

# Orthopockenviren: Infektionen des Menschen

## Stellungnahmen des Arbeitskreises Blut des Bundesministeriums für Gesundheit

**D**er Arbeitskreis Blut des Bundesministeriums für Gesundheit und Soziale Sicherung gibt als nationales Beratungsgremium Stellungnahmen zu neuartigen Erregern ab, bewertet neue Erkenntnisse zu bekannten Erregern und erarbeitet entsprechende Empfehlungen für die Fachöffentlichkeit. Diese Serie von Stellungnahmen zu einzelnen Erregern wurde als Zusammenfassung des aktuellen Wissensstandes veröffentlicht, speziell unter transfusionsmedizinisch relevanten Aspekten (Bundesgesundhbl., 41, 53, 1998).

Frühere Beiträge befassten sich mit der *Creutzfeldt-Jakob-Erkrankung*, dem *Parvovirus B19* und dem *GB-Virus Typ C* (Hepatitis-G-Virus), (Bundesgesundheitsbl., 41, 78–90, 1998), *HTLV-I/-II*, (Bundesgesundheitsbl., 41, 512, 1998), *Yersinia enterocolitica*, (Bundesgesundheitsbl., 42, 613, 1999), *TT-Virus* (Bundesgesundheitsbl., 43, 154–156, 2000), *Hepatitis B Virus (HBV)* (Bundesgesundheitsbl., 43, 240–248, 2000), *Humanes Cytomegalovirus (HCMV)*, (Bundesgesundheitsbl., 43, 653–659, 2000), *Hepatitis A Virus* (Bundesgesundheitsbl., 44, 844–850, 2001), *Treponema pallidum* (Bundesgesundheitsbl. 45, 818–826, 2002), *Hepatitis-C-Virus* (Bundesgesundheitsbl. 46, 712–722, 2003), *Humanes Immunschwächevirus (HIV)* (Bundesgesundheitsbl. 47, 83–95, 2004), *Arboviren – durch Arthropoden übertragbare Viren* (Bundesgesundheitsbl. 47, 910–918, 2004), *Coxiella burnetii – Erreger des Q-*

*(query) Fiebers* (Bundesgesundheitsbl. 48, 814–821, 2005), *Variante Creutzfeldt-Jakob-Krankheit* (Bundesgesundheitsbl. 48, 1082–1090, 2005), *Influenzaviren* (Bundesgesundheitsbl. 50, 1184–1191, 2007), *Arbobakterien (über Arthropoden übertragbare Bakterien)* (Bundesgesundheitsbl. 50, 1192–1207, 2007), *Hepatitis-E-Virus* (Bundesgesundheitsbl. 1, 90–97, 2008), *Malaria* (Bundesgesundheitsbl. 2, 236–249, 2008), *Arboprotzoen* (Bundesgesundheitsbl. 2, 123–146, 2009), *Parvovirus B19* (Bundesgesundheitsbl. im Druck) und *Humanes Cytomegalievirus (HCMV)* (Bundesgesundheitsbl. im Druck)

### 1. Wissensstand über den Erreger

Die menschlichen Pocken, hervorgerufen durch das Variolavirus (VARV), stellten Jahrhunderte lang weltweit eine Bedrohung für die Menschen dar. Die erfolgreiche Ausrottung der Pocken gelang durch umfassende Impfprogramme und Quarantänemaßnahmen unter der Federführung der WHO in den siebziger Jahren des letzten Jahrhunderts. Der letzte natürliche Pockenfall wurde 1977 in Somalia beschrieben [1]. Ein Jahr später fanden zwei wahrscheinlich von einem Viruslabor ausgehende VARV-Infektionen in Großbritannien statt [2, 3]. Die WHO erklärte schließlich Ende 1979 die Pocken für ausgerottet [4].

Andere Pockenviren, die Menschen infizieren können, spielten bis dahin nur

bei Verdacht auf eine VARV-Infektion zur Differentialdiagnose eine Rolle.

Jenner zeigte im Jahre 1796, dass Menschen nach einer Infektion mit Pockenviren des Rindes gegen VARV-Infektionen geschützt waren. Dafür verantwortlich war, wie später gezeigt wurde, die ausgeprägte Kreuzimmunität zwischen verschiedenen animalen Orthopockenviren (OPV) und dem humanen Pockenvirus. Die später zur systematischen Impfung (Vakzination) verwendeten OPV wurden als Vacciniavirus (lat. *vacca* = die Kuh) bezeichnet. Bereits vorher, wahrscheinlich von China und Indien ausgehend, wurde ein Schutz vor letal verlaufenden Pockenerkrankungen erzielt durch Übertragung von VARV von Erkrankten auf Kinder, die bis dahin keine Pockeninfektion durchgemacht hatten. Bei diesem als Variolation bezeichneten Verfahren wurde in Kauf genommen, dass etwa 1–2% der auf diese Weise infizierten Kinder an Pocken starben; der Verlauf der Infektion war in der Regel milder als bei natürlichen Pocken [5]. Die Variolation wurde 1796 durch die Vakzination mit Kuhpocken durch die Arbeiten von Jenner abgelöst. Bayern führte bereits 1807 die Pocken-Impfpflicht ein, Preußen (und das Deutsche Reich) hingegen erst 1874. Dementsprechend starben im Jahr 1871 in München nur 89, in Berlin dagegen 623 Menschen pro 100.000 Einwohner an Pocken.

Tabelle 1

Familie: Poxviridae			
Subfamilie	Genus	Subfamilie	Genus
	Orthopoxvirus (OPV)		Alpha-Entomopoxvirus
	Avipoxvirus		Beta-Entomopoxvirus
	Capripoxvirus		Gamma-Entomopoxvirus
	Leporipoxvirus		weitere nicht zugeordnete Entomopoxviren
Chordopoxvirinae	Suipoxvirus	Entomopoxvirinae	
	Molluscipoxvirus (MOCV)		
	Yatapoxvirus		
	weitere nicht zugeordnete Chordopoxviren		

Tabelle 2

Orthopockenviren (OPV): Wirt und Wirtsspezifität			
Virus	Infektionen bei	Wirtsbereich	Natürlicher Wirt
Variola (VARV)	Mensch	eng	Mensch
Vaccinia (VACV)	Mensch, Büffel, Rind, Elefant, Schwein, Kaninchen etc.	breit	unbekannt
VACV-ähnliche brasilianische Isolate (BRZ-VACV)	Mensch, Rind, Nager	breit	Nager
Büffelpocken (BPXV-VACV)	Büffel, Rinder, Mensch	breit	
Kaninchenpocken (RPV-VACV)	Kaninchen in Zuchten	breit	
Affenpocken (MPXV)	Mensch, Menschenaffen, Affen, Nagetiere, Präriehunde etc.	breit	Nagetiere, Hörnchen
Kuhpocken (CPXV)	Mensch, Katzen, Rind, Elefant, Nagetiere, Nashorn etc.	breit	Nagetiere
Kamelpocken <sup>a</sup> (CMLV)	Kamel	eng	unbekannt
Ectromelia (ECTV)	Mäuse, Labormäuse	eng	Wühlmäuse?
Waschbärpocken	Waschbär ( <i>raoon</i> )	breit?	unbekannt
Wühlmauspocken	Wühlmaus ( <i>vole</i> ), Pinon-Maus	eng	Wühlmäuse
Uasin-Gisha-Pocken	Pferd	mittel (?)	unbekannt
Taterapocken	Tatera kemp (Gerbil)	eng	Gerbil?

<sup>a</sup> Kamelpocken weisen eine sehr hohe genetische Verwandtschaft zu VARV auf, Infektionen des Menschen mit Kamelpocken hingegen wurden nicht beobachtet [133].

VARV gehört zusammen mit einer Reihe von Tierpockenviren in die Familie der *Poxviridae* (■ Tabelle 1), Subfamilie der *Chordopoxvirinae*, Genus *Orthopoxvirus* (OPV) (■ Tabelle 2).

In (■ Tabelle 3) sind Viren der Subfamilie *Chordopoxvirinae* zusammengefasst, die nicht in den Genus OPV eingruppiert werden, jedoch Menschen infizieren und Krankheitssymptome auslösen. Zu bemerken ist, dass neben VARV nur das Virus des *Molluscum contagiosum* (Dellwarzen), Genus *Molluscipoxvirus*, ausschließlich humanpathogen ist. Alle anderen Pockenviren, die Menschen infizieren können, haben Tiere als Reservoir und sind somit zu den Zoonoseerregern einzugruppierten.

Seit Eradikation der Menschenpocken beobachtet man in Deutschland, aber auch in anderen Ländern Europas, zunehmend Infektionen mit Kuhpockenviren (*cowpox virus*, CPXV), in Afrika mit Affenpockenviren (*monkeypox virus*, MPXV) sowie in einigen Regionen wie Indien und Brasilien Infektionen mit Vacciniavirus-ähnlichen Erregern [6]. Alle diese Viren gehören zum Genus OPV und werden durch Kontakt zu infizierten Tieren auf den Menschen übertragen. Die beobachtete Zunahme ist vor allem dadurch bedingt, dass nach der Einstellung der Impfungen gegen VARV kein Impfschutz mehr gegen OPV in der nicht geimpften, vorwiegend jungen Bevölkerung besteht. Bis auf Infektionen mit Affenpockenviren verlaufen OPV-Infektionen bei Immungesunden in der Regel selbstlimitierend, und es treten nur lokale, meist auf die Infektionsstelle begrenzte Hautläsionen sowie Allgemeinsymptome in Form einer febrilen Lymphangitis und -adenitis auf. Differentialdiagnostisch müssen bei Verdacht auf eine Pockenvirusinfektion *Ecthyma contagiosum*, Melkerknoten, Herpesinfektionen, Aktinomykose und Milzbrand berücksichtigt werden.

### 1.1 Erregerigenschaften

Orthopoxviren sind umhüllte, quaderförmige Viren (350 × 270 nm) mit einem doppelsträngigen, linearen DNA-Genom

Tabelle 3

Weitere Chordopockenviren, die Menschen infizieren können			
Genus	Spezies	Erkrankung	Wirt
Parapockenvirus	Orfvirus	Orf; <u>Ecthyma contagiosum</u>	Schaf, Ziege, Wildwiederkäuer
	Pseudokuhpockenvirus	Melkerknoten	Rind
	Parapocken des Rindes (Stomatitis Papulosa-Virus des Rindes)	lokale Infektionen	Rind
	Parapockenvirus der Seehunde (Seal parapox virus, SPPV)	lokale Infektionen	Robbe
	Parapockenvirus der Rentiere	lokale Infektionen	Rentier
Molluscipoxvirus	Molluscum contagiosum-Virus	gutartige Tumore	Mensch
Yatapoxvirus	Yaba monkey tumor virus	Yaba-Affentumor	Affen
	Tanapoxvirus	Tanapocken	Affen (Nager)

mit einer Größe von etwa 200 kb, deren Enden durch kovalente Bindungen verbunden sind [7]. Morphologisch lassen sich die verschiedenen OPV mit dem Elektronenmikroskop nicht unterscheiden (Abb. 1). Zudem weisen OPV untereinander eine enge Antigenverwandtschaft auf und zeigen eine hohe Homologie auf Genomebene. Das Genom der Pockenviren kodiert für 150–200 verschiedene Gene. Im Gegensatz zu anderen DNA-Viren vermehren sich Pockenviren im Zytoplasma infizierter Zellen in so genannten Virusfabriken (Guarnierische Einschlusskörper). Ursprünglich wurden vier verschiedene infektiöse Viruspartikel während der OPV-Vermehrung unterschieden: intrazelluläre reife Viruspartikel (IMV), intrazelluläre umhüllte Viruspartikel (IEV), zellassozierte umhüllte Viruspartikel (CEV) und extrazelluläre umhüllte Viruspartikel (EEV). Für die Pathogenese spielen sowohl die intrazellulären als auch die extrazellulären Viren eine wichtige Rolle. Intrazelluläre und zellassozierte Viren sind an der Ausbreitung der Erreger von Zelle zu Zelle beteiligt, während von der Zelle freigesetzte Viren die Ausbreitung im infizierten Organismus ermöglichen.

Die ersten Schritte der Infektion von Zellen wie die Adsorption und die Aufnahme in die Zelle sind bisher nicht ausreichend gut verstanden. Reife Viruspartikel (*mature virus*, MV) adsorbieren an die Zellmembran, und die Virusmembran fusioniert mit der Zellmembran unter Freisetzung des Virus-Cores [8, 9]. Das komplex aufgebaute Viruspartikel enthält bereits eine Reihe von viralen Enzymen und regulatorischen Proteinen, die für die ersten Schritte der Virusvermehrung notwendig sind. Eines dieser Proteine ist an der Abschaltung der zelleigenen DNA- und RNA-Synthese beteiligt. Während der Replikation werden verschiedene Enzyme und regulatorische sowie Virusstrukturproteine in koordinierter Weise exprimiert. Schon im Virus-Core beginnt nach der Infektion der Zelle die Transkription der frühen (*early*) Gene durch die im Viruspartikel vorhandene virale DNA-abhängige RNA-Polymerase. Nach der Replikation des Virusgenoms durch virale DNA-abhängige DNA-Polymerasen erfolgt die Synthese der mittleren (*intermediate*) und der späten (*late*) Gene [10]. Die DNA-Replikation läuft innerhalb von 6 Stunden ab, wobei bis zu 10.000 neue

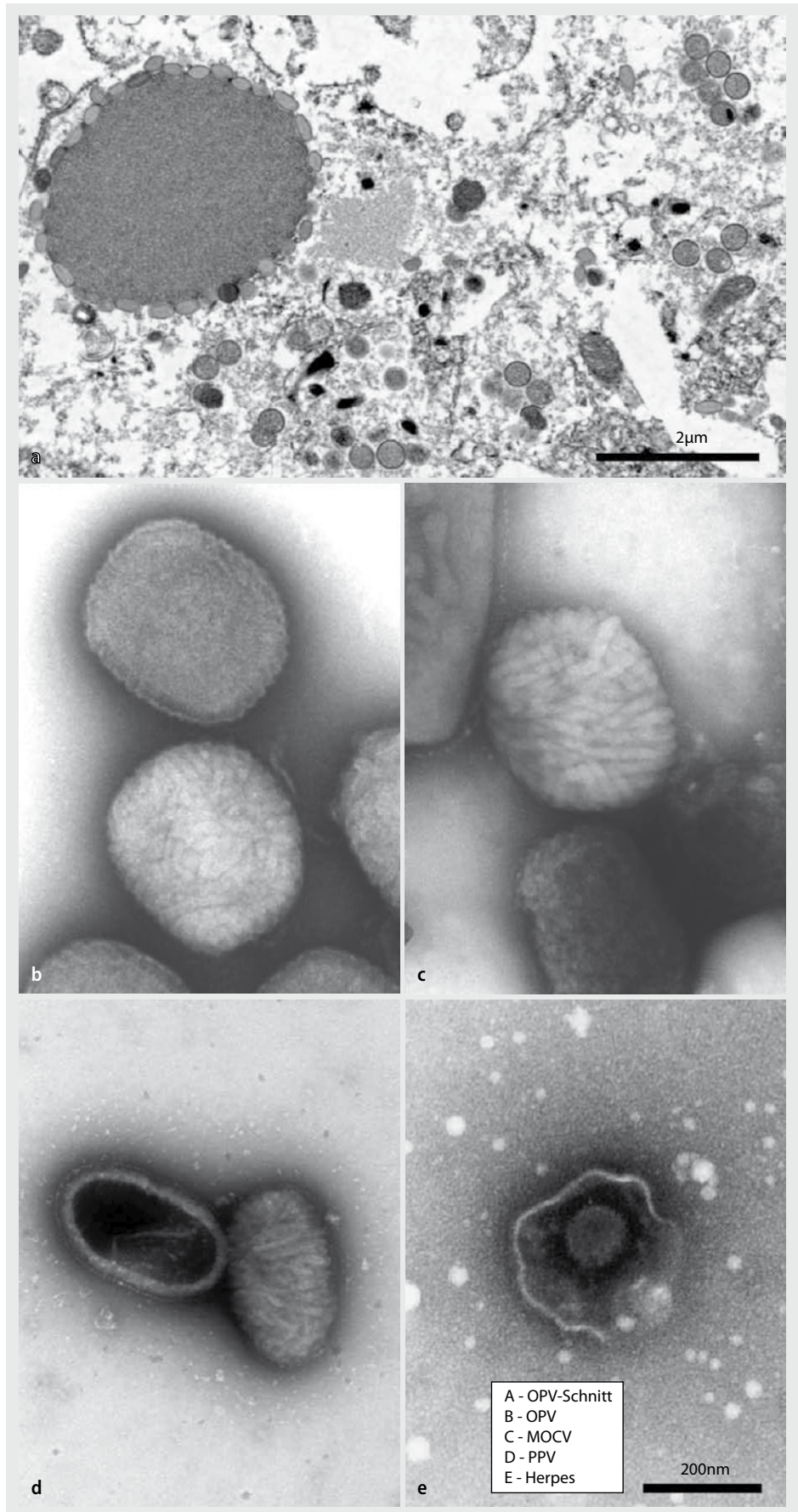
Kopien pro infizierter Zelle gebildet werden.

Der Zusammenbau von Vacciniavirus-(VACV)-Partikeln erfolgt in elektronenmikroskopisch gut erkennbaren elektronendichten Bereichen des Zytoplasma (Abb. 1). Es bilden sich kugelförmige elektronendichte Partikel mit einer Lipidmembran (IEM). Diese Partikel werden dann in die Peripherie der Zelle transportiert, wo sie zwei weitere Lipidhüllen erhalten (IEV). Nach Verschmelzen der äußeren Virushüllmembran mit der Zellmembran werden die Viruspartikel ausgeschleust, und es bilden sich die mit einer Doppelmembran behüllten zellassozierten CEV und die zellfreien EEV.

Pockenviren kodieren für eine Vielzahl verschiedener Proteine, die als Antagonisten der Zytokine an der Immunabwehr von Pathogenen beteiligt sind. Diese viralen Proteine sind wichtige Faktoren für die Pathogenese [11, 12]. Man kann dabei prinzipiell drei verschiedene Aktivitäten unterscheiden: viruskodierte Homologe von zellulären Chemokinrezeptoren, viruskodierte Homologe von zellulären Chemokinen sowie viruskodierte Chemokin-bindende Proteine. Die verschiedenen Pockenviren haben dabei unterschiedliche Strategien ausgebildet, die durch die Ko-Evolution der Viren und der Wirte bedingt sein kann.

Unter den Pockenviren wurden bisher Vertreter des Genus OPV am genauesten untersucht, und daher stehen für diese Viren die umfangreichsten Daten zur Verfügung. OPV sind in Krusten und Sekreten sehr stabil und können über längere Zeit in der Umwelt infektiös bleiben [13]. In Aerosolen sind humane Pockenviren relativ umweltresistent und können in Abhängigkeit von der Umgebungstemperatur und Luftfeuchte 24 h lang überleben [14, 15]. In der Literatur sind Untersuchungen zur Stabilität von OPV in Krusten beschrieben. Variolavirus überlebte temperatur- und feuchtigkeitsabhängig in Krusten mehrere Wochen (3 Wochen bei 35°C und 65–68% Luftfeuchte, 8 Wochen bei 25,8–26,4°C und 85–90% Luftfeuchte, 12 Wochen bei 25,8–26,4°C und <10% Luftfeuchte

**Abb. 1 ▶ A.** Elektronenmikroskopie: Ultradünnschnitt durch eine Orthopockenvirus(OPV)-infizierte Zelle. Das Zytoplasma zeigt links oben eine elektronendichte „Virusfabrik“, an deren Oberfläche sich Viruspartikel ansammeln, darüber hinaus auch verstreut weitere runde, unreife Partikel mit einer gut zu erkennenden elektronendichten Hülle, die stellenweise auch noch nicht geschlossen ist. **B – E.** Elektronenmikroskopie: diagnostische Negativkontrastierung von Pocken- und Herpesviren. **B.** Zwei quaderförmige OPV-Partikeln mit typischer, gut erkennbarer Oberflächenstruktur. Das obere Teilchen ist vom Kontrastmittel penetriert. Damit wird seine Wandstruktur sichtbar, während das untere Virion ausschließlich seine „Beeren“-förmige Oberfläche zeigt (Capsid-Form versus Mulberry-Form beim unteren Teilchen). **C.** Molluscum contagiosum Virus-(MOCV-)Partikel ähneln den OPV-Partikeln in Größe und Form, zeigen aber eine etwas andere Oberflächenstruktur, die zur Differenzierung genutzt werden kann. **D.** Parapockenviren (PPV mit dem Orfvirus als Prototyp) sind ovoid, zeigen längere, zum Teil parallel umlaufende Oberflächenstrukturen und sind deutlich kleiner als OPV. **E.** Herpesvirus aus einem diagnostischen Exsudat: das regelmäßige Kapsid von 100 nm Durchmesser ist noch von den Resten der Viruslipidhülle umgeben. EM-Aufnahmen und Zusammenstellung der Bilder erfolgten durch Herrn Dr. Andreas Kurth; Robert Koch-Institut, Berlin.



[16]). In weiteren Arbeiten wurde gezeigt, dass VARV aus getrockneten und dunkel aufbewahrten Krusten, die von Pockenkranken gewonnen worden waren, sogar noch nach mehr als einem Jahr [17] beziehungsweise bis zu 13 Jahren [18] reisoliert werden konnte. Berechnungen ergaben, dass unter diesen Versuchsbedingungen der Titer in den Krusten nach etwa 3.000 Tagen nur um den Faktor 100 abgesunken war [15]. Aufgetrocknet auf Objektträger gelang der Nachweis von infektiösem VARV noch nach etwa 3 Monaten [17].

In umfangreichen Untersuchungen testeten Tanabe und Hotta [19] die Wirkung von Desinfektionsmitteln auf VARV und VACV. Als Beispiele seien nur wenige üblicherweise verwandte Desinfektionsmittel genannt: innerhalb einer Minute wurde VARV durch 50%–70% Ethanol beziehungsweise 40%–50% Isopropanol, 0,1–2% Natriumhypochlorit oder 1% Formaldehyd bis unter die Nachweisgrenze inaktiviert (Reduktionsfaktor  $\geq 10^6$ ).

In nicht stabilisierten Virussuspensionen wurde VACV innerhalb einer 15-minütigen Aufwärmperiode auf 65°C vollständig inaktiviert [20]. Eine hohe Stabilität in Lebensmitteln und in der Umwelt wurde auch für VACV gezeigt [21].

## 1.2 Infektion und Infektionskrankheiten

### Menschenpocken (Smallpox virus; Variola virus, VARV)

Prinzipiell unterscheidet man zwei verschiedene Verlaufsformen bei Pockenerkrankungen, die durch Infektion mit Variola major-Virus beziehungsweise Variola minor-Virus (auch unter dem Namen Alastrimvirus bekannt) hervorgerufen werden. Infektionen mit Variola major-Virus waren durch einen heftigen Krankheitsverlauf und einen hohen Prozentsatz (20–50%) mit letalem Ausgang gekennzeichnet, während Infektionen mit dem Variola minor-Virus milder verliefen und lediglich eine Mortalität von zirka 1% beobachtet wurde.

Die Übertragung des Menschenpockenvirus erfolgt in der Regel über

Kontakt mit Tröpfchen oder Aerosolen. Daher infizierte das Virus zuerst Zellen im Nasen-Rachenraum beziehungsweise in der Mukosa des Respirationstraktes. Epidemiologische Untersuchungen belegen, dass nur wenige infektiöse Partikel notwendig waren, um eine Infektion auszulösen. Die weitere Vermehrung des Virus erfolgte in den regionalen Lymphknoten, gefolgt von der ersten Virämiephase am 3.–4. Tag nach Infektion, die weitgehend asymptomatisch verlief. Das Virus befiel dann vor allem lymphatische Organe wie Milz, Lymphknoten und Knochenmark. Die zweite Virämie begann etwa am 8. Tag nach Infektion, wobei infizierte Leukozyten das Virus in die Peripherie transportierten, und dort wurden vor allem Zellen der kleinen Blutgefäße in der Haut und in den Schleimhäuten infiziert. Etwa am 12.–14. Tag nach Infektion entwickelten die Infizierten hohes Fieber mit Unwohlsein und Zeichen extremer Erschöpfung mit Kopf- und Rückenschmerzen. Es bildete sich ein makulopapulöses Erythem (*macula*) auf der Mukosa des Mundes und des Rachens, das sich über das Gesicht und die Unterarme und anschließend auf den Rumpf und die Beine ausbreitete. Aus dem Exanthem entwickelten sich etwa am 8.–9. Tag nach Auftreten des Ausschlages Vesikel (*papula*) und anschließend Pusteln (*pustula*). Die Pusteln waren üblicherweise rund und tief in die Haut eingebettet. Es bildeten sich Krusten (*crusta*), die während der Genesungsphase unter Narbenbildung ausheilten.

Durch die ulzerierenden Läsionen im Mund- und Rachenraum wurden große Mengen an Virus in den Speichel freigesetzt. Da dies in der 1. Woche der klinischen Erkrankung erfolgte, waren diese Patienten in dieser Zeit besonders infektiös. Ein Teil der Patienten starb etwa in der 2. Krankheitswoche durch toxische Reaktionen (Zytokinsturm), hervorgerufen durch zirkulierende Immunkomplexe und virale Proteine. Als Komplikation, oder auch als seltene Folge einer Impfung mit Vacciniavirus, konnte eine Enzephalitis auftreten, die vergleichbar ist mit der perivaskulären Demyelinisierung bei schweren Ver-

läufen der Masern beziehungsweise Windpocken. Zwei Formen der Pockenvirusinfektion verliefen in der Regel tödlich: die hämorrhagischen und die malignen Pocken. Inwieweit dies auf eine unterschiedliche Virulenz von VARV-Stämmen zurückzuführen ist, ist unklar.

### Affenpocken (Monkeypox virus, MPXV)

Seit Ausrottung der Menschenpocken sind Affenpocken (MPXV) die bedeutendste OPV-Infektion beim Menschen. Affenpocken wurden erstmals 1958 bei Versuchsaffen in Kopenhagen [22] beobachtet und Infektionen beim Menschen erstmals 1970 beschrieben. Affenpocken sind bisher eine seltene, sporadisch auftretende Krankheit beim Menschen. Als Reservoir für diese OPV-Spezies werden afrikanische Erdhörnchen und Nagetiere angesehen; Affenpocken beim Menschen stellen somit eine Zoonose dar [23, 24].

Vergleichbar zu den Menschenpocken beträgt die Inkubationszeit bei den Affenpocken des Menschen 10–14 Tage. Auch vom klinischen Bild her ähneln Affenpocken den Menschenpocken. Die Erkrankten sind in der ersten Woche des Auftretens des Erythems infektiös. Etwa 2 Tage vor Auftreten des Hautausschlags tritt wie bei den Menschenpocken eine Prodromalphase mit Fieber und Unwohlsein auf. Im Gegensatz zu den Menschenpocken beobachtet man bei der überwiegenden Zahl von Patienten mit einer MPXV-Infektion eine ausgeprägte unilaterale oder bilaterale Lymphadenopathie, die verschiedene Lymphknoten betreffen kann. Der weitere Verlauf ist ähnlich wie bei Menschenpocken, wobei sich das typische Erythem zentrifugal ausbreitet. Bisher wurden bei Erkrankungen durch Affenpocken keine hämorrhagischen Verläufe beobachtet [24, 25].

### Kuhpockeninfektionen (Cowpox virus; CPXV)

Infektionen beim Menschen erfolgen in den meisten Fällen über Hautläsionen durch direkten Kontakt mit infektiösem Gewebe oder Sekreten von Katzen oder infizierten Ratten [26, 27, 28, 29]. An

der Infektionsstelle bilden sich nach 7–12 Tagen Papeln, die sich zu Vesikeln und anschließend zu schmerzhaften hämorrhagischen Pusteln und schwarzen Krusten entwickeln, häufig an der Hand, der Schulter oder im Gesicht. Infizierte Personen zeigen Grippe-ähnliche Symptome, Übelkeit und Muskelschmerzen. In der Regel treten die Läsionen zwar lokal begrenzt auf, es wird aber auch über schwere Verläufe berichtet, die eine Hospitalisierung der Patienten erfordern [27, 30]. Aber auch Infektionen im Bereich der Augen wurden beschrieben, die vermutlich durch Schmierinfektionen hervorgerufen wurden. Oft beobachtet man eine Lymphadenopathie der regionalen Lymphknoten. Nach etwa 6–8 Wochen trocknen die Pusteln/Krusten ab, wobei Narben zurückbleiben können.

Obwohl bei einigen Patienten, die sich mit CPXV infiziert haben, nur lokale Symptome beobachtet wurden, gelang der Nachweis einer Virämie durch quantitative PCR im Blut. Dies war unerwartet, da bei Personen nach Impfungen mit Vacciniavirus in der Regel ebenfalls nur lokale Reaktionen auftreten und keine Virämie beobachtet werden konnte [31].

Bei Immunsupprimierten und bei Patienten mit gestörter lokaler zellulärer Immunantwort kann es zu generalisierten Exanthenen und schweren systemischen, letalen Erkrankungen kommen, die einer VARV-Infektion ähnlich sind. Einen Todesfall gab es 1991 bei einem Asthma-Patienten unter immunsuppressiver Therapie [32, 33].

### Vacciniavirus

Vacciniaviren wurden als Impfvirus zur Prophylaxe gegen Menschenpocken und während der Eradikationskampagne bis zur Ausrottung der Menschenpocken durch die WHO [4, 34] weltweit zur Impfung beim Menschen eingesetzt. Die Impfung führt in der Regel zu einer lokalen Impfreaktion, die auch als Marker für eine erfolgreiche Impfung angesehen wird. Es können jedoch auch selten signifikante Nebenwirkungen auftreten, unter anderem die generalisierte Vaccinia, bakterielle Kontaminationen mit nachfolgenden bakteriellen In-

fektionen, das Ekzema vaccinatum sowie die Vaccinia gangraenosum. Sehr selten treten die Impfenzephalitis (1 in 100.000) beziehungsweise Todesfälle (1 in 1 Million) auf. Kontrovers wird im Zusammenhang mit der Impfung die Frage der Virämie diskutiert. Während berichtet wurde, dass Virusgenome im Blut nur bei Geimpften mit erheblichen Nebenwirkungen nachweisbar sind, berichten andere Arbeitsgruppen, dass mit empfindlichen Nachweismethoden (PCR) virale Genome bei einem Teil der Geimpften bis etwa drei Wochen nach Impfung im Blut nachgewiesen werden können, jedoch kein infektiöses Virus isoliert werden kann [35, 36].

Bedingt durch die erheblichen Nebenwirkungen der klassischen Impfstoffe wurde nach dem 11. September 2001 verstärkt die Impfstoffentwicklung mit attenuierten Vacciniaviren, wie zum Beispiel Modified Vacciniavirus Ankara (MVA) und LC16m8, vorangetrieben. Diese sogenannten Impfstoffe der dritten Generation können eine gute Immunantwort induzieren und im Tierexperiment einen hohen Schutz gegen eine Belastungsinfektion mit hochpathogenen OPV erreichen, andererseits können die Nebenwirkungen herkömmlicher Impfstoffe weitgehend ausgeschlossen werden [37, 38, 39, 40, 41, 42]. In Japan wurde LC16m8 kürzlich durch die Landesbehörde als Impfstoff zugelassen.

### Erkrankungen durch andere Pockenvirus-Spezies

In der Regel verlaufen Infektionen mit anderen Pockenviren gutartig und die klinischen Symptome bleiben auf die Infektionsstelle beschränkt. Aus Gründen der Praktikabilität wird auf diese Erkrankungen im epidemiologischen Teil kurz eingegangen.

### 1.3 Epidemiologie

#### Menschenpocken (Smallpox virus, Variola virus, VARV)

Die Infektionskette bei Pockenviren wird im Wesentlichen durch Mensch-zu-Mensch-Übertragungen aufrecht erhalten. Hauptübertragungsvehikel sind dabei Tröpfchen und Aerosole, die

infizierte Personen bereits kurz vor Beginn der symptomatischen Phase aushusten. Kontaminierte Kleidung und Bettwäsche haben teilweise zur Weiterverbreitung des Erregers beitragen.

Eine Unterscheidung der beiden Krankheitsformen Variola major beziehungsweise minor wurde nur anhand epidemiologischer Daten bei Ausbrüchen durchgeführt. Variola minor (Alastrim) wurde erstmals Ende des 19. Jahrhunderts in Südafrika beobachtet, tauchte später in Florida auf und breitete sich anschließend in den USA, in Lateinamerika und Europa aus. Der Krankheitsverlauf der Variola minor war milde und die Todesrate wird mit etwa 1% oder niedriger angegeben. Die typischen Menschenpocken, Variola major, hingegen sind seit mehreren tausend Jahren in Asien bekannt und verliefen in der Regel schwer mit einer Todesrate bis etwa 30%. In Europa sind Pockenvirusepidemien etwa im 6. Jahrhundert erstmals historisch belegt. Es ist zu bemerken, dass im Vergleich zu anderen viralen Infektionen wie Masern und Influenza eine Übertragung der Pockenerreger erst bei Auftreten klinischer Symptome (etwa 14–17 Tage nach Infektion) erfolgte. Folglich waren bei Pockenausbrüchen häufig nur Haushaltsmitglieder, Pflegepersonal oder andere Personen mit engem Kontakt zu Pockenerkrankten betroffen.

Der letzte Fall einer natürlichen Pockeninfektion wurde 1977 aus Somalia berichtet. Aufregung erzeugte dann 1978 die tödlich verlaufende Infektion einer Fotografin in Birmingham, die in einem Institut arbeitete, das über Pockenviren forschte [2, 3]. Diese Patientin übertrug zudem das Pockenvirus auf ihre Mutter. Über welchen Infektionsweg sich die Fotografin infizierte, konnte nicht mit Sicherheit festgestellt werden.

In Anbetracht der Gefahr, dass VARV-Infektionen in Laboratorien stattfinden und sogar aus den Bereichen herausgetragen werden können, veranlasste die WHO und die nationalen Behörden, alle Pockenviren zu vernichten oder diese an die von der WHO benannten Collaborating Centres in den USA beziehungsweise vormaligen UdSSR (jetzt Russland) abzugeben [43]. Seit 1984

lagern die bekannten Variola-Virusisolate in den Centers for Disease Control and Prevention (CDC) in Atlanta und am Research Institute of Viral Preparations in Moskau, von wo sie im Jahre 1994 zum State Research Center of Virology and Biotechnology (The Vector Institute) in Koltsovo (Region Novosibirsk, Russland) verlagert wurden. Forschungsprojekte mit lebenden Viren oder Variola-Genomen beziehungsweise Variola-Genen werden seit Beginn der 1990er-Jahre des letzten Jahrhunderts durch ein Expertenkomitee der WHO (WHO Advisory Committee on Variola Virus Research; <http://www.who.int/csr/disease/smallpox/research/en/index.html>) begutachtet und entweder empfohlen, mit Auflagen versehen oder abgelehnt. Unter anderem dürfen für wissenschaftliche Untersuchungen außerhalb der Collaborating Centres höchstens 20 % des Gesamtgenoms eingesetzt werden (<http://www.who.int/csr/disease/smallpox/SummaryrecommendationsMay08.pdf>). Eine weitere Auflage ist, dass ohne Genehmigung der WHO niemandem erlaubt ist, mehr als 500 Basen einer VARV-Sequenz zu synthetisieren oder anders herzustellen, zudem müssen diese Arbeiten streng von Arbeiten mit anderen OPV-Spezies getrennt sein.

### **Affenpocken (Monkeypox virus, MPXV)**

Erkrankungen und kleinere Ausbrüche wurden hauptsächlich in den tropischen Regenwäldern Zentral- und Westafrikas (Sierra Leone, Zentral-Afrikanische Republik Kongo, Liberia, Elfenbeinküste, Kamerun, Nigeria, Gabun) beobachtet. Größere Ausbrüche wurden bisher nur in der Demokratischen Republik Kongo beschrieben. Epidemiologische Untersuchungen von MPXV-Infektionen in den 1980er-Jahren zeigten eine Todesrate von 17 % bei Primärinfektionen des Menschen und eine Übertragungsrate von 9 % (Sekundärinfektionen) [44, 45]. Die längste dabei beobachtete Infektionskette umfasste fünf [46] beziehungsweise sechs Übertragungen [47]. Seroepidemiologische Untersuchungen weisen darauf hin, dass in den Regionen, in denen Affenpockenerkrankungen auftreten, eine erhöhte Seroprävalenz

gegen OPV gefunden wird, was darauf hinweist, dass nicht erkannte Infektionen mit OPV beziehungsweise MPXV stattfinden.

Im Juni 2003 wurden erstmals Affenpockenvirusinfektionen bei Menschen in den USA diagnostiziert [48]. Tierhändler importierten MPXV durch infizierte afrikanische Nagetiere wie zum Beispiel Hamsterratten aus Gambia in die USA, und in den Tierhandlungen wurde das Virus auf Präriehunde übertragen. Als Folge des Tierhandels wurden infizierte Präriehunde auf verschiedene Bundesstaaten verteilt und infizierten nachfolgend mehr als 70 Personen (Tierpfleger und Käufer). Der Verlauf der Erkrankungen war im Vergleich zu Erkrankungen mit Affenpocken in Afrika milde, und alle Erkrankten überwand die Infektion, was als Hinweis auf unterschiedlich virulente Virusstämme angesehen wird.

In Europa (Niederlande, Dänemark, Frankreich) wurde das Affenpocken-Virus ausschließlich bei importierten Affen beobachtet [49].

### **Kuhpocken (Cowpox virus, CPXV)**

Kuhpockenviren wurden bisher nur in Europa und den angrenzenden Westasiatischen Ländern, aber auch in Ägypten nachgewiesen [50, 51]. Als Reservoir dienen Nagetiere wie Mäuse, Wühlmäuse und Ratten. Kuhpocken stellten lange Zeit ein Problem in der Milchviehzucht dar. Da Läsionen hauptsächlich an den Zitzen auftraten, breitete sich der Erreger durch das Melken schnell in einem Bestand aus. In Deutschland und anderen europäischen Ländern wurden in den letzten Jahrzehnten keine CPXV-Infektionen mehr bei Rindern beschrieben [31]. Dafür beobachtet man zunehmend Erkrankungen an Kuhpocken bei Katzen, die das Virus dann auch auf den Menschen übertragen können, weshalb man in diesen Fällen auch von „Katzenpocken“ spricht [52]. Katzen infizieren sich vermutlich bei der Jagd auf (infizierte) Mäuse und bei deren Verzehr. Aus den Niederlanden ist auch ein Übergang von einer Ratte auf ein Mädchen dokumentiert, und kürzlich konnten mehrere Übertragungen durch

als Haustiere gehaltene Ratten auf deren Besitzer unter anderem in Deutschland und Frankreich nachgewiesen werden (<http://hygimia69.blogspot.com/2009/02/ecdc-risk-assessment-cowpox-in-germany.html>) [53, 54, 55].

Kuhpocken haben ein breites Wirtsspektrum, und letale CPXV-Infektionen wurden in einer Vielzahl von Tieren nachgewiesen. Neben den oben beschriebenen Tierspezies hat man zum Beispiel Ausbrüche in Zoologischen Gärten beschrieben, in denen eine Vielzahl verschiedener Tierarten betroffen waren, unter anderem Großkatzen und andere Katzenartige, Elefant, Rhinoceros, Okapi und Ameisenbär [29, 56]. Zudem wurden in den letzten Jahren Übertragungen von CPXV in Freigehegen auf Alt- und Neuweltaffen berichtet [57, 58]. In allen Fällen wird als Infektionsquelle der direkte oder indirekte Kontakt der Primaten mit Nagetieren angenommen.

Die genetische Analyse von CPXV zeigt, dass diese Viren im Gegensatz zu VARV, MPXV, CMXV (Kamelpockenviren) und ETCV (Mäusepockenviren) nicht eine eng verwandte Spezies darstellen, sondern eine für OPV hohe genetische Variabilität aufweisen und in verschiedene, phylogenetisch getrennte Gruppen eingeteilt werden können. Zu bemerken ist, dass diese Eingruppierung teilweise abhängig von dem untersuchten Genombereich ist [57, 59, 60]. Es gibt bisher keine vergleichenden Untersuchungen zum Pathopotenzial der verschiedenen CPXV-Isolate; die hohe Variabilität der Kuhpocken und die Vielzahl von CPXV-Erkrankungen von verschiedenen Tierspezies lassen die Frage offen, inwieweit Pathogenitätsunterschiede bestehen. In diesem Zusammenhang ist zu erwähnen, dass CPXV, die nach einem Ausbruch bei Neuweltaffen in einem privaten Zoo in Deutschland isoliert wurden, letal verlaufende Infektionen bei Marmosets (*Callithrix jacchus*) auslösten, jedoch in der Maus nicht pathogen zu sein scheinen [57, 61].

Kuhpocken können ebenso wie Affenpocken als eine Emerging beziehungsweise Re-Emerging Disease angesehen werden; es wird daher diskutiert, dass deren zunehmendes Auftreten die Entwicklung

von sicheren OPV-Impfstoffen und von Chemotherapeutika rechtfertigt.

In der Tat steigt die Anzahl der beschriebenen CPXV-Infektionen beim Menschen in Deutschland in den letzten Jahren an. Unklar ist, ob dies primär auf eine gesteigerte Aufmerksamkeit der Ärzte zurückzuführen ist oder auf eine sinkende Immunität gegen die Viren, nachdem in den 1970er-Jahren die Impfung gegen humane Pocken eingestellt wurde. Die Erkrankung und der Nachweis von CPXV beim Menschen sind derzeit nicht meldepflichtig.

### Vacciniavirus und verwandte Erreger

Vacciniaviren dienen als Prototyp im Genus OPV und wurden zur Impfung gegen Menschenpocken eingesetzt. VACV weisen ein breites Wirtsspektrum auf und können eine Vielzahl von Säugetieren infizieren und zu schweren Erkrankungen führen, so wurde berichtet, dass Elefanten im Zoo durch frisch geimpfte Personen infiziert wurden. Die Herkunft der zur Impfung verwendeten VACV ist unbekannt, und es konnte bisher kein Tierreservoir für diese Viren beschrieben werden. Durch phylogenetische Sequenzanalysen konnte jedoch gezeigt werden, dass VACV eine enge Verwandtschaft zu anderen Spezies des Genus OPV hat wie zum Beispiel dem Pferdepockenvirus und den Büffelpockenviren. Da zu den CPXV eine geringere Verwandtschaft besteht, wird diskutiert, ob das Pferdepockenvirus den Ursprung für VACV darstellt.

VACV und Derivate werden nicht nur für die Impfung gegen VARV verwendet, sondern dienen als Vektor in der Molekularbiologie und als Ausgang für die Entwicklung von modernen Impfstoffen gegen Infektionserreger, aber auch in der Krebstherapie [62, 63, 64]. Laborinfektionen mit VACV bei nicht-immunisierten Personen werden gelegentlich berichtet [65, 66].

VACV-ähnliche Viren stellen insbesondere in Indien und Brasilien nicht nur in der Landwirtschaft, sondern auch für Menschen, die engen Kontakt zu Büffeln und Milchkühen haben, ein gesundheitliches Problem dar. In Brasilien wurden in den letzten

Jahrzehnten zunehmend Infektionen mit VACV-ähnlichen Isolaten bei Milchkühen sowie Melkern und Bauern beobachtet [67, 68], was ein erhebliches Problem sowohl für die Betroffenen als auch für das Umfeld darstellt, insbesondere in der Milchwirtschaft. Infizierte entwickeln Hautläsionen in Form von Vesikeln, hauptsächlich an den Händen, Armen und im Gesicht, sowie Erytheme. Weitere klinische Zeichen waren unter anderem Fieber, Kopfschmerzen, Schweißausbrüche und vergrößerte axilläre Lymphknoten [69]. Die klinischen Symptome weisen darauf hin, dass zumindest bei einem Teil der Patienten eine virämische Phase auftritt.

Bereits in den 1960er-Jahren wurden VACV-ähnliche Viren isoliert und heute als Erreger mit einem erheblichen zoonotischen Potenzial charakterisiert [67, 68, 70, 71]. Die brasilianischen Isolate wurden im Genus OPV unter der Speziesbezeichnung BRZ-VACV beziehungsweise BR-VACV zusammengefasst. Phylogenetische Analysen zeigen, dass sich die bisherigen brasilianischen Isolate in zwei voneinander abtrennbare Clades eingruppiert lassen. Nagetiere werden als Reservoir für diese Erreger angesehen, da vergleichbare Viren aus Ratten und Mäusen isoliert werden konnten und eine hohe Seroprävalenz in Nagern nachgewiesen wurde. Der Ursprung der BRZ-VACV ist jedoch unbekannt und wird diskutiert. Einerseits weist die enge phylogenetische Verwandtschaft der Isolate mit Impfviren darauf hin, dass es sich bei BRZ-VACV um Impfviren handelt, die sich in der Natur zum Beispiel in der Nagerpopulation landesweit ausgebreitet haben. Wann VACV in die Nager gelangte und ob es multiple Eintragungen gab, ist unklar. Es wird sogar diskutiert, dass sich die ersten Impfviren, die Anfang des 19. Jahrhunderts mit Sklaven, die das Impfvirus durch Arm-zu-Arm-Passage aus Portugal nach Brasilien brachten, in der Natur ausbreiteten, ebenso wie die nachfolgend nach Brasilien importierten unterschiedlichen VACV. Dies könnte die unterschiedliche phylogenetische Zuordnung der BRZ-VACV-Isolate erklären [67].

**Büffelpocken (Buffalopox virus; BPXV).** Büffelpocken wurden erstmals 1934 beschrieben. Ausbrüche bei Tieren und Menschen, die auf Infektionen durch Büffelpockenvirus zurückzuführen sind, werden aus Regionen berichtet, in denen asiatische Büffel (*Bubalus bubalis*) als Milchvieh gehalten werden wie in Indien, Pakistan, Indonesien und Ägypten, insbesondere seit der Ausrottung von Menschenpocken [72]. BPXV stellen für die Milchproduktion in der Landwirtschaft ein großes Problem dar. Menschen können sich über den Kontakt zu erkrankten Tieren infizieren. Krankheitssymptome sind in der Regel vergleichbar zu Infektionen mit CPXV. BPXV ist jedoch eng verwandt mit VACV, und es wurde vorgeschlagen, BPXV als einen selbständigen Clade in die Spezies VACV zu gruppieren. Es wird angenommen, dass sich Büffel über VACV-vakzinierter Menschen infiziert haben und das Virus seither in der Büffelpopulation zirkuliert. Es gibt jedoch auch Vermutungen, dass originäre BPXV existieren, die mit VACV eng verwandt sind [72, 73].

Kürzlich wurde auch über nosokomiale Infektionen mit BPXV in Pakistan berichtet, was einerseits auf die hohe Stabilität des Erregers zurückzuführen ist, andererseits jedoch auch die Möglichkeit der Mensch-zu-Mensch-Übertragung belegt [74].

**Pferdepockenvirus (Horsepox virus; HSPV).** Phylogenetische Untersuchungen an einem Pferdepockenvirus-Isolat (Horsepox virus; HSPV) aus der Mongolei zeigen eine enge Verwandtschaft zwischen HSPV und VACV. Es wird daher diskutiert, ob VACV, das zur Vakzinierung von Menschen verwendet wird, ursprünglich ein Pferdepockenvirus ist und nicht von Pocken des Rindes abstammt [75, 76].

**Kaninchenpockenviren (Rabbitpox virus; RPV).** Kaninchenpockenviren wurden von erkrankten Tieren einer Kaninchenzucht in den Niederlanden isoliert und können als Tiermodell für Menschenpocken dienen [77]. RPV ist phylogenetisch eng verwandt mit VACV, und es wird auch hier diskutiert, dass



es sich bei dem Pockenvirus-Isolat aus Kaninchen um eine unbeabsichtigte Übertragung von VACV auf Labortiere handeln kann [78].

### **Parapocken (Prototyp Orf-Virus).**

Parapockenviren (PPV) verursachen beim Menschen Krankheitsbilder, die von lokalen OPV-Infektionen nicht zu unterscheiden sind. Das Orf-Virus des Schafes und der Ziege ist der Prototyp im Genus PPV; das Bovine Stomatitisvirus und das Pseudokuhpockenvirus (Melkerknoten) werden durch direkten Kontakt von infizierten Rindern auf den Menschen übertragen [75, 79]. Es gibt keine verlässlichen Daten über die Verbreitung von PPV, Ausbrüche bei Schafen und Ziegen sowie Rindern wurden weltweit berichtet. Die Infektion erfolgt in der Regel über Hautläsionen bei Kontakt zu infizierten Tieren. Nach 3 – 7 Tagen Inkubation bilden sich, meist an den Händen, Papeln, gefolgt von Vesikeln und schließlich warzenähnlichen Knötchen. Diese bilden sich nach 3–4 Wochen zurück. Die Differenzierung zwischen PPV und OPV kann elektronenmikroskopisch erfolgen (▣ Abb. 1), in den vergangenen Jahren wurde jedoch zunehmend auch über molekulare Nukleinsäure-Nachweismethoden berichtet [80, 81, 82]. PPV wurden von weiteren Tierarten isoliert: von Rotwild in Neuseeland, finnischen Rentieren, Eichhörnchen im Vereinigten Königreich und Seehunden in der Nordsee.

### **Molluscum contagiosum (Molluscum contagiosum virus; MOCV).**

Molluscum contagiosum tritt weltweit auf. Es handelt sich um selbstlimitierende Wucherungen der Epidermis, die als kleine hellrote, perlenartige Knötchen überall am Körper auftreten können und durch das MOCV hervorgerufen werden. MOCV infiziert ausschließlich Menschen. Eine Häufung wird dabei im Frühjahr und im Herbst beobachtet. Betroffen sind üblicherweise Kinder. Die Übertragung erfolgt durch direkten Kontakt oder indirekt über kontaminierte Materialien. Bei jungen Erwachsenen kann die Übertragung durch sexuelle Kontakte stattfinden. Im Prinzip führt MOCV zu einer

dauerhaften Immunität, die jedoch bei Immunsuppression durchbrochen werden kann, weswegen Immunsupprimierte und auch HIV-Infizierte häufiger durch MOCV-Infektionen betroffen sind [83, 84, 85]. Die Diagnose wird meist klinisch und histologisch gestellt. Elektronenmikroskopisch lassen sich MOCV von anderen Pockenviren und Herpesviren unterscheiden (▣ Abb. 1). Für die Differentialdiagnostik und die Subtypisierung von MOCV können PCR und Sequenzanalyse eingesetzt werden [81, 86].

### **Yaba monkey tumor virus (YMTV) und Tanapockenviren (TANV).**

Yaba monkey tumor virus und Tanapockenviren stellen einen eigenen Genus in der Familie der Pockenviren dar und werden zum Genus Yatapockenviren zusammengefasst. Das Verbreitungsgebiet ist Zentralafrika [87, 88, 89]. Beide Viren haben einen vergleichbaren Wirtsbereich und können nur auf Primatenzellen vermehrt werden [88]. Infektionen mit TANV können ähnlich wie eine milde MPXV-ähnliche Infektion der Primaten einschließlich des Menschen verlaufen [90]. TANV verursacht in Zentralafrika gelegentlich Infektionen bei Menschen und es wird angenommen, dass die Übertragung durch beißende Insekten erfolgt. Über Infektionen bei Reisenden wurde berichtet [91, 92]. Über Infektionen des Menschen mit YMTV liegen keine Berichte vor. Das Reservoir von YMTV ist unbekannt.

## **1.4 Nachweismethoden und Aussagekraft**

Die Diagnostik und Differentialdiagnostik der Pockenviren erfolgte ursprünglich durch Verimpfung von klinischen Proben auf die Chorioallantoismembran embryonierter Hühnereier. Anhand der Anzuchtbarkeit der Viren auf der Chorioallantoismembran embryonierter Hühnereier bei bestimmten Temperaturen (*ceiling temperature*), der Pockenmorphologie und histologischer Untersuchungen konnten verschiedene OPV voneinander und insbesondere VARV von den anderen OPVs und von Herpesviren

differenziert werden. Diese Methode galt als Goldstandard der WHO während der Eradikationsphase. Heute erfolgt die Anzucht von OPV in der Regel in Zellkulturen, und das 11–13 Tage bebrütete Hühnerei wird nur noch in spezialisierten Laboratorien eingesetzt [81]. Infizierte Zellen lassen sich mit Antikörpern, zum Beispiel gerichtet gegen Vaccinia-Antigene, in der Immunfluoreszenz oder durch immunhistologische Färbung nachweisen.

### **Elektronenmikroskopie (EM)**

Die EM ermöglicht aus klinischen Proben mit Hilfe der Negativkontrastierung eine schnelle morphologische Differenzierung von Viren des Genus OPV zu anderen Erregern wie PPV- und Herpesviren, aber auch Bakterien wie *Bacillus anthracis*, die vergleichbare Läsionen wie Pusteln, Vesikel beziehungsweise Wundschorf (Krusten) auf der Haut induzieren können und dadurch differentialdiagnostisch abgeklärt werden können (▣ Abb. 1). Die EM-Diagnostik eignet sich daher für eine schnelle Primärdiagnostik, die eine Erreger-unabhängige morphologische Zuordnung von Erregern erlaubt (Diagnostik des offenen Blicks [93, 94]). OPV-Partikel sind im „negative staining“ quaderförmig, wohingegen PPV ovoid ist; beide Genera weisen in der Negativkontrastierung charakteristische Oberflächenstrukturen auf (▣ Abb. 1). Eine morphologische Differenzierung von MOCV zu OPV ist in erfahrenen EM-Laboratorien möglich (▣ Abb. 1). Eine Differenzierung der verschiedenen Spezies innerhalb des Genus OPV ist mit der EM nicht möglich, da alle OPV die gleichen morphologischen Eigenschaften aufweisen [81, 93, 95].

### **Serologie**

Der Nachweis einer OPV-Infektion kann mit Hilfe von serologischen Testmethoden geführt werden. Als geeignet haben sich dabei ELISA und Immunfluoreszenzverfahren erwiesen. Der Nachweis von OPV-spezifischen IgM ist ein Hinweis auf eine akute OPV-Infektion, die durch ein zweites, in einem Abstand von 10–14 Tagen gewonnenes Serum weiter abgeklärt werden kann [75, 81]. Eine Differenzierung der Immunantwort

gegen OPV-Spezies ist (bisher), bedingt durch die enge Antigenverwandtschaft innerhalb des Genus, nicht routinemäßig möglich. Aufwendige Prä-Adsorptionen von Seren mit Antigenen verschiedener OPV-Spezies und anschließende Untersuchung auf die Reaktivität in ELISA oder Immunfluoreszenztesten ermöglichen in begrenztem Umfang eine Differenzierung [96, 97].

Eine Differenzierung von neutralisierenden Antikörpern gegen verschiedene OPV-Spezies ist auf Grund der engen Antigenverwandtschaft ebenfalls nicht möglich. Der Neutralisationstest, meist unter Verwendung von Vacciniavirus als Zielvirus im Plaque-Reduktionstest, wird jedoch zur Verfolgung der Immunantwort nach der Impfung, zur Bestimmung des Immunstatus beziehungsweise als Bestätigungstest in der Serologie eingesetzt.

### Antigennachweis

Der Nachweis von OPV-Antigenen zum Beispiel in klinischen Proben (zum Beispiel Pusteln, Vesikeln, Krusten) ist in einigen spezialisierten Laboratorien mit Antigen-Capture-ELISA möglich [75, 81]. Kitamoto und Mitarbeiter [98] verwendeten monoklonale Antikörper im Immunoblot zum Nachweis von OPV-Antigenen. Antigennachweisteste sind weniger sensitiv als die PCR und ermöglichen zudem keine Differenzierung der OPV-Spezies.

### Zellkultur

Aus klinischen Proben von erkrankten Menschen können OPV in geeigneten Zellkulturen (Affenzellen beziehungsweise humanen Zellen) angezüchtet werden. Infizierte Zellen können in der Zellkultur mit charakterisierten polyklonalen und/oder auch OPV-spezifischen monoklonalen Antikörpern identifiziert werden [75, 81, 98]. Nach Anzucht kann eine Differenzierung der Virusspezies mit der PCR geführt werden und durch Sequenzanalyse eine phylogenetische Einordnung der Isolate erfolgen [80, 81].

### Nukleinsäurenachweis

Als besonders geeignet erwiesen haben sich Polymerase-Ketten-Reaktions-Methoden (PCR) zur Identifizierung und Differenzierung von verschiedenen OPV-Spezies sowie für die Differentialdiagnostik innerhalb der Poxviridae wie OPV, PPV und MOCV und zu anderen Viren wie Varizella Zoster- (VZV) und Herpes-Simplex-Virus (HSV), aber auch zu Bakterien wie *Bacillus anthracis* [81].

PCR-Teste in Kombination mit Restriktionsfragmentlängenanalyse erlauben eine Differenzierung von OPV [99]. In den letzten Jahren haben verschiedene Arbeitsgruppen Real-time-PCR-Verfahren veröffentlicht, die eine Identifizierung von OPV, aber auch eine Differenzierung der Spezies ermöglichen (Übersichtsartikel: [80, 81]).

Bedingt durch das hohe Bedrohungspotenzial, das Menschenpocken für die Bevölkerung darstellen, sind besondere Anforderungen an die Spezifität und Sensitivität der diagnostischen Methoden im Falle eines Verdachts zu stellen. Nach dem heutigen Kenntnisstand erfolgt eine Differenzierung von OPV-Spezies mit geeigneten Nukleinsäurenachweisverfahren einschließlich einer phylogenetischen Analyse. Die enge genetische Verwandtschaft der OPV erfordert eine besonders sorgfältige Validierung der Nachweisverfahren. In der Literatur sind verschiedene PCR- beziehungsweise Real-time-PCR-Methoden beschrieben, die einen verlässlichen Nachweis von VARV erlauben (Übersichtsartikel: [80, 81]). Die Real-time-PCR ermöglicht einerseits die Quantifizierung von viralen Genomen, andererseits können unter Verwendung von geeigneten Sonden Schmelzkurvenanalysen durchgeführt werden, die eine Differenzierung verschiedener OPV ermöglichen oder, im Falle des Verdachts auf das Vorliegen von VARV-Genomen in klinischen oder Umweltproben, dieses Virus ausschließen oder bestätigen [80, 81, 100, 101]. Prinzipiell wird empfohlen, für die molekularen Nachweisverfahren mehrere Genomregionen mit der PCR zu untersuchen und eine phylogenetische

Analyse nach Sequenzierung bestimmter Genombereiche durchzuführen, um eine zuverlässige Einordnung der Viren zu erzielen.

Die Isolierung von Pockenviren kann bei klinischen Proben zum Beispiel für molekularepidemiologische Untersuchungen nützlich sein, wohingegen zur Abschätzung eines Infektionsrisikos durch kontaminierte Umweltproben der Nachweis eines vermehrungsfähigen Virus notwendig ist [102].

Bei Auftreten von Symptomen auf der Haut, die auf eine Pockenvirusinfektion hindeuten, kann eine Abklärung der Verdachtsdiagnose (verschiedene Orthopocken [zum Beispiel Kuhpocken, Affenpocken], Parapocken, Molluscum contagiosum, kutaner Anthrax, Mykosen, *Bartonella henselae*) durch virologische beziehungsweise mikrobiologische Verfahren erfolgen. In spezialisierten Laboratorien werden heute zunehmend molekulare Nachweismethoden (PCR, Real-time-PCR) für die Diagnostik und Differentialdiagnostik eingesetzt [81].

## 2. Blut- und Plasmaspender

### 2.1 Prävalenz und Inzidenz bei Spenderkollektiven

Über die Seroprävalenz von OPV in Deutschland gibt es keine belastbaren aktuellen Daten, weder in der humanen noch in der Tier-Population [103, 104]. Die Pocken-Pflichtimpfung wurde in der Bundesrepublik Deutschland 1977 und in der Deutschen Demokratischen Republik 1980 eingestellt, sodass seit dieser Zeit von einer Zunahme des Anteils immunologisch naiver Personen in der Bevölkerung auszugehen ist. In Deutschland sind in den vergangenen Jahren nur in sehr begrenztem Umfang Personen im Rahmen von Impfstudien mit VACV Lister-Elstree geimpft worden.

Erkrankungen durch MOCV treten in Deutschland wie auch in anderen Ländern in der Regel bei Kindern und Immunsupprimierten auf. Untersuchungen zur Prävalenz von PPV wurden bisher nicht durchgeführt.

## 2.2 Definition von Ausschlusskriterien

Zur Ermittlung der Ausschlusskriterien für Blutspender gelten grundsätzlich die Richtlinien der Bundesärztekammer und des PEI [105, 106]. In diesen Richtlinien sind keine spezifischen Ausschlusskriterien für Pocken-Infektion festgelegt, da Menschenpocken als ausgerottet gelten. Pockenvirus-Infektionen, die mit einer Virämie einhergehen können, manifestieren sich durch lokale Hautläsionen, begleitet von Fieber und Unwohlsein, und werden durch die üblichen Ausschlusskriterien für Blutspender erfasst.

## 2.3 Spendertestung und Aussagekraft

Eine Spendertestung auf OPV-Genom mit der PCR oder über Antikörpernachweis (IgM beziehungsweise IgG) ist prinzipiell möglich. Nach den bisher vorliegenden Erkenntnissen zur Epidemiologie der OPV-Infektion in Deutschland wird eine Spendertestung als nicht notwendig angesehen.

## 2.4 Spenderbefragung

Die spendewillige Person wird in der Anamnese vor jeder Spende entsprechend den Richtlinien der Bundesärztekammer und des PEI nach fieberhaften Erkrankungen befragt [105, 106].

## 2.5 Spenderinformation und -beratung

Da keine spezielle Untersuchung auf OPV-Marker erfolgt, ist keine OPV-spezifische Spenderinformation möglich und sinnvoll.

## 3. Empfänger

### 3.1 Prävalenz und Inzidenz von blutassozierten Infektionen und Infektionskrankheiten bei Empfängerkollektiven

Zur Prävalenz und Inzidenz von OPV-Infektionen liegen für Deutschland weder Spender- noch Empfänger-

spezifische Informationen vor. Auf Grund der Impfpflicht gegen Pocken, die 1874 im Deutschen Reich eingeführt wurde und in Deutschland bis 1976 beziehungsweise 1980 bestand, ist davon auszugehen, dass ein großer Teil der Personen, die unter die Impfpflicht fielen, restliche Antikörper gegen OPV haben. Wie hoch der Bevölkerungsanteil ist, der nach Aufhebung der Impfpflicht eine Immunantwort gegen Kuhbeziehungsweise Katzenpockenviren oder andere OPV erworben hat, ist bisher nicht ausreichend untersucht worden.

### 3.2 Abwehrlage (Resistenz, vorhandene Immunität, Immunreaktivität, Alter, exogene Faktoren)

Es liegen keine Erkenntnisse zum Serostatus der Empfänger von Blut und Blutprodukten in Deutschland vor. Untersuchungen in verschiedenen Ländern haben ergeben, dass Personen, die vor der Einstellung der Impfung nach der Eradikation der Menschenpocken geimpft wurden, teilweise Antikörper gegen VACV aufweisen. Epidemiologische Studien hatten gezeigt, dass nach etwa 3 Jahren 90 % der Geimpften noch einen ausreichenden Schutz aufwiesen, der im Laufe der Jahre weiter abnahm. Eine Infektion mit Menschenpocken verlief jedoch auch bei solchen Personen in der Regel milder. Inwieweit heute bei ehemals geimpften Personen ein Schutz gegen OPV-Infektionen besteht, wird diskutiert [107, 108, 109].

### 3.3 Schweregrad und Verlauf der Erkrankung

Bisher liegen keine Berichte über Infektionen mit OPV oder anderen humanpathogenen Pockenerregern durch Transfusionen vor.

### 3.4. Therapie und Prophylaxe

#### Impfung

Theoretisch ist auch heute eine prophylaktische Impfung gegen OPV möglich mit den vormals zugelassenen oder auch in der Entwicklung befindlichen VACV-Impfstoffen. Auf

Grund der erheblichen Nebenwirkungen wurden in Deutschland keine Impfungen durchgeführt, im Gegensatz zu den USA, wo nach dem 11. September 2001 bestimmte Personengruppen (Militär, Gesundheitsdienst etc.) mit VACV immunisiert wurden [107]. Wann und inwieweit neue Impfstoffe auf der Basis weiter attenuierter VACV wie MVA (Modified Vacciniavirus Ankara) oder der japanische Impfstamm LC16m8, die auch als Impfstoffe der dritten Generation bezeichnet werden, die Impfstoffe, die zur Eradikation eingesetzt wurden, beziehungsweise Impfstoffe der zweiten Generation, generell ersetzen, bleibt abzuwarten. Zu bemerken ist, dass LC16m8 in Japan als Impfstoff zugelassen wurde. Inwieweit MVA oder Derivate von MVA zur prophylaktischen Impfung des Menschen zugelassen werden, bleibt abzuwarten [39, 42, 110]. Am weitesten fortgeschritten ist hierbei die klinische Prüfung des MVA-Impfstoffes IMVAMUNE in den USA [41, 111].

Neue Daten aus unterschiedlichen Tiermodellen lassen den Schluss zu, dass durch MVA-Immunsierung kurzfristig, evtl. sogar post-expositionell, ein wirksamer Schutz gegen OPV-Infektionen erzielt werden kann [109, 112].

#### Chemotherapie

Die Entwicklung von Chemotherapeutika wurde insbesondere im Hinblick auf potenzielle bioterroristische Anschläge mit VARV vorangetrieben. Cidofovir ist ein azyklisches Nukleosidphosphat und hemmt die DNA-Polymerase verschiedener DNA-Viren. Es wird zur Therapie von CMV-Infektionen, insbesondere bei der CMV-Retinitis bei HIV-Infizierten, verwendet, und hemmt auch die Replikation von OPV [9, 113]. Cidofovir kann jedoch auf Grund seiner i.v.-Applikation und seiner ausgeprägten Nebenwirkungen (Nierentoxizität) nur in begrenztem Umfang eingesetzt werden. Hexadecyloxypropyl-cidofovir (CMX001), ein Derivat von Cidofovir, ist nach oraler Gabe bioverfügbar.

ST246 ist ein *small molecule compound*, das spezifisch mit einem OPV-Hüllprotein (F13L-Protein) interagiert und so den Austritt von OPV

aus infizierten Zellen effektiv hemmen kann [114]. In Tierexperimenten hat sich die Behandlung mit ST246 sogar noch als wirksam erwiesen, wenn bereits Krankheitssymptome aufgetreten sind [115]. In experimentellen Systemen konnte zudem gezeigt werden, dass die Impfung mit gleichzeitiger Verabreichung von ST246 zu einer zellulären und humoralen Immunantwort führte und die Mäuse gegen eine Überinfektion mit pathogenem VACV geschützt waren [116].

ST246 wurde erfolgreich zur Behandlung eines 28 Monate alten Säuglings eingesetzt, der durch seinen mit VACV geimpften Vater infiziert wurde und schwer an einem Eczema vaccinatum erkrankte [117]. CMX001 wies in Kombination mit ST246 einen synergistischen Effekt bei der Behandlung von experimentellen OPV-Infektionen auf [118].

### Passive Immunisierung

Eine passive Impfung mit Immunglobulinpräparationen (Vaccinia IgG; VIG) wird bisher nur bei Auftreten von Impfkomplicationen empfohlen. VIG-Präparate stehen jedoch weltweit nur in sehr begrenztem Umfang zur Verfügung.

### 3.5 Übertragbarkeit

Es liegen keine Berichte zur Übertragung von OPV durch Blut oder Blutprodukte vor.

### 3.6 Häufigkeit der Applikation sowie Art und Menge der Blutprodukte

Auf Grund der Inaktivierung beziehungsweise Eliminierung von OPV bei der Herstellung von Plasmaprodukten besteht kein Risiko einer Übertragung durch diese Produkte. Bisher wurden keine Übertragungen durch zelluläre Blutprodukte berichtet. Es ist davon auszugehen, dass bei Leukozyten-depletierten zellulären Blutprodukten das theoretische Risiko einer Übertragung in der Virämiephase weitgehend reduziert wird, da Kuhpocken- und auch Affenpockenviren zellassoziert im Blut zirkulieren.

## 4. Blutprodukte

### 4.1 Belastung des Ausgangsmaterials und Testmethoden

Bisher gibt es keine Untersuchungen zur Belastung des Ausgangsmaterials durch OPV. Untersuchungen von gesunden, mit Vacciniaviren immunisierten Personen zeigen, dass VACV weder im Plasma noch zellassoziert im Laufe der Immunisierung nachgewiesen werden kann. Personen, die schwer an Vaccinia erkrankten, wiesen Viren zellassoziert auf.

Bei klassisch generalisierenden Pockenvirusinfektionen bei Menschen beziehungsweise Tieren (VARV, ECTV, CMXV) erwartet man zwei Ausbreitungsphasen; die erste erfolgt lymphogen nach der Vermehrung am Infektionsort beziehungsweise dem Befall der drainierenden Lymphknoten mit der Ausbreitung auf die inneren lymphatischen Gewebe, und die zweite führt über das Blut zur Infektion von Haut und Schleimhäuten und weiteren Organen. Bei der Infektion mit VARV konnte infektiöses Virus im Blut von Erkrankten nachgewiesen werden [119]. Eine systemische Ausbreitung (Virämie) nach Infektion mit anderen OPV scheint hingegen nicht zwangsläufig einzutreten. So gelingt selbst der Nachweis von MPXV im Blut von Infizierten nicht regelmäßig und ist wahrscheinlich von der Schwere der Erkrankung abhängig [47, 120]. Der Nachweis von VACV nach der Immunisierung in Blut wird kontrovers diskutiert [5, 36, 121]. In einigen Studien wurde eine Virämie bis zu 21 Tage nach Immunisierung nachgewiesen [35]. Anderen Autoren gelang der Nachweis von VACV-DNA im Blut nicht oder nur in Einzelfällen und dann auch nur kurz nach der Impfung [36, 122, 123]. Infektiöses Virus konnte dabei nicht nachgewiesen werden, es ist daher davon auszugehen, dass virale DNA zellgebunden vorliegt. In Fällen, in denen erhebliche Nebenwirkungen der Impfung auftraten, war in der Regel eine Virämie nachweisbar [124, 125].

Kürzlich konnten Nitsche und Mitarbeiter zeigen, dass auch bei CPXV-Infektionen Virus-DNA im Blut

nachgewiesen werden kann und der Genomnachweis nur in der zellhaltigen Fraktion des Blutes möglich ist [126].

Da OPV nach dem heutigen Kenntnisstand auch in der Virämiephase zellgebunden auftreten, wäre eine Untersuchung von zellhaltigen Materialien auf OPV-Genom durch NAT möglich [100, 126, 127].

### 4.2 Möglichkeiten zur Abtrennung und Inaktivierung von Infektionserregern

Bei der Herstellung von Plasmaprodukten sind generell die Möglichkeiten zur Inaktivierung beziehungsweise Abtrennung für umhüllte, lipidhaltige Viren einfacher als für nicht-behüllte Viren. Bei Filtrationsverfahren (Virusfilter, Nanofilter) kann man annehmen, dass diese auf Grund der Größe OPV effektiv aus dem Produkt entfernen. Eine Gamma-Bestrahlung mit 50 kGy reduzierte in Urokinase-Präparationen VACV um mehr als 7,7 log<sub>10</sub> [128].

### 4.3 Praktikabilität und Validierbarkeit der Verfahren zur Eliminierung/Inaktivierung von Infektionserregern

Untersuchungen zur Abtrennung und Inaktivierung von OPV in Blutprodukten wurden im Rahmen von Modelluntersuchungen zur Virussicherheit von Blutprodukten durchgeführt. In umfangreichen Versuchen zur Virussicherheit von Plasmaprodukten wurden durch Remington und Mitarbeiter verschiedene Verfahren untersucht [129]. In stabilisierten Alpha1-Proteinase Inhibitor-Präparaten (0,38% Citrat, 37% Sucrose) war der Titer von VACV bei der Pasteurisierung (10 Stunden bei 60°C) nach einer Stunde um etwa den Faktor 10<sup>2</sup> reduziert und nach 3 Stunden unter die Nachweisgrenze gesunken (Reduktionsfaktor ≥ 10<sup>5</sup>). In nicht stabilisierter humaner Plasmaprotein-Lösung war der Titer von VACV bereits nach 2 Stunden nicht mehr nachweisbar (Reduktionsfaktor ≥ 10<sup>5</sup>). In Untersuchungen der Stabilität

von VACV im Solvent/Detergent (S/D)-Verfahren zur Herstellung von virussicherem Anti-Haemophilic-Factor (AHF) durch Behandlung mit 0,3% TNPB/1% Tween80 beziehungsweise 0,15% TNPB/0,5% Tween80 war der Titer nach 6 Stunden Behandlung lediglich um den Faktor  $10^3$  reduziert. In Inaktivierungsexperimenten unter Verwendung von 0,3% TNPB/0,2% Cholat wurde VACV innerhalb von 30 Minuten um mehr als den Faktor  $10^4$  inaktiviert, und nach 3 Stunden Behandlung war kein infektiöses Virus mehr nachweisbar. Vergleichende Untersuchungen von Roberts [130] zeigten, dass VACV im Vergleich zu anderen umhüllten Viren eine höhere Resistenz bei der Behandlung mit dem S/D-Verfahren aufwies. Die Behandlung von Immunglobulinpräparaten mit 20mM Natrium-Caprylat führte zu einer Reduktion des VACV-Titers nach bereits 3 Minuten unter die Nachweisgrenze (Reduktionsfaktor  $\geq 10^6$ ). In verschiedenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass Pockenviren durch Filtration effektiv aus Plasmaprodukten entfernt werden können [131, 132]. Insgesamt stehen damit verschiedene Eliminierungs- beziehungsweise Inaktivierungsverfahren zur Verfügung, die Plasmaprodukte im Hinblick auf die Übertragung von OPV sicher machen. Ein Risiko einer Übertragung von OPV durch Plasmaprodukte ist daher nicht erkennbar.

Die Effektivität der Inaktivierungsverfahren, die für Plasma und zelluläre Blutprodukte entwickelt wurden (zum Beispiel Behandlung mit Amotosalen, Riboflavin oder Methylenblau), ist gegenwärtig nicht bekannt. Da OPV nach dem heutigen Kenntnisstand zellgebunden vorliegen, ist davon auszugehen, dass durch die Leukozytendepletion eine erhebliche Reduzierung des Risikos einer Übertragung von OPV erreicht wird.

## 5. Bewertung

Wie in verschiedenen Untersuchungen gezeigt wurde, können bei Infektionen mit Vertretern der Orthopockenviren wie dem Affenpockenvirus (Monkeypox Virus; MPXV) und Kuhpockenvirus

(Cowpox Virus; CPXV) als auch bei mit Vacciniavirus (VACV) Geimpften Virämien auftreten. So konnten bis zu drei Wochen nach Auftreten von klinischen Symptomen OPV-Genome in der zellhaltigen Fraktion des Blutes nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu Variolavirusinfektionen konnte jedoch kein infektiöses Virus aus Blut isoliert werden. Prinzipiell können durch Einsatz von NAT-Verfahren virämische Blutspenden erkannt werden.

Infektionen mit Affenpockenviren beim Menschen wurden beobachtet. In den zurückliegenden Jahren wurde in Deutschland zunehmend über Infektionen mit Kuhpockenviren bei Menschen berichtet, die teilweise mit schweren klinischen Symptomen verliefen. Die beobachteten genetischen Unterschiede der CPXV-Isolate und die unterschiedlichen klinischen Verläufe lassen vermuten, dass CPXV unterschiedlich pathogen für den Menschen sein können. Es erscheint notwendig, dass eine Überwachung der epidemiologischen Situation von OPV- und insbesondere CPXV-Infektionen durchgeführt wird. Molekularepidemiologische Studien können Hinweise auf bisher unbekannt OPV-Varianten geben, die ein verändertes Pathopotenzial aufweisen.

Infektionen mit Orthopockenviren stellen jedoch zum gegenwärtigen Zeitpunkt in Deutschland für das Blutspendewesen kein erkennbares Risiko dar. OPV werden in Plasmaprodukten durch die Herstellungsverfahren eliminiert und/oder inaktiviert, sodass diese Produkte sicher sind.

Sollte eine Impfung gegen Orthopockenviren notwendig werden, ist eine Rückstellung für 4 Wochen nach Impfung mit Lebendimpfstoff ausreichend.

Dieses Papier wurde fertig gestellt am 07.10.2009 und vom Arbeitskreis Blut am 07.06.2010 verabschiedet. Es wurde erarbeitet von den Mitgliedern der Untergruppe „Bewertung Blut-assoziiierter Krankheitserreger“ des Arbeitskreises Blut:

Prof. Dr. Georg Pauli, Dr. Johannes Blümel, Prof. Dr. Reinhard Burger, Prof. Dr. Christian Drosten, Dr. Albrecht

Gröner, Prof. Dr. Lutz Gürtler, Dr. Margarethe Heiden, Prof. Dr. Martin Hildebrandt, Prof. Dr. Dr. Bernd Jansen, Dr. Thomas Montag-Lessing, Dr. Ruth Offergeld, Prof. Dr. Rainer Seitz, Dr. Uwe Schlenkrich, Dr. Volkmar Schottstedt, Dr. Johanna Strobel, Dr. Hannelore Willkommen, Prof. Dr. Carl-Heinz Wirsing von König

## Literatur

- Ladnyi ID, Breman JG (1978) Smallpox eradication: progress and problems. *Dev Biol Stand* 41: 281–290
- Anonymous (1978) Smallpox in Birmingham. *Br Med J* 2(6140):837
- Geddes AM (2006) The history of smallpox. *Clin Dermatol* 24:152–157
- WHO (1980) Global Commission for the Certification of Smallpox Eradication (ed.). The global eradication of smallpox. Final Report of the Global Commission for the Certification of Smallpox Eradication, Geneva, 1979. Geneva: WHO, 1980
- Fenner F, Henderson DA, Arita I, Jezek Z, Ladnyi ID (1988) Smallpox and its Eradication – World Health Organisation 1988 (<http://whqlibdoc.who.int/smallpox/9241561106.pdf>)
- Moussatché N, Damaso CR, McFadden G (2008) When good vaccines go wild: Feral Orthopoxvirus in developing countries and beyond. *J Infect Developing Countries* 2:156–173
- Garon CF, Barbosa E, Moss B (1978) Visualization of an inverted terminal repetition in vaccinia virus DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 75:4863–4867
- Moss B (2006) Poxvirus entry and membrane fusion. *Virology* 344:48–54
- Sliva K, Schnierle B (2007) From actually toxic to highly specific – novel drugs against poxviruses. *Virology J* 4:8
- Roberts KL, Smith GL (2008) Vaccinia virus morphogenesis and dissemination. *Trends Microbiol* 16:472–479
- Seet BT, Johnston JB, Brunetti CR, Barrett JW, Everett H, Cameron C, Sypula J, Nazarian SH, Lucas A, McFadden G (2003) Poxviruses and immune evasion. *Annu Rev Immunol* 21:377–423
- Mahalingam S, Karupiah G (2000) Modulation of chemokines by poxvirus infections. *Curr Opin Immunol* 12:409–412
- Ambrose CT (2005) Osler and the Infected Letter. *Emerg Infect Dis* 11:689–693
- Harper GL (1961) Airborne micro-organisms: survival test with four viruses. *J Hyg* 59:479–486
- Sinclair R, Boone SA, Greenberg D, Keim P, Gerba CP (2008) Persistence of category A select agents in the environment. *Appl Environ Microbiol* 74: 555–563
- Huq F (1976) Effect of temperature and relative humidity on variola virus crusts. *Bull World Health Organ* 54:710–712
- Downie AW, Dumbell KR (1947) Survival of variola virus in dried exudat and crusts from smallpox patients. *Lancet* 1:550–553
- Wolff HL, Croon JJ (1968) The survival of smallpox virus (variola minor) in natural circumstances. *Bull World Health Organ* 38:492–493

19. Tanabe I, Hotta S (1976) Effect of disinfectants on variolavirus in cell culture. *Appl Environ Microbiol* 32:209–212
20. Lelie PN, Reesink HW, Lucas CJ (1987) Inactivation of 12 viruses by heating steps applied during manufacture of a hepatitis B vaccine. *J Med Virol* 23: 297–301
21. **Essbauer S, Meyer H, Porsch-Özcürümez M, Pfeiffer M** (2007) Long-lasting stability of Vaccinia virus (Orthopoxvirus) in food and environmental samples. *Zoonoses Public Health* 54:118–124
22. **von Magnus P, Anderson EK, Petersen KB, Birch-Anderson A** (1959) A pox-like disease in cynomolgus monkeys. *Acta Pathol Microbiol Scand* 46:156–176
23. **Di Giulio DB, Eckburg PB** (2004) Human monkeypox: an emerging zoonosis. *Lancet Infect Dis* 4: 15–25
24. Parker S, Nuara A, Buller RM, Schultz DA (2007) Human monkeypox: an emerging zoonotic disease. *Future Microbiol* 2:17–34
25. Sbrana E, Xiao SY, Newman PC, Tesh RB (2007) Comparative pathology of North American and central African strains of monkeypox virus in a ground squirrel model of the disease. *Am J Trop Med Hyg* 76:155–164
26. Eis-Hübinger AM, Gerritzen A, Schneweis KE, Pfeiff B, Pullmann H, Mayr A, Czerny CP (1990) Fatal cowpox-like virus infection transmitted by cat. *Lancet* 336(8719):880
27. Baxby D, Bennett M, Getty B (1994) Human cowpox 1969–93: a review based on 54 cases. *Br J Dermatol* 131:598–607
28. Wolfs TF, Wagenaar JA, Niesters HG, Osterhaus AD. 2002. **Rat-to-human transmission of cowpox infection.** *Emerg Infect Dis* 8:1495–1496
29. Kurth A, Wibbelt G, Gerber HP, Petschaelis A, Pauli G, Nitsche A (2008) Rat-to-elephant-to-human transmission of cowpox virus. *Emerg Infect Dis* 14: 670–671
30. **Bonnekoh B, Falk K, Reckling KF, Kenkies S, Nitsche A, Ghebremedhin B, Pokrywka A, Franke I, Thriene B, König W, Pauli G, Gollnick H** (2008) Cowpox infection transmitted from a domestic cat. *J Dtsch Dermatol Ges* 6:210–213
31. Nitsche A, Pauli G (2007) Sporadic human cases of cowpox in Germany. *Euro Surveill* 12(4): E070419.3
32. Czerny CP, Eis-Hübinger AM, Mayr A, Schneweis KE, Pfeiff B (1991) Animal poxviruses transmitted from cat to man: current event with lethal end. *Zentralbl Veterinarmed B* 38:421–431
33. Pfeiff B, Pullmann H, Eis-Hübinger AM, Gerritzen A, Schneweis KE, Mayr A (1991) Letale Tierpocken-Infektion bei einem Atopiker unter dem Bild einer Variola vera. *Hautarzt* 42:293–297
34. WHO (1980) Declaration of global eradication of smallpox. *Wkly Epidemiol Rec* 55:2127–2137
35. Cummings JF, Polhemus ME, Hawkes C, Klote M, Ludwig GV, Wortmann G (2004) Lack of Vaccinia viremia after smallpox vaccination. *Clin Infect Dis* 38:456–458
36. Savona MR, Dela Cruz WP, Jones MS, Thornton JA, Xia D, Hadfield TL, Danaher PJ (2006) Detection of vaccinia DNA in the blood following smallpox vaccination. *JAMA* 295:1898–1900
37. Morikawa S, Sakiyama T, Hasegawa H, Saijo M, Maeda A, Kurane I, Maeno G, Kimura J, Hirama C, Yoshida T, Asahi-Ozaki Y, Sata T, Kurata T, Kojima A (2005) An attenuated LC16m8 smallpox vaccine: analysis of full-genome sequence and induction of immune protection. *J Virol* 79:11873–11891
38. Parrino J, Graham BS (2006) Smallpox vaccines: Past, present, and future. *J Allergy Clin Immunol* 118:1320–1326
39. Kenner J, Cameron F, Empig C, Jobses DV, Gurwith M (2006) LC16m8: An attenuated smallpox vaccine. *Vaccine* 24:7009–7022
40. Frey EF, Newman FK, Kennedy JS, Sobek V, Ennis FA, Hill H, Yan LK, Chaplin P, Vollmar J, Chaitman BR, Belsheb RB (2007) Clinical and immunologic responses to multiple doses of IMVAMUNE (Modified Vaccinia Ankara) followed by Dryvax challenge. *Vaccine* 25:8562–8573
41. Kennedy JS, Greenberg RN (2009) IMVAMUNE®: modified vaccinia Ankara strain as an attenuated smallpox vaccine. *Exp Rev Vaccines* 8:13–24
42. Saito T, Fujii T, Kanatani Y, Saijo M, Morikawa S, Yokote H, Takeuchi T, Kuwabara N (2009) Clinical and immunological response to attenuated tissue-cultured smallpox vaccine LC16m8. *JAMA* 301: 1025–1033
43. WHO (2002) Smallpox eradication: destruction of variola virus stocks. *Wkly Epidemiol Rec* 77(5): 34–38
44. Breman JG, Kalisa R, Steniowski MV, Zanotto E, Gromyko AI, Arita I (1980) Human monkeypox, 1970–79. *Bull World Health Organ* 58:165–182
45. Jezek Z, Grab B, Szczeniowski MV, Paluku KM, Mutombo M (1988) Human monkeypox: secondary attack rates. *Bull World Health Organ* 66:465–470
46. Jezek Z, Arita I, Mutombo M, Dunn C, Nakano JH, Szczeniowski M (1986) Four generations of probable person-to-person transmission of human monkeypox. *Am J Epidemiol* 123:1004–1012
47. Learned LA, Reynolds MG, Wassa DW, Li Y, Olson VA, Karem K, Stempora LL, Braden ZH, Kline R, Likos A, Libama F, Moudzeo H, Bolanda JD, Tarangonia P, Boumandoki P, Formenty P, Harvey JM, Damon IK (2005) Extended interhuman transmission of monkeypox in a hospital community in the Republic of the Congo, 2003. *Am J Trop Med Hyg* 73:428–434
48. CDC, Centers for Disease Control and Prevention (2003) Multistate outbreak of monkeypox – Illinois, Indiana, and Wisconsin, 2003. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 52:537–540
49. Arita I, Gispén R, Kalter SS, Lim Teong Wah, Marennikova SS, Netter R, Tagaya I (1972) Outbreaks of monkeypox and serological surveys in nonhuman primates. *Bull World Health Organ* 46:625–631
50. Vorou R, Papavassiliou VG, Pierrotsakos IN (2008) Cowpox virus infection: an emerging health threat. *Curr Opin Infect Dis* 21:153–156
51. Amer M, El-Gharib I, Rashed A, Farag F, Emara M (2001) Human cowpox infection in Sharkia Governorate, Egypt. *Int J Dermatol* 40:14–17
52. Bennett M, Begon ME (1997) Virus zoonoses – a long-term overview. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 20:101–109
53. Ninove L, Domart Y, Vervel C, Voinot C, Salez N, Raoult D, Meyer H, Capek I, Zandotti C, Charrel RN (2009) Cowpox virus transmission from pet rats to humans, France. *Emerg Infect Dis* 15:781–784
54. Kuczka A, Nitsche A, Höveler R, Becker C, Kurth A (2009) Ein Bericht über durch Heimtierratten auf Menschen übertragene Kuhpockenvirusinfektion. *Dt Tierärztebl* 3:316–319
55. Becker C, Kurth A, Hessler F, Kramp H, Gokel M, Hoffmann R, Kuczka A, Nitsche A (2009) Cowpox Virus Infection in Pet Rat Owners – Not Always Immediately Recognized. *Dtsch Arztebl Int* 106: 329–334
56. Bennett M, Baxby D (1996) Cowpox. *J Med Microbiol* 45:157–158
57. Mätz-Rensing K, Ellerbrok H, Ehlers B, Pauli G, Floto A, Alex M, Czerny CP, Kaup FJ (2006) Fatal poxvirus outbreak in a colony of New World monkeys. *Vet Pathol* 43:212–218
58. Martina BE, van Doornum G, Dorrestein GM, Niesters HG, Stittelaar KJ, Wolters MA, van Bolhuis HG, Osterhaus AD (2006) Cowpox virus transmission from rats to monkeys, the Netherlands. *Emerg Infect Dis* 12:1005–1007
59. Gubser C, Hué S, Kellam P, Smith GL (2004) Poxvirus genomes: a phylogenetic analysis. *J Gen Virol* 85:105–117
60. Pelkonen PM, Tarvainen K, Hynninen A, Kallio ERK, Henttonen H, Palva A, Vaheiri A, Vapalahti O (2003) Cowpox with Severe Generalized Eruption, Finland. *Emerg Infect Dis* 9:1458–1461
61. Kramski M (2009) Infections of common marmosets with calpox virus: A model for smallpox virus infections. Dissertation, Humboldt-Universität Berlin.
62. Drexler I, Staib C, Sutter G (2004) Modified vaccinia virus Ankara as antigen delivery system: how can we best use its potential? *Curr Opin Biotechnol* 15: 506–512
63. Shen Y, Nemunaitis J (2005) Fighting cancer with vaccinia virus: teaching new tricks to an old dog. *Mol Ther* 11:180–195
64. Gómez CE, Nájera JL, Krupa M, Esteban M (2008) The poxvirus vectors MVA and NYVAC as gene delivery systems for vaccination against infectious diseases and cancer. *Curr Gene Ther* 8:97–120
65. Wlodaver CG, Palumbo GJ, Waner JL (2004) Laboratory-acquired vaccinia infection. *J Clin Virol* 29: 167–170
66. Lewis FM, Chernak E, Goldman E, Li Y, Karem K, Damon IK, Henkel R, Newbern EC, Ross P, Johnson CC (2006) Ocular vaccinia infection in laboratory worker, Philadelphia, 2004. *Emerg Infect Dis* 12: 134–137  
Available from <http://www.cdc.gov/ncidod/EID/vol12no01/05-1126.htm>
67. Trindade GS, Emerson GL, Carroll D, Kroon EG, Damon IK (2007) Brazilian vaccinia viruses and their origins. *Emerg Infect Dis* 13:965–972  
Available from <http://www.cdc.gov/EID/content/13/7/965.htm>
68. Drumond BP, Leite JA, da Fonseca FG, Bonjardim CA, Ferreira PC, Kroon EG (2008) Brazilian Vaccinia virus strains are genetically divergent and differ from the Lister vaccine strain. *Microbes Infect* 10: 185–197

69. Nagasse-Sugahara TK, Kisielius JJ, Ueda-Ito M, Curti SP, Figueiredo CA, Cruz AS, Silva MMMJ, Ramos CH, Silva MCC, Sakurai T, Salles-Gomes LF (2004) Human Vaccinia-like virus outbreaks in São Paulo and Goiás states, Brazil: Virus detection, isolation and identification. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 46:315–322
70. Damaso CR, Esposito JJ, Condit RC, Moussatche N (2000) An emergent poxvirus from humans and cattle in Rio de Janeiro State: Cantagalo virus may derive from Brazilian smallpox vaccine. *Virology* 22:439–449
71. Leite JA, Drummond BP, Trindade GS, Lobato ZIP, da Fonseca FG, dos Santos JR, Madureira MC, Guedes MIMC, Ferreira JMS, Bonjardim CA, Ferreira PCP, Kroon EG (2005) Passatempo virus, a Vaccinia virus strain, Brazil. *Emerg Infect Dis* 11:1935–1938
72. Singh RK, Hosamani M, Balamurugan V, Bhanuprakash V, Rasool TJ, Yadav MP (2007) Buffalopox: an emerging and re-emerging zoonosis. *Anim Health Res Rev* 8:105–114
73. Singh RK, Hosamani M, Balamurugan V, Satheesh CC, Rasool TJ, Yadav MP (2006) Comparative sequence analysis of envelope protein genes of Indian buffalopox virus isolates. *Arch Virol* 151: 1995–2005
74. Zafar A, Swanepoel R, Hewson R, Nizam M, Ahmed A, Husain A, Grobbelaar A, Bewley K, Mioulet V, Dowsett B, Easterbrook L, Hasan R (2007) Nosocomial buffalopoxvirus infection, Karachi, Pakistan. *Emerg Infect Dis* 13:902–904
75. Essbauer S, Pfeffer M, Wilhelm S, Meyer H (2004) Zoonotische Pockenviren. *Bundesgesundheitsbl. – Gesundheitsforsch. – Gesundheitsschutz* 47: 671–679
76. Tulman ER, Delhon G, Afonso CL, Lu Z, Zsak L, Sandybaev NT, Kerembekova UZ, Zaitsev VL, Kutish GF, Rock DL (2006) Genome of horsepox virus. *J Virol* 80:9244–9258
77. Adams MM, Rice AD, Moyer RW (2007) Rabbitpox virus and Vaccinia virus infection of rabbits as a model for human smallpox. *J Virol* 81: 11084–11095
78. Li G, Chen N, Roper RL, Feng Z, Hunter A, Danila M, Lefkowitz EJ, Buller RM, Upton C (2005) Complete coding sequences of the rabbitpox virus genome. *J Gen Virol* 86:2969–2977
79. Büttner M, Rziha HJ (2002) Parapoxviruses: From the Lesion to the Viral Genome. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 49:7–16
80. Pfeffer M, Meyer H (2007) Poxvirus diagnostics. In Mercer AA, Schmidt A, Weber O (eds.), *Poxviruses*. Basel: Birkhäuser Verlag, pp. 355–373
81. Kurth A, Nitsche A (2007) Fast and reliable diagnostic methods for the detection of human poxvirus infections. *Future Virology* 2:467–479
82. Nitsche A, Büttner M, Wilhelm S, Pauli G, Meyer H (2006) Real-time PCR detection of parapoxvirus DNA. *Clin Chem* 52(2):316–319
83. Braue A, Ross G, Varigos G, Kelly H (2005) Epidemiology and impact of childhood molluscum contagiosum: a case series and critical review of the literature. *Pediatr Dermatol* 22:287–294
84. Brown J, Janninger CK, Schwartz RA, Siverberg NB (2006) Childhood molluscum contagiosum. *Int J Dermatol* 45:93–99
85. Hanson D, Diven DG (2007) Molluscum Contagiosum. *Dermatol Online J* 9(2):2
86. Trama JP, Adelson ME, Mordechai E (2007) Identification and genotyping of molluscum contagiosum virus from genital swab samples by real-time PCR and Pyrosequencing. *J Clin Virol* 40:325–329
87. Downie AW, España C (1972) Comparison of Tanapox virus and Yaba-like viruses causing epidemic disease in monkeys. *J Hyg (Lond)* 70:23–32
88. Downie AW, España C (1973) A comparative study of Tanapox and Yaba viruses. *J Gen Virol* 19: 37–49
89. Jezek Z, Arita I, Szczeniowski M, Paluku KM, Ruti K, Nakano JH (1985) Human tanapox in Zaire: clinical and epidemiological observations on cases confirmed by laboratory studies. *Bull World Health Organ* 63:1027–1035
90. Damon IK (2007) Poxviruses. In: Knipe, D.M., Howley, P.M. (eds.), *Fields Virology*, vol. 2. Fifth ed. Lippincott, Williams & Wilkins, New York, pp. 2947–2976
91. Stich A, Meyer H, Kohler B, Fleischer K (2002). Tanapox: first report in a European traveller and identification by PCR. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 96:178–179
92. Dhar AD, Werchniak AE, Li Y, Brennik JB, Goldsmith CS, Kline R, Damon I, Klaus SN (2004) Tanapox infection in a college student. *N Engl J Med* 350:361–366
93. Biel SS, Gelderblom HR (1999) Electron microscopy of viruses. In: Cann AJ, ed. *Cell culture – a practical approach*. Oxford: Oxford University Press, pp. 111–147
94. Gelderblom HR, Renz H, Özel M (1991) Negative staining in diagnostic virology. *Micron Microsc Acta* 22:435–447
95. Curry A, Appleton H, Dowsett B (2006) Application of transmission electron microscopy to the clinical study of viral and bacterial infections: present and future. *Micron* 37:91–106
96. Goldberg TL, Chapman CA, Cameron K, Saj T, Karesh WB, Wolfe ND, Wong SW, Dubois ME, Slifka MK (2008) Serologic evidence for novel poxvirus in endangered red Colobus monkeys, Western Uganda. *Emerg Infect Dis* 14:801–803
97. Dubois ME, Slifka MK (2008) Retrospective analysis of monkeypox infection. *Emerg Infect Dis* 14: 592–599
98. Kitamoto N, Kobayashi T, Kato Y, Wakamiya N, Ikuta K, Tanaka T, Ueda S, Miyamoto H, Kato S (2005) Preparation of monoclonal antibodies cross-reactive with orthopoxviruses and their application for direct immunofluorescence test. *Microbiol Immunol* 49:219–225
99. Esposito JJ, Knight JC (1985) Orthopoxvirus DNA: a comparison of restriction profiles and maps. *Virology* 143:230–251
100. Nitsche A, Ellerbrok H, Pauli G (2004) Detection of orthopoxvirus DNA by real-time PCR and identification of variola virus DNA by melting analysis. *J Clin Microbiol* 42:1207–1213
101. Olson VA, Laue T, Laker MT, Babkin IV, Drosten C, Shchelkunov SN, Niedrig M, Damon IK, Meyer H (2004) Real-Time PCR system for detection of orthopoxviruses and simultaneous identification of smallpox virus. *J Clin Microbiol* 42:1940–1946
102. Nitsche A, Stern D, Ellerbrok H, Pauli G (2006) Detection of infectious poxvirus particles. *Emerg Infect Dis* 12(7):1139–1141
103. Czerny CP, Wagner K, Gessler K, Mayr A, Kaaden OR (1996) A monoclonal blocking-ELISA for detection of orthopoxvirus antibodies in feline sera. *Vet Microbiol* 52:185–200
104. Meyer H, Schay C, Mahnel H, Pfeffer M (1999) Characterization of orthopoxviruses isolated from man and animals in Germany. *Arch Virol* 144:491–501
105. Bundesanzeiger (2005) Bekanntmachung der Richtlinien zur Gewinnung von Blut und Blutbestandteilen und zur Anwendung von Blutprodukten (Hämotherapie) gemäß §§ 12 und 18 des Transfusionsgesetzes (TFG) (Novelle 2005) vom 19. September 2005 ISSN 0720-6100 G 1990 Jahrgang 57 Ausgegeben am Sonnabend, dem 5. November 2005 Nummer 209a
106. Bundesanzeiger (2007) Bekanntmachung der Richtlinien zur Gewinnung von Blut und Blutbestandteilen und zur Anwendung von Blutprodukten (Hämotherapie) gemäß §§ 12 und 18 des Transfusionsgesetzes (TFG) (Änderungen und Ergänzungen 2007) vom 17. April 2007. Bundesanzeiger Nr. 92, 19.05.2007, S. 5075
107. Thomssen, R (2003) Pocken als bioterroristische Bedrohung. *Bundesgesundheitsbl. – Gesundheitsforsch. – Gesundheitsschutz* 46:965–975
108. Pütz MM, Alberini I, Midgley CM, Manini I, Montomoli E, Smith GL (2005) Prevalence of antibodies to Vaccinia virus after smallpox vaccination in Italy. *J Gen Virol* 86:2955–2960
109. Paran N, Suezzer Y, Lustig S, Israely T, Schwantes A, Melamed S, Katz L, Preuss T, Hanschmann KM, Kalinke U, Erez N, Levin R, Velan B, Löwer J, Shafferman A, Sutter GJ (2009) Postexposure immunization with modified vaccinia virus Ankara or conventional Lister vaccine provides solid protection in a murine model of human smallpox. *Infect Dis* 199:39–48
110. Parrino J, McCurdy LH, Larkin BD, Gordon IJ, Rucker SE, Enama ME, Koup RA, Roederer M, Bailer RT, Moodie Z, Gu L, Yan L, Graham BS; VRC 201/203 Study Team (2007) Safety, immunogenicity and efficacy of modified vaccinia Ankara (MVA) against Dryvax challenge in vaccinia-naïve and vaccinia-immune individuals. *Vaccine* 25: 1513–1525
111. Jones T (2008) IMVAMUNE, an attenuated modified vaccinia Ankara virus vaccine for smallpox infection. *Curr Opin Mol Ther* 10:407–417
112. Earl PL, Americo JL, Wyatt LS, Espenshade O, Bassler J, Gong K, Lin S, Peters E, Rhodes L Jr, Spano YE, Silvera PM, Moss B (2008) Rapid protection in a monkeypox model by a single injection of a replication-deficient vaccinia virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:10889–10894
113. Jordan R, Hruby D (2006) Smallpox antiviral drug development: satisfying the animal efficacy rule. *Expert Rev Anti Infect Ther* 4:277–289
114. Yang G, Pevear DC, Davies MH, Collett MS, Bailey T, Rippen S, Barone L, Burns C, Rhodes G, Tohan S, Huggins JW, Baker RO, Buller RL, Touchette E, Waller K, Schriewer J, Neyts J, DeClercq E, Jones K, Hruby D, Jordan R (2005) An orally bioavailable antipoxvirus compound (ST-246) inhibits extracellular virus formation and protects mice from lethal orthopoxvirus challenge. *J Virol* 79: 13139–13149

115. Quenelle DC, Buller RML, Parker S, Keith KA, Hruby DE, Jordan R, Kern ER (2007) Efficacy of delayed treatment with ST-246 given orally against systemic orthopoxvirus infections in mice. *Antimicrob Agents Chemother* 51:689–695
116. Grosenbach DW, Jordan R, King DS, Berhanu A, Warren TK, Kirkwood-Watts DL, Tyavanagimatt S, Tan Y, Wilson RL, Jones KF, Hruby DE (2008) Immune responses to the smallpox vaccine given in combination with ST-246, a small-molecule inhibitor of poxvirus dissemination. *Vaccine* 26: 933–946
117. Vora S, Damon IK, Fulginiti V, Weber SG, Kahana M, Stein SL, Gerber SI, Garcia-Houchin S, Lederman ER, Hruby D, Collins L, Scott D, Thompson K, Barson JV, Regnery RL, Hughes C, Daum RS, Li Y, Zhao H, Smith S, Braden Z, Karem K, Olson VA, Davidson WB, Trindade G, Bolken T, Jordan R, Tien D, Marciniak J (2008) Severe eczema vaccinatum in a household contact of a smallpox vaccinee. *Clin Infect Dis* 46:1555–1561
118. Quenelle DC, Prichard MN, Keith KA, Hruby DE, Jordan R, Painter GR, Robertson A, Kern ER (2007) Synergistic efficacy of the combination of ST-246 with CMX001 against orthopoxviruses. *Antimicrob Agents Chemother* 51:4118–4124
119. Downie AW, McCarthy K, MacDonald A (1950) Viraemia in smallpox. *Lancet* 2:513–514
120. Likos AM, Sammons SA, Olson VA, Frace AM, Li Y, Olsen-Rasmussen M, Davidson W, Galloway R, Khristova ML, Reynolds MG, Zhao H, Carroll DS, Curns A, Formenty P, Esposito JJ, Regnery RL, Damon IK (2005) A tale of two clades: monkeypox viruses. *J Gen Virol* 86:2661–2672
121. Bray M (2003) Pathogenesis and potential antiviral therapy of complications of smallpox vaccination. *Antiviral Res* 58:101–114
122. Srinivasan K, Akolkar PN, Taffs RE, Hewlett IK (2006) Absence of detectable viremia in plasma and peripheral blood mononuclear cells from smallpox vaccinees: implications for blood safety. *Transfusion* 46(9):1589–1592
123. Cohen JI, Hohman P, Preuss C, Li L, Fischer SH, Fedorko DP (2007) Detection of vaccinia virus DNA, but not infectious virus, in the blood of smallpox vaccine recipients. *Vaccine* 25:4571–4574
124. Fulginiti VA, Papier A, Lane JM, Neff JM, Henderson DA (2003). **Smallpox vaccination: a review, part I. Background, vaccination technique, normal vaccination and revaccination, and expected normal reactions.** *Clin Infect Dis* 37:241–250
125. Fulginiti VA, Papier A, Lane JM, Neff JM, Henderson DA (2003) Smallpox vaccination: a review, part II. Adverse events. *Clin Infect Dis* 37:251–271
126. Nitsche A, Kurth A, Pauli G (2007) Viremia in human Cowpox virus infection. *J Clin Virol* 40: 160–162
127. Schmidt M, Roth WK, Meyer H, Seifried E, Hourfar MK (2005) Nucleic acid test screening of blood donors for orthopoxviruses can potentially prevent dispersion of viral agents in case of bioterrorism. *Transfusion* 45:399–403
128. Amareld RW, Wersocki M, Drohan M, Drohan MN, Burgess WH, Mann M, Forng RY (2003) Controlled gamma-irradiation mediated pathogen inactivation of human urokinase preparations with significant recovery of enzymatic activity. *Biologicals* 31:261–264
129. Remington KM, Trejo SR, Buczynski G, Li H, Osheroff WP, Brown JP, Renfrow H, Reynolds R, Pifat DY (2004) Inactivation of West Nile virus, vaccinia virus and viral surrogates for relevant and emergent viral pathogens in plasma-derived products. *Vox Sanguinis* 87:10–18
130. Roberts P (2000) Resistance of Vaccinia virus to inactivation by solvent/detergent treatment of blood products. *Biologicals* 28:29–32
131. Chandra S, Cavanaugh JE, Lin CM, Pierre-Jerome C, Yerram N, Weeks R, Flanigan E, Feldman F (1999) Virus reduction in the preparation of intravenous immune globulin: in vitro experiments. *Transfusion* 39:249–257
132. Berting A, Goerner W, Spruth M, Kistner O, Kreil TR (2005) Effective poxvirus removal by sterile filtration during manufacture of plasma derivatives. *J Med Virol* 75:603–607
133. Gubser C, Smith GL (2002) The sequence of camelpox virus shows it is most closely related to variola virus, the cause of smallpox. *J Gen Virol* 83:855–872