FRIEDRICH-LOEFFLER-INSTITUT
FLI
Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit
Federal Research Institute for Animal Health

Amtliche Methodensammlung

Infektion mit dem West-Nil-Virus bei einem Vogel oder Pferd

1. Charakterisierung der Infektion
2. Untersuchungsmaterial
3. Untersuchungsgang

Infektion mit dem West-Nil-Virus bei einem Vogel oder Pferd

1. Charakterisierung der Infektion

1.1 Erreger

Den Namen erhielt das Virus nach seinem erstmaligen Isolierungsort 1937 im West-Nil-Distrikt in Uganda/Afrika. Das West-Nil-Virus (WNV) gehört zur Familie der *Flaviviridae*, zu der auch eine große Zahl anderer für den Menschen gefährlicher Krankheitserreger zählen: z. B. Gelbfiebervirus, Denguevirus Typ 1-4, Japan-Enzephalitis-Virus, St. Louis-Enzephalitis-Virus, Frühsommer-Meningoenzephalitis-Virus sowie Hepatitis-C-Virus.

Da das Virus durch Insekten (blutsaugende Mücken) übertragen wird, zählt es zu den Arbo-Viren (Abkürzung für „arthropod-borne“).

1.2 Klinische Symptomatik

Bei **Vögeln** bleibt eine Infektion mit WNV in den meisten Fällen symptomlos. Eine Reihe von Vogelarten ist jedoch sehr empfänglich für WNV, so dass es zu massiven Epidemien mit Todesfällen kommt. Hierbei sind besonders die Sperlingsvögel (Passeriformes), darunter vor allem die Rabenvögel (*Corvidae*), aber auch einige Greifvogelarten aus der Ordnung der Accipitri-/Falconiformes zu nennen. Auch bei Wirtschaftsgeflügel kommt es immer wieder zu neurologischen Erkrankungen, die häufig tödlich enden (Israel 1997-2000, Ungarn 2003, USA 2005, Kanada 2007).

Die Mehrzahl der **Pferde**, die mit WNV infiziert werden, entwickeln ähnlich dem Menschen keinerlei klinische Symptomatik. Einige Tiere hingegen reagieren jedoch mit deutlichen zentralnervösen Ausfallerscheinungen aufgrund von Meningitiden oder Enzephalitiden. Zu den klinisch auffälligen zentralnervösen Störungen zählen Stolpern, Nachhandlähmungen, Ataxien, allgemeine Schwäche, Muskelzittern (Tremor) und Lähmungen bis zum Festliegen der Tiere. Die erkrankten Pferde zeigen seltener, d. h. in nur ungefähr einem Viertel der infizierten Fälle, fiebrige Allgemeinerkrankungen. Pferde mit klinischen Anzeichen können die Infektion zwar überleben, behalten aber oft lebenslang neurologische Schäden zurück. Eine spezifische Behandlungsmöglichkeit existiert nicht, nur eine symptomatische Therapie ist möglich. Bei bis zu 40 Prozent der infizierten Tiere kann die Erkrankung tödlich verlaufen.

Die Infektion beim **Menschen** verläuft bei 80 Prozent der Infizierten ohne Symptome. Nur etwa 20 Prozent der Infizierten zeigen leichte Krankheitssymptome, wie Fieber und grippeähnliche Erscheinungen. Diese Erkrankungsform wird deshalb auch als „West-Nil-Fieber“ bezeichnet und gilt als klassischer Verlauf der Krankheit. In weniger als 1 Prozent der Fälle kann allerdings auch ein schwerer, hoch fieberhafter Krankheitsverlauf mit Meningitis oder Enzephalitis auftreten, der zu bleibenden neurologischen Schädigungen führen kann und in seltenen Fällen tödlich endet.

Besonders im Rahmen des Seuchengeschehens in den USA wurden verschiedene Impfstoffe für Pferde entwickelt. In Deutschland stehen für Pferde drei Impfstoffe zur Verfügung (ein inaktivierter Vollvirusimpfstoff, ein inaktivierter Rekombinantimpfstoff sowie ein rekombinanter Lebendimpfstoff), zugelassen durch die EU zur Verfügung. Für Vögel gibt es bisher keinen zugelassenen Impfstoff.

1.3 Differentialdiagnose

Die neurologischen Erkrankungen bei Pferden mit ZNS-Symptomatik können vielfältiger Natur sein. Dabei sollte neben Tollwut, equine Herpesviren und ggf. Borna auch eine mögliche Frühsommer-Meningoenzephalitis-Virus (FSMEV)-Infektion und eine WNV-Erkrankung abgeklärt werden.

Neurologische Symptome beim Wirtschaftsgeflügel können auch z. B. durch Influenza-, Paramyxo- oder aviäre Borna-Viren hervorgerufen werden. Ebenso können einige bakterielle Erreger als Ursache fungieren.

1.4 Diagnostische Indikation

Beim Auftreten einer unklaren ZNS-Symptomatik bei Pferden sollte auch immer an eine mögliche Infektion mit dem WNV gedacht werden. Da meist spezifische Krankheitssymptome fehlen, sollte bei gehäuftem Auftreten von neurologischen Symptomen in einem Pferdebestand und einem vermehrten Vogelsterben unter Wildvögeln in diesem Gebiet dieser Verdacht abgeklärt werden. Häufig werden jedoch zunächst nur Einzelfälle von neurologisch erkrankten Pferden beobachtet, ohne Bezug zu einem Wildvogelgeschehen, was die initiale Erkennung des Infektionsausbruches erschwert. Bei vermehrten Todesfällen mit neurologischer Symptomatik unter Wirtschaftsgeflügel (vorrangig in Freilandhaltung) sollte auch eine mögliche WNV-Infektion abgeklärt werden.

1.5 Zuständige Untersuchungseinrichtung

Zuständige Untersuchungseinrichtung ist das Friedrich-Loeffler-Institut, Südufer 10, 17493 Greifswald - Insel Riems, sowie die von den jeweils zuständigen Landesbehörden dazu bestimmten Untersuchungseinrichtungen der Länder.

1.6 Rechtsgrundlagen

- Verordnung über anzeigepflichtige Tierseuchen in der jeweils gültigen Fassung

Eine Verordnung zum Schutz gegen die Infektion mit dem West-Nil-Virus bei einem Vogel oder Pferd ist für Deutschland bisher nicht vorhanden.

2. Untersuchungsmaterial

Vorsichtsmaßnahmen

Da es sich bei WNV um einen Erreger handelt, der potenziell auch Menschen infizieren kann, ist während der Probennahme und der Verarbeitung der Proben bei Verdacht einer WNV-Erkrankung für den Probennehmer ein Schutz vor einer viralen Infektion empfohlen.

Für die serologische Untersuchung: Nativblutprobe oder Serum
Für die virologische Untersuchung: EDTA-Vollblut, Plasma, Serum oder Liquor bei Pferden
Blutkuchen aus Nativblutprobe bei Vögeln
bzw. post mortem verschiedenes Organmaterial (besonders Gehirn, aber auch Milz, Herz, Leber oder Niere
Probenmaterial bitte auslaufsicher verpacken und gut gekühlt versenden!

3. Untersuchungsgang

Vorsichtsmaßnahmen

West-Nil-Virus ist ein Erreger der Risikogruppe 3. Das Arbeiten mit potenziell WNV-infiziertem Material und WNV-Kulturen kann nur in Laboratorien der Sicherheitsklasse 3 erfolgen.

3.1 Nukleinsäurenachweis in der real-time PCR

Der Nachweis von WNV -Genom erfolgt über OIE-gelistete real-time PCR-Protokolle oder entsprechend den Literaturangaben (Lanciotti *et al*. 2000, Jiménez-Clavero *et al*. 2006, Linke *et al*. 2007).
Für die Diagnostik im nationalen Referenzlabor finden derzeit zwei verschiedene real-time PCR Verfahren Anwendung, die sowohl die Stämme der Linie 1 als auch der Linie 2 sicher erkennen (Eiden *et al.*, 2010). Diese PCR dient dem sensitiven Nachweis von WNV-Genom in EDTA-Blut, Serum, Liquor und Organproben. Die Amplifizierung erfolgt auf Basis des QuantiTect Probe RT-PCR Kit (Qiagen) in 25µl Gesamtvolumen. Im System ist die Amplifizierung eines internen Kontrollsystems (IC2 DNA) als duplex Assay integriert.

3.2 Virusisolierung

Aus dem eingesandten Probenmaterial kann, wenn erforderlich, auch eine direkte Virusanzucht auf verschiedenen Zellkultursystemen erfolgen. Hierzu eignen sich sowohl verschiedene Säugerzellen als auch Insektenzellkulturen.
Diese Arbeiten können aber nur im S3 Sicherheitslabor durchgeführt werden.

3.3 Antikörpernachweis

Im nationalen Referenzlabor (NRL) werden folgende modifizierte OIE-Methoden angewandt:

- Für den Nachweis von WNV spezifischen IgG-Antikörpern mittels ELISA-Technik steht ein kompetitiver ELISA zur Verfügung, der für die Anwendung bei Pferden, Hühnern, Enten und Gänsen zugelassen ist. In diesem kompetitiven ELISA zum Nachweis von IgG können falsch positive Reaktionen infolge von Kreuzreaktionen mit Antikörpern gegen andere Flaviviren auftreten. Hierbei kommt es häufig zu falsch positiven Ergebnissen infolge von FSME-virusspezifischen Antikörpern bei Pferden.
  Infektionen mit dem FSME-Virus kommen in zunehmendem Maße bei Pferden in FSME-Endemiegebieten vor. Es gibt aber auch Berichte von infizierten Tieren infolge lokaler FSME-Naturherde. Das klinisch/neurologische Erkrankungsbild der FSME beim Pferd kann nicht von einer WNV-Klinik unterschieden werden. Reaktive Proben müssen daher zur weiteren Abklärung zwingend am NRL nachuntersucht werden.

- Für den Nachweis von WNV spezifischen IgM-Antikörpern beim Pferd steht ein zugelassener WNV-IgM-Capture ELISA zur Verfügung. Der Nachweis von IgM-Antikörpern im Serum ist sowohl für epidemiologische Studien als auch für die Diagnose der WNV-Erkrankung sehr nützlich, weil die Antikörper auf eine frische Infektion des Wirts hinweisen, wobei IgM-Antikörper bis zu 3 Monate nach der Infektion nachgewiesen werden können.

- Weiterhin findet der Neutralisationstest im 96-Well-Format zur Absicherung der IgG-ELISA-Ergebnisse Anwendung. Hiermit können häufig die auftretenden flavivirusspezifischen Kreuzreaktionen aus dem kompetitiven ELISA abgeklärt werden. Diese Arbeiten mit den spezifischen Flaviviren (WNV und FSMEV) erfolgen ausschließlich im S3 Sicherheitslabor. Abklärungsuntersuchungen zum Usutu-Virus können auch im S2-Labor durchgeführt werden.

Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit
Südufer 10, D-17493 Greifswald – Insel Riems, www.fli.de