

### 3 Ergebnisse

Das *West-Nil-Virus* gehört zu den am weltweit verbreitetsten Flaviviren. Durch die rasante Ausbreitung des Virus in Nordamerika und den dortigen hohen Fallzahlen an Infektionen bei Menschen und Tieren, wurde das Projekt initiiert, die Prävalenz und Inzidenz von *West-Nil-Virus* in Deutschland zu untersuchen. Um das Vorkommen des Erregers nachzuweisen, wurden zunächst geeignete sensitive Nachweissysteme etabliert. Dabei wurden sowohl diagnostische Methoden zum Virusnachweis aufgebaut als auch serologische Nachweissysteme etabliert und validiert. Die Nachweismethoden wurden für verschiedene Spezies adaptiert, um das natürliche Reservoir des Pathogens, Wildvögel und die Fehlwirte Pferd und Mensch zu untersuchen.

#### 3.1 Etablierung und Validierung von Untersuchungsmethoden für den Nachweis von WNV

Zum Nachweis von *West-Nil-Virus* gibt es verschiedenen Möglichkeiten. Zum einen können die Erreger mit Hilfe von Zellkultur angezüchtet werden, zum anderen können es aber auch Immunfluoreszenztest oder Antigen-capture-ELISA angewendet werden. Weitere diagnostische Nachweismethoden sind Elektronenmikroskopie und molekularbiologische Nachweissysteme. Um die Inzidenz von akuten WNV-Infektionen in der vorliegenden Studie zu untersuchen, wurden die Proben mit Hilfe verschiedener PCR-Systeme analysiert.

##### 3.1.1 Nukleinsäurenachweissysteme (PCR) für WNV

Zunächst wurde versucht, eine Duplex-PCR auf der Basis einer bereits publizierten WNV-TaqMan-PCR von Briese *et al.* (Briese *et al.* 1999) zu etablieren. Die publizierte PCR-Methode weist einen Bereich des NS3-Genes von WNV-Genotyp 1 nach, nicht jedoch von WNV-Genotyp 2. Es wurde daher ein neuer sens Primer und eine neue TaqMan-Sonde entwickelt, die spezifisch den Genotyp 2 nachweisen. Die neu etablierte Sonde wurde mit dem Farbstoff JOE (2,7-Dimethoxy-4,5-dichloro-6-carboxyfluorescein) und einem Darkquencher markiert. Beim Test der beiden Sonden in der Einzelmessung, zeigten beide Sonden spezifische Signale. Im Rahmen der Duplex-PCR mit beiden Sonden in einem Mix zeigte sich aber, dass das Fluoreszenzsignal der FAM/TAMRA-Sonde auch im



Einordnung von WNV-Isolaten entwickelt. Phylogenetische Analysen werden zumeist im Bereich des Envelope-Protein-Genes durchgeführt, da in diesem Bereich eine hohe Variabilität innerhalb vieler Flaviviren vorhanden ist (Berthet et al. 1997). Eine klassische PCR von Wengler et al. (Wengler et al. 1985) wurde modifiziert, indem zu dem publizierten Primerpaar ein weiteres entwickelt wurde. Dabei wurde berücksichtigt, dass alle bekannten WNV-Sequenzen in diesem Bereich erfasst werden.

#### *3.1.1.1 Entwicklung von Primern für die generische TaqMan-PCR zum Nachweis von WNV Genotyp 1 und 2*

Die Etablierung einer generischen TaqMan-PCR zum Nachweis von beiden WNV-Genotyp-Linien erfolgte unter der Berücksichtigung, dass bekannte Sequenzen der beiden Genotypen von WNV nachweisbar sind. Daher sollte die PCR sowohl WNV-Genotyp 1, Genotyp 2 als auch *Kunjin-Virus* erfassen. Andere eng verwandte Flaviviren sollten nicht mit der PCR amplifizierbar sein. Dafür wurden zunächst spezifische Primer und Sonden mit Hilfe des Programms DNASTAR Lasergene 6 (DNASTAR Inc., USA) ausgewählt. Komplette Genomsequenzen von verschiedenen WNV-Isolaten aus der NCBI Datenbank wurden untereinander verglichen. Aus diesem Alignment wurde ein Bereich ausgewählt, der sich innerhalb der Sequenzen als homogen darstellte. Für diesen konservierten Bereich wurden Primer- und Sondensequenzen festgelegt (Abbildung 8).



Abbildung 8: Alignment von *West-Nil-Virus*- und *Kunjin-Virus*-Sequenzen, sowie die Bereiche von Primer und Sonden. Basis des Alignments sind Sequenzen aus der NCBI-Datenbank. Dabei entsprechen die Sequenzen AF404757, AF404756, AF404754, AF404753, AF481854, AF196835, AF260969, AF260967, AF206518, AF404755, AF260968, AF404755, AF317203 dem WNV-Genotyp 1, die Sequenzen D00246, M32550, M18922 *Kunjin-Virus*-Isolaten. Die Sequenzen M12294, AF533540 entsprechen dem WNV-Genotyp 2. Die Umrandungen stellen die Basenpaare der Primer (rot) und der Sonde (blau) dar.

### 3.1.1.2 Etablierung einer TaqMan-PCR zum Nachweis von WNV Genotyp 1 und 2

Die TaqMan-PCR wurde als diagnostische Nachweismethode von viraler genomischer RNA von WNV ausgewählt. Es wurde von dem molekularbiologischen Testsystem gefordert, dass die PCR spezifisch für den Nachweis von WNV sein musste und keine falsch positiven Ergebnisse auftraten. Zudem sollte die PCR in der Lage sein, auch niedrige Kopienzahlen von WNV-spezifischer Nukleinsäure nachzuweisen.

Um diese Hauptbedingungen zu erfüllen, wurde das PCR-System zunächst auf die optimale Annealingtemperatur eingestellt. Für die PCR ergab sich eine optimale Annealingphase bei 60 °C. Unter diesen Bedingungen wurden zunächst Verdünnungsreihen von Plasmid-DNA von  $10^6$  -  $10^1$  Kopien/Ansatz in der Real-Time-PCR eingesetzt. Abbildung 9 zeigt die Standardkurve für die TaqMan-PCR zum Nachweis des Capsid-Protein-Genes (ProC). Die Abbildung zeigt weiterhin die lineare Abhängigkeit von  $C_T$ -Wert und Plasmid-DNA. Dabei lag die Steigung der Standardkurve bei 3,4 und die Standardkurve schneidet die Y-Achse bei einem  $C_T$ -Wert von 39,56. Der Korrelationskoeffizient lag bei 0,996. Die Verdünnungsreihe aus Plasmid-DNA zeigte eine Sensitivität von 10 Kopien/Ansatz.

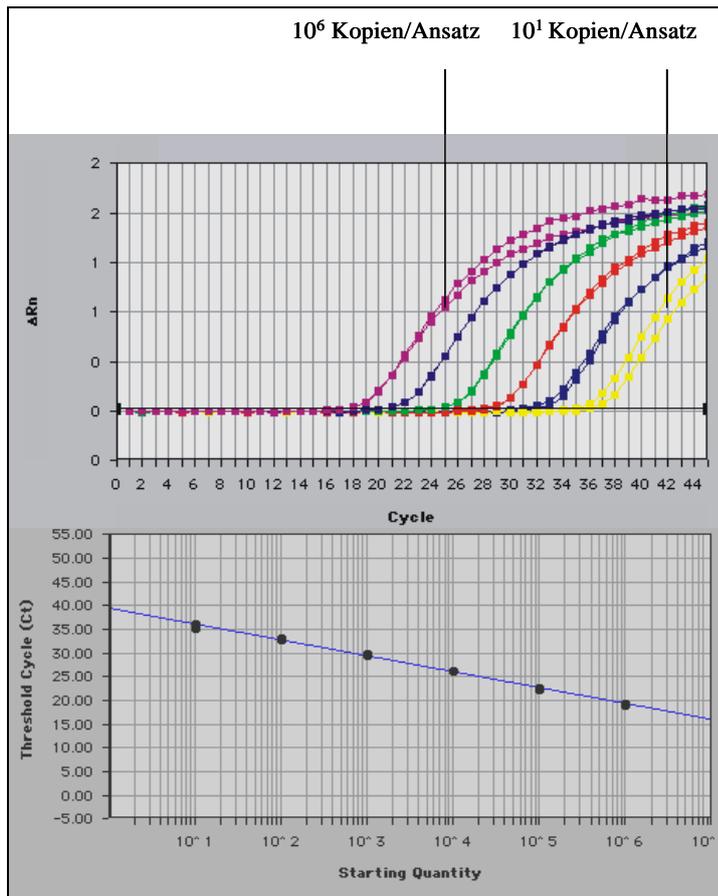


Abbildung 9: TaqMan-PCR zum Nachweis des Capsid-Protein-Genes (ProC): serielle Verdünnung von Plasmid-DNA (Doppelwerte), 10<sup>6</sup> - 10<sup>1</sup> Kopien/Ansatz.

### 3.1.1.3 Sensitivität der TaqMan-PCR und Probit-Analyse

Für eine diagnostische PCR ist eine sichere niedrige Nachweisgrenze unerlässlich. Daher wurde die Probit-Analyse verwendet, um die Nachweisgrenze der Plasmid-DNA statistisch abzusichern. Für die statistische Untersuchung wurde eine Verdünnungsreihe von WNV-Plasmid-DNA mit 10<sup>6</sup>-10<sup>-1</sup> Kopien/Ansatz in 8-facher Bestimmung mit der ProC-PCR zweimal unabhängig voneinander gemessen. Abbildung 10 zeigt die mittleren C<sub>T</sub>-Werte für die verschiedenen Verdünnungsstufen. Kopienzahlen von 0,5 und 0,1 Kopien/Ansatz waren mit der PCR nicht mehr nachweisbar. Statistisch konnten 0,7 Kopien/Ansatz nachgewiesen werden, wobei 4 von 16 Parallelbestimmungen positiv waren. Bei 20 Kopien/Ansatz waren alle 16 Bestimmungen positiv.

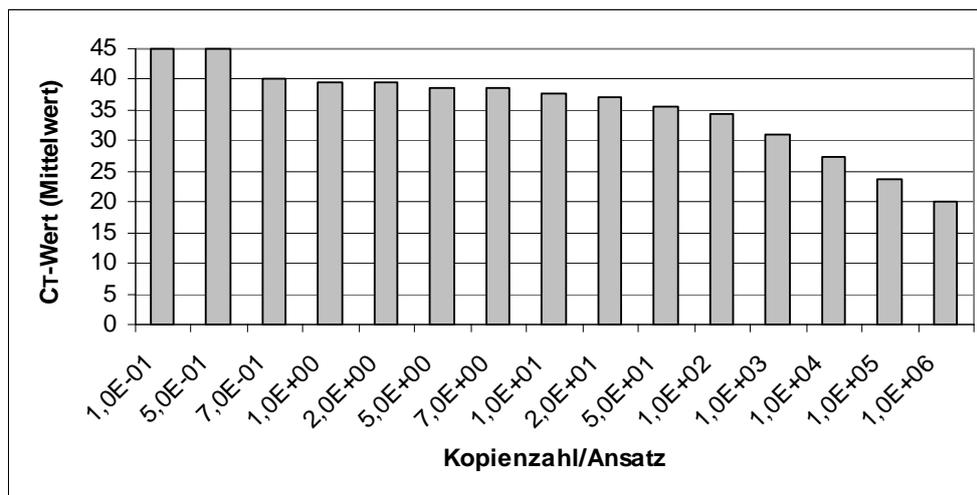


Abbildung 10: Nachweisgrenze von Plasmid-DNA in der TaqMan-PCR zum Nachweis der WNV-ProC-PCR: Darstellung der mittleren  $C_T$ -Werte für verschiedene Kopienzahlen pro Ansatz (gemittelte Werte aus insgesamt 16 Ansätzen).

Mit Hilfe der Probit-Analyse wurde statistisch untersucht, welche Plasmid-Kopienzahl/Ansatz mit einer 95 % Wahrscheinlichkeit durch die PCR erfassbar waren. Es konnte gezeigt werden, dass innerhalb der ProC-PCR 9,33 Kopien von Plasmid-DNA/Ansatz mit 95 % Wahrscheinlichkeit nachweisbar waren. Die 95 % Konfidenzgrenzen lagen bei 7,54 Kopien/Ansatz und 12,65 Kopien/Ansatz (Abbildung 11).

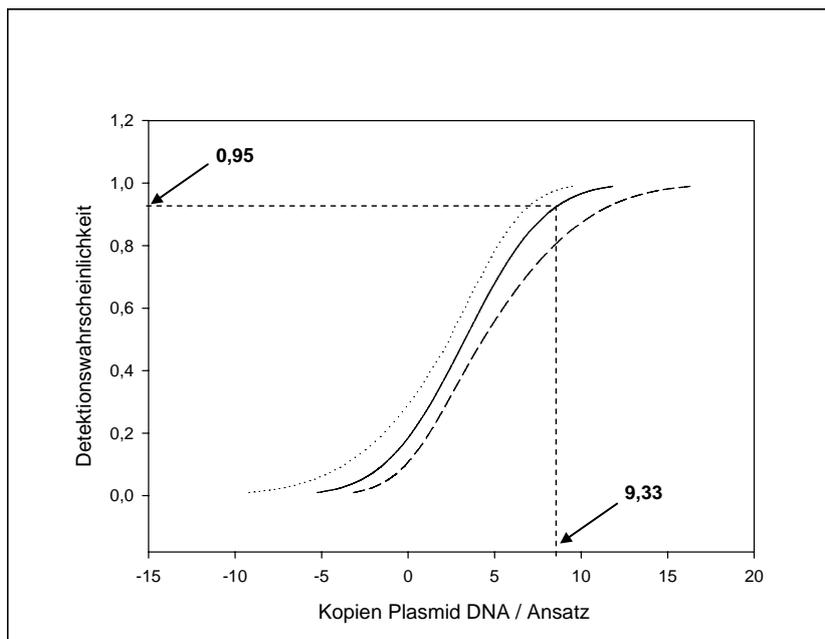


Abbildung 11: Probit-Analyse der ProC-TaqMan-PCR. Mit einer Wahrscheinlichkeit von 95 % konnten 9,33 Kopien Plasmid-DNA/Ansatz nachgewiesen werden. Die gepunktete Linie stellt die obere Konfidenzgrenze von 12,65 Kopien/Ansatz dar, die gestrichelte Linie zeigt die untere Konfidenzgrenze (7,54 Kopien/Ansatz).

#### 3.1.1.4 Spezifität der TaqMan-PCR zum Nachweis von WNV Genotyp 1 und 2

Für die Überprüfung der Spezifität der ProC-PCR wurden verschiedene eng verwandte Flaviviren mit Hilfe der WNV-PCR untersucht (Tabelle 7). Dabei handelte es sich um verschiedene Virusüberstände mit einem Titer von  $> 1 \cdot 10^5$  TCID<sub>50</sub>/ml. Alle eingesetzten WNV-Isolate konnten mit der WNV-PCR erfasst werden, wohingegen alle anderen Flavivirusisolate nicht erkannt wurden, obwohl diese Viren in serologischen Tests ausgeprägte Kreuzreaktionen aufweisen.

Tabelle 7: Überprüfung der Spezifität der ProC-PCR mittels verschiedener Flaviviren

Virus-Isolat	Genotyp	Accessionnumber/ATCC- Nummer	ProC-PCR
WNV Uganda B956	Genotyp 2	AY532665	+
WNV goshawk-Hungary/04		DQ116961	+
WNV France PaAn001	Genotyp 1	AY268132	+
WNV New York		AF196835	+
WNV Israel		nicht veröffentlicht	+
<i>Kunjin-Virus</i>		nicht veröffentlicht	+
WNV Isolat Rabensburg 97-103	Genotyp 3*	AY765264	(+)*
<i>Usutu-Virus</i> , Stamm Vienna 2001 from Austria		AY453411	-
<i>Japan-Enzephalitis-Virus</i>		ATCC SA14-14-2	-
<i>St.-Louis-Enzephalitis-Virus</i>		ATCC VR-1265	-
<i>Denguevirus</i> , Typ 1		ATCC VR-344	-
<i>Denguevirus</i> , Typ 2		ATCC VR-345	-
<i>Denguevirus</i> , Typ 3		ATCC VR-1256	-
<i>Denguevirus</i> , Typ 4		ATCC VR-1257	-
<i>Frühsummer- Meningoenzephalitis-Virus</i>		AF091010	-
<i>Gelbfiebervirus</i> , Stamm ASIBI		AY640589	-
<i>Gelbfiebervirus</i> , Stamm 17D		X03700	-

\*: Das WNV-Isolat Rabensburg 97-103 wird derzeit als WNV-Genotyp 3 eingegliedert (Bakonyi et al. 2005a). Das Isolat war bei einer Annealingtemperatur von 60 °C gering amplifizierbar (+), das Temperaturoptimum der Annealingphase lag bei 58 °C. +: amplifizierbar, -: nicht amplifizierbar.

### 3.1.1.5 Etablierung von PCR-Systemen zum Nachweis von WNV, USUV und Squirrel-Monkey-Retrovirus, SMRV

#### ***West-Nil-Virus, WNV***

Neben der Screening-PCR wurden weitere PCR-Systeme etabliert und validiert, die für zusätzliche Genotypisierungen oder phylogenetische Einordnungen dienen sollten. Für die jeweiligen TaqMan-PCR-Methoden wurden Plasmidstandards hergestellt und in Verdünnungsreihen getestet. Die TaqMan-PCR-Systeme zum Nachweis von Genomabschnitten der Regionen NS3 und NS5 von WNV wurden ebenfalls auf die Spezifität untersucht. Die PCR-Systeme wurden auf eine Sensitivität von mindestens 10 Kopien Plasmid-DNA/Ansatz eingestellt.

Zur Überprüfung der WNV-PCR-Methoden wurde ein Probe aus Ungarn untersucht, die von Prof. Dr. Nowotny; Veterinärmedizinische Universität Wien zur Verfügung gestellt wurde. Bei der Probe handelte es sich um Gehirn-Homogenisat neugeborener Mäusen, die mit Gehirnmaterial eines WNV-infizierten Habichts intercerebral infiziert wurden. Das Material wurde mit verschiedenen WNV-spezifischen TaqMan-PCR Systemen untersucht. In der ProC-PCR zeigte die Probe eine Kopienzahl von  $3,3 \cdot 10^6/5 \mu\text{l}$  Nukleinsäure, während in der NS3-PCR Genotyp 1 keine Amplifikation nachweisbar war. Eine Vervielfältigung der Nukleinsäure war jedoch mit der spezifischen NS3-PCR für den Genotyp 2 möglich. Es wurde daher die Schlussfolgerung gezogen, dass es sich bei diesem Isolat um einen WNV-Genotyp 2 handelte, was durch Sequenzierungen des E-Protein-Gens bestätigt werden konnte. Diese Untersuchung zeigte, dass die verschiedenen PCR-Systeme in der Lage waren, WNV aus klinischem Material nachzuweisen. Die Ergebnisse deckten sich mit den Untersuchungen der Arbeitsgruppe um Bakonyi et al. (Bakonyi et al. 2006).

#### ***Usutu-Virus, USUV***

Zum spezifischen Nachweis von *Usutu-Virus* wurde eine TaqMan-PCR etabliert. Der zu amplifizierende Genbereich liegt in der NS5-Region des Virus. Ebenso wie bei anderen PCR-Systemen wurde die optimale Temperatur der Annealingphase von 60 °C ermittelt und die Sensitivität von 10 Plasmid-DNA Kopien/Ansatz eingestellt. Die Spezifität der PCR wurde anhand verschiedener Flaviviren untersucht. Dabei zeigte sich, dass nur das *Usutu-Virus* amplifizierbar war (Tabelle 8)

Tabelle 8: Untersuchung der Spezifität der *Usutu-Virus*-spezifischen TaqMan-PCR anhand verschiedener Flavivirusisolate

Virus-Isolat	Accessionnummer, ATCC-Nummer	<i>Usutu-Virus</i> -PCR
<i>Usutu-Virus</i> , Stamm Vienna 2001 from Austria	AY453411	+
<i>West-Nil-Virus</i> , WNV Uganda B956	AY532665	-
WNV France PaAn001	AY268132	-
WNV Israel	nicht veröffentlicht	-
<i>Kunjin-Virus</i>	nicht veröffentlicht	-
<i>Japan-Enzephalitis-Virus</i>	ATCC SA14-14-2	-
<i>Denguevirus</i> , Typ 1	ATCC VR-344	-
<i>Denguevirus</i> , Typ 2	ATCC VR-345	-
<i>Denguevirus</i> , Typ 3	ATCC VR-1256	-
<i>Denguevirus</i> , Typ 4	ATCC VR-1257	-
<i>Frühsummer-Meningoenzephalitis-Virus</i>	AF091010	-
<i>Gelbfieberevirus</i> , Stamm 17D	X03700	-

+: amplifizierbar, -: nicht amplifizierbar

### ***Squirrel-Monkey-Retrovirus*, SMRV**

Als interne Kontrolle der Probenaufarbeitung und der PCR wurden die Proben von Pferden und Vögeln mit Virusüberstand des *Squirrel-Monkey-Retrovirus* (SMRV) gespikt. Das SMRV ist ein RNA-Virus mit Plusstrangorientierung, das in die Familie der *Retroviridae*, Genus der *Betaretroviridae* eingeordnet wird. Beschrieben wurde das Virus zunächst bei Totenkopffäffchen (*Saimiri sciureus*) der Neuwelt (Colcher et al. 1977, Ikeda et al. 1995). Das Virus wurde nicht bei Wirbeltieren der Altwelt nachgewiesen, so dass es sich eignete, die Aufarbeitungsmethode bezüglich Hemmungsfaktoren oder systematischer Fehler als interne Kontrolle zu überprüfen. In einer spezifischen TaqMan-PCR zum Nachweis des Gens des Envelope-Proteins wurde jede Probe parallel auf das Vorhandensein von viraler SMRV-Nukleinsäure untersucht.

### 3.1.2 Externe Qualitätssicherheitsstudie zum molekularen Nachweis von WNV

Im Rahmen der ersten externen Qualitätssicherheitsstudie des „European Network for Diagnostics of „Imported“ Viral Diseases (ENIVD)“ zum molekularen Nachweis von *West-Nil-Virus* wurden 30 Diagnostiklabore aus 18 Ländern ausgesucht, um die Leistungen der verschiedenen Diagnostiklabore zu vergleichen. Ziel dieser Qualitätssicherheitsstudie war die Standardisierung der diagnostischen Ansprüche in Bezug auf Erregerdiagnostik. Den Laboren wurden daher Überstände von Flavivirusstämmen zugesendet. Diese Überstände enthielten inaktivierte Viren in unterschiedlichen Konzentrationen. Aufgabe der Labore war es, die einzelnen Proben mit den in den Laboren etablierten Methoden zu untersuchen. Im Rahmen dieses Ringversuches wurden die in dieser Arbeit etablierten, WNV spezifischen TaqMan-PCRs eingesetzt.

Die Auswertungen ergaben, dass die verwendete ProC-TaqMan-PCR in der Lage war, alle WNV-Isolate zu erkennen. Dabei wurden die 7 Proben von WNV-Virusüberständen mit  $9,4 \cdot 10^2$  Kopien/ml bis zu  $9,4 \cdot 10^5$  Kopien/ml nachgewiesen. Die NS3-PCR differenzierte die Genotypen und die Sequenzierung des E-Proteins unterstützte die Ergebnisse der TaqMan-PCR. Fünf Proben waren in den WNV spezifischen PCRs negativ. Dabei handelte es sich um zwei negative Kontrollen und drei Proben aus Virusüberständen verschiedener Flaviviren (Probe 1: *Denguevirus* Typ 1-4; Probe 2: *Gelbfieberevirus* und *Frühsommer-Meningoenzephalitis-Virus*; Probe 3: *St.-Louis-Enzephalitis-Virus* und *Japan-Enzephalitis-Virus*) (Niedrig et al. 2006). Es wurden keine Flaviviren außer WNV mit Hilfe der WNV-spezifischen PCRs nachgewiesen, das heißt, es gab keine falsch positiven Ergebnisse. Damit konnte gezeigt werden, dass die in dieser Arbeit etablierten PCRs für den Nachweis von WNV geeignet waren.

### 3.2 Stabilität von WNV in Plasma

Aufgrund des logistischen Aufwandes, Blutproben von wildlebenden Vögeln bundesweit zu entnehmen und zeitnah zu versenden, wurde ein Versuch durchgeführt, der zeigen sollte, ob eine kurzfristige Lagerung von 12 - 24 Stunden des Probenmaterials zu einem Verlust von viraler WNV-Nukleinsäure führt. Der Versuch wurde mit humanem Plasma als Modell durchgeführt. Um die Stabilität von WNV in humanem Plasma zu überprüfen, wurden 3 ml

Plasma eines Spenders mit 10  $\mu\text{l}$  WNV-Isolat Israel ( $1 \cdot 10^7$  TCID<sub>50</sub>/ml) versetzt. Das Plasma wurde bei Raumtemperatur für 10 Tage gelagert. Nach folgenden Zeitintervallen: Tag 0 (direkt nach dem Spiken) bis Tag 4 und Tag 7 bis 9 wurde aus je 2 Aliquots mit jeweils 100  $\mu\text{l}$  Plasma die RNA extrahiert, cDNA synthetisiert und eine TaqMan-PCR (ProC) durchgeführt. In der PCR sollte überprüft werden, ob die Lagerung einen Einfluss auf die virale Kopienzahl hatte bzw. ob über die Zeit der Virustiter abnahm.

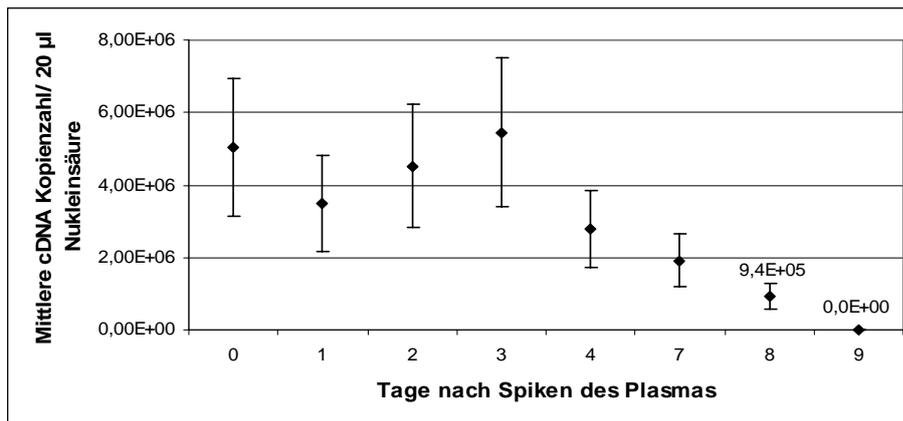


Abbildung 12: Nachweisbarkeit von *West-Nil-Virus*-Nukleinsäure in Plasmaproben über eine Zeitdauer von 10 Tagen mittels TaqMan-PCR (ProC). Die mittlere Kopienzahl ist mit Standardabweichung dargestellt (Nachweisgrenze der PCR < 10 Virusgenom-Kopien).

Abbildung 12 zeigt die Abnahme der Kopienzahl des WNV-Isolates Israel bei Lagerung des Plasmas. In den Tagen 0 - 3 nach Spiken des Plasmas, waren im Mittel  $4,6 \cdot 10^6$  Kopien/20  $\mu\text{l}$  Nukleinsäure nachweisbar, wobei eine geringe Schwankungsbreite der Kopien innerhalb dieser Tage zu beobachten war. Ab Tag 4 nahm die Kopienzahl von WNV ab und am Tag 9 war die Nachweisgrenze unterschritten. Aus diesem Versuch wurde geschlossen, dass eine Kurzzeitlagerung von ein bis zwei Tagen bei Raumtemperatur bzw. bei 4 °C möglich war.

### 3.3 Optimale Probenvorbereitung von Blutproben für den Nachweis von WNV

Da von vielen Proben, insbesondere von Vögeln nur geringe Probenvolumina vorhanden waren, wurde untersucht, inwieweit mit geeigneten Probenvorbereitungsmethoden die Serum- oder Plasmaproben effektiv ausgenutzt werden konnten. Dazu sollte untersucht werden, ob ein Unterschied in der Virusausbeute entsteht, wenn das Plasma zentrifugiert und nur das

Viruspellet für den Virusnachweis aufarbeitet wird und der Plasmaüberstand für serologische Untersuchungen genutzt wird. Die alternative Probenvorbereitung wäre das Aufteilen des Gesamtvolumens für PCR und Serologie gewesen.

1 ml Plasma eines humanen Spenders wurde mit 10  $\mu\text{l}$  WNV-Isolat Israel ( $1 \cdot 10^7$  TCID<sub>50</sub>/ml) gespikt. Das Plasma wurde jeweils in 4 Aliquots zu 200  $\mu\text{l}$  aufgeteilt. Zwei Proben wurden für 1,5 Stunden bei 4 °C und 14.000 rpm in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die virale RNA extrahiert, cDNA synthetisiert und die Menge der Nukleinsäure mittels TaqMan-PCR (ProC) gemessen. Die RNA des Viruspellets wurde ebenfalls aufgearbeitet und in der TaqMan-PCR (ProC) quantitativ bestimmt. Von zwei Proben wurde die RNA direkt aus 200  $\mu\text{l}$  Gesamtvolumen extrahiert, in cDNA transkribiert und mit der TaqMan-PCR (ProC) gemessen. Der Versuch wurde zweimal unabhängig voneinander durchgeführt.

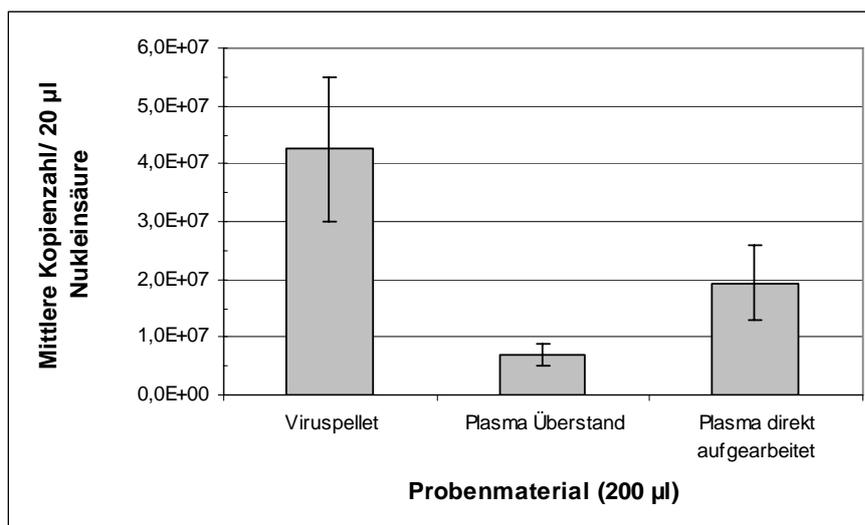


Abbildung 13: Nachweis viraler Nukleinsäure von *West-Nil-Virus* in Plasma mittels TaqMan-PCR (ProC). Der Virusgenomnachweis erfolgte direkt aus gespiktem Plasma und aus dem Pellet bzw. dem Überstand von Plasma nach Zentrifugation. Dargestellt ist die mittlere Kopienzahl mit Standardabweichung (2 Parallelansätze, 2 unabhängige Experimente).

Bei der direkten Aufarbeitung von 200  $\mu\text{l}$  Plasma wurden im Mittel  $1,9 \cdot 10^7$  Kopien/20  $\mu\text{l}$  cDNA-Präparation nachgewiesen (Abbildung 13). Nach Zentrifugation des gespikten Plasmas, konnten im Viruspellet  $4,3 \cdot 10^7$  Kopien/20  $\mu\text{l}$  Nukleinsäure nachgewiesen werden und im Überstand  $6,9 \cdot 10^6$  Kopien/20  $\mu\text{l}$  cDNA-Präparation. Summiert man die Kopien der viralen Nukleinsäure aus dem Pellet und dem Überstand erhält man einen theoretischen Wert

von  $5,0 \cdot 10^7$  Kopien/20  $\mu$ l cDNA-Präparation, der geringfügig höher als in der direkten Aufarbeitung war. Die Ergebnisse zeigten, dass eine Aufkonzentrierung von WNV in Plasma durch Zentrifugation möglich war, wobei etwa 90 % der Viren pelletiert wurden, was den Nachweis von Virusgenomamplifikaten im Überstand zeigte. Insgesamt war die Virusgenomausbeute im Pellet größer als in der direkten Aufarbeitung ohne Aufkonzentrierung, so dass die Methode geeignet ist, die Probenvorbereitung von Materialien wie Serum, Cerebrospinalflüssigkeit und Plasma durch Einführung eines Zentrifugationsschrittes zu modifizieren. Damit war es möglich, das Probenmaterial für Serologie und PCR optimal zu nutzen.

### **3.4 Sensitivität der TaqMan-PCR bei WNV-gespiktem Vogelplasma**

Nachdem die Sensitivität der ProC-PCR mit Hilfe von Plasmid-DNA-Verdünnungen untersucht worden war, sollte weiterhin überprüft werden, ob eine vergleichbare Sensitivität der PCR mit biologischem Material wie Plasma von Vögeln erreicht werden konnte. Daher wurde Plasma von spezifisch pathogen-freien Hühner (SPF-Hühner) mit WNV gespikt. Es wurden serielle Verdünnungsreihen hergestellt. 360  $\mu$ l Plasma wurden mit 40  $\mu$ l  $1 \cdot 10^6$  PFU/ml WNV gespikt. Von dieser Suspension ( $4 \cdot 10^4$  PFU/ml) wurden weitere Verdünnungen 1:10 hergestellt bis zu einer theoretischen Verdünnung von  $4 \cdot 10^{-2}$  PFU/ml. Aus 200  $\mu$ l Plasma jedes Verdünnungsschrittes (Parallelbestimmung) wurde die RNA durch Zentrifugation aufkonzentriert, isoliert und umgeschrieben und in der ProC-PCR als Doppelwert gemessen (Abbildung 14).

Es zeigte sich, dass bei niedrigen Verdünnungen, d.h. hohe Viruskonzentrationen, ein linearer Zusammenhang zwischen eingesetzter Virusmenge und Kopienzahl bestand. Bei hohen Verdünnungen war diese Linearität nicht mehr nachweisbar und eine starke statistische Streuung trat auf, die eine Erklärung für die nicht lineare Abhängigkeit in diesem Bereich geben könnte. Insgesamt zeigte der Zusammenhang von niedriger Virusverdünnung und ermittelte Kopienzahl, dass die Kopienzahl um einen Faktor 100 höher war als die theoretisch eingesetzten Plaquebildenden-Einheiten (PFU). Dies konnte dadurch erklärt werden, dass nur ein gewisser Prozentsatz von Viruspartikeln in der Zellkultur infektiös ist.

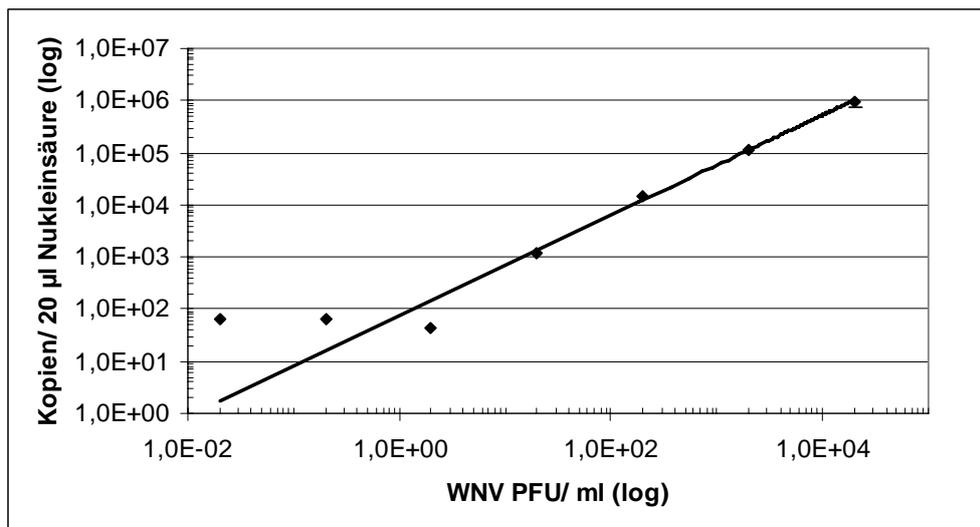


Abbildung 14: Nachweis von *West-Nil-Virus*-Nukleinsäure mit Hilfe von TaqMan-PCR (ProC). Der Virusnachweis erfolgte in gespiktem Plasma von spezifisch pathogen-freien Hühnern. Dargestellt ist die Korrelation zwischen nachgewiesener viraler Nukleinsäure in den verdünnten Proben und der eingesetzten Virusmenge (PFU/ml) sowie die Ausgleichsgerade durch die vier niedrigsten Verdünnungen.

### 3.5 Interne Kontrolle der Probenaufbereitung

Die PCR ist ein sensibles Nachweissystem, welches durch eine Vielzahl von Komponenten und Parametern beeinflusst werden kann. Dadurch können zum einen falsch-positive Ergebnisse produziert werden aber auch falsch-negative Resultate. Falsch-negative Ergebnisse entstehen beispielsweise durch Personen-gebundene Fehler bei der Probenaufreinigung, es können aber auch verschiedene Substanzen in einer Diagnostikprobe inhibitorische Effekte zeigen, die eine ineffektive Amplifikation in der PCR verursachen. Um die Aufreinigung und PCR zu kontrollieren, gibt es die Möglichkeit externe und interne Kontrollen mitzuführen.

Interne Standards zeigen beispielsweise den Einfluss einer einzelnen Probe auf den pH-Wert, auf die  $Mg^{2+}$ -Konzentration, auf generelle Ionenkonzentrations-Verschiebungen oder auf die Viskosität (Ballagi-Pordany und Belak 1996). Einige Proben haben ferner auch direkt inhibitorische Effekte auf die DNA-Polymerase. Als interne Standards können verschiedene Modelle verwendet werden. Zum einen eignet sich bei Gewebeproben der Nachweis von Housekeeping-Genen als endogene Zielsequenzen, die wiederum in Plasma- und Serumproben zu einem geringen Anteil vorhanden sind und je nach Qualität der Probe

schwanken, wodurch keine quantitative Beurteilung möglich ist. Weiterhin können auch synthetische Kontrollen wie Plasmid-DNA oder in vitro-RNA verwendet werden (Rosenstraus et al. 1998), die jedoch bei der Aufreinigung von viraler RNA nicht der gleichen biologischen Ausgangssituation entsprechen.

Für die PCR-Untersuchungen von Proben in der vorliegenden Arbeit wurde ein Verfahren genutzt, bei dem eine Virussuspension verwendet wurde, um die zu untersuchende Probe zu spiken. Zunächst wurde ein Virus ausgewählt, dass bei Vögeln und Pferden unbekannt ist. Es handelte sich um das *Squirrel-Monkey-Retrovirus* (SMRV), das ebenfalls wie WNV zu den Plusstrang-RNA-Viren gehört (Colcher et al. 1977, Ikeda et al. 1995). 100 µl Plasma wurden mit 10 µl SMRV-Kulturüberstand (1:10 verdünnt in PBS „ohne“, hitzeinaktiviert) gespikt und die virale RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. 5 µl cDNA wurden in die spezifische SMRV-PCR eingesetzt. Es wurden 10 Parallelbestimmungen durchgeführt.

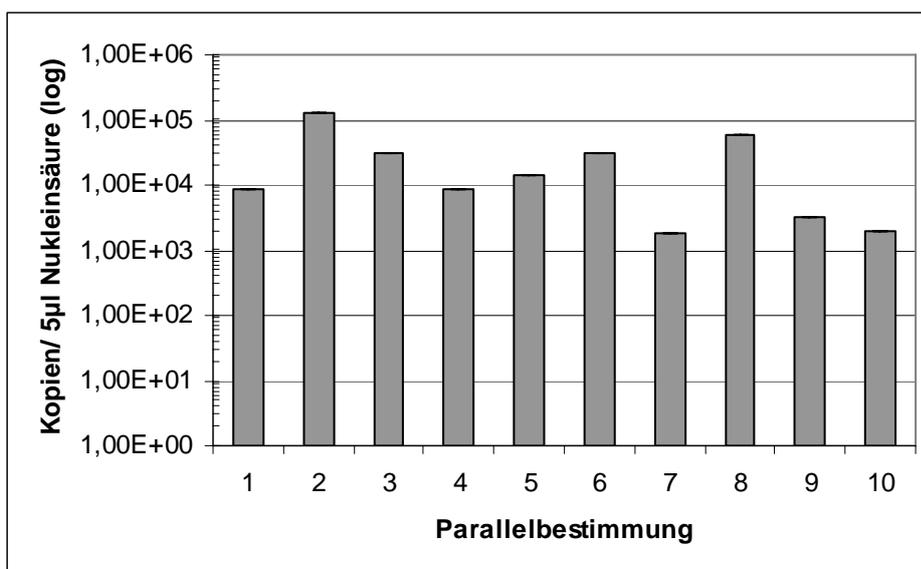


Abbildung 15: Nachweis von SMRV-Virusgenom in SMRV-gespiktem Plasma von SPF-Hühnern mit Hilfe der SMRV-spezifischen TaqMan-PCR. Dargestellt sind die mittleren Kopienzahlen in 5 µl Nukleinsäure.

Es zeigte sich, dass innerhalb der Parallelbestimmungen die Kopienzahl des SMRV jeweils innerhalb einer Logstufe zum Minimal und Maximalwert schwankte, wobei der Mittelwert bei  $2,9 \cdot 10^4$  Kopien pro 5 µl eingesetzter Nukleinsäure lag (Abbildung 15). Der niedrigste Wert lag bei  $1,9 \cdot 10^3$  Kopien pro 5 µl Nukleinsäure während der maximale Wert bei  $1,3 \cdot 10^5$  Genomkopien pro 5 µl Nukleinsäure lag. Durchschnittlich werden dabei  $2,9 \cdot 10^4$

Genomequivalente nachgewiesen. Die Schwankungsbreite entspricht der statistischen Schwankungsbreite, wenn die Standardabweichung und die eingesetzte Menge an Virusüberstand in die Berechnungen einbezogen werden.

Da bei der cDNA-Synthese aus einer Plasmaprobe sowohl WNV- als auch SMRV-RNA umgeschrieben werden sollte, musste geklärt werden, ob die Anwesenheit von Nukleinsäure beider Viren in Zusammenspiel mit dem RT-Mix zu einer Beeinflussung in der cDNA-Synthese führt. Das SPF-Plasma (200 µl) von Geflügel wurde sowohl mit SMRV (10 µl SMRV, 1:100 verdünnt und hitzeinaktiviert) und/oder mit 10 µl WNV ( $1 \cdot 10^1$  PFU/ml, WNV-Isolat Israel) gespickt, bei 14.000 rpm für 1,5 h (4 °C) zentrifugiert und wie oben beschrieben weiterbearbeitet. Es wurden 3 Parallelbestimmungen durchgeführt.

Die Ergebnisse der PCR zeigten, dass beim alleinigen Spiken mit SMRV höhere Kopienzahlen nachgewiesen wurden als im Mix von WNV und SMRV. Die Kopienzahlen von WNV hingegen waren in beiden Proben fast identisch. Zusammenfassend konnte man feststellen, dass durch das Spiken der Plasmaproben mit SMRV keine Beeinflussung der PCR für das WNV Ziel-Gen stattfand. Die Verwendung von SMRV erschien daher geeignet als interne Kontrolle von Blut und Gewebeproben (Abbildung 16).

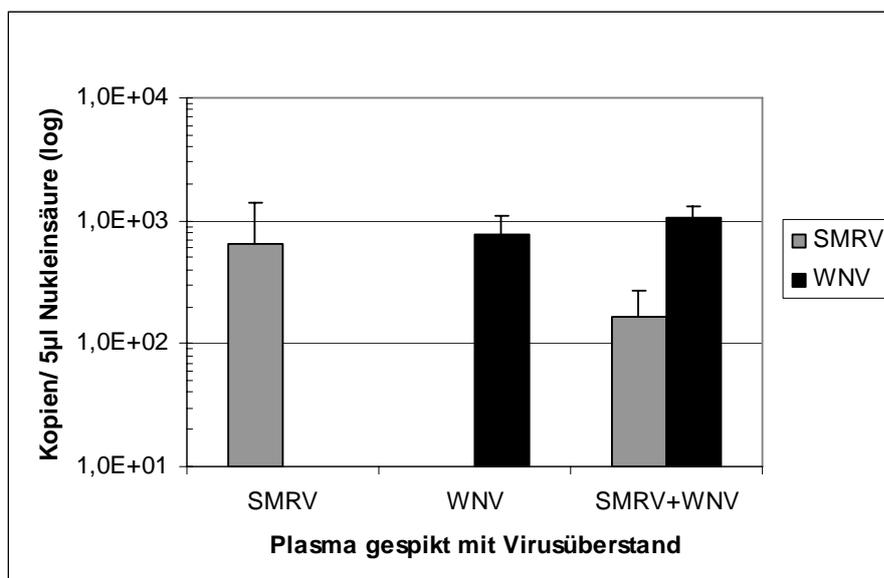


Abbildung 16: Nachweis von Virusgenomkopien von WNV- und SMRV-gespicktem Geflügelplasma mit Hilfe spezifischer TaqMan-PCRs. Dargestellt ist die mittlere Kopienzahl von WNV und SMRV mit Standardabweichung.

Aus den verschiedenen Vorversuchen ergab sich abschließend ein Standardprotokoll für die Probenvorbereitung und die molekulare Analyse von humanen, equinen und aviären Proben. Die zu untersuchenden Proben aus Plasma, Serum oder Cerebrospinalflüssigkeit wurden zunächst mit SMRV-Kulturüberstand (10 µl SMRV-Überstand, 1:10 verdünnt in PBS „ohne“, hitzeinaktiviert) versetzt und dann für 1,5 h bei 14.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Danach erfolgte die RNA-Extraktion und cDNA-Synthese aus dem Pellet und der spezifische Nachweis mittels quantitativer PCR für beide Virusgenome. Der Überstand wurde für die serologische Untersuchung bereitgestellt.

### **3.6 Etablierung von serologischen Nachweismethoden**

Neben der Inzidenz von WNV-Infektionen, die durch den Nachweis einer Virämie ermittelt werden sollte, lag der zweite Schwerpunkt der Studie auf der Erfassung der WNV-Seroprävalenz in Deutschland. Dazu sollten Diagnostiksysteme etabliert, validiert und angewendet werden, um spezifische Antikörper gegen WNV in den Proben nachzuweisen.

#### **3.6.1 Etablierung eines indirekten Immunfluoreszenztests (IFT) für den Antikörpernachweis gegen WNV**

Für den Nachweis von Antikörpern gegen WNV bei Menschen wurde ein Immunfluoreszenztests (IgG-Antikörper) der Firma EUROIMMUN nach Anweisungen des Herstellers angewendet. Für den Nachweis von Antikörpern gegen WNV in equinen und aviären Proben wurde der Test adaptiert. Es wurden spezifische Sekundär-Antikörper zur Erkennung von artspezifischen Antikörpern gegen Vögel und Pferde eingesetzt. Der IFT wurden zunächst mit bekannt positiven Kontrollseren getestet. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 9 zusammengefasst.

Im Folgenden wird von reaktiven Proben gesprochen, wenn diese eine spezifische Reaktion im WNV-Immunfluoreszenztest zeigten. Das Wort „reaktiv“ wird verwendet, um den Unterschied zu positiven Proben darzustellen, die im Neutralisationstest neutralisierende Antikörper aufweisen. Da der Immunfluoreszenztest nicht in der Lage ist, zwischen Antikörpern gegen eng verwandte Flaviviren zu diskriminieren, soll die Definition „reaktiv“

anzeigen, dass zwar Antikörper gegen WNV-Antigene nachgewiesen werden, diese Reaktion aber auch auf kreuzreaktive Antikörper zurückgeführt werden könnte.

Tabelle 9: Kontroll-Vogelseren untersucht im WNV-Immunfluoreszenztest (IgG)

Vogelart	Herkunft	Indirekter Immunfluoreszenztest, WNV IgG (EUROIMMUN) <sup>1</sup>					
		Verdünnungsstufe	1:50	1:100	1:500	1:1000	1:10000
Gans	England		5	4	3	3	1
Gans 1	Israel		3	2	1	n.d.	n.d.
Gans 2	Israel		2	1	-	n.d.	n.d.
Gans 3	Israel		3	2	1	n.d.	n.d.
Gans 4	Israel		3	2	1	n.d.	n.d.
Gans 5	Israel		3	2	1	n.d.	n.d.
Gans 6	Israel		2	1	-	n.d.	n.d.
Taube 3	Israel		1	1	-	n.d.	n.d.
Taube 5	Israel		2	2	1	n.d.	n.d.
Taube 6	Israel		4	4	3	2	1
Weißstorch L4541	Israel		2	1	-	n.d.	n.d.
Weißstorch L4545	Israel		2	1	-	n.d.	n.d.
Weißstorch L4548	Israel		2	1	-	n.d.	n.d.
Weißstorch L4553	Israel		3	2	1	n.d.	n.d.
Ente	Frankreich		3	2	1	n.d.	n.d.

<sup>1</sup>: angegeben ist die Reaktivitätsstärke nach den Kriterien des Herstellers: 5 bewertet dabei hohe Antikörpertiter (starke Fluoreszenz), während 1 grenzwertige Antikörpertiter (schwache Fluoreszenz) anzeigt, - keine spezifischen Reaktionen feststellbar, n.d.: nicht durchgeführt.

### 3.6.2 Etablierung eines Virusneutralisationstestsystems zum Nachweis von Antikörpern gegen WNV

Für die serologische Flavivirusdiagnostik gilt der Neutralisationstest (NT) als Goldstandard. Werden mit Hilfe der Testsysteme IFT und ELISA reaktive Proben nachgewiesen, ist es notwendig, eine Bestätigung des serologischen Befundes durch den NT durchzuführen. Für den Nachweis von neutralisierenden Antikörpern gegen WNV wurde deshalb ein Mikrotiterneutralisationstest etabliert. Dieses Testverfahren im 96-Well Format hat den Vorteil, dass eine Untersuchung mit geringem Ausgangsvolumen durchgeführt werden kann.

Somit konnte aviäre Proben untersucht werden, von denen nur wenige Mikroliter Ausgangsvolumen zur Verfügung stand. Es wurde zunächst versucht, den NT-Test parallel mit Isolaten des WNV-Genotyps 1 und 2 zu etablieren. Es stellte sich jedoch heraus, dass das verwendete Isolat des WNV-Genotyps 2 (WNV-Isolat B965) keinen konstant gut erkennbaren zytopathischen Effekt auf den Vero E6 Zellen bei niedrigeren Virusverdünnungen 500-1000 TCID<sub>50</sub>/ml zeigte, so dass der NT nur mit dem WNV-Genotyp 1 fortgeführt wurde. Zur Untersuchung von Plasmaproben wurde der Test verändert, so dass das Plasma-Virusgemisch eine Stunde auf den Zellen inkubiert wurde, um die Adsorption von nicht neutralisierten Viren zu gewährleisten. Anschließend wurde das Plasma-Virusgemisch abgenommen und durch frisches Medium ersetzt. Bei der Untersuchung von Singvolgeblutproben zeigte sich, dass die Seren bakteriell kontaminiert waren und somit eine Auswertung der Neutralisationstests nicht möglich war, da die Zellen durch diese Bakterien überwachsen wurden. Daher wurde ein Test mit verschiedenen Konzentrationen des Antibiotikums Gentamicin auf Vero E6 Zellen durchgeführt, um die optimale Analyse des Singvogelblutes zu gewährleisten. Dabei war für die Untersuchung dieser Proben eine Zellzahl von  $1,5 \cdot 10^5$  Zellen/ml und eine Dosis von 10 mg/ml Antibiotikum ein guter Kompromiss aus hoch dosiertem Antibiotikum und konfluentem Zellmonolayer.

### **3.6.3 Etablierung eines Virusneutralisationstestsystems zum Nachweis von Antikörpern gegen USUV**

Zum Nachweis von neutralisierenden Antikörpern gegen das *Usutu-Virus* wurde ein Plaque-Reduktionsneutralisationstest etabliert, um auch geringe Antikörpertiter zu erfassen. Der Test wurde aufgrund der geringen Probenvolumina auf einem 48-Well-Format etabliert und mit jeweils einer Positivkontrolle ausgetestet.

Neben dem molekularbiologischen Durchführungsprotokoll wurde ein serologisches Standardprotokoll eingeführt. Es sah vor, dass alle Proben zunächst mit Hilfe des WNV-Immunfluoreszenztests testen werden sollten. Proben von denen genügend Material vorhanden war, sollten mit dem WNV-Virusneutralisationstest getestet werden. Reaktive Proben des WNV-IFTs wurden generell mit dem WNV-NT-Test überprüft. Eine Stichprobe von verschiedenen Proben wurde weiterhin im *Usutu-Virus*-NT untersucht.

### 3.7 Nachweis von WNV in Proben verschiedenen Ursprungs

Um Erhebungen zur Prävalenz und Inzidenz von *West-Nil-Virus* in Deutschland durchzuführen, wurden Proben von Vögeln als natürliches Reservoir zusammengetragen sowie Proben von akut erkrankten equinen und humanen Patienten, die Fehlwirte von WNV darstellen. Dies sollte Aufschluss darüber geben, ob WNV als ätiologisches Agens an zentralnervösen Erkrankungen in Deutschland beteiligt ist. Ferner wurde ein Studienkollektiv von deutschen und österreichischen Personen untersucht, die durch den engen Kontakt zu Zugvögeln ein theoretisches Risiko aufweisen, sich mit WNV zu infizieren, da Zugvögel als Instrument der Verbreitung des Erregers gelten.

#### 3.7.1 Vögel

Der Schwerpunkt der Studie lag auf der Untersuchung von Vögeln, die in Endemiegebieten das natürliche Reservoir von WNV darstellen. Dazu sollten in Deutschland wildlebende Vögel untersucht werden, die zum einen als Zugvögel das Virus aus endemischen Gebieten nach Deutschland einschleppen können und zum anderen Standvögel, die das ganze Jahr über in Deutschland verweilen. Es sollte geklärt werden, ob WNV-Infektionen auch auf einheimische Standvogelpopulationen übertragen wurden und sich die Infektion in verschiedenen Standvögeln ausbreiten konnte. Dazu wurden 3427 Proben (EDTA-Blut, Serum bzw. Gewebeproben) von 87 verschiedenen Vogelarten untersucht.

Den wildlebenden Vögeln wurde im Rahmen von Vogelberingungsmaßnahmen Blut abgenommen. Mit Hilfe von Japannetzen und Fallen wurden die Tiere gefangen und geblutet. Die Blutentnahme der Nestlinge erfolgte direkt auf den Horsten. Im Rahmen der Fangaktionen wurden verschiedene Parameter aufgenommen wie Alter, Geschlecht, Parasitenbefall und Gesundheitszustand. Die Altersbestimmung erfolgte anhand des Euring Exchange Codes (Euring 2006).

Die Sammlung der Proben erfolgte durch die Zusammenarbeit mit den deutschen Vogelwarten: Vogelwarte Hiddensee (Dr. U. Köppen), Vogelwarte Helgoland (Prof. F. Dr. Bairlein), Vogelwarte Radolfzell (Prof. Dr. P. Berthold, Dr. W. Fiedler) sowie durch die Zusammenarbeit mit Dr. Kaiser, Universität Mainz; Dr. T. Müller und Prof. Dr. F.J. Conraths, Friedrich-Loeffler-Institut; Dr. R.U. Mühle, Universität Potsdam, Prof. Dr. H. Will, Heinrich-

Pette-Institut, Herrn N. Hagen, Freie Universität Berlin sowie 12 ehrenamtlichen Vogelberingern. An der Gewinnung der Proben von Weißstörchen und von Krähenvögeln wurde aktiv teilgenommen.

Weitere Proben von erkrankten Wildvögeln wurde von Frau Dr. K. Müller, Freie Universität Berlin zur Verfügung gestellt. Tabelle 10 schlüsselt die Proben auf die einzelnen Vogelarten auf.

Tabelle 10: Anzahl der Blutproben bezogen auf die Vogelart und deren systematische Einordnung

Vogelordnung	Vogelfamilien	Art		Probenanzahl
Ciconiiformes	Störche (Ciconidae)	Weißstorch	<i>Ciconia ciconia</i>	570
Anseriformes	Entenvögel (Anatidae)	Höckerschwan	<i>Cygnus oler</i>	135
		Saatgans	<i>Anser fabalis</i>	7
		Blässgans	<i>Anser albifrons</i>	109
		Kurzschnabelgans	<i>Anser brachyrhynchus</i>	1
Accipitriformes	Habichtartige (Accipitridae)	Seeadler	<i>Haliaeetus albicilla</i>	36
		Habicht	<i>Accipiter gentilis</i>	23
		Mäusebussard	<i>Buteo buteo</i>	41
		Wespenbussard	<i>Pernis apivorus</i>	2
		Schwarzmilan	<i>Milvus migrans</i>	1
		Sperber	<i>Accipiter nisus</i>	2
	Rohrweihe	<i>Circus aeruginosus</i>	23	
	Fischadler (Pandionidae)	Fischadler	<i>Pandion haliaeetus</i>	140
Falconiformes	Falken (Falconidae)	Turmfalke	<i>Falco tinnunculus</i>	10
		Wanderfalke	<i>Falco peregrinus</i>	3
Cuculiformes	Kuckucke (Cuculidae)	Kuckuck	<i>Cuculus canorus</i>	2
Strigiformes	Eulen (Strigidae)	Waldkauz	<i>Strix aluco</i>	6
		Waldohreule	<i>Asio otus</i>	6
		Zwergohreule	<i>Otus scops</i>	1
		Steinkauz	<i>Athene noctua</i>	12
	Schleiereulen (Tytonidae)	Schleiereule	<i>Tyto alba</i>	2
Coraciiformes	Eisvögel (Alcedinidae)	Eisvogel	<i>Alcedo atthis</i>	1
Piciformes	Spechte (Picidae)	Buntspecht	<i>Dendrosopos major</i>	4
		Grünspecht	<i>Picus viridis</i>	1
Passeriformes	Schwalben (Hirundinidae)	Mehlschwalbe	<i>Delichon urbicum</i>	19
		Rauchschwalbe	<i>Hirundo rustica</i>	3
		Uferschwalbe	<i>Riparia riparia</i>	29
	Stelzenverwandte (Motacillidae)	Baumpiper	<i>Anthus trivialis</i>	31
		Bachstelze	<i>Motacilla alba</i>	2
		Schafstelze	<i>Motacilla flava</i>	41
	Zaunkönige (Troglodytidae)	Zaunkönig	<i>Troglodytes troglodytes</i>	17
Braunellen (Prunellidae)	Heckenbraunelle	<i>Prunella modularis</i>	36	

Drosseln (Turdidae)	Singdrossel	<i>Turdus philomelos</i>	34
	Wacholderdrossel	<i>Turdus pilaris</i>	2
	Rotdrossel	<i>Turdus iliacus</i>	1
	Amsel	<i>Turdus merula</i>	186
Schnäpperverwandte (Musciapidae)	Braunkehlchen	<i>Saxicola rubetra</i>	20
	Rotkehlchen	<i>Erithacus rubecula</i>	160
	Nachtigall	<i>Luscinia megarhynchos</i>	18
	Sprosser	<i>Luscinia luscinia</i>	1
	Blaukehlchen	<i>Luscinia svecica</i>	13
	Trauerschnäpper	<i>Ficedula hypoleuca</i>	24
	Grauschnäpper	<i>Ficedula striata</i>	26
	Hausrotschwanz	<i>Phoenicurus ochruros</i>	31
	Gartenrotschwanz	<i>Phoenicurus phoenicurus</i>	52
Grasmücken (Sylviidae)	Klappergrasmücke	<i>Sylvia cucuca</i>	32
	Mönchsgrasmücke	<i>Sylvia atricapilla</i>	43
	Gartengrasmücke	<i>Sylvia borin</i>	149
	Dorngrasmücke	<i>Sylvia communis</i>	30
Rohrsängerverwandte (Acrocephalidae)	Sumpfrohrsänger	<i>Acrocephalus palustris</i>	70
	Schilfrohrsänger	<i>Acrocephalus schoenobaenus</i>	9
	Teichrohrsänger	<i>Acrocephalus scirpaceus</i>	306
	Drosselrohrsänger	<i>Acrocephalus arundinaceus</i>	8
	Orpheusspötter	<i>Hippolais polyglotta</i>	1
	Gelbspötter	<i>Hippolais icitorina</i>	47
Goldhähnchen (Regulidae)	Wintergoldhähnchen	<i>Regulus regulus</i>	1
	Sommergoldhähnchen	<i>Regulus ignicapilla</i>	2
Laubsänger (Phylloscopidae)	Fitis	<i>Phylloscopus trochilus</i>	135
	Zilpzalp	<i>Phylloscopus collybita</i>	52
	Waldlaubsänger	<i>Phylloscopus sibilatrix</i>	7
Grassänger (Megaluridae)	Feldschwirl	<i>Locustella naevia</i>	3
Schwanzmeisen (Aegithalidae)	Schwanzmeise	<i>Aegithalos caudatus</i>	2
Meisen (Paridae)	Weidenmeise	<i>Parus montanus</i>	4
	Haubenmeise	<i>Parus cristatus</i>	8
	Blaumeise	<i>Parus caeruleus</i>	51
	Kohlmeise	<i>Parus major</i>	127
	Tannenmeise	<i>Parus ater</i>	16
	Sumpfmeise	<i>Parus palustris</i>	3
Kleiber (Sittidae)	Kleiber	<i>Sitta europaea</i>	3
Baumläufer (Certhiidae)	Gartenbaumläufer	<i>Certhia bachydactyla</i>	5
Würger (Laniidae)	Neuntöter	<i>Lanius collurio</i>	26
Krähen (Corvidae)	Eichelhäher	<i>Garrulus glandarius</i>	10
	Kolkrabe	<i>Corvus corax</i>	3
	Elster	<i>Pica pica</i>	5
	Aaskrähe	<i>Corvus corone</i>	9
	Saatkrähe	<i>Corvus frugilegus</i>	14
Stare (Sturnidae)	Star	<i>Sturnus vulgaris</i>	20
Braunellen (Passeridae)	Feldsperling	<i>Passer montanus</i>	43
	Hausperling	<i>Passer domesticus</i>	41

Finken (Fringillidae)	Erlenzeisig	<i>Carduelis spinus</i>	1
	Buchfink	<i>Fringilla coelebs</i>	35
	Grünfink	<i>Carduelis chloris</i>	160
	Gimpel	<i>Phyrrula phurrula</i>	24
	Fichtenkreuzschnabel	<i>Loxia curvirostra</i>	13
Ammernverwandte (Emberizidae)	Rohrammer	<i>Emberiza schoeniclus</i>	22
	Goldammer	<i>Emberiza citrinella</i>	2
	Ortolan	<i>Emberiza hortulana</i>	1

Für die Einschätzung, ob Zugvögel als Instrument der Verbreitung von *West-Nil-Virus* dienen, wurden vorrangig Zugvögel oder Durchzügler (57 % der Arten) untersucht aber auch reine Standvögel und Vogelpopulationen von Wintergästen, deren Brutgebiete außerhalb Deutschlands liegen (Abbildung 17). Die Klassifizierung der Verbreitungsgebiete erfolgte nach Johnson und Blotzheim (Johnson 1992, Glutz von Blotzheim 1998).

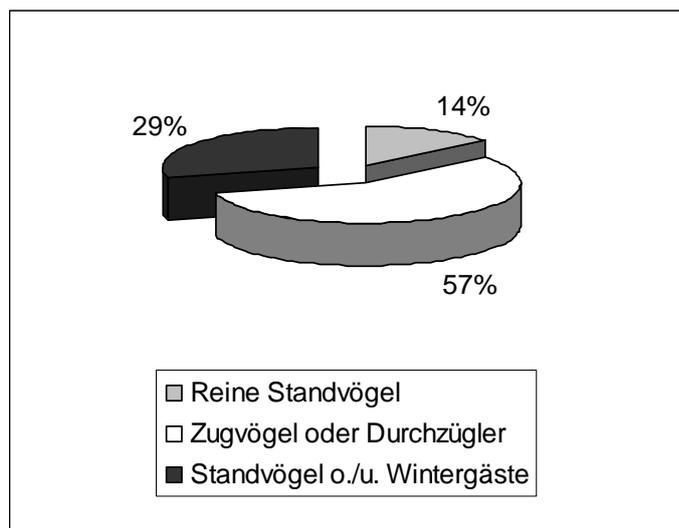


Abbildung 17: Anteil von Zugvögeln, Durchzügler, Standvögeln und Wintergästen in Bezug auf die Gesamtzahl der gesammelten Vogelproben.

Die Vogelfänge wurden in verschiedenen Regionen des Bundesgebietes durchgeführt. Die Beprobungen fanden in den Jahren 2000, 2002 - 2005 statt. Im Jahr 2000 wurden 41 Blutproben von Singvögeln gesammelt, die zusammen mit 1175 Proben von Singvögeln und Entenvögeln aus dem Jahr 2002 retrospektiv in die Studie aufgenommen wurden. Im Jahr 2003 wurden Blutproben von 438 Weißstörchen gewonnen, während 1532 Blutentnahmen bei Weißstörchen, Singvögeln und Greifvögeln 2004 stattfanden. Im Jahr 2005 wurden 241 Proben von Weißstörchen und Greifvögeln gesammelt. Die Beprobungen der Vögel fanden

zeitgleich zum Frühjahrszug und zum Herbstzug der Zugvögel statt. Ferner wurden Vögel, vor allem Nestlinge im Hochsommer geblutet sowie die Krähenvögel im Herbst und Winter. Die Abbildung 18 zeigt die Fangorte im Bundesgebiet und die Anzahl der Beprobung in den angegebenen Jahren.

Weißstorchbeprobung 2003-2005

Singvogel-, Entenvogel-, Greifvogelbeprobung 2000, 2002-2005

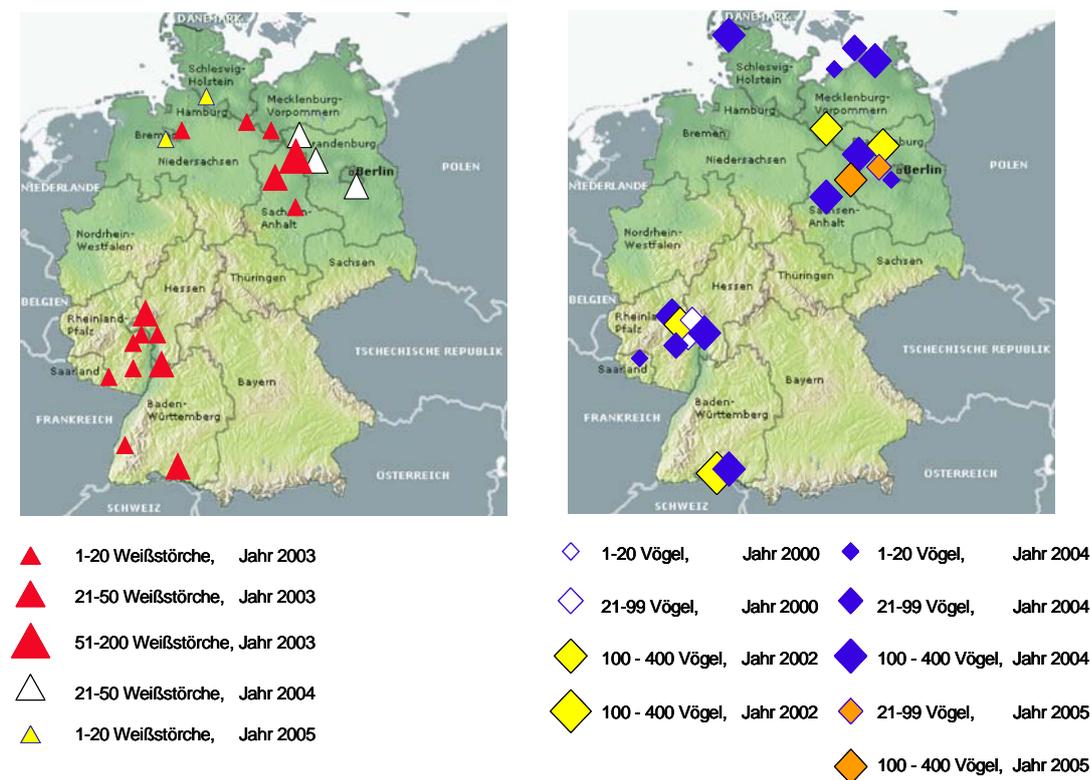


Abbildung 18: Beprobungsorte von Vögeln bezogen die Anzahl der Fänge pro Jahr in den verschiedenen Regionen.

### 3.7.1.1 Nukleinsäurenachweis für WNV in Vögeln

Ziel der molekularbiologischen Diagnostik war der Nachweis von viraler Nukleinsäure in dem natürlichen Reservoir von WNV. Weißstörche wurden besonders intensiv untersucht, da Untersuchungen in Israel zeigten, dass bei Weißstörchen aus Deutschland in den Jahren 1997 bis 2000 WNV-Antikörper nachgewiesen werden konnten (Malkinson und Banet 2002). Weiterhin wurden juvenile Störche auf ihrer ersten Wanderung (Migration) nach Afrika in Israel mit akuten WNV-Infektionen aufgefunden, wobei ungeklärt blieb, wo diese Tiere

aufgezogen wurden (Malkinson et al. 2002). Um festzustellen, ob akute Infektionen bei Weißstörchen in Deutschland nachweisbar sind, wurden 552 Proben von Nestlingen und adulten Tieren untersucht. Die Proben wurden mit Virusüberstand von SMRV gespikt und mit den TaqMan-PCRs analysiert.

Es konnte in keiner der 552 untersuchten Proben WNV-Nukleinsäure nachgewiesen werden. In allen Proben außer in zwei Proben war der Nachweis des gespikten SMRV-Kulturüberstandes möglich. Es kann davon ausgegangen werden, dass in der überwiegenden Anzahl der Proben keine Hemmung der Aufarbeitung und der PCR vorlag.

Weiterhin wurden 19 Proben von adulten Fischadlern und Nestlingen auf akute Infektionen mit WNV untersucht. Die Plasmaproben wurden mit einer verdünnten SMRV Lösung gespikt. In den Proben konnte kein WNV nachgewiesen werden, während die Amplifikation von SMRV erfolgreich war. Die Schwankungsbreite der SMRV-Kopien von circa einer Logstufe war vergleichbar zu den Vorversuchen (Abbildung 19)

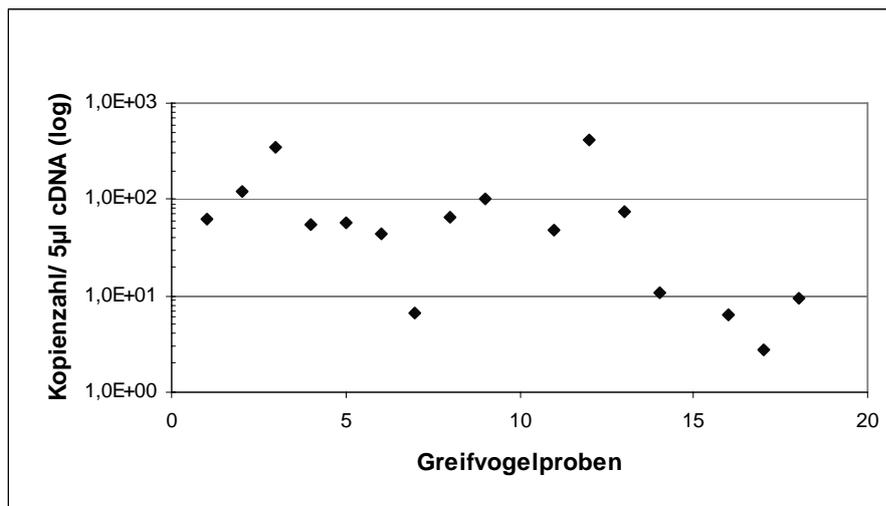


Abbildung 19: Nachweis von gespiktem SMRV in Proben von Fischadlern mit Hilfe der TaqMan-PCR. Dargestellt sind die Mittelwerte aus Doppelwerten der PCR.

### 3.7.1.2 Seroprävalenz von Vögeln im WNV-Immunfluoreszenztest

Als primäre Screeningmethode wurde der WNV-Immunfluoreszenztest zum Nachweis von IgG-Antikörper eingesetzt. 3427 Blutproben von Vögeln wurden mit dieser Methode untersucht: 569 Proben von Weißstörchen, 2299 Proben von Singvögeln, 252 Proben von Gänsen und Schwänen sowie 307 Proben von Greifvögeln und Eulen. Von den getesteten

Proben waren 17 Proben von Greifvögeln, 9 Proben von Singvögeln und 33 Proben von Weißstörchen im WNV-IFT reaktiv. Insgesamt konnten 9 Vogelarten mit Antikörpern gegen WNV-Antigene festgestellt werden (Tabelle 11). Die Seroprävalenzen variierten innerhalb der 9 Vogelarten und waren insgesamt relativ gering mit weniger als 10 % (0,63 % - 11,4 %) wobei die Prävalenz bei Fischadlern mit 11,4 % am höchsten war.

Tabelle 11: Ergebnisse der serologischen Untersuchung von Blutproben mit Hilfe des WNV-IFTs (IgG) bezogen auf Vogelarten

Art	Anzahl der seroreaktiven Proben im IFT (Gesamtzahl der untersuchten Proben)	Seroprävalenz (%)	Konfidenzintervalle (95 %)
Weißstorch	33 (569)	<b>5,8</b>	5,78-5,81
Rotkehlchen	1 (160)	<b>0,63</b>	0,62-0,64
Gartengrasmücke	1 (149)	<b>0,67</b>	0,67-0,68
Neuntöter	2 (26)	<b>7,7</b>	7,2-8,2
Schafstelze	1 (41)	<b>2,4</b>	2,2-2,5
Gartenrotschwanz	2 (52)	<b>3,8</b>	3,7-3,9
Trauerschnäpper	2 (24)	<b>8,3</b>	7,7-8,9
Fischadler	16 (140)	<b>11,4</b>	11,2-11,5
Seeadler	1 (36)	<b>2,8</b>	2,7-2,9

Nachfolgend sind fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von WNV-reaktiven Proben als Beispiele dargestellt. Die Identifikation von Antikörpern gegen WNV erfolgte durch die Verwendung von fluoreszenzmarkierten Sekundäantikörpern (FITC). Die fluoreszierenden Antikörper bildeten eine charakteristische perinukleäre Corona um den Zellkern WNV infizierter Zellen (Abbildung 20).

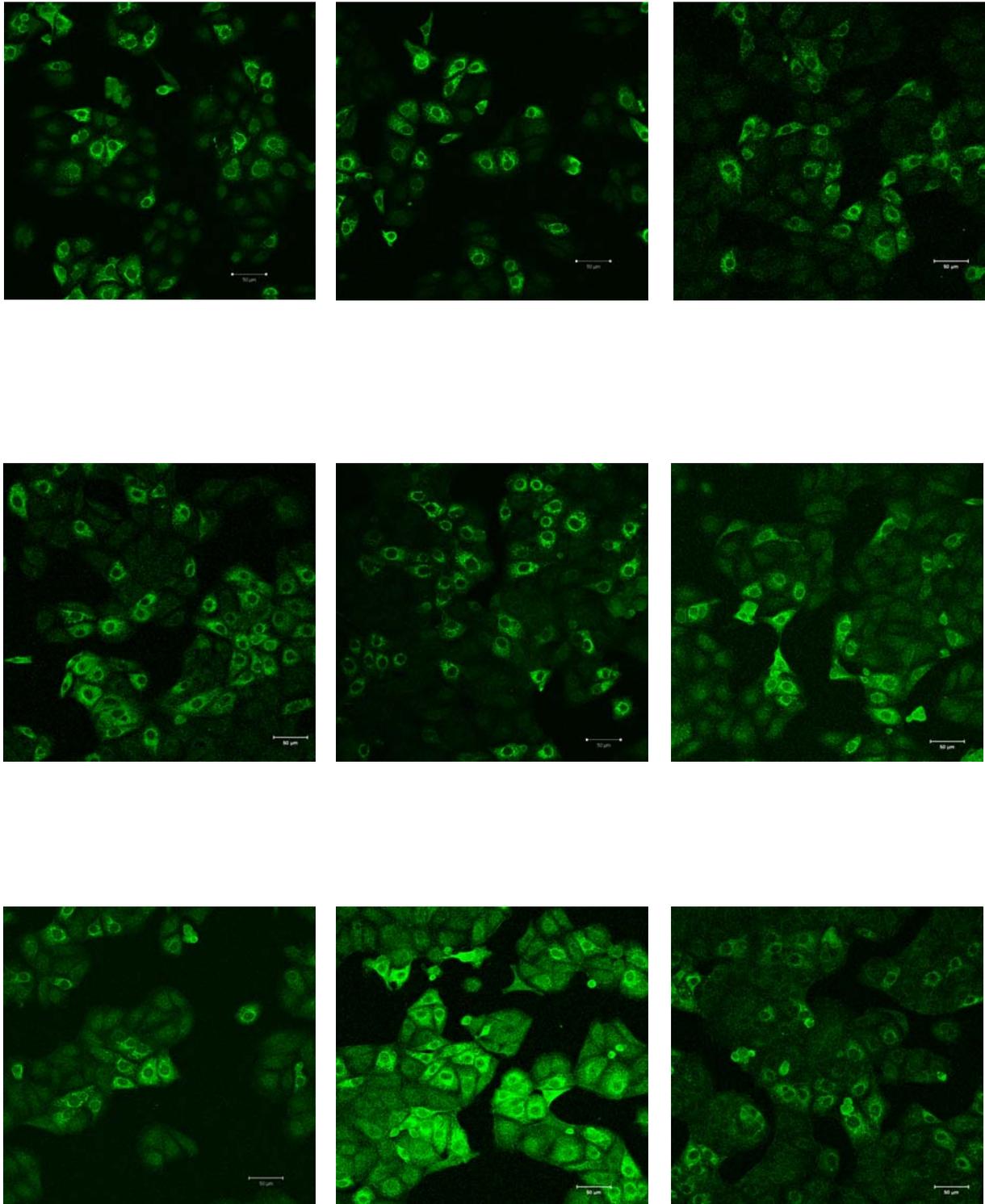


Abbildung 20: Reaktive Proben verschiedener Vogelarten im WNV-Immunfluoreszenztest. Markierung der Sekundärantikörper mit FITC. Von oben links nach unten rechts: Rotkehlchen (Serumverdünnung (SV) 1:10), Gartengräsmücke (SV 1:140), Weißstorch (SV 1:10), Weißstorch (SV 1:10), Schafstelze (SV 1:70), Fischadler (SV 1:100), Trauerschnäpper (SV 1:50), Fischadler (SV 1:10), Positivkontrolle Gans (SV 1:200), Maßstabsmarke: 50  $\mu\text{m}$ .

### 3.7.1.3 Seroprävalenz von Vögeln im WNV-Virusneutralisationstest

Als Goldstandard der Flavivirus-Serologie gilt der Neutralisationstest, der zur Bestätigung des IFTs durchgeführt wurde. Blutproben von Vögeln mit ausreichendem Probenvolumen wurden im WNV-Virusneutralisationstest getestet. 569 Proben von Weißstörchen, 193 Proben von Singvögeln, 252 Proben von Gänsen und Schwänen sowie 271 Proben von Greifvögeln und Eulen wurden untersucht. Ein Teil der Neutralisationsteste konnte nicht ausgewertet werden, da sich die Seren als zytotoxisch gegenüber den Zellen erwiesen. In die Berechnung der Seroprävalenzen im NT wurden folgende Proben einbezogen: 233 Seren von Greifvögeln und Eulen, 252 Seren von Gänsen und Schwänen, 45 Proben von Singvögeln, 556 Proben von Weißstörchen (Tabelle 12). Insgesamt konnten in Blutproben von 8 Vogelarten neutralisierende Antikörper gegen WNV festgestellt werden. Bei den Arten: Gartenrotschwanz, Neuntöter, Trauerschnäpper, Schwarzmilan lagen lediglich 1-3 Proben vor, so dass hier die Gesamtzahlen zu gering waren, um eine Seroprävalenz zu berechnen. Bei Weißstörchen, Habichten und Höckerschwänen zeigte sich, dass die Seroprävalenzen zwischen 2,2 % - 5,3 % lagen, während die Seroprävalenz der Fischadler mit 20 %, vergleichbar zum WNV-IFT, am höchsten war.

Tabelle 12: Ergebnisse der serologischen Untersuchung von Blutproben im WNV-NT bezogen auf die Vogelart

Art	Anzahl positiver Proben im NT (Gesamtzahl der untersuchten Proben)	Seroprävalenz (%)	Konfidenzintervalle (95 %)
Weißstorch	13 (556)	<b>2,3</b>	1,0-3,0
Höckerschwan	3 (135)	<b>2,2</b>	0,3-4,7
Gartenrotschwanz	1 (2)	*	*
Neuntöter	2 (3)	*	*
Trauerschnäpper	2 (2)	*	*
Habicht	1 (19)	<b>5,3</b>	4,7-5,7
Schwarzmilan	1 (1)	*	*
Fischadler	28 (140)	<b>20,0</b>	19,7-20,2

\*: aufgrund der geringen Gesamtzahl der Proben wurde darauf verzichtet, die Seroprävalenz sowie die Konfidenzintervalle zu berechnen

### 3.7.1.4 Vergleich der Seroprävalenzen von Vögeln im WNV-IFT und WNV-NT

Ein Vergleich der Antikörperreaktionen gegenüber WNV von Vogelblutproben mit den Methoden IFT und NT zeigte, dass der Antikörpernachweis innerhalb der Systeme nicht deckungsgleich war. Die Tabelle 13 fasst diese Ergebnisse zusammen. Es zeigte sich, dass bei

Weißstörchen im WNV-IFT mehr reaktive Seren ( $n = 33$ ) festgestellt werden konnten, als mit dem WNV-NT ( $n = 13$ ). Die Summe der Proben, die in beiden Testsystemen reaktiv waren, lag bei  $n = 7$ . Im Gegensatz dazu konnten mehr Greifvögelproben mit neutralisierenden Antikörpern nachgewiesen werden ( $n = 30$ ) als reaktive Proben im WNV-IFT ( $n = 17$ ), wobei die Schnittmenge bei  $n = 15$  lag. Bei Höckerschwänen, Schwarzmilan und Habichten konnte nur eine geringe Anzahl seropositiver Proben im NT festgestellt, die nicht im IFT bestätigt werden konnten. Bei den Singvögeln ähnelte das Bild den Ergebnissen der Weißstörche. Im IFT waren geringfügig mehr Proben reaktiv ( $n = 9$ ) als im NT ( $n = 5$ ) mit einer Querschnittssumme von 5. Ein einheitliches Bild der Antikörperreaktionen war in den Vogelgruppen nicht identifizierbar.

Tabelle 13: Ergebnisse der serologischen Untersuchung von Vogelproben mit Hilfe des WNV-NT und -IFT bezogen auf Vogelgruppen

Vogelgruppe	neutralisierende Proben im WNV-NT	reaktive Proben im WNV-IFT	NT-positive und IFT-reaktive Proben
Weißstörche	13	33	<b>7</b>
Greifvögel	30	17	<b>15</b>
Schwäne	3	0	<b>0</b>
Singvögel	5	9	<b>5</b>

### 3.7.1.5 Seroprävalenz in adulten und juvenilen Vögeln gegen WNV

Betrachtete man die reaktiven Proben der Vögel in Bezug auf das Alter, war feststellbar, dass bei den Singvögeln keine juvenilen Tiere und keine Nestlinge Antikörper gegen WNV aufwiesen. Bei Greifvögeln und Weißstörchen konnten Antikörper gegen WNV sowohl bei Nestlingen als auch bei adulten Tieren nachgewiesen werden, bei Höckerschwänen waren nur Antikörper bei adulten Vögeln nachweisbar. Bei Weißstörchen konnte eine Seroprävalenz von 1,8 % im WNV-NT und 5,4 % im WNV-IFT für Nestlinge von Weißstörchen im Alter von 2 - 10 Wochen festgestellt werden.

Die WNV-Neutralisationstiter von Weißstorch- und Greifvogel-Nestlingen waren allgemein recht niedrig mit einem mittleren Neutralisationstiter von 25 (Abbildung 21). Lediglich der Titer eines juvenilen Schwarzmilans lag weit über dem Durchschnitt mit 80. Demgegenüber schwankten die Neutralisationstiter gegen WNV bei den adulten Vögeln stärker. Der



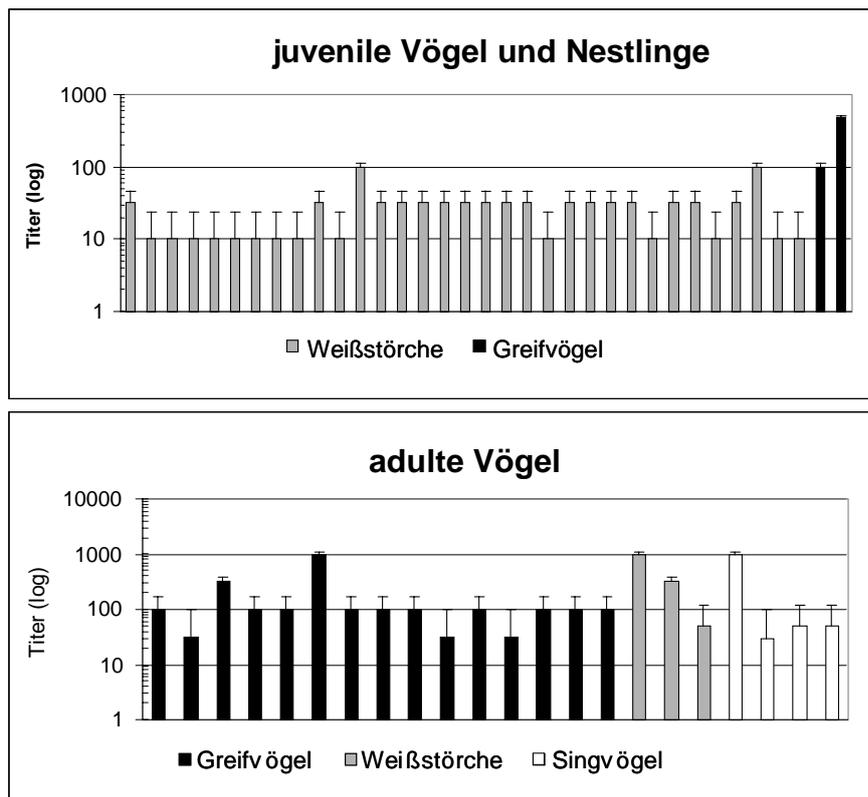


Abbildung 22: Reaktive Proben von Nestlingen, juvenilen und adulten Vögeln im WNV-IFT, Angabe der Antikörpertiter als reziproker Wert mit Standardfehler.

Insgesamt konnte mit beiden Testsystemen festgestellt werden, dass die WNV-Antikörperantwort der Jungtiere niedriger war als bei den Alttieren. Antikörper gegen WNV in Jungtieren konnten hauptsächlich bei Weißstorchnestlingen nachgewiesen werden, lediglich 3 Greifvogelnestlingen zeigten eine Antikörperantwort in den Antikörpertesten. Juvenile Singvögel wiesen keine Antikörper gegen WNV auf. Ein Vergleich der Titerangaben zwischen NT und IFT war aufgrund der unterschiedlichen Bewertungsmaßstäbe beider Verfahren nicht möglich. Es konnte jedoch festgestellt werden, dass in beiden Testsystemen die Antikörperantwort individuell war und innerhalb der Vogelgruppen schwankte.

### 3.7.1.6 Seroprävalenz von Vögeln im USUV-Neutralisationstest

Da die serologische Diagnostik von Flaviviren durch Kreuzreaktionen erschwert wurde, sollte untersucht werden, ob Zugvögel neben Antikörpern gegen WNV auch Antikörper gegen *Usutu-Virus* (USUV) aufwiesen. Es wurden stichprobenartig Proben von n = 14 Weiß-

störchen, n = 8 Singvögeln und einem Greifvogel untersucht. Zwei Proben von Weißstörchen konnten aufgrund von Zytotoxizität nicht ausgewertet werden. 10 Vögel wiesen neutralisierende Antikörper gegen USUV bei 50 %iger Hemmung auf. Berechnete man den Neutralisationstiter mit 90 % Hemmung (PRNT<sub>90</sub>/ml), so reduzierte sich die Anzahl der seropositiven Proben auf zwei. Neutralisierende Antikörper gegen USUV konnten bei Weißstörchen, Fischadler, Seeadler und verschiedenen Singvogelarten festgestellt werden, wobei USUV-Antikörper bei drei Jungtieren und bei sieben adulten Vögeln vorhanden waren (Tabelle 14). Die Antikörpertiter (PRNT<sub>50</sub>/ml) schwankten bei den Individuen von 17 bis 248.

Im Rahmen der Analysen zur Kreuzreaktivität zwischen IFT und NT, zeigte der Vergleich von Antikörperantworten gegen WNV und USUV nicht einfach zu bewertende Ergebnisse. In 8 WNV-IFT reaktiven Blutproben konnten neutralisierende Antikörper gegen USUV nachgewiesen werden. Zwei Seren waren ausschließlich im USUV-NT reaktiv. Vier Blutproben hatten sowohl im WNV-NT als auch im USUV-NT neutralisierende Eigenschaften. Die Neutralisationstiter dieser Proben waren in den beiden Tests unterschiedlich hoch. Während im WNV-NT der Neutralisationslevel vergleichsweise gering war: 10 - 20, schwankten die Antikörpertiter gegen USUV zwischen 25 - 248.

Tabelle 14: Antikörpertiter gegen *Usutu-Virus* (USUV) im Neutralisationstest von verschiedenen Vogelarten vergleichend zum Antikörpertiter gegen *West-Nil-Virus* (WNV) im NT und IFT

Altersgruppe	Vogelart	WNV-IFT-Titer	WNV-NT-Titer	USUV-NT-Titer (PRNT <sub>50</sub> /ml)	USUV-NT-Titer (PRNT <sub>90</sub> /ml)
Nestling	Weißstorch	100	-	37	-
adult	Neuntöter	-	-	27	-
adult	Klappergrasmücke	-	-	40	-
adult	Neuntöter	1000	20	248	40
adult	Gartenrotschwanz	30	10	25	-
adult	Trauerschnäpper	50	15	55	-
adult	Neuntöter	50	10	175	35
adult	Gartenrotschwanz	10	-	33	-
Nestling	Fischadler	100	-	34	-

### *3.7.1.7 WNV-Seroprävalenz von Weißstörchen bei Nestgeschwistern*

Parallel zur Blutentnahme von Weißstorchnestlingen in Mecklenburg-Vorpommern und in Sachsen-Anhalt wurden epidemiologische Parameter aufgenommen wie beispielsweise Anzahl der Nestlinge pro Horst. Untersuchte man die WNV-Seroprävalenz unter der Berücksichtigung der gleichverteilten Antikörperantwort gegen WNV in Nestgeschwister pro Horst, konnte man feststellen, dass bei 9 IFT-reaktiven Jungtiere die Nestgeschwister (2 - 3 Tiere pro Horst) keine Antikörperreaktion zeigten, trotz ähnlichem Alter. In einem Fall waren 3 von 3 Jungtieren eines Horstes im WNV-IFT reaktiv, wobei die 3 Wochen alten Tiere jeweils einen Antikörpertiter von 10 aufwiesen. Betrachtete man die Nestgeschwister unter dem Aspekt der Gleichverteilung von neutralisierenden Antikörpern, so zeigten 2 Jungtiere neutralisierende Antikörper gegen WNV, während deren Nestgeschwister (1 bis 3 Tiere pro Horst) keine WNV-Antikörper aufwiesen. Die Antikörperantwort gegen WNV in juvenilen Weißstörchen schien innerhalb der Nestgeschwister eines Horstes individuell zu sein. Hier könnten einerseits Unterschiede in der Halbwertszeit oder Immunoglobine in den Nestlingen eine Rolle spielen, andererseits könnten über die Eier unterschiedliche Mengen an Antikörpern weitergegeben worden sein.

### *3.7.1.8 WNV-Seroprävalenz von Vögeln in den Bundesländern der Bundesrepublik Deutschland*

Um Erkenntnisse zu gewinnen, in welchen Regionen bzw. Bundesländern WNV-seroreaktive Vögel vorkamen, wurde die Verteilung der Seroprävalenzen von Vögeln auf die Bundesländer aufgeschlüsselt (Tabelle 15). In 6 von 11 Bundesländern konnten in Vögeln WNV-Antikörper im IFT nachgewiesen werden, jedoch nur in 3 von 11 Bundesländern Vögeln mit neutralisierenden Antikörpern. Die höchsten Seroprävalenzen konnten in den nordöstlichen Bundesländern gemessen werden, während in den südwestlichen Bundesländern wenig IFT-reaktive und NT-positive Proben festgestellt wurden. Es gab einen signifikanten Unterschied zwischen den seroreaktiven Proben im IFT und den seropositiven Proben im NT ( $p = 0,1406$ ,  $t = 1,697$ ). Innerhalb der Bundesländer waren die Seroprävalenzen (IFT und NT) statistisch nicht gleichverteilt ( $\text{Chi}^2\text{-Test}_{0,95}$ ).

Tabelle 15: WNV-Seroprävalenz von Vögeln bezogen auf die Bundesländer Deutschlands

Bundesland	Untersuchte Probenanzahl	Seroreaktive Proben im WNV-IFT (%)	Seropositive Proben im WNV-NT (%)
Baden-Württemberg	941	2 (0,2)	1 (0,1)
Bayern	18	-	-
Brandenburg und Berlin*	921	30 (3,3)	32 (3,5)
Hamburg	17	-	-
Hessen	254	-	-
Mecklenburg-Vorpommern	401	12 (3,0)	-
Niedersachsen	8	2 (25,0)	-
Rheinland-Pfalz	298	1 (0,3)	-
Saarland	16	-	-
Sachsen-Anhalt	167	12 (7,2)	3 (1,4)
Schleswig-Holstein	364	-	-

\*: Für die Auswertung wurden die Proben aus Berlin und Brandenburg zusammengefasst, da die klinischen Proben aus Berlin stammten, die Vögel aber aus beiden Bundesländern kamen.

### 3.7.1.9 WNV-Seroprävalenz von Weißstörchen in Bezug auf die Migrationsrouten

Durch Nachverfolgung beringter Weißstörche konnte gezeigt werden, dass nicht alle Weißstörche Deutschlands den gleichen räumlichen Migrationsablauf zu ihren Überwinterungszielen nutzen. Weißstörche aus dem westlichen Teil Deutschlands ziehen über eine südwestliche Route nach Westafrika, während die Weißstorchpopulationen im östlichen Teil Deutschlands als Ostzieher bezeichnet werden und über den Balkan, die Türkei, Israel und Ägypten in die östlichen Regionen Afrikas ziehen. Werden Populationen innerhalb einer Art in ihrem Zugverhalten voneinander getrennt, bezeichnet man diese Trennungslinie als Zugscheide (Bairlein 1996). Vergleich man die WNV-Seroprävalenz von Weißstörchen mit der Zugscheide, konnte festgestellt werden, dass alle 33 IFT-reaktiven Weißstörche ausschließlich aus den östlichen Regionen Deutschlands stammten. Neutralisierende Antikörper gegen WNV wurden in 11 Vögeln aus den östlichen Verbreitungsgebieten und in 2 Weißstörchen aus den westlichen und südlichen Verbreitungsgebieten nachgewiesen, so dass Ostzieher eher Antikörper gegen WNV aufwiesen als Westzieher.

### *3.7.1.10 Seroprävalenz von Vögeln gegen WNV in Bezug auf ihr Zugverhalten*

Die europäischen Zugvögel gehören zum paläarktisch-afrikanischen Migrationssystem. Viele der Zugvögel überwintern in Afrika und überwinden auf ihrem Zugweg das Mittelmeer und die Sahara. Generell ist das räumliche und zeitliche Wanderverhalten der Vögel sehr komplex, da die Bewegungen in einer Fülle von verschiedenen Formen und Übergängen vorkommen (Bairlein 1996). Im Folgenden wurde der Definition von Schüz und Mitarbeitern (Schüz et al. 1971) gefolgt, die das Zugverhalten als saisonale regelmäßige Pendelbewegung zwischen einem Brutgebiet und einem Ruheziel definiert. Man unterscheidet verschiedene Arten von Zugbewegungen. Unter dem Teilzug versteht man die Fälle, bei denen aus demselben Brutgebiet Sesshaftigkeit und periodisches Wandern nebeneinander vorkommen. Der Langstreckenzug ist dadurch geprägt, dass fast alle Individuen in ein einheitliches Überwinterungsziel wandern. Arten, die wenige hundert Kilometer oder kürzer wandern, bezeichnet man als Kurzstrecken- bzw. Mittelstreckenzieher. Innerhalb dieser Arten gibt es starke Differenzierungen bezüglich der periodisch pendelnden Individuen innerhalb des Alters und des Geschlechtes. Standvögel verbleiben ganzjährig im Brutgebiet.

In diese Migrationskategorien wurden die serologisch-reaktiven Vogelarten eingeordnet. Es zeigte sich, dass ein Großteil der Vögel zu den Langstreckenziehern gehörte. Die meisten Singvogelarten wie Gartengrasmücke, Gartenrotschwanz, Neuntöter, Schafstelze und Trauerschnäpper sind Langstreckenzieher, die ins tropische und subtropische Afrika ziehen. Weißstörche, Fischadler und Schwarzmilan fliegen ebenfalls in verschiedene Regionen Afrikas. Zu den Teilziehern gehört das Rotkehlchen, das als mitteleuropäischer Brutvogel in den Mittelmeerraum pendelt, während die nordeuropäischen als Wintergäste nach Mitteleuropa ziehen (Glutz von Blotzheim 1998). Als Stand- und Strichvogel werden die mitteleuropäischen Arten von Seeadler, Höckerschwan und Habicht bezeichnet. Innerhalb dieser Arten wurden jedoch partielle Wanderungen aufgrund von klimatischen Einflüssen oder Altersstrukturen beobachtet (Glutz von Blotzheim 1998). Die Abbildung 23 zeigt am Beispiel einiger langstreckenziehenden Vogelarten deren Verbreitungsgebiete in paläarktischem Raum sowie in Afrika. Viele der Regionen in Süd- und Südosteuropa, Sibirien und in Afrika wurden als endemische Regionen oder Regionen mit sporadischen WNV-Epidemien beschrieben.

sowie in Afrika. Viele der Regionen in Süd- und Südosteuropa, Sibirien und in Afrika wurden als endemische Regionen oder Regionen mit sporadischen WNV-Epidemien beschrieben.

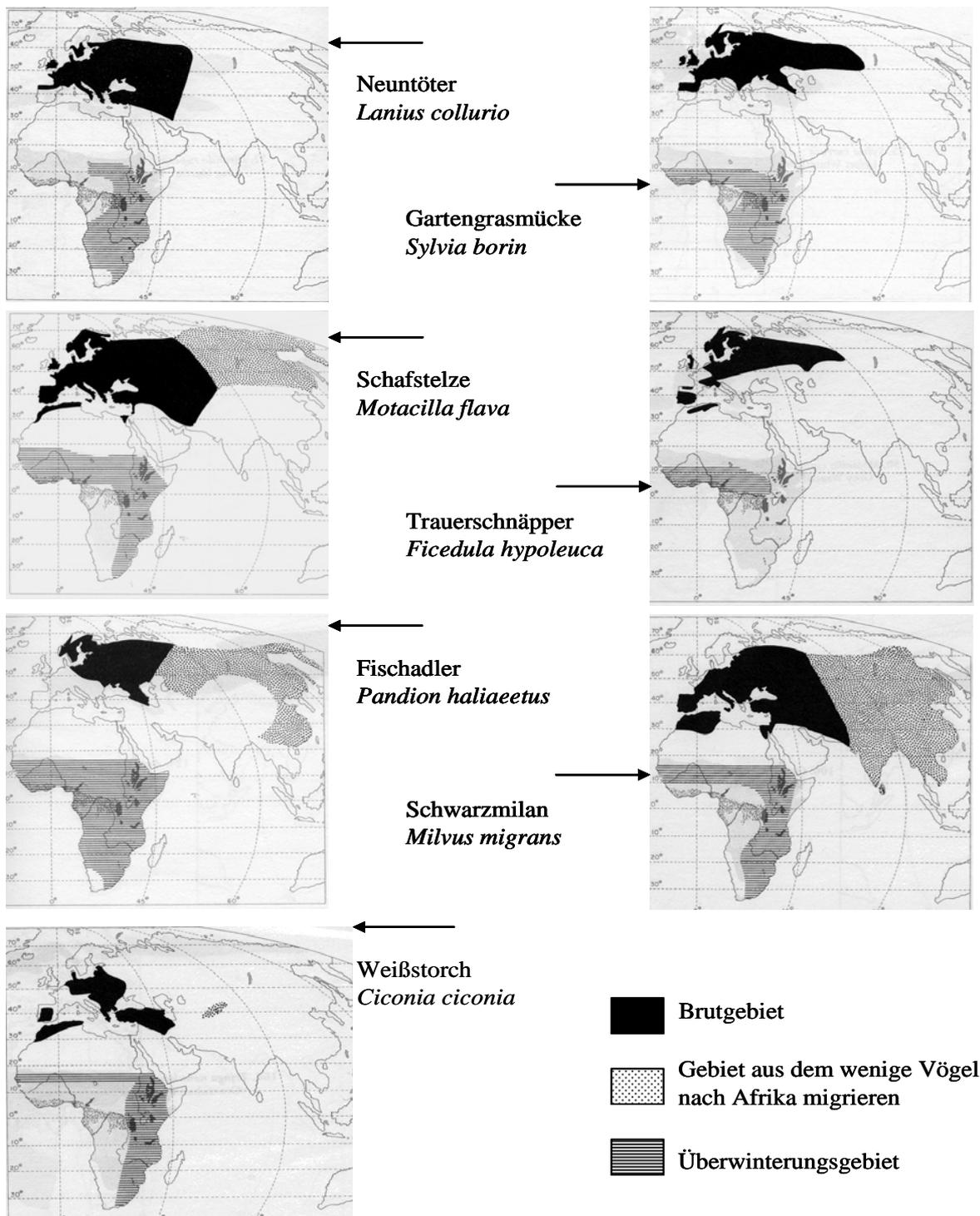


Abbildung 23: Darstellung der Verbreitungsgebiete (Brutgebiet und Überwinterungsgebiet) von ausgewählten langstreckenziehenden Vogelarten, die neutralisierende Antikörper gegen WNV aufwiesen, Quelle: The Palaearctic-African Bird Migration System (Moreau 1972).

### 3.7.2 Pferde mit ZNS-Symptomatik

Pferde reagieren sehr empfindlich auf WNV-Infektionen. Zur Einschätzung in wie weit Pferde in Deutschland bisher unentdeckt an WNV-Infektionen erkrankten, wurden 172 Proben von Pferden untersucht. Diese Proben ZNS-symptomatischer Pferde wurden retrospektiv molekularbiologisch untersucht. Die Liquor- und Serumproben wurden von Prof. Dr. G. Schusser und Prof. Dr. H. Müller, Universität Leipzig und von Frau Prof. Dr. K. Borchers, Freie Universität Berlin zur Verfügung gestellt.

#### *3.7.2.1 Nukleinsäurenachweis von WNV in Pferden*

Bei keiner der untersuchten Proben konnte mit der PCR virale WNV-Nukleinsäure nachgewiesen werden. Die interne Kontrolle von SMRV war in allen Proben außer in drei Proben amplifizierbar, was zeigt, dass keine Infektionen der Tiere vorhanden waren und die Nukleinsäureisolierung erfolgreich war.

#### *3.7.2.2 WNV-Seroprävalenz in Pferden*

Um die Seroprävalenz von WNV in Pferden zu bestimmen, wurden die 172 Proben von ZNS-erkrankten Tieren sowie Seren von 28 gesunden Pferden untersucht. Die gesunden Tiere stammten aus Brandenburg (Region Spreewald). Pferde dieser Region wurden gezielt ausgewählt, da dort viele Wassergebiete vorkommen, in denen die Vermehrung von Stechmücken begünstigt wird. Die Proben der gesunden Kontrollgruppe wurden von Frau I. Reuter, Freie Universität Berlin zur Verfügung gestellt.

Die Proben wurden sowohl mit WNV-IFT als auch im WNV-NT untersucht. Es konnten bei keinem Tier Antikörper gegen WNV nachgewiesen werden.

### 3.7.3 Menschen

Menschen gelten wie Pferde als Endwirte von WNV-Infektionen. Um abzuschätzen, ob WNV-Infektionen in Deutschland auftreten, wurden Proben von verschiedenen Kollektiven auf WNV-Genome bzw. WNV-spezifische Antikörper untersucht.

3.7.3.1 *Patienten mit neurologischen Symptomen unklarer Genese*

In Zusammenarbeit mit Herrn Prof. Dr. D. Neumann-Haefelin und Dr. T. Schenk, Universitätsklinikum Freiburg wurden 112 Liquorproben von Patienten mit neurologischen Symptomen unklarer Ursache retrospektiv untersucht. Bei dem Studienkollektiv handelte es sich um Patienten aus dem Einzugsgebiet der Universitätsklinik Freiburg. Dieses Patienten war von besonderem Interesse, da die Region am Rhein klimatisch sehr mild ist und das Vorkommen von verschiedenen Stechmückenarten begünstigt. Die Angaben zu den Krankheitssymptomen (Tabelle 16) zeigten, dass Meningitiden (16,1 %), Enzephalitiden (29,5 %) und Meningoenzephalitiden (14,3 %) innerhalb dieses Kollektives dominierten.

Tabelle 16: Darstellung der Krankheitssymptome von Patienten mit neurologischen Symptomen unklarer Genese aus der Universitätsklinik Freiburg

Krankheitssymptome	Anzahl der Patienten	Prozentsatz (%)
Meningitis	18	16,1
virale Meningitis	3	2,7
Enzephalitis	33	29,5
virale Enzephalitis	3	2,7
Herpesenenzephalitis	4	3,6
Meningitis und Enzephalitis	21	18,8
Myelitis	7	6,3
Querschnittsmyelitis	1	0,9
Meningoenzephalitis	16	14,3
Cerebrellitis	1	0,9
unbekannte Symptome	5	4,5

Ferner wurden 61 Patienten aus dem gesamten Bundesgebiet mit akuten zentralnervösen Beschwerden untersucht. Proben dieser Patienten wurden von verschiedenen Ärzten zur Abklärung der Krankheitsursache eingeschickt. 51 RNA-Proben stammten von AFP-Patienten mit unklarer Genese, die freundlicherweise von Frau Dr. S. Diedrich und Herrn Dr. E. Schreier, Robert Koch-Institut zur Verfügung gestellt wurden.

Alle Proben von Patienten mit zentralnervösen Beschwerden unklarer Ursache wurden auf das Vorhandensein von viraler Nukleinsäure (WNV) untersucht. In keiner Probe konnte WNV-Genom nachgewiesen werden, d.h. es waren keine WNV-Infektionen bei den Patienten feststellbar.

3.7.3.2 WNV-Verdacht bei Personen aus Rumänien

Während bisher keine WNV-Infektionen bei Menschen bekannt geworden sind, die in Deutschland erworben wurden, so gibt es Regionen in Europa, in denen WNV-Epidemien aufgetreten sind. Daher wurde eine Gruppe von rumänischen Patienten mit den Krankheitssymptomen einer Enzephalitis bzw. Meningitis untersucht. Zu diesen Patienten lag die Information vor, dass im IgM-ELISA, positive oder grenzwertige Reaktionen vorlagen. Die Proben wurden von Frau Dr. C. Ceianu, Cantacuzino Institut, Rumänien zur Verfügung gestellt. Die Serum- und Liquorproben (150 µl) wurden in Rumänien auf Filterpapier getropft und getrocknet. Anschließend wurden die Proben nach Deutschland gesendet. Die Proben stammten von fünf männlichen und einer weiblichen Patienten (Alter 15 - 75 Jahren), wobei der Altersdurchschnitt bei 42 Jahren lag (Tabelle 17). Fünf der Patienten litten unter Symptomen einer Meningitis während eine Person Symptome einer Enzephalitis zeigte. Drei der Patienten lebten in ländlichen Gebieten, während drei aus der Stadt stammten. Die Erkrankungen traten in den Sommermonaten des Jahres 2005 auf (27.07.05 bis 09.09.05).

Tabelle 17: Angaben zu den rumänischen Patienten mit Verdacht auf WNV-Infektionen

Patientendaten						Abnahmetermine		
Labornr.	Alter	Sex	Region	Diagnose	Krankheitsbeginn	Serum 1	Liquor	Serum 2
124	16	männl.	rural	Meningitis	27.07.05	01.08.05	29.07.05	29.08.05
216	53	männl.	rural	Meningitis	21.08.05	?	?	01.09.05
243	39	männl.	urban	Meningitis	14.08.05	19.08.05	18.08.05	01.09.05
285	15	männl.	rural	Meningitis	09.09.05	13.09.05	13.09.05	22.09.05
335	52	männl.	urban	Enzephalitis	02.09.09	05.09.05	05.09.05	19.09.05
250	75	weibl.	urban	Meningitis	17.08.05	18.08.05	18.08.05	30.08.05

?: Abnahmetermin bzw. Krankheitsbeginn nicht bekannt

Um virale Nukleinsäure bei den Patienten nachzuweisen, wurde die auf Filterpapier getrocknete Cerebrospinalflüssigkeit (150 µl) untersucht. Aus diesen Filterdiscs wurde RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Mittels der durchgeführten PCR-Untersuchungen konnte in den Proben keine WNV Nukleinsäure nachgewiesen werden.

Von den Patienten wurden in Rumänien 9 - 27 Tage nach Erstabnahme weitere Serumproben abgenommen (Serum 2). In diesen Seren waren IgG-Antikörper gegen WNV im Immunfluoreszenztest feststellbar (Tabelle 18). Eine Bestätigung der IFT-Reaktivität in den Proben konnte mit Hilfe des WNV-NTs durchgeführt werden. Insgesamt schwankten die Neutralisationstiter individuell innerhalb des Studienkollektives, während der IFT einheitliche Ergebnisse lieferte. Die Proben einer Patientin, die im IgM-ELISA grenzwertige Ergebnisse zeigte, hatte Antikörper gegen WNV im NT und im IFT.

Tabelle 18: Ergebnisse der serologischen WNV-Diagnostik bei Patienten aus Rumänien

WNV-IgM-ELISA				WNV-IgG-IFT (Titer)	WNV-NT (Titer)
Labornr.	Serum 1	Liquor	Serum 2	Serum 2	Serum 2
124	+	+	+	+ (100)	+ (80)
216	+	+	+	+ (100)	+ (10)
243	+	+	+	+ (100)	+ (20)
285	+	+	+	+ (100)	+ (10)
335	+	+	+	+ (100)	+ (36)
250	-	grenzwertig	grenzwertig	+ (100)	+ (30)

+: seroreaktiv/seropositiv, -: nicht reaktiv

### 3.7.3.3 Serologische Untersuchungen bei Vogelberingern aus Deutschland und Österreich

Zur Klärung, ob die Beringung von Zugvögeln in Deutschland ein Risiko für den Erwerb einer WNV-Infektion darstellt, wurden Seren von 137 Beringern aus Deutschland und Österreich im Rahmen einer epidemiologischen Studie untersucht, die in Zusammenarbeit mit der Ärztin Frau M. Muehlen, MD, DTMPH und Prof. Dr. K. Stark; Robert Koch-Institut durchgeführt wurde. Die Teilnehmer wiesen insgesamt eine Alterspanne von 22 bis 74 Jahren (Mittelwert: 53 Jahre) auf, wobei 14 % der Beringer Frauen waren. 51 % der Personen beringten Vögel das ganze Jahr, 37 % lediglich im Sommer. Fast alle untersuchten Teilnehmer beringten Vögel, die ins tropische oder subtropische Afrika ziehen (85 %). 67 % der Beringer gaben an, sich bei der Beringung kleinere Verletzungen zugezogen zu haben, 89 % berichteten, dass sie bei ihren Tätigkeiten regelmäßig von Stechmücken gestochen wurden,

wobei 22 % immer Mückenrepellents verwendeten. Persönliche Schutzausrüstungen wurden selten von Beringern verwendet: 6 % trugen Kittel, 4 % verwendeten einen Mundschutz und nur 1 % trug bei der Vogelberingung Handschuhe.

Die Serumproben der Vogelberinger wurden auf Antikörper mit Hilfe von ELISA (IgG), IFT (IgG) und NT gegen verschiedene Flaviviren untersucht: WNV, FSME-Virus, *Gelbfiebervirus* und *Denguevirus* Typ 1-4 (Tabelle 19).

#### ***West-Nil-Virus, WNV***

Mit Hilfe des WNV-Immunfluoreszenztest konnten bei 12 Personen (8,8 %) Antikörper gegen WNV nachgewiesen werden. Die WNV-ELISAs dreier Hersteller zeigten Reaktivitäten von 4,4 % (EUROIMMUN), 32,1 % (Focus) und 39,4 % (Panbio). Schlüsselt man die reaktiven Proben innerhalb des Studienkollektives in Bezug auf Nord-Süd auf, zeigte sich, dass der Anteil der reaktiven Proben von Beringern aus Süddeutschland und Österreich in zwei WNV-ELISA-Testen, aber auch im WNV-IFT der Firma EUROIMMUN um das Dreifache höher waren als bei den norddeutschen Personen. Lediglich drei Beringer (3 von 137 = 2 %) wiesen neutralisierende Antikörper gegen WNV auf. Die Neutralisationstiter zweier Personen waren sehr niedrig (1:10), der Antikörpertiter einer Person betrug 1:80.

#### ***Frühsummer-Meningoenzephalitis-Virus, FSME-Virus***

Da in der Studie ebenfalls abgefragt wurde, welche Impfungen bei den einzelnen Personen durchgeführt worden waren, insbesondere Impfungen gegen die Flaviviren: FSME-Virus und Gelbfiebervirus, wurde in weiteren Untersuchungen geprüft, inwieweit die Reaktivität in WNV-Testen auf Kreuzreaktionen anderer Flaviviren zurückgeführt werden kann. Die Impfdaten zeigten, dass in der südlichen Studiengruppe 50 % der Personen gegen FSME-Virus geimpft waren. Für den Antikörpernachweis gegen FSME-Virus wurden ELISA-Tests zweier Hersteller verwendet. Es zeigte sich, dass in beiden Testsystemen vergleichbar hohe Seroprävalenzen für die südliche Studiengruppe nachweisbar waren: 28,5 % (EUROIMMUN) bzw. 32,8 % (Dade-Behring). Die Ergebnisse des FSME-Virus-IFT (EUROIMMUN) lagen in einem ähnlichen Bereich (24,8 % reaktive Seren). Die nördliche Studiengruppe wurde lediglich mit dem FSME-Virus-IFT untersucht und zeigte eine Seroprävalenz von 10,2 %. Die meisten reaktiven Seren stammten dabei von Personen, die gegen FSME-Virus geimpft waren.

### *Denguevirus*

Alle Seren wurden auf IgG-Antikörpern gegen *Denguevirus* Typ 1-4 getestet (IFT, EUROIMMUN), wobei sich eine Gesamtprävalenz von 33,6 % gegen mindestens einen Serotyp ergab. Die Prävalenz gegen *Denguevirus* in der Südgruppe war um das doppelte höher als bei der Nordgruppe. Obwohl ein Teil der Reaktionen im *Denguevirus*-Test auf Kreuzreaktionen von Antikörpern beruhen, kann nicht ausgeschlossen werden, dass einzelne Personen sich in *Denguevirus*-Endemiegebieten infiziert haben. Andererseits ist nicht ausgeschlossen, dass unspezifische Reaktionen im Testsystem auftraten.

### *Gelbfiebervirus*

Die Untersuchungen zum Nachweis von Antikörpern gegen das *Gelbfiebervirus* zeigten, dass die Prävalenz gegen diesen Erreger im IFT generell höher (48,2 %) war als im NT (23,4 %). Proben der Südgruppe zeigten höhere Reaktionen gegen *Gelbfiebervirus* als die Nordgruppe (NT: Südgruppe: 24,8 % - Nordgruppe: 8,0 %). Die Impfdaten zeigten hingegen, dass in der Nordgruppe 16 Personen (26,2 %) gegen *Gelbfiebervirus* geimpft waren und in der Südgruppe 17 Personen (22,4 %). Trotz ähnlich hoher Impfrate waren die Reaktionen in der Südgruppe höher als in der Nordgruppe. Worauf diese unerwarteten Reaktivitäten zurückzuführen sind, ist unklar.

Betrachtete man die Proben mit neutralisierenden Antikörpern gegen WNV, so waren diese Proben auch in allen FSME-Virus- und *Denguevirus*-Testen reaktiv. Bei genauerer Analyse der Kreuzreaktionen der drei WNV-NT-positiven Seren zeigte sich, dass eine Probe mit einem WNV-Neutralisationstiter von 10 in einem von drei WNV-ELISAs und im *Gelbfiebervirus*-NT negativ, jedoch reaktiv im *Gelbfiebervirus*-IFT war. Dieser Proband hatte angegeben, nicht gegen das *Gelbfiebervirus* geimpft zu sein, so dass hier wahrscheinlich eine Kreuzreaktion im *Gelbfiebervirus*-IFT nachweisbar ist. Der Beringer mit einem WNV-Neutralisationstiter von 80 gab an, nicht gegen *Gelbfiebervirus* geimpft zu sein, wobei für die Person ein Neutralisationstiter gegen *Gelbfiebervirus* von 43 und ein IFT-Titer von 32 feststellbar war, so dass in diesem Fall nicht ausgeschlossen werden konnte, dass eine Kreuzreaktion im *Gelbfiebervirus*-NT stattfand bzw. die Angabe zur Impfungen unkorrekt war. Inwieweit spekuliert werden kann, dass dieser Beringer sich sowohl eine WNV- als auch mit *Gelbfiebervirus*-Infektion bei seinen Beringungsaktivitäten zugezogen hat, ist unklar.

Für die Probanden mit neutralisierenden Antikörpern gegen WNV wurde ein FSME-Virus-NT in einer Kooperation mit Dr. S. Aberle, Medizinische Universität Wien durchgeführt. Das Serum mit einem WNV-NT-Titer von 80 und einen *Gelbfiebervirus*-NT-Titer von 43 hatte keine neutralisierenden Antikörper gegen FSME-Virus. Die Probe mit einem WNV-Antikörpertiter von 10, *Gelbfiebervirus*-NT-Titer = 20, hatte einen FSME-Virus-NT-Titer von 40. Der zweite Proband mit neutralisierenden Antikörpern gegen WNV (Titer: 10) hatte einen Antikörpertiter von 20 gegen FSME-Virus. Beide Proben mit einem WNV-Antikörperlevel von 10 zeigten damit einen Neutralisationstiter > 10 für die verwandten Flaviviren. Der WNV-Titer von 80 war hingegen doppelt so hoch wie der Neutralisationstiter gegen das *Gelbfiebervirus*.

Tabelle 19: Ergebnisse der serologischen Untersuchung von deutschen und österreichischen Vogelberingern gegenüber verschiedenen Flaviviren mit ELISA, Immunfluoreszenztest (IFT) und Neutralisationstest (NT)

Testsystem (Hersteller)	Σ reaktiver Seren von Vogelberingern aus Norddeutschland (n = 61)	Σ reaktiver Seren von Vogelberingern aus Süddeutschland und Österreich (n = 76)	Σ reaktiver Seren von Vogelberingern gesamt (n = 137)
WNV-NT (RKI)	0	3	3
WNV-IFT, IgG (EUROIMMUN)	2	10	12
WNV-ELISA, IgG (Focus)	11	23	34
WNV-ELISA, IgG (PanBio)	20	34	54
WNV-ELISA, IgG (EUROIMMUN)	3	3	6
<i>Denguevirus</i> , Typ 1-4 IFT, IgG (EUROIMMUN)	14	32	46
<i>Gelbfiebervirus</i> IFT, IgG (EUROIMMUN)	21	45	66
<i>Gelbfiebervirus</i> -NT (RKI)	11	21	32
FSME-Virus-ELISA IgG (Dade Behring)	nicht durchgeführt	45	45
FSME-Virus-ELISA, IgG (EUROIMMUN)	nicht durchgeführt	39	39
FSME-Virus-IFT, IgG (EUROIMMUN)	14	34	48

Schaute man sich vergleichend die Anzahl der reaktiven Seren anhand der IgG-IFT-Untersuchungen für *Denguevirus*, *Gelbfiebertvirus*, FSME-Virus und WNV an, so wurde deutlich, dass im WNV-IFT weniger reaktive Seren nachgewiesen werden konnten, als bei den anderen Flaviviren-IgG-IFTs. Innerhalb der *Denguevirus*-Serotypen fanden Reaktionen in verschiedenem Maß für die vier Serotypen statt. Weiterhin war zu bemerken, dass viele Seren in den Flavivirus-IFT-Analysen mehrfach reaktiv waren. Dabei war es nicht möglich ein bestimmtes Reaktionsmuster zu identifizieren, beispielsweise dass Seren mit einem hohen Titer für ein Flavivirus durchgehend auch einen hohen Titer für andere Flaviviren hatten (Abbildung 24).

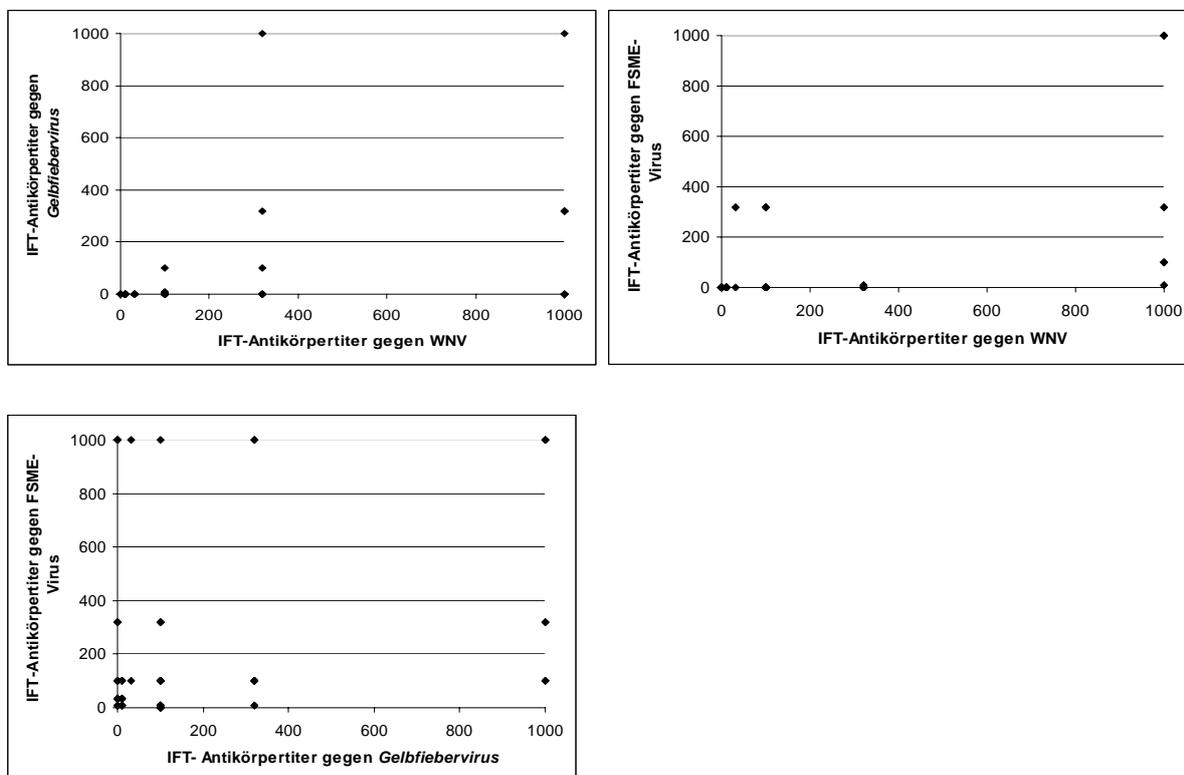


Abbildung 24: Korrelation zwischen Antikörpertitern gegen verschiedene Flaviviren. Aufgetragen sind die reziproken Werte der im IFT gemessenen Titer gegen die angegebenen Viren.

Die epidemiologischen Daten zur Reisetätigkeit der Vogelberinger zeigten, dass sich zwei der drei Vogelberinger mit neutralisierenden Antikörpern gegen WNV (Neutralisationstiter = 10 bzw. 80) in WNV-Endemiegebieten im südlichen Afrika aufgehalten hatten.

Zusammenfassend zeigte das untersuchte Studienkollektiv von Vogelberingern ein komplexes Muster an serologischen Reaktionen gegen Flaviviren. Aus dem Vergleich der verschiedenen Testsysteme konnte gefolgert werden, dass zur Diagnostik von WNV bei dieser Gruppe das System der ELISA weniger sensitiv war als der IFT, beide Diagnostikverfahren zeigten aber im Vergleich zum WNV-Neutralisationstest einen hohen Anteil von Seroreaktionen an, die auf das Problem der Differenzierung von Flavivirusinfektionen mit serologischen Methoden hinweist.