spec.</i> , <i>Aedes spec.</i> , <i>Anopheles spec.</i>	Vögel, Fledermäuse, Füchse, Menschen
<i>West-Nil-Virus</i> (WNV), <i>Kunjin-Virus</i> (KUNV)	Afrika, Asien, Europa, Australien, Amerika	<i>Culex spec.</i> , <i>Aedes spec.</i> , <i>Anopheles spec.</i>	Vögel, Pferde, Menschen
<i>Yaounde-Virus</i> (YAOV)	Afrika	<i>Culex spec.</i> , <i>Aedes spec.</i>	Vögel, Nager
<i>Usutu-Virus</i> (USUV)	Afrika, Europa	<i>Culex spec.</i>	Vögel, Nager, Rinder, Schafe, Menschen

Flaviviren werden über Arthropoden (Gliedertiere) übertragen, weshalb sie auch zu den Arboviren (arthropod-borne virus) eingruppiert werden. Bei den Arboviren handelt es sich um keine taxonomische Einordnung, sondern eine ökologische, da diese Viren haematophage, blutsaugende Gliedertiere zur Transmission zwischen den Wirten benötigen (Gubler 2001). Es sind mehr als 530 Arboviren bekannt, die sich in 13 taxonomische Familien einordnen, wobei die humanpathogenen Arboviren zu den Familien der *Togaviridae*, *Bunyaviridae* und *Flaviviridae* gehören (Calisher et al. 1981, Gubler 1996).

1.2 Molekulare Klassifikation von WNV

Durch Sequenzierungen von verschiedenen WNV-Isolaten sowie phylogenetischen Analysen konnte man zwei Hauptgenotyplinien von WNV unterscheiden, die sich auf Nukleotidebene um 21 % - 29 % und auf Aminosäurebasis um 3 % - 7 % unterscheiden (Berthet et al. 1997, Charrel et al. 2003). Diese Genotyplinien werden als WNV-Genotyp Linie 1 und 2 bezeichnet.

Innerhalb der WNV-Genotyp Linie 1 werden drei Subklassen von WNV-Isolaten unterschieden (Abbildung 1). Die Isolate der Subklasse 1a sind genetisch eng miteinander verwandt (95,2 % - 99,9 % Nukleotididentität) und über verschiedene Kontinente (Afrika, Amerika, Europa) verbreitet (Peterson et al. 2003). Das *Kunjin-Virus* wird als Subklasse 1b klassifiziert und kommt in Australien vor (Scherret et al. 2001, Hall et al. 2002). Die Subgruppe 1b ist relativ divergent mit einer genetischen Distanz von bis zu 13 % innerhalb der untersuchten Isolate (Scherret et al. 2001, Charrel et al. 2003). Monoklonale Antikörper zeigen jedoch dasselbe Bindungsverhalten gegenüber *Kunjin-Virus* und WNV-Isolaten, was die enge Verwandtschaft der Isolate des Genotyps 1 zeigt (Scherret et al. 2001). WNV-Isolate aus Indien werden dem Subtyp 1c zugeordnet, der nach evolutionärer Abspaltung von WNV-Linie 1 und 2 entstanden sein soll (Gould 2002). Innerhalb der Genotyp Linie 1 zeigen die Isolate eine genetische Verwandtschaft von maximal 87 % auf Nukleotidebene (Berthet et al. 1997).

WNV-Isolate des Genotyps 1a aus den USA haben sich seit der Einschleppung 1999 genetisch nur wenig verändert. Alle sequenzierten US-amerikanischen Isolate sind auf Nukleotidebene $\geq 99,6$ % identisch und es konnten bisher maximal drei Aminosäureaustausche innerhalb der bisherigen Isolate festgestellt werden (Lanciotti et al. 2002). Studien zur Evolution von WNV in den USA zeigten bei 22 analysierten Virus-Isolaten aus dem Jahr 2001 - 2002, dass diese sich maximal um 0,35 % vom erstmals in den USA isolierten WNV-Stamm New York 1999 unterschieden (Davis et al. 2003). Sequenzvergleiche von US-amerikanischen WNV-Isolaten mit Isolaten aus den Mittelmeerländern zeigten eine Nukleotidübereinstimmung von $\geq 99,8$ % zu einem israelischen Isolat aus dem Jahr 1998. Im Vergleich zum WNV-Stamm New York fand man zwei Nukleotidaustauschen über eine Länge von 1278 Basenpaaren (Lanciotti et al. 1999, Briese et al. 2002).

Es liegt daher die Vermutung nahe, dass es sich bei der Einschleppung von WNV in die USA um ein Virus aus Nahost handelte (Lanciotti et al. 1999).

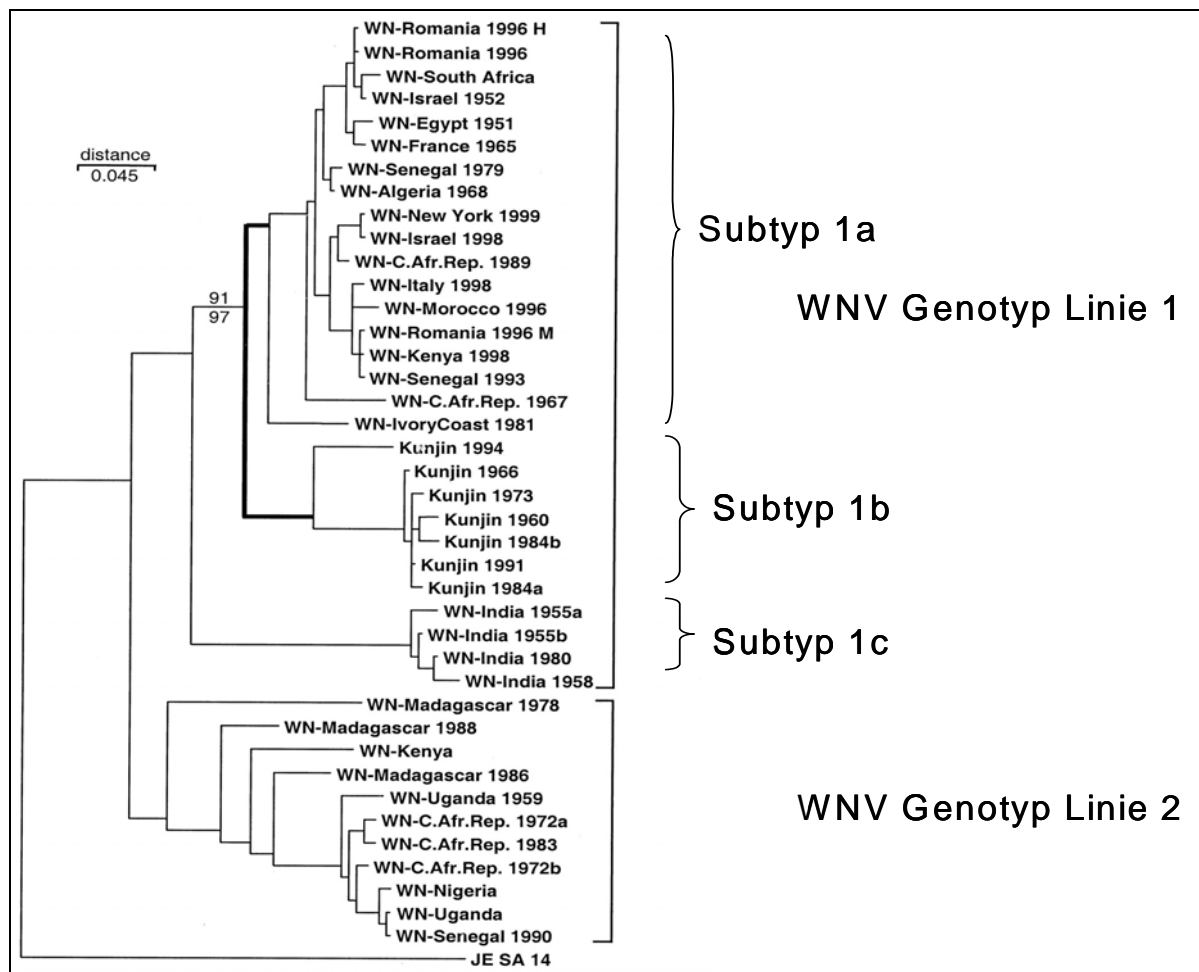


Abbildung 1: Stammbaumanalyse von WNV-Isolaten auf der Basis des Genes für das Hüllprotein (Envelope-Gen: 225 Basenpaare), phylogenetischer Stammbaum mit Hilfe der neighbor-joining Methode. Die Genotyplinie 1 wird unterteilt in die Subklassen 1a, 1b, 1c, verändert nach Lanciotti et al. 1999, Lanciotti et al. 2002.

WNV-Isolate der Genotyp Linie 2 kommen in endemischen Gebieten Afrikas südlich der Sahara, Südafrika und Madagaskar vor. Die Übereinstimmung innerhalb der Genotyp Linie 2 beträgt nur etwa 80,5 % (Berthet et al. 1997). 2006 wurde erstmals ein Isolat der WNV-Genotyp-Linie 2 in Ungarn bei einem Habicht isoliert (Bakonyi et al. 2006).

In Mitteleuropa (Marktgemeinde Rabensburg zwischen Tschechien und Österreich) wurde aus der Stechmückenart *Culex pipiens* ein weiteres Virus (Rabensburg-Virus) isoliert, welches eine Aminosäure-Identität von 89 % - 90 % zu den WNV-Genotyp Linien 1 und 2 aufweist.

Derzeit wird diskutiert, ob es sich dabei um eine neue WNV-Genotyp Linie 3 handelt oder um ein neues Flavivirus der Japan-Enzephalitis-Gruppe (Bakonyi et al. 2005a).

1.3 Virologische Grundlagen

1.3.1 Morphologie von WNV

Das *West-Nil-Virus* ist ein sphärisch umhülltes Virus mit einer Größe von 40 - 60 nm ($\sim 500 \text{ \AA}$). Es weist eine ikosaedrische Symmetrie auf. In elektronenmikroskopischen Aufnahmen sind keine Oberflächen-Projektionen oder Spikes zu beobachten (Mukhopadhyay et al. 2003). Das Nukleocapsid besteht aus multiplen Kopien des viralen Capsid-Proteins (C-Protein) mit einer Größe von 12 kDa. Umgeben ist das Capsid von einer 40 nm ($35 - 40 \text{ \AA}$) dicken Lipidmembran, in die zwei virale Proteine eingelagert sind. Es handelt sich dabei um das Hüllprotein (Envelope-Protein: E-Protein) und das Membran-Protein (M-Protein). Über die Funktion des M-Proteins ist bisher nichts bekannt.

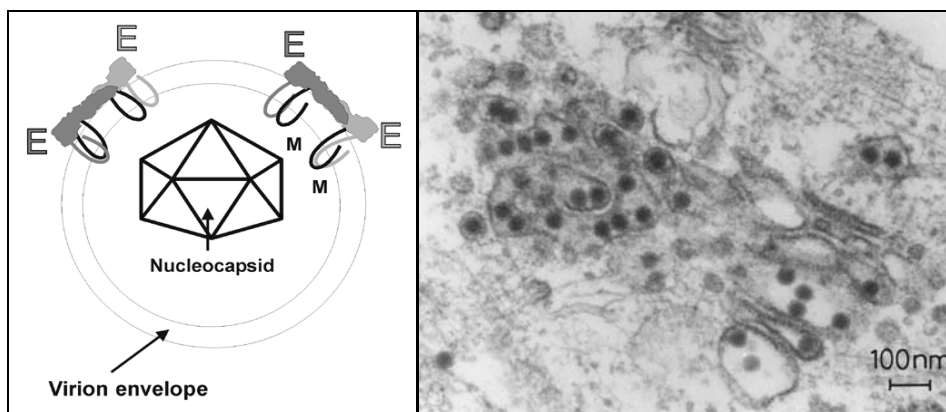


Abbildung 2: Links: Darstellung des Virions von *West-Nil-Virus*. Das ikosaedrische Nukleocapsid umhüllt die virale RNA. Die viralen Proteine E und M sind mit der Hüllmembran verknüpft. Quelle: Petersen und Roehring 2001. Rechts: Elektronenmikroskopische Aufnahme von WNV. Quelle Dr. H.R. Gelderblom, Robert Koch-Institut.

Das E-Protein ist vor allem für die Rezeptorbindung an der Wirtszelle notwendig sowie für die Symmetrie des Capsides durch Interaktion der E-Proteine mit den C-Proteinen (Kuhn et al. 2002). In reifen Virionen liegt das E-Protein der Lipidschicht an und bildet Homodimere, die mit den M-Proteinen assoziiert sind (Brinton 2002).

1.3.2 Organisation des viralen Genoms

Das Genom von WNV besteht aus einzelsträngiger RNA mit Plusstrangorientierung. Die Größe des Genoms liegt je nach Isolat bei ca. 11.000 - 12.000 Nukleotiden. Es codiert für ein großes Vorläuferpolyprotein. Der Leserahmen wird am 5'-Ende und am 3'-Ende von nicht translatierten Nukleotidfolgen (UTR) flankiert. Die 5'-UTR hat eine Größe von 96 Nukleotiden, während die 3'-UTR aus 631 Nukleotiden aufgebaut ist. Das 3'-Ende ist nicht polyadenyliert und am 5'-Ende trägt die RNA eine Cap-Struktur Typ 1 (Wengler und Wengler 1981, Castle und Wengler 1987). Das Genom wird in zwei funktionelle Bereiche unterteilt (Abbildung 3). Am 5'-Ende befinden sich die genetischen Informationen für die Strukturproteine: Capsidprotein (C), prM/Membranprotein (M) und Envelope-Protein (E), während im Bereich zum 3'-Ende die Gene für die Nichtstrukturproteine (NS-Proteine) NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b, NS5 liegen (Deubel et al. 2001).

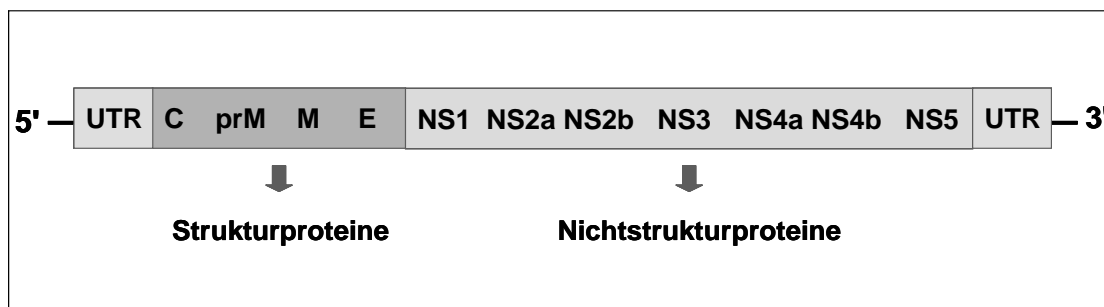


Abbildung 3: Genomstruktur des *West-Nil-Virus*. Ein offener Leserahmen codiert für das Vorläuferpolyprotein, das im Verlauf der Translation und posttranslational prozessiert wird, UTR: untranslatierte Region, C: Capsid-Gen, prM/M: Membran-Gen, E: Envelope-Gen.

1.3.3 Replikationszyklus des Virus

Nach Adsorption an die Oberfläche der Wirtszelle wird das Virus mit Hilfe der Clatherin-abhängigen Endozytose in die Zelle aufgenommen (Gollins und Porterfield 1985, Ng und Lau 1988, Chu und Ng 2004b). Die zellulären Rezeptoren sind für die meisten Flaviviren bisher nicht eindeutig bestimmt, Chu und Ng konnten aber für WNV-Genotyp 2 (Isolat Sarafend) in Verozellen, Hela-Zellen und embryonalen Hühnerfibroblasten zeigen, dass Integrin $\alpha V\beta 3$ als Zellrezeptor fungiert (Chu und Ng 2004a). Es wird vermutet, dass die Rezeptoren der Wirtszelle hoch konserviert sind, da sowohl Invertebraten als auch Vertebraten infiziert werden können (Brinton 2002). Da das Virus nach Eintritt in die Zelle zunächst in

Membranvesikeln vorliegt, muss im weiteren Verlauf der Infektion das Viruscapsid ins Zytoplasma entlassen werden. Dazu wird mit Hilfe der ATP-abhängigen H^+ -Ionenpumpe die Vesikelmembran angesäuert und verschmilzt mit der Virusmembran. Es folgt die Freisetzung der viralen RNA ins Zytoplasma (Modrow et al. 2003).

Die Virusreplikation findet in engem Kontakt zum rauen endoplasmatischen Retikulum (ER) statt (Abbildung 4). Die Cap-Struktur des Virus interagiert dabei mit zellulären Ribosomenuntereinheiten, in denen ein Cap-Bindungs-Komplex gebildet wird. Im ersten Schritt fungiert die virale RNA als mRNA. Sobald bei der Translation der aminoterminaler Teil des C-Proteins vorliegt, stoppt die Elongation der Aminosäuren, da die hydrophobe Domäne im carboxyterminalen Bereich des C-Proteins als Signalpeptid wirkt. Diese interagiert mit Teilen des „signal-recognition-particles“, bestehend aus zellulären Polypeptiden und der 5S-RNA. Der Translationskomplex wird daraufhin an die Membran des endoplasmatischen Retikulums transportiert und die Aminosäurekette durch die Membran des ERs geschleust. Dies geschieht unter Einwirkung der prM- und E-Proteine des Polyproteins, die eine Verankerung der Transmembran-Domänen in der Lipidschicht bewirken. Die Prozessierung durch zelluläre Signalasen erfolgt zwischen den C-, prM- E- und NS1-Bereichen. Weitere Spaltungen erfolgen durch die NS2b-NS3-Protease.

Ist das virale NS5-Protein prozessiert, so übernimmt es die Funktion einer RNA-abhängigen RNA-Polymerase. Sie katalysiert die Synthese des Plusstranggenoms in den Minusstrang, von dem weitere genomische Plusstrangkopien synthetisiert werden. Dabei ist die RNA-Synthese semikonservativ und asymmetrisch (Brinton 2002). Die genomische RNA-Synthese ist 10 bis 100fach effizienter als die komplementäre virale RNA-Synthese (Brinton 2001). Die Plusstränge werden mit der Cap-Struktur am 5'-Ende versehen, die von bisher nicht näher charakterisierten viralen Nichtstrukturproteinen synthetisiert werden. Die Morphogenese der infektiösen Partikel erfolgt an der ER-Membran. Die C-, prM- und E- Komponenten werden in die Lipidschicht eingelagert. Die Membran-assoziierten C-Proteine interagieren mit den carboxyterminalen Domänen der E-Proteine sowie mit den basischen Aminosäuren des RNA-Genoms. Durch Ausstülpung der ER-Membran in das Lumen bildet sich ein initialer Budding-Komplex, der sich abschnürt und durch den Golgi-Apparat transportiert wird. Dabei werden die Membranproteine glykosiliert und das prM-Protein zum M-Protein prozessiert (Wengler und Wengler 1989, Heinz et al. 1994).

Die Golgi-Vesikel werden über den sekretorischen Weg zur Zellmembran transportiert und fusionieren mit der Zytoplasma-Membran. Hierbei spielt bei polarisierten Zellen das Zytoskelett eine aktive Rolle (Chu und Ng 2002). Die infektiösen Viruspartikel werden durch Exozytose an die Zelloberfläche freigesetzt (Nowak et al. 1989). Die Abgabe von Virionen aus infizierten Säugetierzellen erfolgt nach 10 - 12 Stunden, wobei der extrazelluläre Virustiter nach ca. 24 Stunden am höchsten ist (Brinton 2002). In experimentellen Studien konnte gezeigt werden, dass die Replikation von WNV in einer Vielzahl von Zellkulturen möglich ist: primäre embryonale Hühner-, Enten-, und Mauszellen sowie in permanenten Zelllinien von Affen, Menschen, Schweinen, Nagern, Amphibien und Insekten.

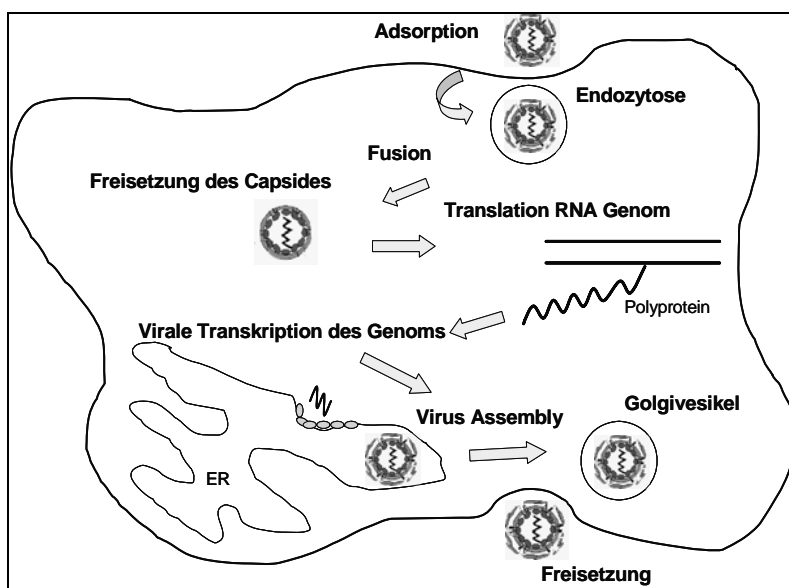


Abbildung 4: Replikationszyklus von *West-Nil-Virus*, vereinfachte Darstellung ohne Nukleus zur besseren Übersichtlichkeit, ER: Endoplasmatisches Retikulum.

1.3.4 Virale Proteine

Das WNV-Genom codiert für 10 virale Proteine, die als ein Vorläuferpolyprotein translatiert werden. Die Prozessierung des Vorläuferproteins in einzelne, funktionell aktive Bestandteile erfolgt durch eine zelluläre, mit der Membran des ER assoziierten Signalase. Sie entfernt im zellulären Stoffwechsel die Signalpeptide von den aminoterminalen Enden der am ER translatierten Proteine. Das Enzym schneidet das Vorläuferprodukt an Erkennungsstellen zwischen den einzelnen Strukturproteinen und am Übergang zwischen dem E- und NS1-Protein. Für die weiteren Prozessierungen sind virale Proteasen verantwortlich: die im NS2-

Protein verankerte proteolytische Aktivität schneidet zwischen den NS2- und NS3-Anteilen, die NS3-Protease führt danach alle weiteren Prozessierungen durch.

Strukturproteine:

Multiple Kopien des C-Proteins bilden das Capsid. Das Protein enthält eine Reihe von basischen Aminosäuren, die im Virion mit dem RNA-Genom interagieren. Es wurde gezeigt, dass das C-Protein eine strukturelle Einheit aus vier Dimeren bildet, die mit der RNA interagieren (Dokland et al. 2004). Das carboxyterminale Ende des C-Proteins ist stark hydrophob. Es wirkt als Signalpeptid für das prM-Protein und ist für die Inkorporation des in Translation befindlichen Polyproteins in der ER-Membran verantwortlich.

Das prM-Protein ist das Vorläuferprotein des M-Proteins. Es formt in unreifen zellassozierten Virionen Heterodimere mit dem E-Protein. Diese Cosynthese scheint wichtig für die richtige Faltung der E-Proteine zu sein. Das prM-Protein ist an Asparaginresten glykosiliert. Erst spät wird der aminoternale Anteil, während der Passage durch den Golgi-Apparat, durch eine Furin-ähnliche zelluläre Protease abgespalten und es entsteht das kleinere nicht glykosilierte M-Protein (Beasley 2005).

Das E-Protein der Flaviviren ist genetisch hoch konserviert und ist vor allem für die Adsorption und Rezeptorbindung des Virus an die Zelle zuständig. Daher ist es auch das Hauptangriffsziel der neutralisierenden Antikörper (Roehring 2003). Das E-Protein liegt als Dimer (hauptsächlich als β -Faltblattstruktur) vor, wobei die Monomere in drei strukturelle Domänen unterteilt werden: eine zentrale Domäne I, eine gestreckte Dimerisations-Domäne II und eine carboxyterminale Immunglobulin-ähnliche Domäne III, die wahrscheinlich für die Rezeptorbindung verantwortlich ist (Beasley 2005) und als Ziel von neutralisierenden Antikörpern dient (Roehring 2003, Throsby et al. 2006).

Über eine hydrophobe Aminosäurefolge im carboxyterminalen Bereich in der Membran verankert, liegen die Dimere am Lipidbilayer flach auf und bestimmen durch ihre Faltung die Krümmung des Viruspartikels. Innerhalb des Replikationszyklus übernimmt das E-Protein Funktionen bei der Einschleusung des Polyproteins in das ER und als Interaktionspartner des C-Proteins während der Morphogenese.

Nichtstrukturproteine:

Das NS1-Protein ist ein variables Glykoprotein, das mit der Zellmembran in unbekannter Art assoziiert ist und teilweise durch Sekretion von der Zelle abgegeben wird (Macdonald et al. 2005). Die membrangebundene Form liegt wahrscheinlich als Dimer vor, während die sezernierte Form Hexamere bildet. Es wird vermutet, dass das Protein am Replikationszyklus mitwirkt (Lindenbach und Rice 1997), eventuell findet auch eine Beteiligung am intrazellulären Transport der viralen Strukturproteine und an der Virusfreisetzung statt (Beasley 2005).

Das NS2-Protein wird in die Anteile NS2a und NS2b prozessiert. Es gibt zwei Formen von NS2a: ein „full-length“ Protein und eine am Carboxyterminus-prozessierte Form. Die Funktion von NS2a ist bisher unbekannt (Modrow et al. 2003). Die hydrophile Domäne des NS2b-Proteins ist ein essentieller Cofaktor der proteolytischen Aktivität der NS3-Protease (Brinkworth et al. 1999).

Das konservierte NS3-Protein ist multifunktionell. Die NS3-Serin-Protease-Aktivität ist für die Spaltungen in den Regionen des Polyproteins verantwortlich, die der NS3-Domäne folgen. Das NS3-Protein formt ein Heterodimer bestehend aus NS2b und NS3. Die aminoterminal Region zeigt eine Proteaseaktivität, die carboxyterminale Region fungiert als Nukleotid-Triphosphatase (NTPase) und RNA-5'-Triphosphatase (RTPase) und zeigt eine Helikaseaktivität (Borowski et al. 2001). Die Helikase ist wahrscheinlich für die Entwindung der stark strukturierten RNA, sowohl bei der Genomreplikation als auch bei der Translation und Synthese des Polyproteins, notwendig.

Über die Funktion der NS4a- und NS4b-Proteine ist man bisher im Unklaren. Eventuell sind die Proteine an der Replikation beteiligt. Es handelt sich um kleine hydrophobe Proteine, wobei NS4a eng mit NS3 und NS5 assoziiert sein könnte.

NS5 ist das größte Nichtstrukturprotein. Das Protein fungiert als RNA-abhängige RNA-Polymerase und ist essentiell für die Replikation des RNA-Genoms. Der carboxyterminale Teil des NS5 Proteins beinhaltet das hoch konservierte GDD-Motiv (Brinton 2002). Der aminoterminal Bereich zeigt die Aktivität der Methyltransferase, die beim Cappingprozess benötigt wird (Methylation des Typ I Cap), da das Virus im Zytoplasma repliziert.

1.4 Transmission von WNV

West-Nil-Virus wird durch Arthropoden wie Stechmücken und Zecken übertragen (McLean et al. 2001b). Wildvögel stellen das natürliche Reservoir dar (Abbildung 5). In Europa ist die Übertragung des Pathogens im Transmissionszyklus durch ornithophile Stechmückenarten (Tabelle 2) hauptsächlich an Feuchtbiotope gebunden z.B. Flussdelta und Auen (Hubalek und Halouzka 1999, Hubalek 2000).

Der Transmissionszyklus zwischen Wildvögeln und ornithophilen Stechmücken wird als ruraler Zyklus bezeichnet, während die Übertragung von WNV durch Brückenvektoren, d.h. Arthropoden, die sowohl an Vögel als auch an andere Wirbeltieren ihre Blutmahlzeiten nehmen, als urbaner Transmissionszyklus beschrieben wird (Hubalek und Halouzka 1999). Die Übertragung des Virus von Vektoren auf Wirte wird als horizontale Transmission definiert. Wird der Erreger innerhalb von Vektorengenerationen über das Ei übertragen, spricht man von einer vertikalen Transmission.

Durch die vertikale Übertragung kann das Virus in den Vektoren persistieren. Verschiedene biotische und abiotische Faktoren können die Transmission beeinflussen, wie z.B. das Geschlecht der Arthropoden, die Wirtspräferenz, Fressverhalten, Langlebigkeit der Vektoren, Durchschnittstemperatur der Umwelt, Feuchtigkeit, saisonale Dichte und Aktivität der Vektoren sowie die Populationsdichte von geeigneten Wirtsorganismen.

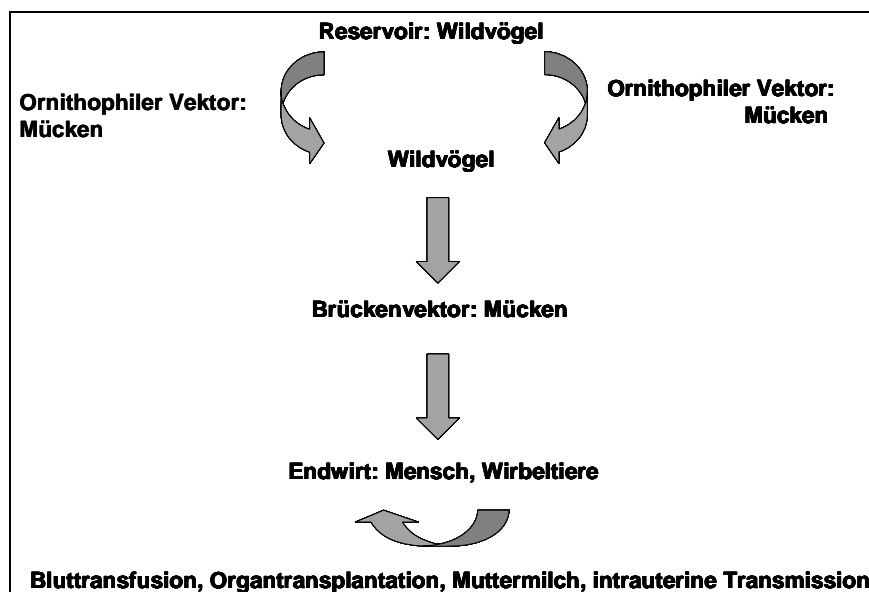


Abbildung 5: Transmissionszyklus des *West-Nil-Virus*, Brückenvektoren sind Arthropoden, die ihre Blutmahlzeit sowohl an Vögeln als auch anderen Vertebraten aufnehmen.

Ersetzen Zecken den Hauptvektor, so wird die Übertragung als konstitutiv bezeichnet. Die Übertragung von Zecken kann die horizontale Transmission auf Wirbeltiere in trockenen Habitaten ersetzen. In den Zecken kann das Virus über eine längere Periode persistieren, da die Arthropoden, seltener als Stechmücken, Blutmahlzeiten aufnehmen und eine längere Lebensdauer aufweisen. Der passive Transport von Zecken durch Zugvögel ermöglicht dem Pathogen eine theoretische Ausbreitung über weite Distanzen.

Die direkte Transmission von WNV bei Vögeln konnte lediglich experimentell gezeigt werden (Komar et al 2003), während die orale Transmission von WNV bei Alligatoren natürlich festgestellt werden konnte (Miller et al. 2003). Faktoren, die als Ursache für eine direkte Transmission bei Vögeln experimentell nachgewiesen wurden, sind die fäkalen und oralen Ausscheidungen und das „Grooming“ von Käfig-Nachbarn (Komar et al. 2003). Die Infektion durch den Konsum von infizierten Arthropoden wurde in Einzelfällen beschrieben.

1.4.1 WNV-Infektionen bei Stechmücken und Zecken

Die Hauptvektoren von WNV sind verschiedene Arten von Stechmücken. Wird das Virus während der Blutaufnahme durch das haematophage Insekt aufgenommen, passiert das Virus den Gastrointestinaltrakt und wird im Lumen des hinteren Teils des Mitteldarmes in den Körper aufgenommen. Dort befinden sich mesenteriale Epithelzellen, die vom Virus infiziert werden und in denen die erste Replikation stattfindet. Der Eintritt in die Zelle erfolgt mittels der Clatherin-vermittelten Endozytose mit anschließender pH-abhängiger Membranfusion (Chu et al. 2006). Die Viren gelangen von den Mitteldarmzellen in das Haemocoel. Durch den Transport der Viren im Haemocoel können eine Vielzahl von Geweben und Organen infiziert werden. Darunter werden je nach Virusspezies Speicheldrüsen, Geschlechtsorgane, Ganglien, Fettkörper, Pericard, Malpighische Gefäße und Muskeln infiziert (Mellor 2000). Bei Studien von infizierten Stechmücken konnte ein mittlerer WNV-Titer von 10^4 PFU pro Extremität nachgewiesen werden (Turell et al. 2002). Um die Viren bei einer Blutmahlzeit horizontal auf ein Wirbeltier zu übertragen, müssen die Speicheldrüsen infiziert werden, in denen eine vermehrte Replikation ohne zytopathischen Effekt nachweisbar ist. Dabei werden „inclusion bodies - virus factories“ gebildet (Whitfield et al. 1971). Von den Speicheldrüsen werden die Viren in das Lumen des Haupt-Sekretionsgang der Stechwerkzeuge sezerniert und beim Stechvorgang freigesetzt. Für Arboviren, wie das *Denguevirus* konnte man feststellen, dass

bei einem Stich wenige bis zu $1 \cdot 10^5$ infektiöse Einheiten abgeben werden können (Gubler und Rosen 1976, Baqar et al. 1993). Die Phase zwischen Nahrungsaufnahme und Sekretion des Virus in die Speicheldrüsen wird als extrinsische Inkubationsperiode bezeichnet. Wirkungsvolle Abwehrmechanismen gegen die Infektion von Arboviren in den Vektoren bestehen in Barrieren des Mitteldarmes bzw. der Speicheldrüsen (Mellor 2000).

Um die vertikale Transmission sicherzustellen, infiziert das Virus auch die Geschlechtsorgane der Stechmücken, so dass die Pathogene transovariell über das Ei weitergegeben werden können (Rosen 1988, Baqar et al. 1993). Bei Flaviviren ist die Effizienz der infizierten Nachkommen mit einer Rate unter 1 % niedrig (Nasci et al. 2001). Das Virus kann sowohl in überwinterten Stechmücken (Diapause) oder in abgelegten Eiern längere Zeit persistieren. Im Frühjahr können die infizierten Stechmücken das Virus übertragen, so dass der Transmissionszyklus aufrecht erhalten wird und eine Langzeit-Persistenz gegeben ist (Turell et al. 2001, Dohm et al. 2002a).

WNV wird von verschiedenen Arthropoden-Arten übertragen. Insgesamt wurde WNV weltweit in 75 Stechmückenarten aus mehr als 10 Genera nachgewiesen (Higgs et al. 2004, Medlock et al. 2005). In den USA wurden alleine 60 WNV kompetente Stechmückenarten gefunden (CDC 2005). Individuen des *Culex pipiens*-Komplexes gelten als Primärvektor von WNV (Savage et al. 1999). Studien zeigten, dass es innerhalb des *Culex pipiens*-Komplexes WNV-kompetente Hybridarten gibt, die in den USA und in Südeuropa vorkommen. Es wird vermutet, dass besonders Hybridarten für eine schnelle und weit reichende WNV-Verbreitung verantwortlich sind (Couzin 2004). Bei den Hybriden handelt es sich um Nachkommen der Arten *Culex pipiens sensu stricto* und *Culex pipiens* Biotyp *molestus* (Fonseca et al. 2004).

Infektionsstudien an verschiedenen Zeckenarten zeigten, dass Vertreter der Familie der Schildzecken (Ixodidae) und der Lederzecken (Argasidae) WNV-kompetent sind (Mumcuoglu et al. 2003). Die Effizienz der WNV Transmission durch Zecken ist im Vergleich zu Stechmücken jedoch sehr viel geringer (Lawrie et al. 2004). Berichte über natürliche WNV-Übertragungen durch Zecken sind bisher nicht beschrieben worden (Anderson, 2003).

Tabelle 2: Verbreitung von Arthropoden in Europa aus denen WNV isoliert wurde.
Adaptiert nach Taylor et al. 1956, Hubalek und Halouzka 1999, Hubalek 2000

Europäische Vektoren, aus denen WNV isoliert wurde	Vektorvorkommen in Europa, Mittelmeerraum * §	WNV-Virusisolationen in folgenden Ländern	Möglicher Brückenvektor
Stechmücken			
<i>Culex pipiens sensu stricto</i> (Linnaeus), <i>Culex pipiens</i> Biotyp <i>molestus</i> (Forskål)	Europa, Nordafrika, Israel	Israel, Rumänien, Tschechien, Bulgarien	+** +***
<i>Barraudius modestus</i> (Ficalbi)	Osteuropa, Griechenland, Spanien, Israel	Frankreich, Russland	+ ***
<i>Culex perexiguus</i> (Theobald)	Nordafrika, Griechenland, Türkei, Israel	Israel	
<i>Culex univittatus</i> (Theobald)	Bulgarien, Ägypten, Portugal, Spanien	Ägypten, Israel	
<i>Culex antennatus</i> (Becker)	Nordafrika, Ägypten, Israel	Ägypten	
<i>Ochlerotatus caspius</i> (Pallas)	Südosteuropa, Portugal, Paläarktische Region, Nordafrika	Ukraine	
<i>Ochlerotatus excrucians</i> (Walker)	Osteuropa	Ukraine	
<i>Coquillettidia richiardii</i> (Ficalbi)	Europa	Russland	+ ***
<i>Anopheles coustani</i> (Laveran)	Israel, Marokko, Ägypten	Israel	
<i>Anopheles maculipennis</i> (Meigen)	Europa	Portugal, Ukraine	
Zecken			
<i>Argas hermanni</i> (Audouin)	Ägypten	Ägypten	
<i>Ornithodoros capensis</i> (Neumann)	Südosteuropa	Aserbajdschan	
<i>Hyalomma marginatum</i> (Koch)	Südeuropa	Aserbajdschan	
<i>Rhipicephalus turanicus</i> (Pomerantsev)	Südeuropa	Aserbajdschan	
<i>Dermacentor marginatus</i> (Sulzer)	Europa	Moldawien	

*(WRBU 2006), ** (Kilpatrick et al. 2005), *** (Medlock et al. 2005), § (Hoogstraal et al. 1979)

1.4.2 WNV-Infektionen bei Vögeln

Wildvögel sind die Hauptwirte von WNV und stellen das natürliche Reservoir des Pathogens dar. Die Ausbreitung von WNV in den USA im Jahr 1999 wurde erst wahrgenommen, als Hunderte von Vögeln in New York erkrankten und verstarben. Die meisten Informationen zur Infektion und den daraus resultierenden klinischen Symptomen bei Vögeln stehen durch die WNV-Epidemien in den USA zur Verfügung. Dort zeigte sich, dass Arten wie die Amerikanische Krähe (*Corvus brachyrhynchos*) und andere Corviden (Rabenvögel) gegenüber WNV-Infektionen sehr sensitiv waren und im Zuge der Einschleppung des Pathogens nach New York von hohen Mortalitätsraten betroffen waren (Eidson et al. 2005). Vom CDC sind bisher 284 Vogelarten aufgelistet worden, die an WNV-Infektionen verstorben sind (CDC 2006a). Es ist bekannt, dass Vögel der Ordnung Passeriformes (Sperlingsvögel) besonders empfänglich gegenüber WNV-Infektionen sind (Komar et al. 2003). Durch Untersuchungen in den fünfziger Jahren des letzten Jahrhunderts konnte gezeigt werden, dass Krähenvögel und Sperlinge als WNV Reservoir besonders geeignet sind (Work et al. 1955).

Das Virus infiziert eine Vielzahl von inneren Organen und das ZNS der Vögel. Der Nachweis von viraler RNA erfolgte beispielsweise im Gehirn, Niere, Leber, Haut, Auge und Lungenwebe (Panella et al. 2001, Komar et al. 2003). Ferner konnte virale RNA auch in Kloaken- und Rachenabstrichen (Komar et al. 2002) sowie in Federkielen (Docherty et al. 2004) nachgewiesen werden. Die Virämie bei Vögeln ist je nach Art unterschiedlich lang, wobei sie meist zwischen 5 und 7 Tagen liegt. Dabei kann im Blut ein Virustiter von 10^3 - 10^{10} PFU/ml erreicht werden (Komar et al. 2003).

Klinische Symptome wie Lethargie, Koordinationsschwierigkeiten, Ataxie, Depression, Schiefhals, Opisthotonus und Blutungen in Schnabel- und Kloakenregion konnten nachgewiesen werden (Swayne et al. 2001, Komar et al. 2003). Die Mortalitätsraten sind je nach Vogelart und Pathogenität der Virusisolate unterschiedlich (Brault et al. 2004, Langevin et al. 2005, Nemeth et al. 2006). Bei natürlichen Infektionen in Gänsen lag die Mortalität beispielsweise bei 25 - 40 %. Nach Auftreten von klinischen Symptomen bei experimentell infizierten Vögeln trat der Tod bei vielen Arten innerhalb von 24 Stunden ein (Komar et al. 2003). In weiteren Studien konnte gezeigt werden, dass das Alter der infizierten Vögel eine wesentliche Rolle bei der Entwicklung von schweren Krankheitssymptomen spielt. Während bei 1 - 11 Tage alten Hühnerküken ein hoher Virustiter nachweisbar war, zeigten 3 Wochen alte Tiere wesentlich weniger ausgeprägte Virämien. Ähnliche Ergebnisse zeigten auch die

Infektionen von Gänsen, bei denen Tiere mit einem Alter von 15 Monaten keine klinischen Symptome aufwiesen, jedoch eine Serokonversion (Austin et al. 2004).

1.4.3 WNV-Infektionen bei Menschen

Die WNV-Infektion beim Menschen beruht auf einer zufälligen Infektion durch WNV-infizierte Stechmücken, die als Brückenvektoren sowohl Vögel als auch andere Wirbeltiere stechen. Die Infektion des Menschen ist bisher nur durch Stiche von Arthropoden und Mensch-zu-Mensch-Transmissionen durch Blutprodukte wie Plasma und Thrombozyten (Iwamoto et al. 2003, Pealer et al. 2003), Schwangerschaft (Paisley et al. 2006), Muttermilch sowie Organtransplantate beschrieben worden (Petersen et al. 2002, Solomon et al. 2003). Es gibt keinerlei Hinweise auf eine direkte Kontakt-Transmission. Die WNV-Infektion verläuft beim Menschen meist asymptomatisch, ca. 80 % der Infektionen sind symptomlos. Rund 20 % der WNV-Infektionen sind oligosymptomatisch.

Nach einer Inkubationszeit von 2 - 6 (14) Tagen (Petersen und Marfin 2002) dauert die Erkrankung zwischen 3 - 6 Tagen (Abbildung 6). Der Virustiter im Menschen ist im Gegensatz zum Vogel mit ca. 10^2 PFU/ml Blut relativ gering. Diese Titer sind zu gering, um Stechmücken bei der Blutaufnahme zu identifizieren, weshalb der Mensch auch als „Dead-End-Host: Endwirt“ beschrieben wird. Nach Infektion sind IgM-Antikörper erstmals ca. 6 Tage nach Infektionszeitpunkt nachweisbar und die IgM-Titer persistieren in manchen Patienten bis zu 500 Tage (Roehrig et al. 2003).

Nach Übertragung der Viren durch stechende Insekten, findet der erste Replikationszyklus in der Haut statt. Dort werden dendritische Langerhanszellen infiziert, in denen die Virusreplikation stattfindet (Diamond et al. 2003b). Die infizierten Zellen wandern zu den regionären Lymphknoten, in denen die zweite Replikationsrunde abläuft und die virämische Phase beginnt. Die Virusinfektion breitet sich auf die inneren Organe aus und es kann zu einem Durchbruch der Blut-Hirnschranke kommen. Im Zentralnervensystem (ZNS) können sowohl Neuronen als auch Gliazellen infiziert werden (Diamond et al. 2003a, Diamond et al. 2003b). Um die Zielzellen der WNV-Infektion bei Bluttransfusionen zu identifizieren, wurden experimentell primäre Monozyten infiziert, die effizient WNV replizierten und die Infektion aufrechterhalten konnten. Bei einer Bluttransfusion könnten die infizierten Zellen im

Empfänger aus dem peripheren Blut zu den Lymphknoten und ins Gewebe migrieren und dort als Reservoir für WNV dienen (Rios et al. 2006).

Der direkte Virusnachweis bei Patienten erfolgt in Blut und Cerebrospinalflüssigkeit. Es konnte aber gezeigt werden, dass virale RNA auch durch Urin ausgeschieden wird (Tonry et al. 2005).

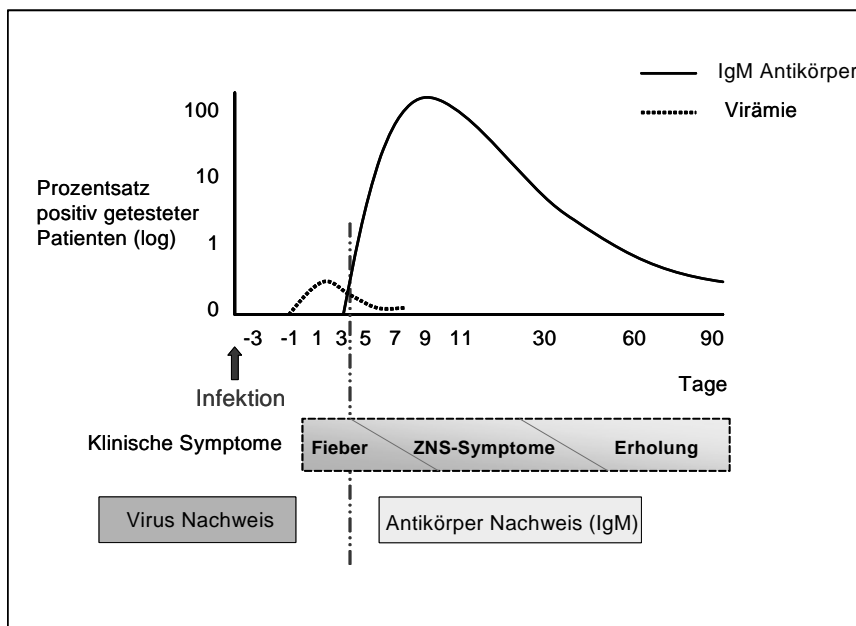


Abbildung 6: *West-Nil-Virus* Infektion beim Menschen: Virämie und Entwicklung der IgM-Antikörper, verändert nach Solomon et al. 2003.

Die am häufigsten beobachteten klinischen Zeichen beim Menschen (ca. 20 % der Infizierten) sind: Fieber, Kopfschmerzen, gastrointestinale Symptome, Hautausschläge und Lymphadenopathie. Diese leichteren Erscheinungsformen werden auch als WNV-Fieber bezeichnet. 1 % der Infizierten entwickelt neurologische Komplikationen. Die Gefahr an schweren neurologischen Symptomen zu erkranken, besteht vor allem bei älteren Personen über 70 Jahre und bei Kindern.

Als schwere Krankheitssymptome treten auf: Bewusstseinstörungen, Schluckstörungen, Dysphagien, Koordinationsstörungen (Ataxien), Schwindel, Lähmungserscheinungen am Augenmuskel und Zittern (Burton et al. 2004). Bei WNV-Enzephalitiden ist ebenfalls eine Verhaltens- und Persönlichkeitsveränderung zu erkennen, die über längere Zeit auftreten kann. Klinische Zeichen der schlaffen Lähmung (*acute flaccid paralysis*: AFP) werden

seltener beobachtet, führen aber zu einer akuter Muskel- und Gliederschwäche, die zu Lähmungserscheinungen der Extremitäten führen kann. Neueste Ergebnisse konnten zeigen, dass die Lähmung auf eine Infektion der Vorderhornzellen vom Rückenmark zurückzuführen sind, wodurch Poliomyelits-ähnliche Symptome entstehen (Glass et al. 2002). Treten schwere neurologische Symptome im Rahmen der WNV-Infektion bei Patienten auf, so ist die Prognose einer Heilung schlecht. Wird die Erkrankung überlebt, sind Lähmungserscheinungen auch noch nach Monaten vorhanden (Sejvar et al. 2003). Innerhalb dieser Patienten kann es in 10 % der Fälle zur Todesfolge durch die WNV-Infektion kommen (Campbell et al. 2002, Klee et al. 2004). Tabelle 3 zeigt einen Überblick über die häufigsten schweren neurologischen Symptome von WNV-Infektionen.

Tabelle 3: Neurologische Symptome beim Menschen durch WNV-Infektionen, nach Stock 2004

West-Nil-Meningits	West-Nil-Enzephalitis	WNV-assoziierte "acute flaccid paralysis" (AFP)
Klinisches Zeichen einer Hirnhautentzündung mit Nackensteifheit, Photophobie oder Phonophobie	Enzephalopathie, Bewusstseinsveränderung, Lethargie oder Persönlichkeitsveränderung > 24 h	Akutes Auftreten von Gliederschwäche mit deutlicher Progression über 48 h
Zusätzliche Hinweise auf eine akute Infektion mit mindestens einem der folgenden Kennzeichen: Fieber > 38 °C oder Hypothermie < 35 °C Erhöhte Zellzahl der Cerebrospinalflüssigkeit Periphere Leukozytenzahl: > 10.000/mm ³ Neurographische Befunde stimmen mit akuter Hirnhautentzündung überein	Zusätzliche Hinweise auf eine Entzündung des ZNS mit mindestens zwei der folgenden Kennzeichen: Fieber > 38 °C oder Hypothermie < 35 °C Erhöhte Zellzahl in der Cerebrospinalflüssigkeit: > 5 Leukozyten/mm ³ Periphere Leukozytenzahl > 10.000/mm ³ Neurographische Befunde stimmen mit akuter Entzündung oder Demyelinisierung überein Präsenz einer fokalen neurologischen Störung Meningismus Elektroenzephalographische Befunde stimmen mit Enzephalitis überein	Zusätzliche Hinweise auf eine Entzündung des ZNS mit mindestens zwei der folgenden Kennzeichen: Asymmetrie bis Schwäche, Areflexie/Hyporeflexie der betroffenen Gliedmaßen Ausbleibender Schmerz, Parästhesie oder Taubheit der betreffenden Gliedmaßen Erhöhte Zellzahl in der Cerebrospinalflüssigkeit > 5 Leukozyten/mm ³ Erhöhte Proteinwerte > 45 mg/dl Elektrodiagnostische Studien stimmen mit Vorderhorn-Prozess überein Rückenmarksmagnetresonanztomographie dokumentiert abnormal gesteigertes Signal in der grauen Substanz des Vorderhorns

Als Risikofaktoren bei einer WNV-Infektion gelten Grunderkrankungen wie Diabetes und Bluthochdruck, die eine Überwindung der Blut-Hirnschranke für WNV erleichtern (Beasley 2005) sowie eine Immunsuppression.

1.4.4 WNV-Infektionen bei Pferden

Pferde gehören ebenso wie Menschen zu den Fehlwirten von WNV. Pferde reagieren sehr sensitiv auf WNV-Infektionen und zeigen oft klinischen ZNS-Symptomatiken. Die Hauptsymptome sind Fieber und neurologische Symptome, wie diffuse Enzephalomyelitis mit Ataxie und Parese. In experimentellen Untersuchungen führten 10 % - 12 % der WNV-Infektionen zu Erkrankungen des ZNS (Bunning et al. 2002). Bei ZNS-Symptomatik liegt die Mortalitätsrate bei Pferden zwischen 28 % - 45 % (van der Meulen et al. 2005). Infektionen mit dem Subtyp *Kunjin-Virus* sind in Australien beschrieben worden, die denselben Phänotyp wie andere WNV-Isolate zeigten. Serokonversionen gegen das *Kunjin-Virus* konnten bei einer Reihe von klinisch gesunden Pferden nachgewiesen werden (Hall et al. 2002). Die Virämie bei Pferden ist im allgemeinen kurz und der Virustiter mit ca. 10^1 - 10^3 PFU/ml Blut niedrig (Deubel et al. 2001, Bunning et al. 2002).

Infektionen mit WNV bei Pferden sind sowohl in Europa als auch in Amerika bekannt. Hohe WNV-Seroprävalenzen bei Pferden sind bereits 1956 in Ägypten und 1960 in Israel beschrieben worden (Schmidt und El Mansoury 1963, Akov und Goldwasser 1966). Die erste Virusisolation aus einem Pferd mit ZNS-Symptomatik erfolgte 1963. Neurologische Symptome wurden weiterhin bei Epidemien in Frankreich (Carmague), Italien (Toskana), Israel, Portugal und Marokko festgestellt (Cantile et al. 2000, Murgue et al. 2001a, Murgue et al. 2001b, van der Meulen, 2005). In der westlichen Hemisphäre konnten equine Infektionen unter anderem in den USA, Mexiko und Argentinien festgestellt werden (Blitvich, 2003, Lorono-Pino et al. 2003, van der Meulen et al. 2005, ProMED 2006a).

1.4.5 WNV-Infektionen bei weiteren Vertebraten

WNV-Infektionen sind nicht nur bei Pferden nachweisbar, sondern auch bei verschiedenen anderen Wirbeltieren. Im Gegensatz zu Pferden konnte aber keine Art festgestellt werden, die in hohem Maße gegenüber WNV-Infektionen sensitiv ist und symptomatisch erkrankt.

Tabelle 4 zeigt eine Zusammenfassung der Wirbeltiere, bei denen WNV bzw. Antikörper gegen den Erreger nachgewiesen wurden.

Tabelle 4: West-Nil-Virus Infektionen bei Wirbeltieren, adaptiert nach Hubalek 2000, McLean et al. 2001a, Klenk et al. 2004, Dietrich et al. 2005, van der Meulen et al. 2005

Wirbeltiere	WNV-Antikörper	Virusnachweis WNV
Alligator (Alligatoridae)	nicht untersucht	+
Alpaka (Camelidae)	nicht untersucht	+
Braunbär (Ursidae)	+	nicht untersucht
Fledermaus (Chiroptera)	+	+
Frosch (Ranidae)	nicht untersucht	+ (experimentell)
Hase (Leporidae)	nicht untersucht	+
Hund (Canidae)	+	+
Igel (Erinaceidae)	+	nicht untersucht
Kamel (Camelidae)	+	nicht untersucht
Kaninchen (Leporidae)	+	nicht untersucht
Katze (Felidae)	+	+ (experimentell)
Krokodil (Crocodylidae)	+	nicht untersucht
Leguan (Iguanidae)	nicht untersucht	+ (experimentell)
Lemur (Lemuridae)	+	+ (experimentell)
Makaken (Cercopithecidae)	+	nicht untersucht
Maus (Muridae)	nicht untersucht	+ (experimentell)
Natter (Colubridae)	+	+ (experimentell)
Pavian (Cercopithecidae)	+	nicht untersucht
Rentier (Cervidae)	nicht untersucht	+
Rind (Bovidae)	+	nicht untersucht
Rotwild (Cervidae)	+	nicht untersucht
Schaf (Bovidae)	+	+ (experimentell)
Schildkröte (Chelonia)	+	+
Schimpanse (Homidae)	nicht untersucht	+
Schwarzbär (Ursidae)	+	nicht untersucht
Schwein (Suidae)	+	+ (experimentell)
Stinktief (Mephitidae)	+	nicht untersucht
Waschbär (Procyonidae)	+	nicht untersucht
Wolf (Canidae)	nicht untersucht	+
Ziege (Bovidae)	+	nicht untersucht

1.5 Das *Usutu-Virus*, USUV

Das *Usutu-Virus* (USUV) gehört ebenfalls zu den Flaviviren und wird wie WNV zum Japan-Enzephalitis-Serokomplex gezählt. Der Erreger wurde zum ersten Mal aus Stechmücken 1959 in Südafrika isoliert und nach einem Fluss in Swaziland benannt. Das natürliche Reservoir stellen Vögel dar, wobei das Virus aber auch bei Säugern in Afrika nachweisbar war. Bisher konnte USUV lediglich bei einem Menschen in Afrika isoliert werden, der an Fieber und Hautausschlägen litt (Pasteur 2006). Zu den Vektoren gehören verschiedene Stechmückenarten. Zecken wurden bisher nicht als Vektoren beschrieben (Pasteur 2006). Das *Usutu-Virus* ist in Afrika endemisch und wurde in Österreich zum ersten Mal 2001 bei Vögeln nachgewiesen (Kuno et al. 1998, Weissenböck et al. 2002). Die Epidemie von USUV in Österreich bei Wildvögeln führte dazu, dass vor allem Amseln (*Turdus merula*) und Bartkäuze (*Strix nebulosa*) an der Infektion verstarben. Die Krankheitssymptome der Vögel waren Enzephalitis, Nekrosen in der Leber und Niere sowie die Degeneration des Herzmuskels (Chvala et al. 2005). Phylogenetische Untersuchungen von Isolaten aus Afrika und Europa zeigten, dass das österreichische Isolat auf der Nukleotidebene zu 97 % identisch ist mit einem Isolat aus Afrika, sowie eine Identität von 99 % auf Aminosäurelevel aufweist (Weissenböck et al. 2002, Bakonyi et al. 2004). Es wird vermutet, dass das Virus über Zugvögel von Afrika nach Mitteleuropa oder durch den Import von infizierten exotischen Vögeln eingeschleppt wurde. Über mehrere Jahre konnte eine Persistenz von USUV in Österreich festgestellt werden, wobei die Vektoren dort bisher unbekannt sind (Weissenböck et al. 2003a).

In Österreich konnten keine USUV-assoziierten Erkrankungen bei Menschen diagnostiziert werden, so dass davon ausgegangen wird, dass die Pathogenität des Virus für Menschen gering ist (Weissenböck et al. 2003a). Über das Wirtsspektrum und die Pathogenität von USUV ist wenig bekannt, es konnte jedoch gezeigt werden, dass verschiedene permanente Zelllinien von Wirbeltieren, vor allem von Säugetieren infizierbar sind (Bakonyi et al. 2005b). Experimentelle USUV-Infektionen bei Gänsen und Hühnern zeigten eine geringe Pathogenität des Virus: es kam zu einer Replikation ohne klinische Symptome. Eine Serokonversion war 10 Tage nach experimenteller Infektion nachweisbar (Agrawal und Petersen 2003, Chvala et al. 2005, 2006). Antikörper gegen USUV konnten nicht nur in Mitteleuropa sondern auch in England bei Wildvögeln nachgewiesen werden (Buckley et al. 2003).

1.6 Diagnostische Nachweismethoden von WNV

1.6.1 Diagnostischer Virusnachweis, direkter Nachweis

Der Virusnachweis von WNV ist mit Hilfe verschiedener Methoden durchführbar. Zum einen hat sich der Nachweis von viraler RNA mittels der RT-PCR bewährt aber auch Virusisolationen in der Zellkultur oder die Inokulation des Virus in juvenilen Mäusen sind möglich. Weiterhin können die Viruspartikel durch elektronenmikroskopische Untersuchungen bestimmt werden. Diese Art der Diagnostik ist nur möglich, wenn genügend hohe Virustiter im Untersuchungsmaterial vorhanden sind. Die Virusanzucht ist in einem Labor der Sicherheitsstufe BSL3 durchzuführen. Eine Virusanzucht sollte nach der Empfehlung des CDC auf Mamalierzelllinien oder Insektzelllinien erfolgen. Zum Nachweis von WNV in Gewebe, Cerebrospinalflüssigkeit und Blut eignen sich Methoden wie RT-PCR, Real-Time-PCR und NASBA. In amerikanischen Blutspendern werden seit Juli 2003 Minipools von Spendern mit Hilfe der NAT-Methode (nucleid acid testing) untersucht (Koppelman et al. 2006). Ferner kann das WNV-Antigen mit immunhistochemischen Analyseverfahren bestimmt werden oder aber mit Antigen-capture ELISA-Testen (Enzyme-linked-immuno-sorbent-assay) (CDC 2006c), die bereits in den USA für den Nachweis von WNV in Stechmückenpools und in verschiedenen Vogelarten getestet wurden (Nasci et al. 2002, Gancz et al. 2004).

1.6.2 Serologische Diagnostik, indirekter Nachweis

Die serologische Diagnostik von WNV beruht auf dem Nachweis einer spezifischen Immunantwort gegen Virusproteine. Im Serum oder Cerebrospinalflüssigkeit von Patienten können spezifische IgM-Antikörper in der akuten Krankheitsphase gegen das WNV nachgewiesen werden. Der Nachweis von IgM-Antikörpern gegen WNV konnte bis zu 500 Tage nach Infektion in den USA bestätigt werden (Petersen et al. 2002, Roehrig et al. 2003). Zum Nachweis von Antikörpern können verschiedene Methoden verwendet werden: Western Blot, ELISA und Immunfluoreszenztest (IFT). Für den IgM-Antikörpernachweis in Serum oder Cerebrospinalflüssigkeit (Liquor) bei infizierten Personen in den USA gibt es FDA-zugelassene IgM-Capture-ELISA (Malan et al. 2003). Der Nachweis von IgM-Antikörpern kann aber auch mit Nachweismethoden wie IFT oder Hämagglutination-Inhibitions-Test (HI) in der akuten Phase der Infektion durchgeführt werden (Koraka et al. 2002). Zum Nachweis

von IgG-Antikörpern sind sowohl IFT- als auch ELISA Testsysteme kommerziell erhältlich. Neutralisierende Antikörper schützen die Zellen vor dem Eindringen von Pathogenen und können in einem Virusneutralisationstest nachgewiesen werden. Da die serologische WNV-Diagnostik teilweise ausgeprägte Kreuzreaktionen mit eng verwandten Flaviviren, insbesondere des Japan-Enzephalitis-Serokomplexes aufweist, müssen serologisch positive Testergebnisse von ELISA, IFT und HI mit einem Neutralisationstest bestätigt werden.

1.7 Behandlung, Vakzine und Vektorbekämpfung

Behandlung:

Zurzeit gibt es nur unterstützende Behandlungsmöglichkeiten bei WNV-Infektionen. Antivirale Medikamente wie Ribavirin in hohe Dosen waren *in vitro* effektiv (Jordan et al. 2000, Crance et al. 2003), in Tierexperimenten an Affen konnte jedoch keine Abnahme der Krankheitssymptome festgestellt werden (Huggins 1989). Zum humanen Einsatz (*in vivo*) kam Ribavirin in Israel 2000 ohne eine besondere Wirkung hervorzurufen (Chowers, 2001). Es werden derzeit Studien zu verschiedenen Immuntherapeutika wie der passiven Immunisierung durch intravenös gegebenes Immunglobulin (IVIG) durchgeführt. Berichte über die Gabe von IVIG zeigten, dass zwei Patienten mit schweren neurologischen Symptomen die Infektion überlebten (Shimoni et al. 2001, Hamdan et al. 2002), während ein dritter leukämiekranker Patient die WNV-Enzephalitis nicht überlebte (Haley et al. 2003). Eine größere Studie zur IVIG-Therapie wird derzeit in den USA durchgeführt. Die Gabe von monoklonalen Antikörpern (mAb) gegen die Domäne III des viralen E-Proteins zeigte erste Erfolge durch eine geringere Mortalitätsrate bei Mäusen (Oliphant et al. 2005). Verschiedene antivirale Therapieformen werden als Ansatz für eine Immunmodulation genutzt. Erste Studien zur Gabe von Interferon (IFN α -2a) wurden durchgeführt. Es zeigte sich, dass die WNV-Replikation in Zellkultur gehemmt werden konnte, während die Replikation im Tiermodell nicht reduziert wurde (Granwehr et al. 2004). Die therapeutische Wirksamkeit von IFN α -2b konnte bisher nur *in vitro* gezeigt werden (Agrawal und Petersen 2003).

Vakzine:

Es sind 2 WNV-Vakzine für den Veterinärbereich in den USA zugelassen. Ein Impfstoff basiert auf einem Kanarienvogelpocken-Vektor, bei dem die WNV-prM- und E-Gene

integriert wurden (Minke et al. 2004). Der zweite Impfstoff ist ein Formalin-inaktiviertes WNV-Präparat. Nachteil des Totimpfstoffs ist eine jährliche Boosterung (Hall und Khromykh 2004). Beide Impfstoffe werden zurzeit in den USA bei Pferden eingesetzt. Ein Lebendimpfstoff für den humanen Gebrauch befindet sich in der klinischen Phase I. Bei dem Impfstoff handelt es sich um das attenuierte *Gelbfiebertvirus* Stamm 17 D, Chimerivax-WN (Monath et al. 2006), bei dem die prM- und E-Gene durch WNV-Gene ausgetauscht sowie 3 Mutationen in das WNV-E-Gen eingefügt wurden, um die Neurovirulenz zu reduzieren. Weitere Strategien beruhen auf der genetischen Veränderung eines chimären *Masern-Virus*-Impfstoffes, bei dem ebenfalls die Genregion des Hüllproteins durch das WNV-E-Proteins ersetzt wurde (Despres et al. 2005) sowie eines Impfstoffes auf Basis von Plasmid-DNA von attenuierten WNV- bzw. *Kunjin-Virus*-Isolaten (Hall et al. 2003, Turell et al. 2003). Derzeit gibt es keine Impfstoffe, die für den humanen Gebrauch zugelassen ist.

Vektorbekämpfung:

Da es keine Schutzimpfung gegen WNV für den Menschen gibt, ist eine individuelle Prävention, vor allen in endemischen Regionen, unerlässlich. In Gegenden, wo das Virus zirkuliert, wird angeraten, sich einer Expositionsprophylaxe gegen Stechmückenstiche zu unterziehen. Durch geeignete Kleidung und verminderten Aufenthalt im Freien zu den Dämmerungsstunden kann das Risiko einer Übertragung durch Mückenstiche eingeschränkt werden. Das CDC empfiehlt weiterhin die Verwendung von Stechmückenrepellents mit 10 % - 30 % DEET (N,N-diethyl-3-methylbenzamid) für die Haut und die Kleidung. Der Wirkmechanismus von DEET ist bisher unbekannt. Man vermutet, dass die Chemikalie die Funktion der Rezeptoren in den Antennen der Stechmücken stört und somit eine Lokalisation des Wirtes nicht möglich ist (Koren et al. 2003). Die Effektivität des Repellents ist abhängig von deren eingesetzter Konzentration. Während 30 % DEET eine Wirkdauer von 6 Stunden aufweist, so ist die Wirksamkeit von 5 % DEET auf nur 2 Stunden beschränkt (Gryboski et al. 1961).

Die Wirksamkeit von Produkten mit DEET ist verbunden mit einer Schädlichkeit für Erwachsene und Kinder. Konzentrationen von DEET im Serum von 1 mmol/l führen zum Tod von Erwachsenen (Koren et al. 2003). Neben Produkten mit DEET gibt es verschiedene alternative Repellentprodukte. Produkte auf Citronella-Öl- oder Lavendel-Öl-Basis haben in Abhängigkeit der Konzentration eine kurze Wirkdauer von 30 Minuten bis 2 Stunden (Fradin

und Day 2002). Weiterhin werden auch Produkte mit Picaridin (KBR 3023) und einem Wirkstoff auf Basis von Eukalyptusöl (PMD: p-Menthan 3,8-diol) empfohlen.

Neben dem Einsatz von Repellents werden Pestizide gegen Stechmücken eingesetzt. Bei der Verwendung von Pestiziden nutzt man zwei mögliche Angriffspunkte: zum einen kann man Larvizide verwenden, um die Entwicklung der Larve zum adulten Insekt zu verhindern, auf der anderen Seite tötet man ausgebildete Insekten mit Adultiziden ab. In Kanada werden Methoprene (Isopropanol (E,E)-(RS)-11-methoxy-3,7,11-trimethyldodeca-2,4-dienoate) und Bti (*Bacillus thuringensis* Subspecies *israelensis*) als Larvizide verwendet (Shapiro und Micucci 2003). Als Adultizid wird Malthion verwendet, das in den Stoffwechsel der Insekten durch die Inhibition der Cholinesterase eingreift. Nachteil des Pestizids ist die hohe Toxizität in aquatischen Organismen (Shapiro und Micucci 2003).

In den USA wurden ab 2000 Surveillance-Systeme eingerichtet, bei denen Sentinel-Hühner, tote Vögel und erkrankte Pferde als Instrumente des Monitorings verwendet wurden. Dies soll qualitative oder quantitative Informationen zur Verbreitung, Intensität und Fluktuation von WNV geben.

1.8 Epidemiologie von WNV

1.8.1 Verbreitung von WNV auf dem amerikanischen Kontinent

1999 wurde WNV zum ersten Mal in die USA eingeschleppt und führte zunächst zu Infektionen bei Vögeln in New York City und alsbald zu ersten Infektionen bei Menschen. Im Jahr 1999 wurden dem CDC 62 menschliche Krankheitsfälle durch WNV-Infektionen gemeldet. Davon hatten 7 Fälle einen fatalen Ausgang, siehe Tabelle 5. Im Laufe der folgenden Jahre verbreitet sich das Virus über den gesamten Kontinent. Besonders schwere Epidemien fanden in den Jahren 2002 - 2003 statt, die zu einer Vielzahl von Krankheits- und Todesfällen führte. Alleine im Jahr 2002 wurden 15.000 Erkrankungen bei Pferden festgestellt. In den Folgejahren breitete sich das Virus in alle Bundesstaaten aus, während sich die Anzahl der symptomatischen Infektionen reduzierte und bei ca. 3000 erfassten Krankheitsfällen einpegelte (CDC 2006b). Auf welchem Weg WNV in die USA eingeschleppt wurde, ist bisher unbekannt. Die illegale Einfuhr von infizierten Vögel oder Stechmücken, die über die Flughäfen oder Häfen eingeschleppt wurden, könnten für den Beginn der Epidemie

verantwortlich sein (Jia et al. 1999, Giladi et al. 2001). Die Ausbreitung von WNV erfasste neben den USA auch Teile Kanadas. Dort wurden 2001 in Ontario die ersten WNV-Infektionen bei Stechmücken und Vögeln festgestellt, in den Folgejahren breitet sich die Infektion in insgesamt 5 Provinzen aus. Der Erreger konnte sowohl in den Norden Amerikas als auch in den Süden verbreiten. 2001 wurden erste Infektionen bei Menschen auf den Kaiman-Inseln festgestellt, 2002 konnten serologische WNV-Nachweise auf Jamaika, Guadeloupe und in der Dominikanischen Republik geführt werden (Komar et al. 2005). Die ersten WNV-Isolationen in Mexiko fanden 2002 bei Pferden statt (Estrada-Franco et al. 2003). Die Ausbreitung folgte weiter südlich zu den Bahamas, Puerto Rico und Kuba. 2004 wurde in Colombo und Trinidad erste WNV- spezifische Nachweise durchgeführt (Komar und Clark 2006) während 2006 erstmals das Virus in Argentinien in Pferden nachgewiesen wurde.

Tabelle 5: Anzahl der humanen Erkrankungen und Todesfälle durch WNV-Infektionen in den USA (CDC 2006b)

Jahr	Humane Krankheitsfälle	Humane Todesfälle
1999	62	7
2000	21	2
2001	66	9
2002	4156	284
2003	9862	264
2004	2539	100
2005	3000	119
2006 (11.12.2006)	4052	146

1.8.2 Verbreitung von WNV in Europa, Asien und Australien

Während in den USA ein hochvirulenter WNV-Stamm zirkuliert, der sich seit Einschleppung wenig verändert hat, gibt es in Südeuropa eine Vielzahl von kozirkulierenden WNV-Isolaten. Bisher sind in Europa fast ausschließlich Virus-Isolate der Genotyp-Linie 1a nachgewiesen

worden. 2006 gab es die erste Isolation eines WNV-Genotyp 2 in Ungarn bei einem Habicht (Bakonyi et al. 2006). Das Virus wird wahrscheinlich über die biannuellen Wanderzüge der palaearktisch-afrikanischen Zugvögel nach Europa eingeschleppt (Hubalek 2000, Malkinson und Banet 2002). WNV-Epidemien sind vor allem in Südeuropa und Südosteuropa seit den 50 – 60er Jahren des letzten Jahrhunderts bekannt (Murgue et al. 2002). Dabei handelte es sich immer um regional und zeitlich begrenzte Epidemien. In Europa sind die WNV-Epidemien an die Stechmückenaktivität gebunden, daher treten die Epidemien vorrangig in den Sommermonaten Juli bis September auf (Hubalek 2000).

In den folgenden Ländern Europas und des Mittelmeerraumes, konnten WNV-Infektionen bei Vögeln, Menschen oder Pferden festgestellt werden: Russland, Rumänien, Bulgarien, Moldawien, Ungarn, Frankreich, Italien, Israel, Ägypten, Portugal, Marokko, Tunesien und Algerien. Serologische Befunde konnten außerdem in Spanien, Slowenien, Tschechien, Russland und Polen festgestellt werden. Bei den WNV-Ausbrüchen in Europa konnten im ersten Jahr des Ausbruches hohe Fallzahlen beobachtet werden, während man in den Folgejahren weniger Krankheitsfälle beobachtete (Hubalek 2000).

Einen besonders starken WNV-Ausbruch konnte man 1996 in Bukarest feststellen, dort traten mehr als 800 menschliche Krankheitsfälle auf. Weitere Ausbrüche waren 1994 in Algerien (50 dokumentierte Erkrankungen), 1996 in Marokko (94 erkrankte Pferde), 1997 in Tunesien (137 Patienten mit WNV-Infektionen), 1998 in Italien (14 bestätigte Krankheitsfälle bei Pferden), 1998 und 2000 in Israel (mehrere hundert WNV-Fieber-Patienten, mehr als Tausend verstorbene Gänse, 18 erkrankte Pferde), in Russland 1999 (ca. 480 humane Fälle) sowie in Frankreich 2000 (76 bestätigte Fälle bei Pferden) zu verzeichnen (Murgue et al. 2001a, Murgue et al. 2002).

Die weltweite Verbreitung von WNV umspannt sowohl gemäßigte, subtropische und tropische Regionen. Isolate des Genotyps 1c zirkulieren in Indien, wo 1967 bereits Antikörper gegen WNV nachweisbar waren (Naficy und Saidi 1970). WNV-Infektionen konnten in Fledermäusen nachgewiesen werden sowie Serokonversionen bei Schweinen, Rindern, Pferden, Ziegen und Schafen (McLean et al. 2001a). In Australien kommt der Subtyp 1b des *Kunjin-Virus* vor, der bei Pferden zu Erkrankungen führt.

In Regionen Afrikas kommen sowohl Isolate des Genotyps 1 und des Genotyps 2 vor. In Südafrika treten jährlich WNV-Infektionen in den warmen Jahreszeiten auf. Im Senegal

konnte WNV bei Menschen und Affen nachgewiesen werden, während in Kenia WNV aus Stechmücken isoliert wurde (Murgue et al. 2002). Die Elfenbeinküste gehört ebenfalls zu den Endemiegebieten von WNV. Bei Halbaffen und Fledermäusen auf Madagaskar konnte man Antikörper gegen WNV feststellen, ebenso wie in Nigeria (McLean et al. 2001a). Phylogenetische Analysen von afrikanischen WNV-Isolaten zeigen hohe Nukleotid-Übereinstimmungen von WNV aus verschiedenen Regionen Afrikas. Man vermutet, dass die Verbreitung von WNV auf transversalen Zugbewegungen von Vögeln innerhalb der tropischen Regionen zurückzuführen ist (Murgue et al. 2002). Während die WNV-Isolate des Genotyps 1 zu schweren Erkrankungen führen, scheint die Pathogenität der Isolate des Genotyps 2 gering zu sein. Bisher konnte man nur feststellen, dass diese Isolate zu keinen klinisch erkennbaren Epidemien bei Wirbeltieren und Menschen führten.

1.9 Ziel der Arbeit

Durch die Einschleppung von *West-Nil-Virus* in die USA und die rasante Verbreitung über den gesamten Kontinent ist das Interesse an WNV weltweit gestiegen. Während in den süd- und südosteuropäischen Ländern bereits WNV-Epidemien auftraten, gibt es für Nord- und Mitteleuropa keine gesicherten Daten.

Ausgehend von der aktuellen Diskussion über die Bedeutung von WNV für Mensch und Tier, sollten Untersuchungen durchgeführt werden, die Auskünfte über die Prävalenz und Inzidenz von *West-Nil-Virus* in Deutschland geben. Folgende Schwerpunkte wurden dabei im Rahmen der Dissertation bearbeitet:

1. Etablierung und Validierung von serologischen und molekularbiologischen Nachweisverfahren für WNV in Menschen, Pferden und Vögeln
2. Nachweis von WNV in einheimischen Vogelpopulationen als natürliches Reservoir
3. Nachweis von WNV in Pferden und Menschen mit neurologischen Symptomen unklarer Ursachen
4. Nachweis von WNV in Personen mit einem Infektionsrisiko, die einen engen Kontakt zu Vektoren und Vögeln haben
5. Untersuchungen zur Prävalenz von *Usutu-Virus* bei einheimischen Vögeln

Die Ergebnisse der Studie sollten dazu beitragen, das Risiko von endemischen WNV-Infektionen in Deutschland abzuschätzen. Dabei sollte geklärt werden, ob Zugvögel ein Instrument zum Import und zur Verbreitung von WNV in Deutschland darstellen.