

## 4 Diskussion

Ziel der vorliegenden Studie war die Untersuchung der Prävalenz und Inzidenz von *West-Nil-Virus* (WNV) in Deutschland. Derzeit gibt es keine Erkenntnisse, ob WNV-Infektionen in Deutschland vorkommen bzw. ob sich der Erreger sich in Deutschland ausbreitet. Die fehlenden Kenntnisse sind dadurch begründet, dass klinische Symptome wie beispielsweise Enzephalitis und Meningitis bisher nicht mit WNV in Verbindung gebracht wurden. Durch die Meldungen aus den USA bezüglich der rasanten Ausbreitung des Erregers und den Krankheits- und Todesfällen bei Menschen entstand jedoch eine weltweite Sensibilisierung. Diese Arbeit repräsentiert die ersten systematischen Untersuchungen zur Erfassung der epidemiologischen Situation von WNV in Deutschland.

Zu Beginn der Untersuchungen standen keine validierten Nachweismethoden für WNV zur Verfügung. Daher mussten zunächst entsprechende Methoden etabliert und validiert werden. Dies betraf sowohl den Nachweis von WNV-Genomen mit Hilfe von PCR-Methoden als auch serologische Nachweissysteme wie den Neutralisationstest. Parallel zur Probengewinnung wurden die verschiedenen molekularbiologischen und serologischen Nachweismethoden entwickelt und getestet.

### 4.1 Etablierung von direkten Nachweismethoden für WNV

Für den direkten Virusnachweis von WNV wurden Nukleinsäuren-Nachweismethoden etabliert. Die Polymerase-Ketten-Reaktion (engl. polymerase chain reaction, PCR) gilt heute als Methode der Wahl zum Nachweis von Nukleinsäuren. Neben der klassischen PCR werden derzeit vorrangig sogenannte Real-Time-PCRs genutzt, da diese eine Quantifizierung der amplifizierten Sequenzen ermöglichen und eine schnelle Bewertung der Ergebnisse zulassen. Aufgrund des geschlossenen Systems wird die Kontaminationsgefahr verringert und die Methode ist insgesamt sensitiv und reproduzierbar. Für die Diagnostik von WNV wurde auf das Konzept der TaqMan-PCR zurückgegriffen. Aufgrund der Epidemie von WNV in den USA gab es bereits publizierte TaqMan-PCRs. Dabei wurden Bereiche in den NS3- und NS5-Genen des WNV-Genotyp 1 amplifiziert (Briese et al. 2000). Diese PCR-Systeme weisen Isolate des Genotyps 1, der in die USA importiert wurde, nach. Da der Genotyp 2 bisher nur in der „Alten Welt“ gefunden wurde und als weniger humanpathogen eingestuft wird, wurde dieser Nachweis des Genotyps 2 in den USA in der klinischen Diagnostik vernachlässigt. Da

jedoch eine Kozirkulation von beiden WNV-Genotypen in Europa und Afrika beobachtet wurde, wurde in dieser Arbeit eine Real-Time-PCR etabliert, die beide Genotypen nachweist. Durch die Migrationswege der paläarktischen-europäischen Zugvögel wird eine Ausbreitung von WNV aus Afrika nach Europa vermutet (Hubalek und Halouzka 1999, Hubalek 2000, van der Meulen et al. 2005). Daher ist anzunehmen, dass in Europa beide Genotypen vorkommen, obwohl bei den vergangenen Epidemien in Europa lediglich der Genotyp 1 beschrieben wurde.

Eine für WNV-Isolate „generische“ TaqMan-PCR wurde entwickelt und etabliert, die einen Genbereich der konservierten 5'UTR/Capsid Protein-Region (ProC) amplifiziert. Diese PCR wurde zunächst auf Spezifität und Sensitivität untersucht. Im Rahmen der Spezifität konnte gezeigt werden, dass das Genom eng verwandte Flaviviren, die serologische Kreuzreaktionen zeigten, nicht amplifiziert wurden. Es wurden 10 verschiedenen Flaviviren untersucht, beispielsweise *Usutu-Virus* und *Denguevirus* Serotypen 1-4. Dagegen wurde WNV-Nukleinsäure der Genotypen 1 und 2 vervielfältigt. Insgesamt wurden drei WNV-Isolate des Genotyps 1a, ein Isolat des Subtyps 1b, sowie zwei Isolate des Genotyps 2 untersucht. Ein weiteres Isolat, das derzeit als WNV-Genotyp 3 diskutiert wird (Bakonyi et al. 2005a), konnte durch Justieren der Annealingtemperatur ebenfalls amplifiziert werden.

Der Ansatz einer Multiplex-PCR zur Diskriminierung von WNV-Genotypen im Bereich der NS3-Region in einem Reaktionsansatz wurde nicht weiter verfolgt, da die Fluoreszenzsignale der Sonden durch die TaqMan-Geräte nicht aufgetrennt werden konnten und so Störsignale innerhalb der Fluoreszenzkanäle auftraten. Daher wurde die PCR aufgesplittet und die Nukleinsäure in zwei Reaktionsansätzen für jeden Genotyp einzeln eingesetzt. Dies hatte zu Folge, dass mehr Probenvolumen eingesetzt werden musste als bei einer Multiplex-PCR. Um den Einsatz von Material zukünftig zu minimieren, wäre es möglich die „generische“ PCR durchzuführen und eine nachträgliche Schmelzpunktanalyse der PCR-Produkte mit Hilfe des Light-Zyklus einzuführen. Dabei könnte durch die Bindungsaffinität der Hybridisierungssonden eine Genotypisierung durchgeführt werden. Dieses Prinzip wurde u.a. für die Genotypisierung von humanen Adenoviren beschrieben (Chmielewicz et al. 2005).

Die Sensitivität der Screening-PCR für ProC wurde mit seriell verdünnter Plasmid-DNA ermittelt. Die Ergebnisse wurden mittels der Probit-Analyse statistisch ausgewertet. Dabei zeigte sich, dass mit einer Wahrscheinlichkeit von 95 %, 9,33 Plasmid-DNA Kopien pro Ansatz nachweisbar waren. Das Konfidenzintervall (95 %) lag bei 7,54 bis 12,65 Kopien pro

Ansatz. Eine ausreichende Nachweisgrenze von  $< 10$  Kopien pro Ansatz war somit durch die PCR gegeben. Damit war ein sensitiver diagnostischer Nachweis von WNV möglich.

Neben der Untersuchung von Plasmid-DNA wurde auch humanes Plasma mit WNV gespikt sowie Gehirnmaterial von WNV-infizierten Mäusen in der PCR untersucht. Dies sollte der realen Probenaufbereitung nahe kommen. Es konnte nachgewiesen werden, dass in klinischem Material ein WNV-RNA-Genomnachweis ebenso sensitiv war wie der Nachweis von Plasmid-DNA.

#### **4.1.1 Externe Qualitätssicherheitsstudie zum molekulargenetischen Nachweis von WNV**

Die externe Qualitätssicherheitsstudie zum Nachweis von WNV erlaubte eine weitere Validierung der etablierten PCR-Systeme für WNV der Genotypen 1 und 2. Es bestätigte sich, dass die im Rahmen der Arbeit etablierten TaqMan-PCRs einen sensitiven und spezifischen Nachweis von WNV ermöglichten.

Insgesamt dokumentierte die Studie, dass im Durchschnitt die Sensitivität der PCR-Systeme in den teilnehmenden Laboren recht gering war und nicht alle Labore in der Lage waren, den WNV-Genotyp 2 nachzuweisen (Niedrig et al. 2006). Eine Ursache für dieses Ergebnis war die Verwendung von publizierten PCR-Systemen, die speziell den Genotyp Linie 1 erfassen. Nachdem jedoch 2006 die erste Isolation von WNV-Genotyp 2 in Ungarn gelang (Bakonyi et al. 2006), sollten in Europa zukünftig Nachweissysteme eingesetzt werden, die beide Genotypen nachweisen.

## **4.2 Etablierung von indirekten Nachweismethoden für WNV**

### **4.2.1 Etablierung eines Immunfluoreszenztests für den Antikörpernachweis gegen WNV**

Der Immunfluoreszenztest, zum Nachweis von Antikörpern gegen WNV in infizierten Vertebraten, wurde als Screeningmethode verwendet. Bei dem Test handelte es sich um ein kommerzielles Testsystem der Firma EUROIMMUN AG, das je nach untersuchter Tierart

adaptiert wurde. Der IFT-Test hat den Vorteil, dass geringe Volumina von Proben untersucht werden können. Für das Screening wurden aus praktischen Überlegungen die Proben zunächst 1:10 verdünnt, um zu ermitteln, ob in den Proben Antikörpertiter vorlagen. Wurden Antikörper in einer Probe nachgewiesen, fand eine Bestimmung der Antikörpertiter nach Angaben des Herstellers statt. War der Hintergrund der Immunreaktion bei einer Verdünnung von 1:10 zu hoch für eine Differenzierung zwischen unspezifischen Fluoreszenzsignalen und spezifischer Antikörperreaktion, wurde die Probe 1:50 bzw. 1:100 verdünnt. Aufgrund der Biochiptechnologie des Produktes waren die Ausgangsbedingungen der einzelnen IFT-Slides vergleichbar und zeitsparend durchzuführen. Da der Test sehr robust ist, konnten auch qualitativ schlechte Proben, beispielsweise gefrorene Vollblutproben analysiert werden. Als Nachteil des IFTs stellt sich die hohe Kreuzreaktivität mit anderen Flaviviren dar. Kreuzreaktionen von Antikörpern mit Antigenen des *Gelbfiebertvirus*, FSME-Virus und *Denguevirus* wurden häufig beobachtet. Weiterhin ist die Beurteilung der Fluoreszenzsignale durch den Experimentator prinzipiell subjektiv und erfordert Erfahrung, um unspezifische Fluoreszenzsignale von spezifischen Antikörperreaktionen zu unterscheiden. Daher wurden die Ergebnisse des IFTs von zwei verschiedenen Personen unabhängig ausgewertet und die Ergebnisse nach der Beurteilung verglichen. Bei Unstimmigkeiten wurde eine dritte Person zur Bewertung hinzugezogen.

#### **4.2.2 Etablierung eines Virusneutralisationstestsystems zum Nachweis von neutralisierenden Antikörpern gegen WNV und USUV**

Alle Vertreter der Flaviviren teilen Antigenepitope, die zu Kreuzreaktionen verwandter Vertreter bei den serologischen Untersuchungen führen (Calisher et al. 1989, Weingartl et al. 2003). Dabei befinden sich die hauptsächlichen Determinanten im Envelope-Protein (E-Protein), das für die Adsorption und Rezeptorbindung des Virus an die Zelle zuständig ist. Weitere Antigenepitope in infizierten Zellen wurden auch in konservierten Bereichen des Nichtstrukturproteins NS1 gefunden, welches nicht in das Virion verpackt wird (Chung et al. 2006). Zur serologischen Diagnostik werden Testsysteme bevorzugt, die spezifisch sind und möglichst keine Kreuzreaktionen nachweisen. Als Goldstandard der Flavivirusdiagnostik gilt der Virusneutralisationstest. (Chiles und Reisen 1998, Blitvich et al. 2003, Malan et al. 2003). Allerdings kann der Virusneutralisationstests zum Nachweis von Antikörpern gegen WNV nur

in einem BSL3 Labor durchgeführt werden, da WNV zu den Erregern der Risikogruppe 3 eingruppiert wird. Um möglichst wenig Probenmaterial für den Test einzusetzen, wurde zum Nachweis von neutralisierenden Antikörpern gegen WNV ein Mikrotiterneutralisationstest (96-Well-Mikrotiterplatten-Format) etabliert. Die Auswertung der zytopathischen Effekte erfolgt durch eine Ja/Nein-Bewertung der Kulturen. Lediglich Proben mit neutralisierenden Eigenschaften wurden austitriert.

Für den Nachweis von Antikörpern gegen Usutu-Virus wurde ein Plaque-Reduktionsneutralisationstest (PRNT) auf einem 48-Well-Format etabliert, um die Auswertung der Plaques zu erleichtern. Der PRNT ist aufgrund der CMC-Überschichtung der Zellmonolayer in einzelnen Wells zeitaufwendig. Dieser Overlay verhindert die unkontrollierte Ausbreitung der Viren in der Kultur, da nur benachbarte Zellen einer einmal infizierten Zelle infiziert werden. Die Auswertung der PRNT erfolgte durch Bestimmung der Plaquezahl mit Berechnung des 50 % und 90 % Neutralisationstiter des Serums. Die Berechnung des PRNT<sub>90/ml</sub> folgte dabei der Auswertung für Neutralisationstiter von *Gelbfiebertivirus*-Impflingen und ist stringenter als der PRNT<sub>50/ml</sub>. Buckley et al. diskutierten in ihrer Studie zum Vorkommen von WNV in Vögeln Großbritanniens, dass ein Threshold von 90 %, wie er in den USA verwendet wird, in Situationen mit kranken Tieren und einer hohen Avidität von Antikörpern sinnvoll ist, während in Europa hauptsächlich gesunde Tiere vorkommen und daher die Neutralisationspotenz der Seren geringer ist (Buckley et al. 2003). Inwieweit diese Annahmen zutreffend sind, ist unklar. Im Prinzip sollte auch in gesunden Tieren die WNV-Infektion zur Produktion von hochaffinen Antikörpern führen. Niedrige Affinitäten könnten auf die Entwicklung von Antikörpern gegen andere Flaviviren zurückzuführen sein oder auch durch Antikörper, die unspezifisch mit WNV-Partikeln reagieren. Die Untersuchungen innerhalb dieser Studie konnten zeigen, dass der PRNT<sub>50/ml</sub> robust und daher als Bewertungskriterium zu verwenden ist. Ein Vergleich von Mikrotiterneutralisationstest und dem Standard-PRNT zeigte ferner bei einer Untersuchung, dass beide Systeme vergleichbare Antikörpertiter gegen WNV aufwiesen (Weingartl et al. 2003).

#### **4.2.3 Einschätzung von serologischen Diagnostikverfahren**

Um die kommerziellen Produkte hinsichtlich der Wertigkeit für die serologische Diagnostik von Flaviviren zu vergleichen, wurden Seren von Personen aus Deutschland und Österreich

(Vogelberinger) mit verschiedenen Produkten zum Nachweis von Antikörpern gegen Flaviviren untersucht. Dabei stand im Vordergrund, die Verfahren auf ihre Spezifität zu testen. In der Studie wurden drei kommerzielle WNV-ELISA (Focus, Panbio und EUROIMMUN), ein WNV-IFT (EUROIMMUN) mit dem als Goldstandard geltenden WNV-NT (RKI) verglichen. Die Ergebnisse zeigten, dass zwei ELISA einen sehr viel höheren Anteil an seroreaktiven Proben ermittelten (24,8 % und 39,4 %) im Gegensatz zum ELISA der Firma EUROIMMUN und zum IFT. Die Aussagekraft der ELISA war durch die Kreuzreaktionen von Antikörpern eng verwandter Flaviviren beeinträchtigt bzw. durch antigenunabhängige Stimulation des Immunsystems durch Infektionen mit Viren wie des *humanen Cytomegalovirus* (CMV) und *Epstein-Barr-Virus* (EBV), die eine hohe Durchseuchung von CMV in der Bevölkerung zeigen. Hogrefe et al, 2004 zeigten beispielsweise, dass der Focus-ELISA (IgG) mit Antikörpern, die gegen andere Flaviviren gerichtet sind, in etwa 35 % der Fälle kreuzreagierte (Hogrefe et al. 2004).

Aufgrund der Ergebnisse in den WNV-Tests, der FSME-Virus-Prävalenz in Süddeutschland und Österreich sowie den Impfungen gegen verschiedene Flaviviren, wurden weitere IFTs zum Nachweis von Antikörpern gegen *Denguevirus*, FSME-Virus und *Gelbfieberevirus* eingesetzt. Weiterhin wurde ein *Gelbfieberevirus*-NT durchgeführt sowie ein FSME-Virus-NT für die Proben, die im WNV-NT neutralisierende Antikörper aufwiesen. Insgesamt entstand ein schwierig zu interpretierendes Bild an Reaktionen. Es zeigte sich, dass der NT von allen Testverfahren die höchste Spezifität und Sensitivität aufwies. 32 Proben zeigten im *Gelbfieberevirus*-NT neutralisierende Antikörper, was prinzipiell mit den Angaben zu *Gelbfieberevirus*-Impfungen übereinstimmte. Innerhalb der WNV- und *Gelbfieberevirus*-NTs kam es zu keinen Kreuzreaktionen. Studien zu neutralisierenden Antikörpern gegen WNV bei Probanden, die gegen *Japan-Enzephalitis-Virus*- oder *Denguevirus*- geimpft waren, zeigten ebenfalls keinerlei Neutralisationstiter im WNV-Test, jedoch in den NTs gegen das jeweilige Impfvirus (Kanasa-Thanan et al. 2002).

Die Kreuzreaktionen von Flaviviren auf serologischer Ebene wurden in den letzten Jahren vielfach diskutiert. Von besonderem Interesse war dabei die Frage, welche Testsysteme kosten- und zeiteffizient sind und dennoch ein genügend hohes Maß an Sensitivität und Spezifität aufweisen. Der Hämagglutinations-Inhibitionstest ist ein verbreiteter Test für serologische Untersuchungen, ist aber weniger sensitiv und spezifischer als andere Testsysteme (Chiles und Reisen 1998, Tesh 2003, Weingartl et al. 2003, Xiao et al. 2003).

Als effizient gilt der ELISA zum Nachweis von IgM- und IgG-Antikörpern, weil er zeitsparend, preiswert und automatisierbar ist (Blitvich et al. 2003, Johnson et al. 2003, Weingartl et al. 2003). In der vorliegenden Studie zeigte sich, dass durch Impfungen und Infektionen von FSME-Viren der WNV-ELISA bevorzugt bei der Gruppe der süddeutschen und österreichischen Personen erhöhte Kreuzreaktivitäten nachwies. Einen hohen Prozentsatz von Kreuzreaktionen durch Flavivirus-Vakzinierungen oder Erkrankungen wurde auch in anderen Studien beschrieben (Allwinn et al. 2002). Die Auswahl von Studienkollektiven in Bezug auf eine Zirkulation von Flaviviren in diesen Herkunftsregionen hat einen großen Einfluss auf die Spezifität der Testsysteme. In anderen Studienkollektiven konnte beispielsweise eine Spezifität von 92,6 % bis 98,8 % in WNV-ELISAs (IgG) von Focus und Panbio gezeigt werden (Malan et al. 2004). Prinzipiell muss bei der Interpretation von WNV-ELISA-Ergebnissen hinterfragt werden, ob andere Flaviviren in der Region (ko-) zirkulieren oder Impfungen gegen FSME-Virus, *Gelbfiebertivirus* oder JEV bei den untersuchten Personen durchgeführt wurden.

Betrachtet man die Zuverlässigkeit von IFT-Testen, so zeigten Besselaar et al., dass der von ihnen getestete IgM-IFT mehr falsch positive Ergebnisse nachwies als der ELISA (Besselaar et al. 1989). In der vorgelegten Studie wies der WNV-IFT (IgG) mehr Seroreaktionen auf als die ELISA-Reaktionen, die im NT bestätigt werden konnten. Um Kreuzreaktionen in Serienzeit- und kostensparend abzuschätzen, könnte es sinnvoll sein, IFTs zu verwenden, die Biochips mit infizierten Zellen verschiedener Flaviviren auf einem Objektträger kombinieren, um in einem Arbeitsschritt Kreuzreaktionen zu ermitteln.

Zusammenfassend ist zu bemerken, dass die serologische Diagnostik von Flaviviren problematisch ist. Die Untersuchung von Studien- oder Patientenkollektiven sollte immer vor dem Hintergrund von regional zirkulierenden Flaviviren betrachtet werden, speziell bei Impfungen und möglichen Infektionen von Flaviviren desselben Serokomplexes. ELISA bzw. IFT sollten daher als Antikörpersuchteste eingesetzt und mit Hilfe des NTs bestätigt werden.

## 4.3 Nachweis von WNV in Proben verschiedenen Ursprungs

### 4.3.1 WNV-Infektionen bei Vögeln

Um Aussagen über die Inzidenz und Prävalenz von WNV in Deutschland machen zu können, wurden Proben von Vögeln, Pferd und Mensch gewonnen, bei denen ein Risiko für eine WNV-Infektion bestand. Das Hauptaugenmerk lag dabei auf der Untersuchung der Wildvögel, die zur Verbreitung des Erregers in Europa fungieren können. Durch die Wanderbewegungen der Zugvögel im Frühjahr kann das Virus mit infizierten Vögeln aus WNV-endemischen Regionen Afrikas nach Europa eingeschleppt und durch Begünstigungen von abiotischen und biotischen Faktoren in Deutschland ausgebreitet werden.

Nach Bauer et al. kommen in Deutschland 254 regelmäßige Brutvogelarten vor (Bauer et al. 2002). Die gesammelten Blut- und Gewebeprobe von Wildvögeln repräsentierten 87 Vogelarten aus 27 Vogelfamilien. Die 3427 Proben sind statistisch gesehen nicht repräsentativ, wobei berücksichtigt werden muss, dass die genaue Anzahl der Vogelpopulationen in Deutschland nicht bekannt sind. Die Proben wurden ferner im Rahmen der Vogelberingung bzw. bei erkrankten Tieren gewonnen und stellen damit nur einen Stichprobenartigen Ausschnitt verschiedener Vogelarten dar. Durch die Zusammenarbeit mit Vogelberingern waren die Fangorte und die Vogelspezies an deren Vogelberingungsaktivitäten gebunden und konzentrierten sich hauptsächlich auf die großen Beringungsstationen von Zugvögeln: Mettnau, Bodensee, Greifswalder Oie, Ostsee und auf Elbe und Rhein als Hauptverbreitungsgebiete von Weißstörchen. Die Proben aus Kliniken spiegelten die Fundorte der Vögel wieder, die im Einzugsgebiet der Freien Universität, Berlin lagen.

Das vorrangige Ziel war die Sammlung und Untersuchung von Proben der Zugvögel als Vehikel für die Einschleppung des Erregers nach Deutschland. Mit einem Gesamtanteil von 57 % der Proben konnte dieses Ziel erreicht werden. Um die Ausbreitung von WNV in die Standvogelpopulationen zu erfassen, wurden auch Standvögel in die Studie eingeschlossen.

Für die Untersuchungen wurden Serum, Plasma und Gewebe eingesetzt. Es zeigte sich, dass die Auswertung von EDTA-Blut in den serologischen Untersuchungen problematisch war. Das Plasma induzierte während der Inkubation auf den verwendeten Zellen zytotoxische Effekte. Ebenfalls problematisch waren Vollblutproben, die im APS-Puffer eingefroren worden waren. Diese Proben mussten mit PBS-Puffer verdünnt und zentrifugiert werden, um die zytotoxischen Effekte zu minimieren. Die Vollblutproben wurden durch Anritzen der

Flügelvene und die Verwendung von Kapillaren gewonnen. Dadurch waren die Blutproben jedoch nicht mehr steril und das Blut bakteriell kontaminiert, was sich im Zellkultursystem als problematisch erwies.

Aus dem Blickpunkt heraus, dass Wildvögel WNV über weite Entfernungen transportieren können, war es von Interesse herauszufinden, ob Wildvögel in Deutschland Antikörper gegen WNV aufweisen. Dazu wurden kommerziell erhältliche serologische Nachweissysteme adaptiert. Um eine möglichst große Bandbreite von IgG-Antikörpern der untersuchten 87 Vogelarten zu erfassen, wurde ein Mastermix aus einem Anti-Tauben-IgG-Hyperimmunserum (zur Verfügung gestellt durch PD Dr. C. Grund) und einem kommerziellen Bird IgG-Antikörper verwendet. Das Hyperimmunserum wurde an 55 Spezies aus 9 Vogelordnungen untersucht und in allen Fällen als positiv bewertet (persönliche Mitteilung: PD Dr. C. Grund). Der kommerzielle Bird IgG Antikörper wurde vom Hersteller an 9 Vogelarten getestet. Ferner wurde der Antikörper in zwei Studien angewendet, in denen insgesamt 68 Vogelarten untersucht wurden (Chiles und Reisen 1998, Ebel et al. 2002). Es kann daher davon ausgegangen werden, dass Immunglobuline der untersuchten Vogelseren durch dieses Testverfahren erfasst wurden.

Mit diesen Antikörpern konnten in dieser Studie bei insgesamt 9 von 87 untersuchten Vogelarten: Weißstorch, Rotkehlchen, Gartengrasmücke, Neuntöter, Schafstelze, Gaardenrotschwanz, Trauerschnäpper, Fischadler und Seeadler Antikörper im WNV-IFT nachgewiesen werden. Die Seroprävalenz war innerhalb der Arten variabel, lag jedoch bei 8 Arten unter 10 %. Lediglich bei den Fischadlern ist die Seroprävalenz höher.

Im Neutralisationstest konnten spezifische Antikörper gegen WNV bei 8 Vogelarten: Weißstorch, Höckerschwan, Gartenrotschwanz, Neuntöter, Trauerschnäpper, Habicht, Schwarzmilan und Fischadler nachgewiesen werden. Auch hier war die Seroprävalenzen < 10 % außer bei Fischadlern mit 20 %.

Um die Seroprävalenzen besser in einen europäischen Kontext einordnen zu können, wird im folgenden detaillierter darauf eingegangen, welche WNV-Prävalenzen bei Vögeln bisher in Europa festgestellt werden konnten. Über die Inzidenz von WNV liegen in Europa keine Zahlen vor. Die meisten Studien in Europa zur Prävalenz von WNV in Europa sind zeitlich weiter zurückliegenden Arbeiten, die zumeist mit dem HI-Test durchgeführt wurden. Aufgrund der ausgeprägten Kreuzreaktionen sind die Zahlen der WNV-Seroprävalenzen daher

mit Einschränkungen zu bewerten. Die Tabelle 20 zeigt eine Zusammenfassung der Seroprävalenzen in Europa.

Tabelle 20: WNV-Seroprävalenz bei Vögeln in Europa nach Juricova et al. 1998, Hubalek und Halouzka 1999, Buckley et al. 2003

Land	Jahr	Prävalenz im Hämagglutinations- Inhibitionstest (%)	Prävalenz im Neutralisationstest (%)
Portugal	1967 - 1970	5	keine Angabe
Frankreich	1967 - 1969	6	keine Angabe
Italien	1967 - 1969	10	keine Angabe
Griechenland	1970 - 1978	22	keine Angabe
Rumänien	1996 - 1997	22	keine Angabe
Bulgarien	1960 - 1970	2	10
Slowakei	1970 - 1973	keine Angabe	1 - 13
Österreich	1964 - 1977	1 - 3	keine Angabe
Tschechien	1985	4 - 10	keine Angabe
Polen	1996	3 - 12	keine Angabe
Russland	1963 - 1968	4 - 59	2-11
Großbritannien	2001 - 2002	keine Angabe	2,6 - 22,7

Vergleicht man die Literaturwerte, so fällt die Seroprävalenz von 59 % aus Russland (Hubalek und Halouzka 1999) aus dem Rahmen der relativ geringen prozentualen Anteile von 1 % bis 23 %, die übereinstimmend mit den gewonnenen Seroprävalenzen der vorliegenden Studie sind. Bei den seropositiven Arten der vorliegenden Studie handelte es sich zum größten Teil um Langstreckenzieher während lediglich eine Art zu den Teilziehern und zwei Arten zu den Stand- und Strichvögeln gruppiert wurden. Beim Vergleich der Migrationswege mit der weltweiten Verbreitung von WNV zeigte sich, dass die Regionen südlich der Sahara bis Südafrika sowie die nordwestlichen Regionen, in denen die Langstreckenzieher überwintern zu den WNV endemischen Regionen Afrikas gehören, die in Abbildung 25 dargestellt sind.

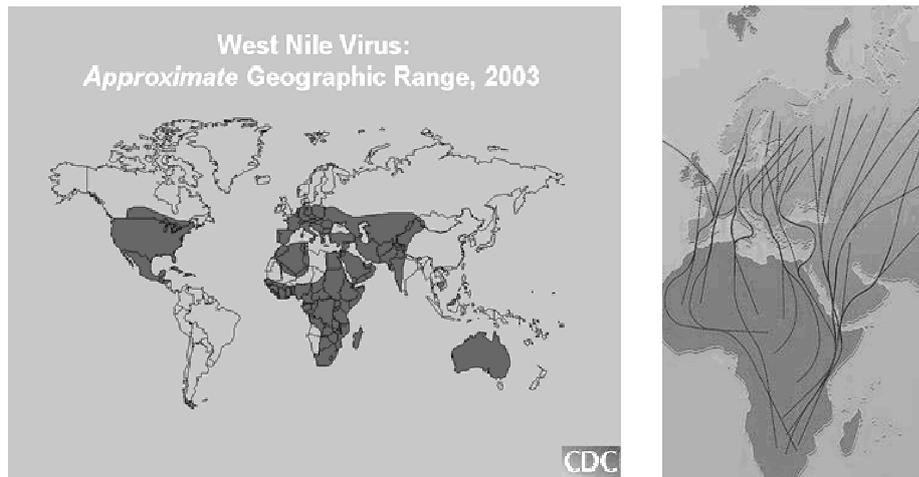


Abbildung 25: links: weltweite Verbreitung von WNV, Kenntnisstand 2003. Quelle: [www.microbeworld.org](http://www.microbeworld.org), rechts: die paläarktisch-afrikanischen Migrationswege von Vögeln, Quelle: <http://www.pandemic360.com>.

Stellt man die WNV-Seroprävalenzen der untersuchten Vögel in den Kontext der Migrationsbewegungen, besteht eine hohe Wahrscheinlichkeit, dass die WNV-Infektionen in Afrika oder auf der Migrationsroute erworben wurden, da WNV-Epidemien in vielen Süd- und Südosteuropäischen Ländern bekannt sind. Die Migrationsrouten der Langstreckenzieher Europas führen im Osten hauptsächlich über die Türkei, Israel, Ägypten in die östlichen Regionen Afrikas, während viele Vogelarten aus Westeuropa über Frankreich, Spanien in die westlichen Regionen Afrikas ziehen. Die Zugwege von Weißstörchen in Deutschland sind durch eine Zugscheide getrennt. Für die seropositiven Weißstörche konnte gezeigt werden, dass mehr Individuen aus den nordöstlichen Gebieten (Ostzieher) Antikörper gegen WNV bzw. andere Flaviviren aufwiesen als die Westzieher. Dies ist aber nur als Trend zu bewerten, da aufgrund der geringen Zahlen keine aussagekräftige statistische Berechnung durchgeführt werden konnte. Dieses Ergebnis ist aber nicht verwunderlich, da ein erheblicher Anteil der Westzieher in Spanien und Nordafrika überwintern und diese Regionen nicht als ausgeprägte Endemiegebiete zählen. Hingegen überwintert ein hoher Prozentsatz im Osten Afrikas bzw. zieht sogar bis ins südliche Afrika (Berthold et al 1997).

Die Stand- und Strichvögel verbleiben meist das ganze Jahr in Deutschland, dennoch gibt es Ausnahmen bei Jungvögeln, die Wanderungen nach Südeuropa durchführen oder kurze Pendelzüge in nah gelegene Ruhegebiete. Zu den Standvögeln gehören Höckerschwäne, die als Brutvögel, den Sommer in Nord- und Osteuropa verbringen und im Herbst stellenweise

nahrungsbedingt nach Deutschland ziehen (Glutz von Blotzheim 1998). Bei den untersuchten Habichten handelte es sich ebenfalls um Standvogelpopulationen (persönliche Mitteilung: Dr. K. Müller, Freie Universität Berlin). Der Nachweis von Antikörpern gegen WNV in der Population der Standvögel würde den Schluss zulassen, dass sich der Erreger auch in Deutschland ausbreiten konnte. Da aber nur ein geringer Prozentsatz von Höckerschwänen neutralisierende Antikörper gegen WNV aufwies und die Untersuchung von anderen Standvögeln keinen Hinweis ergab, dass WNV in nicht ziehenden Vögeln nachgewiesen werden konnte, ist nicht davon auszugehen, dass WNV-Infektionen von Vögeln in Deutschland erworben wurden. Zudem sind aufgrund des komplexen Migrationsverhaltens Aussagen über den Erwerb von WNV durch individuelle Wanderungen vieler Arten nur eingeschränkt möglich.

Die Seroprävalenzen der Vögel wurden weiterhin unter verschiedenen epidemiologischen Aspekten betrachtet. So wurden die WNV-Seroprävalenzen in Bezug zu den Bundesländern, in denen Proben gesammelt wurden, untersucht. Statistische Auswertungen zeigten, dass es zu keiner Gleichverteilung der WNV-Prävalenz in den Bundesländern kam. Die höchsten prozentualen Anteile wurden in Brandenburg und Berlin sowie in Mecklenburg Vorpommern festgestellt. Inwieweit sich hier die Population an untersuchten Vögeln widerspiegelt, die in oder durch WNV-Endemiegebiete zieht, sollte dabei in Betracht gezogen werden.

Der Hauptteil der reaktiven Proben stammte von Vögeln, die der Nähe von Gewässern gefangen wurden, wie Fischadler, Weißstorch, Höckerschwan. Es kann angenommen werden, dass insbesondere Fischadler, die in den Überwinterungsgebieten in Afrika ebenfalls in Feuchthabitaten leben, sich dort eine WNV- bzw. Flavivirusinfektion erworben haben.

Spezifische Antikörper gegen WNV wurden sowohl in Nestlingen als auch in adulten Vögeln nachgewiesen. Es zeigte sich aber, dass die Antikörpertiter der juvenilen Tiere in der Regel niedriger waren als die der Alttiere. Aufgrund dieser Beobachtung kann davon ausgegangen, dass die Jungvögel sich nicht mit WNV infiziert hatten, sondern dass es sich vielmehr dabei um den Nachweis von maternalen Antikörpern handelt, die über das Ei weitergegeben wurden. Die Ergebnisse zeigten, dass Antikörper im Wesentlichen bei Nestlingen von Weißstörchen (2 - 10 Wochen alt) nachweisbar waren. Nestlinge von Fischadlern ähnlichen Alters zeigten jedoch bis auf eine Ausnahme keine Antikörper gegen WNV bzw. Flaviviren, während die Altvögel zu einem großen Anteil seropositiv waren. Eine Erklärung für diesen Befund wäre, dass die maternalen Antikörper in Jungvögeln innerhalb verschiedener Arten

individuell lang persistieren. Diese Individualität der Antikörperpräsenz in Jungtieren konnte auch bei Nestgeschwistern von Weißstörchen festgestellt werden. Bei einigen Tieren konnten Antikörper gegen WNV lediglich bei einem von zwei bzw. drei Jungtieren pro Horst nachgewiesen werden. Das maternale Antikörper an Jungvögeln, wie beispielsweise Singvögel, Greifvögel und Tauben weitergegeben werden, ist bereits mehrfach beschrieben worden (Reeves et al. 1954, Gasparini et al. 2001, Buckley et al. 2003, Stout et al. 2005). Eine weitere Erklärung wäre, dass die Mengen an Antikörpern, die an das Ei weitergegeben werden schwanken, so dass die Nestlinge mit unterschiedlich hohen Antikörpermengen ausgestattet sind. Solche Schwankungen wurden bei der Herstellung von IgG (IgY) nach Immunisierung von Hühner beobachtet (Schade et al. 2000).

Über die generelle Persistenz von maternalen Antikörpern in Jungvögeln ist wenig bekannt. Studien, bei denen adulte Tauben und Hühner mit WNV bzw. mit *Eastern-Equine-Enzephalitis-Virus* (EEEV) bzw. *Western-Equine-Enzephalitis-Virus* (WEEV) infiziert wurden, zeigten, dass in den Küken maternale Antikörper bis zu 5 Wochen lang nachgewiesen werden konnten (Kissling et al. 1954, Reeves et al. 1954, Gibbs et al. 2005). Es muss allerdings auch darauf hingewiesen werden, dass Columiformes (Taubenvögel) Kropfmilch mit Immunoglobulin-A und IgG produzieren, die an die Nestlinge abgegeben wird (Goudswaard et al. 1978).

Der maternale Antikörpertransfer ist sowohl bei Säugetieren als auch bei Vögeln ausgebildet und ermöglicht einen passiven Schutz vor Infektionen in den Jungtieren. Die maternalen Antikörper, auch als IgG oder IgY bezeichnet (Y = yolk antibodies, Antikörper im Eidotter) werden vom Muttervogel im Ovarium in das Ei sezerniert (Brambell 1969). Der passive Schutz bleibt solange erhalten bis der Jungvogel immunkompetent ist und Antikörper aktiv selbst produziert. Der Antikörperlevel des erwachsenen Tieres wird nach 6 Wochen bis 6 Monaten erreicht. Die Menge an sezernierten Antikörpern ist dabei abhängig vom Alter des Muttervogels und des Antikörpertiters im Serum (Tizard 2002). Ob es einen Unterschied zwischen der Persistenz von maternalen Antikörpern in Nesthockern und Nestflüchtern gibt, ist nicht untersucht worden. Letztlich erlaubt die Erfassung der Seroprävalenz von maternalen Antikörpern in Nestlingen eine wertvolle Aussage zum Infektionsgeschehen bei den Muttertieren und eignet sich daher auch als Marker, um die Altvögel zu überwachen (Monitoring).

Bei einem Vergleich der Seroprävalenzen in den Vogelgruppen im WNV-IFT und WNV-NT wurde festgestellt, dass mit beiden Verfahren nicht immer deckungsgleiche Ergebnisse erzielt wurden. Bei den Weißstörchen waren im IFT mehr Proben mit WNV-Antigenen in infizierten Zellen reaktiv als im Virus-NT. Die Schnittmenge der Proben, die in beiden Nachweissystemen positiv waren, war relativ gering. Im Gegensatz dazu reagierten die Greifvögel häufiger im WNV-NT als im IFT. Wahrscheinlich spielen hier Unterschiede in der Sensitivität der Testverfahren eine Rolle bzw. auch die Spezifität der Teste. Es kann angenommen werden, dass einige Weißstörche Antikörper gegen verschiedene Flaviviren entwickelt hatten, die mit dem IFT nachgewiesen wurden, im WNV-NT aber nicht reagierten. Andererseits ist zu bemerken, dass im WNV-NT neutralisierende Antikörper mit einem Titer bis zu 640 bei Fischadler festgestellt werden konnten. Im WNV-IFT waren diese Seren jeweils negativ. Um diese Diskrepanz der Ergebnisse zu erklären, kann spekuliert werden, ob neutralisierende Antikörper in diesen Vögeln länger persistieren als Antikörper, die im IFT reagieren.

In der Diskussion um die Spezifität von Antikörpern gegen WNV, muss man annehmen, dass einige der Seren im WNV-IFT kreuzreaktiv gegenüber anderen Flaviviren waren. Es gibt eine Reihe von Flaviviren, die Vögeln infizieren können. Neben WNV konnten auch Infektionen mit Viren wie dem *Usutu-Virus*, dem *Sibirischen-Zeckenenzephalitis-Virus* und dem *Israel-Meningoenzephalitis-Virus* (ITV) in Vögeln in Europa und Nahost nachgewiesen werden. Weiterhin sind Infektionen mit *St.-Louis-Enzephalitis-Virus*, *Japan-Enzephalitis-Virus* und *Murray-Valley-Virus* bei verschiedenen Vogelarten beschrieben worden (Gylstorff und Grimm 1998, Hubalek 2004).

Eine Stichprobe von 23 Vogelproben wurde zusätzlich im *Usutu-Virus* (USUV)-NT untersucht. Der WNV-NT scheint teilweise Kreuzneutralisationen zu anderen Flaviviren zu zeigen, was bereits für den Japan-Enzephalitis-Serokomplex beschrieben wurde, wobei die höchste Kreuzneutralisation ebenfalls zwischen USUV und WNV festgestellt wurde (Calisher et al. 1989).

#### **4.3.2 WNV-Infektionen bei Pferden**

Pferde mit ZNS-Symptomatik wurde in die Studie mit eingeschlossen, die besonders sensitiv mit Krankheitssymptomen auf WNV-Infektionen reagieren (Pauli 2004). Als Kontrollgruppe

wurden Pferde aus einem Gebiet gewählt, das wasserreich ist und damit abiotische Voraussetzungen für hohe Vektordichten darstellt.

Da die Pferde Symptome aufweisen, die auf eine akute Infektion hindeuteten, wurden diese Tiere mit Hilfe der WNV-spezifischen PCR auf die Anwesenheit von WNV untersucht. In keiner Probe konnte virale Nukleinsäure von WNV nachgewiesen werden, so dass angenommen werden muss, dass kein Erwerb von WNV-Infektionen in Deutschland bei den Tieren stattfand.

Um die Prävalenz von WNV in Deutschland zu beurteilen, wurden Proben von den erkrankten und den gesunden Pferden serologisch untersucht. Dazu wurden die oben beschriebenen Testverfahren Immunfluoreszenztest und Virusneutralisationstest durchgeführt. Die Untersuchung ergab, dass Antikörper weder im IFT noch im NT nachweisbar war. Das bedeutet, dass weder auf molekularbiologischer Nachweisebene noch auf serologischer Seite festgestellt werden konnte, dass bei den untersuchten Tieren WNV-Infektionen aufgetreten sind. Untersuchungen an Pferden (gesunde Individuen, Tiere mit neurologischen Symptomen) aus Österreich bestätigen die Ergebnisse aus Deutschland. Durch serologische Untersuchungen von 250 Seren konnten bei österreichischen Pferden keine Antikörper gegen WNV nachgewiesen werden, bei der Analyse von Tieren aus Ungarn, die nach Deutschland transportiert wurden, waren 4 Seren reaktiv und hatten Antikörpertiter von 1:32 - 1:256. Keines der seropositiven Tiere wies jedoch klinische Symptome auf (Weissenböck et al. 2003b).

#### **4.3.3 WNV-Infektionen bei Menschen**

Bisher wurden keine in Deutschland erworbenen WNV-Infektionen beim Menschen festgestellt. Es muss daher davon ausgegangen werden, dass die Inzidenz von WNV in Deutschland sehr gering ist. Bei der Untersuchung zur WNV-Inzidenz in Deutschland stand im Vordergrund, Personen zu untersuchen, die neurologische Symptome unklarer Genese aufwiesen. Diese Symptome können durch die Verlaufsform einer WNV-Infektion hervorgerufen werden.

Aus dem Institut für Virologie der Universität Freiburg wurden 112 Proben von Patienten aus dem Einzugsgebiet der Universitätsklinik Freiburg zur Verfügung gestellt. Diese Region um die Rheinebene ist klimatisch sehr mild und hat eine mittlere Temperatur von 16,3 °C (April

bis September, Messzeitraum 1961 - 1990) (Klimadiagramme 2006). Durch die klimatischen Begünstigungen und die Wassergebiete sind daher die Umweltfaktoren vorhanden, um hohe Dichten von Stechmücken zu produzieren, die als Vektoren das Virus auf den Menschen übertragen können. Obwohl WNV-Infektionen in dieser Region bisher unbekannt sind, sind andere Virusinfektionen in dieser Region beschrieben worden. Am Obermain wurde beispielsweise 1968 das *Tahyna-Virus*, ein Arbovirus der Familie *Bunyaviridae* nachgewiesen, welches ebenfalls über Stechmückenarten übertragen wird (Spieckermann und Ackermann 1974). Dieses Virus zirkulierte über Jahre auch am Oberrhein und konnte dort 1985 (Pilaski und Mackenstein 1985) sowie 1995 - 1996 (Schübler 2000) in Stechmücken nachgewiesen werden.

Neben den Proben aus dem Freiburger Raum und dem Rheintal wurden 61 Proben aus dem gesamten Bundesgebiet untersucht, die ebenfalls von Patienten mit neurologischen Symptomen unklarer Ursache stammten. In keiner humanen Probe konnte WNV-Nukleinsäure nachgewiesen werden. Die Ergebnisse der Untersuchungen zeigen, dass bei Personen mit neurologischen Symptomen unklarer Ursache keine WNV-Infektion stattfand, so dass angenommen werden muss, dass kein Risiko des Erwerbs einer WNV-Infektion besteht.

Als positive Kontrolle wurde Personen aus Rumänien untersucht. Es ist bekannt, dass dort lokal WNV-Infektionen in den Sommermonaten auftreten, wobei eine große Epidemie in Rumänien zwischen Juli und Oktober 1996 ausbrach mit mehreren hundert klinischen Fällen und 17 Todesfällen (Savage et al. 1999). Die Proben wurden in Rumänien mit einem WNV-ELISA, IgM vorgetestet und sollten mit etablierten Methoden am Robert Koch-Institut bestätigt werden. Die Proben (Serum und Cerebrospinalflüssigkeit) wurden aus Gründen des Gefahrgutrechtes in Rumänien auf vorgestanztes Filterpapier getropft und getrocknet, bevor sie verschickt wurden. Eine IgG-Antwort konnte in 6 Patienten nachgewiesen werden, wobei die Titer im IFT alle bei etwa 100 lagen. Die Antikörperreaktionen konnten durch den WNV-NT bestätigt werden, wobei hier eine individuelle Antikörperantwort mit Titern von 10 - 80 auftraten. Grenzwertige Ergebnisse eines Patienten im IgM-ELISA konnten als seropositive IgG-Proben bestätigt werden. Es ist bekannt, dass IgM-Antikörper im Menschen bis zu einem Jahr verbleiben können, so dass eine lange Zeitspanne beide Isotypen kozirkulieren (Prince et al. 2005). Mit diesen Proben konnte gezeigt werden, dass die serologischen Testsysteme

robust waren und auch getropfte Blutproben auf Filterpapier serologisch untersucht werden können.

Das Risiko eine WNV-Infektion in Deutschland durch intensiven Kontakt zu Wildvögeln zu erwerben, wurde am Beispiel von Vogelberingern untersucht. Der enge Kontakt zu den Vögeln entsteht dadurch, dass die Beringung durch Fangen der Vögel in Netzen, Fangvolieren oder durch die Beringung von Jungtieren auf den Nestern oder Horsten stattfindet. Dabei kommt immer wieder zu Verletzungen der Personen durch Schnabelhiebe und Kratzer der Vögel. Beringungen finden ganzjährig statt, wobei die Hauptberingung im Spätsommer stattfindet. Einige Arten wie Saat- und Nebelkrähen dürfen nur außerhalb der Brutsaison im Herbst und Winter beringt werden. Der Aufenthalt im Freien und der enge Kontakt zu den Vögeln führen zu einer besonderen Exposition gegenüber Stechmücken. Dieses Kollektiv an Studienteilnehmer wurde mit einem Fragebogen zu Beringungsaktivitäten und Impfungen sowie zu demographischen Angaben befragt aber auch serologisch auf WNV untersucht. Ferner wurden die Proben verwendet, um die Vergleichbarkeit und Aussagekraft von verschiedenen Antikörpernachweisverfahren zu untersuchen. Die Befragung zeigte, dass die Beringer während ihrer Tätigkeiten ungenügende Schutzmaßnahmen bezüglich Verletzungen und Stichen von Insekten sowie persönlichen Schutz vor aerosolübertragbaren Pathogenen einhalten und dadurch das theoretische Risiko einer Übertragung von Krankheitserregern bei der Beringung erhöht ist.

Die serologischen Untersuchungen auf WNV von 137 Probanden zeigten, dass drei Personen neutralisierende Antikörper gegen WNV aufwiesen, wobei die Neutralisationstiter mit 10 bis 80 relativ gering waren. Bei den Personen mit einem Titer von 10 kann nicht ausgeschlossen werden, dass Kreuzreaktion von neutralisierenden Antikörpern gegen andere Flaviviren auftraten. Die epidemiologische Auswertung der Fragebögen ergab, dass sich zwei der drei Personen in WNV-Endemiegebieten in Afrika aufgehalten haben, so dass angenommen werden kann, dass die WNV-Infektion nicht in Deutschland erworben wurde. Die Ergebnisse unterstützen daher nicht die Hypothese, dass Aktivitäten wie Vogelberingung in Deutschland ein Risiko darstellen, sich mit WNV zu infizieren. Inwiefern solche Aktivitäten in WNV-Endemiegebieten ein größeres Risiko bergen, kann aus den vorliegenden Untersuchungsergebnissen nicht beurteilt werden. Untersuchungen von Beringern in Endemiegebieten könnten Hinweise auf ein erhöhtes Risiko geben, wenn dies im Vergleich zu geeigneten Kontrollen durchgeführt wird.

#### 4.4 Einschätzung der Gefahr von WNV-Infektionen in Deutschland

Die Studie zeigt, dass es in den untersuchten natürlichen Reservoiren (Vögeln) sowie in Fehlwirten wie Säugetieren (erkrankten Pferden und Menschen mit ZNS-Symptomatik) keine akuten WNV-Infektionen nachgewiesen werden konnten. In einer Studie an der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald wurden 177 Kinder mit Enzephalitis unklarer Ursache aus Deutschland mittels PCR untersucht, bei denen ebenfalls keine virale WNV-Nukleinsäure festgestellt werden konnte (persönliche Mitteilung: Prof. Dr. R. Mentel, Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald). Eine weitere Studie zur Inzidenz von WNV in Stechmücken Süddeutschlands zeigte, dass kein WNV-Genom in den Arthropoden nachgewiesen werden konnte (persönliche Mitteilung: Dr. M. Geier, Universität Regensburg). In Österreich und in den Niederlanden zeigten Untersuchungen aus den Jahren 2003 und 2006 ebenfalls keine Hinweise auf WNV-Infektionen bei equinen, aviären und humanen Proben (Weissenböck et al. 2003b, Koppelman et al. 2006).

In den Niederlanden wurden ferner Proben von Blutspendern untersucht, um die Sicherheit von Blutprodukten zu überwachen. In Deutschland wird ein ähnliches Projekt am Paul-Ehrlich-Institut durchgeführt, bei dem Blutspender auf WNV Antikörper untersucht werden. In Deutschland wird auf Anordnung des Paul-Ehrlich-Institutes eine zeitlich begrenzte Spenderrückstellung (4 Wochen) für Personen durchgeführt, die sich in den USA, Kanada oder Mexiko in den Monaten Juli bis Oktober aufgehalten haben. Alternativ wird eine Untersuchung der Blutspende mittels der Nukleinsäure-Amplifikationstechnik (NAT) empfohlen (PEI 2004). Da auch Personen zurückgestellt werden, die sich in einem Malariagebiet aufgehalten haben, ergibt sich für die endemischen WNV-Regionen Afrikas indirekt ein Rückstellungsprogramm. Durch die Ausbreitung von WNV in die Regionen Südamerikas und der Karibik wäre es sinnvoll zu diskutieren, ob weitere Länder in die Empfehlungen zur Rückstellung eingeschlossen werden müssten. Wenngleich bisher keine in Deutschland erworbenen WNV-Infektionen festgestellt wurden, so sind dennoch 3 importierte WNV-Fälle beschrieben worden, bei denen infizierte Personen aus den USA nach Deutschland einreisten (Jensen und Pauli 2004, Pauli 2004) und damit die Rückstellungsempfehlung sinnvoll erscheinen lassen.

Reisebedingte Erkrankungen in Deutschland sind nicht nur in Bezug auf WNV beschrieben worden, sondern auch bei anderen Erregern. Dabei hat die Malaria einen besonderen hohen

Stellenwert aber auch weitere Erkrankungen wie Brucellose, Cholera, Lepra, Shigellose, Trichellose, Typhus/Paratyphus sowie Flavivirusinfektionen durch *Gelbfiebertvirus* und *Denguevirus* wurden als importierte Infektionen erfasst und dem RKI gemeldet (RKI 2000). Durch die Zunahme des Reiseverkehrs und der internationalen Verflechtungen werden weiterhin Vektor-assoziierte Infektionen importiert: *Denguevirus*- und *Sindbis-Virus* Infektionen konnten bei Reisenden aus Südostasien und der Karibik festgestellt werden (Schwarz et al. 1996, Eisenhut et al. 1999). Ein aktuelles Beispiel vom Import von Arboviren ist das *Chikungunya-Virus*, das auf Mauritius mehrere tausend Personen infizierte und weltweit exportiert wurde (ProMED 2006b).

Obwohl das Risiko in Deutschland eine WNV-Infektion zu erwerben, gering einzuschätzen ist, sollte nicht außer Acht gelassen werden, dass durch verschiedene Faktoren das Infektionsrisiko steigen könnte:

### **Vektoren**

Die Hauptüberträger von WNV sind Stechmücken. Die wichtigsten Überträger sind *Culex*-Arten. Innerhalb des *Culex pipiens* Komplexes gibt es Hybridarten, die als besonders kompetente WNV-Überträger eingeschätzt wurden. Diese Hybridarten lassen sich morphologisch nicht von anderen Arten unterscheiden, sondern nur auf genetischer Ebene. Diese Hybriden sind in den USA verbreitet und konnten ebenfalls zu einem geringen Anteil in Südeuropa nachgewiesen werden, nicht jedoch in Nordeuropa. Diese Verteilung wurde dadurch begründet, dass diese Tiere eine geringere Fitness haben und keine Diapause durchführen können. Durch den Import von adaptierten Hybridarten aus den USA wäre eine Etablierung dieser Arten auch in Mittel- und Nordeuropa möglich (Fonseca et al. 2004). Der heutige Kenntnisstand zur Verbreitung von Stechmücken in Deutschland stammt aus den 60er Jahren des letzten Jahrhunderts und wurde bis heute nicht wesentlich erweitert. Aus diesen Daten ist bekannt, dass 44 Stechmückenarten in Deutschland vorkommen (Mohring 1969). Zurzeit ist es nicht möglich, aktuelle Aussagen darüber zu treffen, welche Stechmückenarten neu importiert oder eingewandert sind und welches Infektionspotential die Insekten haben. Dazu kommt, dass sich die Nahrungspräferenzen bei der Art *Culex pipiens* innerhalb der Vegetationsperiode ändern können, so dass ornithophile Stechmücken im späten Sommer auch Säugetiere als Wirte bevorzugen (persönliche Mitteilung: Dr. M. Geier, Universität Regensburg). Dadurch können synergistische Effekte in Bezug auf die WNV-Transmission auf den Menschen stattfinden (Kilpatrick et al. 2005).

Um eine effiziente Replikation von WNV in den Stechmücken zu erreichen, ist die Umgebungstemperatur ein bestimmender Parameter. Experimentell konnten gezeigt werden, dass nach einer WNV-kontaminierten Blutmahlzeit und einer Umgebungstemperatur von 30 °C innerhalb von 4 Tagen WNV-Infektionen in *Culex pipiens* nachweisbar waren. Bei niedrigen durchschnittlichen Umgebungstemperaturen verlängert sich die Zeit bis eine Stechmücke WNV übertragen kann (Dohm et al. 2002b). Inwieweit ausreichend hohe Temperaturen über längere Zeitintervalle in Deutschland auftreten, so dass im Frühjahr beim Zuzug der Zugvögel eine Ausbreitung von WNV durch Stechmücken ermöglicht wäre, ist spekulativ.

Es wird weiterhin diskutiert, welchen Stellenwert Zecken als WNV-Vektoren haben. Eine Erhaltung im natürlichen Transmissionszyklus wird bei Zecken durch die Transstadialstadien ermöglicht. Durch den passiven Transport der Zecken durch Zugvögel könnte es theoretisch möglich sein, WNV über große Strecken zu verbreiten. Es gab bisher jedoch keine Beobachtung von WNV-Infektionen in Zecken unter natürlichen Bedingungen. Zecken spielen dennoch eine große Rolle bei der Erhaltung von Arboviren, dies zeigt die jährlich zunehmende Bedeutung von FSME-Virus-Infektionen (Süss et al. 2004).

Insgesamt wurden bisher in Deutschland 19 von Arthropoden übertragene Infektionskrankheiten beschrieben. 12 Infektionserkrankungen wurden aufgelistet, die von Arthropoden nach Deutschland eingeschleppt werden könnten, wie zum Beispiel Sindbis-Fieber, Murines-Fleckfieber und Malaria (Faulde und Hoffmann 2001).

### **Reservoir**

Zugvögel gelten als ein wichtiger Mechanismus zur Verbreitung von einer Vielzahl von Pathogenen. Vögel gelten als Reservoir und Amplifikator beispielsweise von *Sindbis-Virus* und *Eastern-Equine-Enzephalitis-Virus*. Ein vielfach diskutiertes Feld ist die Verbreitung von *Influenza-Virus-A-Viren* insbesondere von aviärer Influenza, H5N1 durch Vögel. Aufgrund der Überschneidungen der Flugrouten von Vögeln, konnte sich das Virus weltweit ausbreiten und es besteht die Befürchtung, dass das Risiko einer Pandemie durch die weltweite Zirkulation von H5N1 erhöht wird. Neben viralen Erregern werden auch eine Vielzahl von pathogenen Bakterien, Pilzen und Protozoen durch Vögel verbreitet. Dabei können die ätiologischen Agens sowohl passiv als auch aktiv transportiert werden (Hubalek 2004).

Die Einschleppung und Verbreitung von Erregern ist gebunden an die Migration von Zugvögeln. Bei Weißstörchen ist bekannt, dass sie weite Distanzen zurücklegen beispielsweise von Deutschland bis Südafrika, dabei legen sie pro Tag bis zu 300 km zurück. Es stellt sich die Frage, ob ein WNV-infizierter Vogel den Vogelzug von Afrika bis Mitteleuropa überlebt oder die Zeit auf dem Zug ausreicht, die Virämiephase zu überwinden und zu gesunden. Bisher gibt es lediglich eine Information zu Weißstörchen, die in Mitteleuropa aufgezogen wurden und bei ihrer ersten Migration in Israel mit einer akuten WNV-Infektion aufgefunden wurden. Es wurde spekuliert, dass die Exposition gegenüber WNV in den Brutregionen, aber wahrscheinlicher auf der Route bzw. an den Raststellen im Donaudelta stattgefunden haben (Malkinson et al. 2002). Eine Studie zur Transmission von *Buggy-Creek-Virus* in Schwalben zeigte, dass die Infektionsrate umso höher stieg, je größer die Populationsdichte war. Damit konnte gezeigt werden, dass auch die Populationsdichte der Wirte wichtig für die Verbreitung von Pathogenen ist (Brown et al. 2001). Weiterhin sind abiotische und biotische Faktoren beteiligt, um die Infektionsrate von Arboviren zu erhöhen. Zum einen erhöht Stress in Wirbeltieren die Replikation von WNV (Ben-Nathan 1994) aber auch klimatische (Temperatur, Feuchte, Regen, Wind) und geographische Faktoren (Agrarwirtschaft) sind wichtige Einflussgrößen (Mellor und Leake 2000, Miramontes et al. 2006).

Erste Hinweise, dass Arboviren nach Mitteleuropa eingeschleppt werden und über mehrere Jahre persistieren können, zeigt die *Usutu-Virus*-Epidemie in Österreich. Es konnte bisher nicht gezeigt werden, welche Arthropoden in Österreich als Vektoren das Virus übertragen und wie das Virus eingeschleppt wurden. Das Beispiel zeigte aber deutlich, dass Vögel, wie Amseln, die als Standvögel nicht gegenüber dem afrikanischen *Usutu-Virus* exponiert waren, eine Letalität nach Infektion mit diesem Virus aufwiesen.

Es wird angenommen, dass bei den europäischen Vögeln, durch die Wanderbewegungen zwischen Afrika und Europa, ein ständiger Austausch von Pathogenen über die letzten Jahrtausende stattfand. Es wäre daher vorstellbar, dass eine Selektion von natürlich resistenten Individuen stattgefunden hat. Es ist bekannt, dass natürliche Resistenzmechanismen auch durch verschiedene Faktoren begünstigt werden. Es konnte beobachtet werden, dass es Hühner gibt, die resistent gegen über *Salmonella enterica* serovar Gallinarum und Pullorum waren. Dies beruhte darauf, dass eine genetische Resistenz vorhanden war, die mit der Expression von mononukleären Phagozyten in Zusammenhang stand. Dies korrelierte mit der

erhöhten Abtötung von Salmonellen durch Makrophagen in den Tieren (Wigley et al. 2002, Wigley et al. 2006).

Abschließend stellt sich die Frage, ob zukünftig WNV-Infektionen in Deutschland auftreten könnten. Es wird vielfach diskutiert, dass eine Klimaveränderung die abiotischen und biotischen Umweltfaktoren derart beeinflussen kann, dass in Deutschland eine klimatische Situation eintritt, die mit den Mittelmeerländern zu vergleichen ist. In diesen Ländern kommen WNV-Epidemien vor, die aber lokal und regional begrenzt sind. Es wäre daher theoretisch möglich, dass Infektionserreger, die bisher nur in tropischen oder subtropischen Regionen vorkommen, nach Deutschland eingeschleppt werden können. Inwieweit eine großräumige Ausbreitung möglich ist, kann nicht vorhergesagt werden. Es sollte aber nicht außer Acht gelassen werden, dass durch die Erwärmung auch das Zugverhalten vieler Vogelarten beeinflusst wird. So kann für die Nordhemisphäre beobachtet werden, dass ein fortlaufend späterer Wegzug, ein früherer Heimzug und eine Verkürzung der Zugwege und eine Überwinterung näher zum Brutgebiet bzw. bei Teilziehern eine Zunahme der Standvogelanteile stattfindet (Berthold 2001). Inwieweit solche Änderungen im Zugverhalten das Risiko einer Einschleppung von Zoonoserregern beeinflussen kann, bleibt zu klären.

Man vermutet, dass die rasche Ausbreitung von WNV in den USA dadurch begründet ist, dass die Vogelpopulationen in den USA vorher nicht in Kontakt mit WNV kamen. Die Einschleppung von WNV in die USA beweist eindrucksvoll, wie rasch die Ausbreitung eines Pathogens in neue Regionen erfolgen kann, wenn es dort auf kompetente Vektoren und Wirte trifft und welche Herausforderungen daraus für das öffentliche Gesundheitssystem entstehen.