

Amtliche Methode und Falldefinition

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

Inhaltsverzeichnis

Amtliche Methode	3
1. Charakterisierung der Infektion	3
1.1 Erreger	3
1.2 Klinische Symptomatik	3
1.3 Differentialdiagnose	4
1.4 Diagnostische Indikation	4
1.5 Zuständige Untersuchungseinrichtung	4
1.6 Rechtsgrundlagen.....	4
2. Untersuchungsmaterial	5
3. Untersuchungsgang	5
3.1 Nukleinsäurenachweis in der real-time PCR	5
3.2 Virusisolierung	5
3.3 Antikörpernachweis	6
Falldefinition - West-Nil-Virus (WNV)	7

Amtliche Methode

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. Gelbfieberevirus, 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 Arboviren (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 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 22 bis 44 Prozent der klinisch erkrankten Tiere kann die Infektion 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 einem Prozent der Fälle kann allerdings auch ein schwerer, hoch fiebriger Krankheitsverlauf mit Meningitis oder Enzephalitis auftreten, der zu bleibenden neurologischen Schädigungen führen kann und in seltenen Fällen tödlich endet.

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

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. 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, equinen Herpesviren, bakteriellen Erregern und ggf. Borna auch eine mögliche Früh-sommer-Meningoenzephalitis-Virus (FSMEV)-Infektion und eine WNV-Erkrankung abgeklärt werden.

Neurologische Symptome beim Wirtschaftsgeflügel können auch z. B. durch Influenza-, Paramyxo- oder aviäre Bornaviren 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 Probenahme und der Verarbeitung der Proben bei Verdacht einer WNV-Erkrankung für den/die Probennehmer/in 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 (vom Vogel besonders Gehirn, aber auch Milz, Herz, Leber oder Niere, bei Pferden vorrangig Gehirn und Rückenmark)

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.

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

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-viruspezifischen 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.
Weiterhin ist auch ein falsch positives Ergebnis in dem o. g. ELISA durch das Vorhandensein von Usutu-Virus-Antikörpern bei Vogel und Pferd nicht auszuschließen.
Deshalb können reaktive Proben zur sicheren Abklärung des positiven ELISA-Befundes 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 drei 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.

Falldefinition - West-Nil-Virus (WNV)

Klinisches Bild

Bei **Vögeln** bleibt eine Infektion mit WNV in den meisten Fällen symptomlos. Eine Reihe von Vogelarten sind jedoch sehr empfänglich für WNV und können starke ZNS-Symptomatik entwickeln, gefolgt von massiven Epidemien mit Todesfällen. Hierunter zählen eine Vielzahl von Sperlingsvögeln (*Passeriformes*), besonders Rabenvögel (*Corvidae*), aber auch einige Greifvogel- und Eulenarten. Auch bei Wirtschaftsgeflügel kommt es immer wieder zu auffälligen neurologischen Erkrankungen, besonders bei Gänsen, die häufig tödlich enden.

Die Mehrzahl der **Pferde**, die mit WNV infiziert werden, entwickelt keine 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. Erkrankte Pferde zeigen seltener, d. h. ungefähr ein Viertel der infizierten Tiere, fiebrige Allgemeinerkrankungen. Pferde mit klinischen Anzeichen können die Infektion zwar überleben, behalten aber oft (bis zu 20 %) lebenslang neurologische Schäden zurück. Bei 22 % bis 44 % der infizierten Tiere kann die Erkrankung tödlich verlaufen. Prophylaktisch stehen in Deutschland drei Impfstoffe zur Verfügung.

Labordiagnostischer Nachweis

Erregernachweis:

- Genomnachweis vorrangig mittels qRT-PCR bzw. zusätzlich Pan-Flavi-PCR möglich nach Sequenzierung des Amplikons:
 - bei Pferd aus EDTA-Vollblut, Plasma, Serum oder Liquor während der Inkubationsphase/Anfang der Fieberphase bzw. Beginn der Klinik
 - bei Vögeln Blutkuchen aus Nativblutprobe (weißes Röhrchen für die Serumgewinnung), separiert in Blutkuchen und Serum, beide Proben getrennt
 - aus Gehirn- und/oder Organewebe von Pferd und Vogel
- Erregerisolierung in der Zellkultur (aus Serum während der Inkubationsphase/Anfang der Fieberphase oder aus Gehirn- und Organewebe)

Indirekter Nachweis:

- Antikörpernachweis (IgM ELISA für Pferd)
- Antikörpernachweis nicht in Zusammenhang mit Vakzination (Pferd) oder Kontakt zu Endemiegebiet (Pferd/Vogel) mittels IgG ELISA (Pferd/Huhn/Ente/Gans), SNT oder PRNT₉₀. Dabei müssen serologische Kreuzreaktionen innerhalb der Flaviviren beachtet werden.

West-Nil-Virus (WNV); West Nile Virus

Epidemiologischer Zusammenhang

Epidemiologischer Zusammenhang mit einem labordiagnostisch bestätigten oder mutmaßlichen WNV-Ausbruch. Klinische Symptomatik bei Vogel und Pferd.

Voraussetzung für den Verdacht

Entfällt.

Durch TSN zu übermittelnder Fall

Voraussetzungen für die Feststellung eines WNV-Falles oder eines Ausbruchs in WNV-freien Gebieten:

- Virusnachweis von einem Tier, welches Zeichen einer WNV-Infektion zeigt
- Antigen- oder Genomnachweis (virale RNA) von einem Tier, welches Zeichen
 - einer WNV-Infektion zeigt oder
 - im epidemiologischen Zusammenhang mit einem bestätigten oder mutmaßlichen WNV-Ausbruch steht.
- IgM-Antikörpernachweis bei einem Pferd, welches
 - klinische Symptome einer WNV-Infektion zeigt bzw. nachweislich gezeigt hat oder
 - im epidemiologischen Zusammenhang mit einem bestätigten oder mutmaßlichen WNV-Ausbruch steht. Eine vorangegangene WNV-Vakzination ist dabei auszuschließen.

Rechtsvorschriften

Bisher gibt es keine WNV-Verordnung für Deutschland.

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