

West-Nil-Virus

Stellungnahmen des Arbeitskreises Blut des Bundesministeriums für Gesundheit

Der Arbeitskreis Blut des Bundesministeriums für Gesundheit 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 werden als Zusammenfassung des aktuellen Wissensstandes veröffentlicht, speziell unter transfusionsmedizinisch relevanten Aspekten (Bundesgesundheitsbl., 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 1/2* (Bundesgesundheitsbl., 41, 512–517, 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)* (Bun-

desgesundheitsbl. 50, 1192–1207, 2007), *Hepatitis-E-Virus* (Bundesgesundheitsbl. 51, 90–97, 2008), *Malaria* (Bundesgesundheitsbl. 51, 236–249, 2008), *Arboprotozoen* (Bundesgesundheitsbl. 52, 123–146, 2009), *Orthopockenviren: Infektionen des Menschen* (Bundesgesundheitsbl. 53, 957–972, 2010), *Humanes Cytomegalievirus (HCMV)* (Bundesgesundheitsbl. 53, 973–983, 2010), *Parvovirus B19* (Bundesgesundheitsbl. 53, 944–956, 2010), *Dengue Fieber Virus (DENV)* (Bundesgesundheitsbl. 54, 892–903, 2011), *XMRV* (Bundesgesundheitsbl. 55, 1057–1060) und *Arbonematoden – durch Arthropoden übertragbare Nematoden-Infektionen* (Bundesgesundheitsbl. 55, 1044–1056).

West-Nil-Virus

In den letzten Jahren weckte die Gruppe der Arboviren als Erreger von neu oder erneut auftretenden Infektionskrankheiten beim Menschen (emerging and re-emerging infections) erhebliches Interesse. Die Bedeutung der Arboviren für die Transfusion wurde bereits in einer früheren Veröffentlichung der Arbeitsgruppe dargestellt [1]. Besondere Aufmerksamkeit erregte in den letzten Jahren das West-Nil-Virus (WNV). Seit seiner Erstbeschreibung im Jahre 1940 wurde angenommen, dass dieser Erreger zwar ein weites Verbreitungsgebiet hat (Afrika, Asien, Mittlerer Osten, Südeuropa und Australien [mit dem Subtyp Kunjin-Virus]), aber in der Regel nur wenig pathogen ist. Diese Ansicht änderte sich im Jahre 1999, als WNV erstmals in den USA nachgewiesen wurde und beim Menschen eine Vielzahl schwerer zentralnervöser Erkrankungen ver-

ursachte, teilweise mit letalem Ausgang. Dies führte zu einer Neubewertung der bis dahin in Europa aufgetretenen Ausbrüche durch WNV und zur verstärkten epidemiologischen Überwachung. Seither sind sowohl die Epidemiologie und Pathogenese als auch die Eigenschaften des Virus Gegenstand einer Vielzahl von wissenschaftlichen Untersuchungen.

1 Wissensstand über den Erreger

West-Nil-Virus (WNV) wird zu den Arboviren (arthropod-borne viruses; durch Arthropoden übertragbare Viren) gruppiert. Unter den Arboviren werden diejenigen Viren zusammengefasst, die sich sowohl in Arthropoden (beispielsweise Mücken, Zecken) als auch in Vertebraten (beispielsweise Vögeln und Säugetieren) vermehren und durch die infizierten Gliederfüßler, insbesondere Mücken, bei der Blutmahlzeit auf Vertebraten übertragen werden können. WNV wurde erstmals im Jahre 1937 aus dem Blut einer fiebernden Patientin isoliert, die im Rahmen einer Studie zur Schlafkrankheit im West-Nil-Distrikt von Uganda untersucht wurde [2]. Dieses in Mäusen neurotrophe Virus wurde nach der Herkunftsregion als West-Nil-Virus bezeichnet. WNV wird in die Gattung Flavivirus innerhalb der Familie der Flaviviridae eingeordnet. Namensgeber für diese Virusfamilie ist das Gelbfieberevirus (lat. flavus = gelb). Eine enge Antigenverwandtschaft des WNV besteht zu anderen Vertretern des Genus Flavivirus, und es wird auf Grund der ausgeprägten Kreuzreaktivität zum Antigenkomplex (serogroup) des Japan-Enzephalitis-Virus (JEV) grup-

Tab. 1 Antigenkomplex (serogroup) des Japan-Enzephalitis-Virus (JEV)

Virus	Haupt-Verbreitungsgebiet	Erkrankungen beim Menschen	Infektionen bei Tieren	Reservoir	Vektor (WNV isoliert aus)
Japan-Enzephalitis-Virus (JEV)	Südostasien, Indien, Japan, Korea, Philippinen	Fieber, Enzephalitis, Meningitis	Schweine, Pferde	Schweine, Vögel	Stechmücken
West-Nil-Virus (WNV)	weltweit	Fieber, Enzephalitis, Meningoenzephalitis	Vögel, Säugetiere, Reptilien	Vögel	Stechmücken (Zecken)
Murray-Valley-Enzephalitis-Virus (MVEV)	Australien	Fieber, Enzephalitis, Meningoenzephalitis	Schafe, Affen	Wasservogel	Stechmücken
St. Louis-Enzephalitis-Virus (SLEV)	USA, Mittel- und Südamerika	Fieber, Enzephalitis	keine bekannt	Vögel	Stechmücken
Usutu-Virus (USUV)	Afrika, Österreich, Ungarn, Südeuropa, Deutschland	Fieber, Enzephalitis bei Immunsupprimierten	Vögel	Nagetiere, Vögel	Stechmücken
Rabensburg-Virus (RABV)	Tschechien	keine bekannt	keine bekannt	unbekannt	Stechmücken
Koutanga-Virus (KOUV)	Senegal, Somalia, Zentralafrikanische Republik	keine bekannt	keine bekannt	(Nagetiere)	Stechmücken, Zecken
Alfy-Virus (ALFV)	Australien	Fieber	keine bekannt	(Sumpffasan) Vögel	Stechmücken
Yaounde-Virus (YAOUV)	Kamerun, Senegal, Zentralafrikanische Republik, Kongo	keine bekannt	keine bekannt	(Nagetiere)	Stechmücken
Cacipacore-Virus (CPCV)	Brasilien	keine bekannt	keine bekannt	(Schwarzkopf-) Ameisendrossel	unbekannt

piert (■ **Tab. 1**). Diese Erregergruppe umfasst für Menschen und Tiere wichtige Krankheitserreger wie den Namensgeber JEV, das St. Louis-Enzephalitis-Virus (SLEV), das Murray-Valley-Enzephalitis-Virus (MVEV), das WNV zusammen mit dem Kunjin-Virus (KUNV) und das Usutu-Virus (USUV) [3]. Dem JEV-Antigenkomplex werden weitere Flaviviren zugeordnet, über deren Bedeutung als Krankheitserreger für Menschen und Tiere jedoch wenig bekannt ist (■ **Tab. 1**).

WNV ist heute das geografisch am weitesten verbreitete durch Mücken übertragene Virus; Infektionen mit WNV wurden auf allen fünf Kontinenten beobachtet. Der natürliche Übertragungszyklus findet zwischen ornithophilen Mücken (Vektor) und Vögeln statt (Reservoir oder Amplifikator). Mücken infizieren sich bei der Blutmahlzeit an virämischen Vögeln und können bei nachfolgenden Blutmahlzeiten das Virus auf andere Vögel übertragen. Menschen und Säugetiere, die bei der Blutmahlzeit durch solche Mücken infiziert werden, werden als Endwirte angesehen, können aber an einer Enzephalitis oder Meningitis erkranken. Bis etwa 1999 nahm man an, dass die verschiedenen in Afrika, Europa, Asien und Australien zir-

kulierenden WNV beim Menschen und bei Pferden entweder asymptomatische Infektionen verursachen oder nur milde Erkrankungen hervorrufen. Nur gelegentlich wurde über schwere Krankheitsverläufe berichtet. Dies traf sowohl für WNV zu, die zur Linie 1 (Lineage 1) gehören, die in Europa, dem Mittelmeerraum, Asien und Australien zirkulierten, als auch für WNV der Lineage 2, die in Südafrika im Jahr 1974 zu einem Ausbruch von fieberhaften Erkrankungen bei Menschen und Pferden führten [4, 5, 6, 7]. Nachdem WNV im Jahre 1999 in die USA eingeschleppt wurde, beobachtete man dort gehäuft schwere Krankheitsverläufe.

1.1 Erregereigenschaften

WNV zeichnet sich dadurch aus, dass es sich in Arthropoden (Mücken, Zecken), Reptilien (unter anderem Alligatoren), Vögeln und Säugetieren (unter anderem Mensch, Pferd) vermehren kann. Dies erfordert eine Anpassung an die jeweilige Temperatur des infizierten Wirtes. In Mücken als wechselwarme (poikilotherme) Wirte kann WNV sich ab einer Umgebungstemperatur von 14°C vermehren und in febrilen Vögeln bis zu einer Temperatur von etwa 45°C [8, 9].

WNV ist umhüllt, die Lipidmembran leitet sich von Membranen des endoplasmatischen Retikulums ab. Das ikosaedrische Viruspartikel hat einen Durchmesser von etwa 50 nm und enthält das Kapsid mit einem Durchmesser von etwa 30 nm [10] (■ **Abb. 1**). Das Kapsid umschließt wie bei den anderen Flaviviren das Positivstrang-RNA-Genom mit einer Größe von etwa 11 kb.

Das virale Genom dient in der infizierten Zelle als mRNA für die Synthese der viralen Struktur- und Nicht-Struktur-(NS-)Proteine und ist wie bei allen Positivstrang-RNA-Genomen infektiös (Ausnahme: Retroviren). Das 5'-Ende des Genoms hat wie alle eukaryote mRNA eine Cap-Struktur, die für die Stabilität der mRNA und für die Translation am Ribosom wichtig ist. Anders als zelluläre mRNA enthält das Genom jedoch kein polyadenyliertes 3'-Ende.

Das Genom kodiert für ein Polyprotein mit einer Größe von etwa 3.300 Aminosäuren (■ **Abb. 2**). Die ersten drei Genabschnitte kodieren für die Strukturproteine: das Kapsidprotein (C), das Vorläufer-Membranprotein/Membranprotein (prM/M) und das Hüllprotein (E, envelope protein). Die Strukturproteine sind

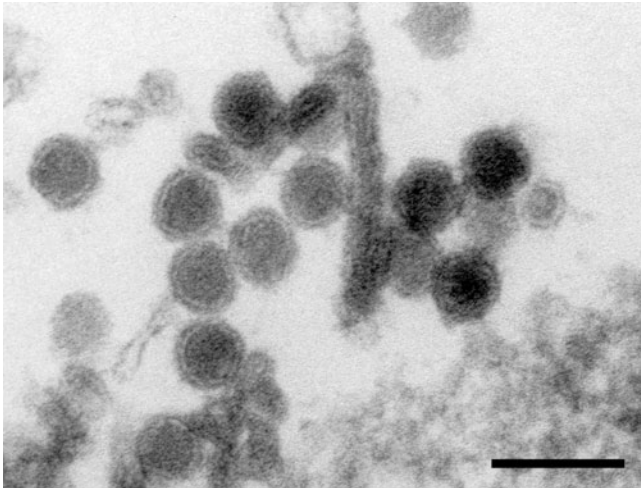


Abb. 1 ◀ Ultradünnschnitt einer West-Nil-Virus-infizierten Zellkultur. Viruspartikel sind umhüllt mit innen liegendem Core. EM-Aufnahme nach Negativkontrastierung mit Uranylacetat. Der Balken entspricht einer Länge von 100 nm. Aufnahme Dr. H. R. Gelderblom, Robert Koch-Institut

5'-Cap-UTR-C-prM-E-NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS5B-NS5-UTR-3'

Abb. 2 ▲ Genomstruktur von WNV.

C=Capsid-Protein/Kapsid-Protein, prM-Vorläufer des Membranprotein, E=Oberflächenglykoprotein (envelope protein), NS=Nichtstrukturprotein, UTR= nicht-translatierte Sequenz (untranslated region)

für die Bildung der Viruspartikel notwendig, während die sieben Nicht-Strukturproteine an der Virusreplikation und dem Zusammenbau (assembly) der Viruspartikel beteiligt sind. Zudem findet man sowohl am 5'- als auch am 3'-Ende regulatorische nicht-translatierte Sequenzen (UTR, untranslated region). Die Spaltung von C/prM, prM/E sowie E/NS1 erfolgt durch zelluläre Furin-ähnliche Proteasen, während die virale NS3-Protease die anderen Schnittstellen des viralen Polyproteins spaltet. NS3 ist eine Serin-Protease, wobei für die Aktivität des Enzyms NS2B als Ko-Faktor dient. Zudem hat NS3 weitere enzymatische Aktivitäten (5'-RNA-Triphosphatase [RTPase], Nukleosid-Triphosphatase [NTPase] und ATP-abhängige RNA-Helikase). Das multifunktionale NS3-Protein wird ebenso wie das NS5-Protein als geeignetes Ziel für die Entwicklung von antiviralen Medikamenten angesehen [11]. NS5 kodiert für die RNA-abhängige RNA-Polymerase sowie für eine N-7- und eine 2'-O-Methyltransferase (MTase), die für die Methylierung der 5'-RNA-Cap-Struktur notwendig sind. NS1 wird in großen Mengen aus infizierten Zellen ausgeschleust und induziert eine Immunantwort in Infizierten [12]. Das NS1-Protein inhibiert die Signaltransduktion für die angeborene Im-

munität und ist damit in der Lage die Verbreitung des Erregers im Organismus zu erleichtern [13]. NS2A trägt zum Virusassembly bei. NS2A inhibiert die Aktivierung des IFN- β -Promotors, während NS4B die IFN-Antwort blockiert. NS4A modifiziert die Struktur des ER und ermöglicht so eine effiziente Replikation [14, 15]. Alle Struktur- und NS-Proteine sind für eine effiziente WNV-Replikation notwendig.

Das infektiöse Viruspartikel enthält drei Strukturproteine, das Core- oder Kapsidprotein C, das Hüllprotein E und das Membranprotein M. Die äußere Schicht des Virus wird durch die E-Proteine gebildet, die als Homodimere vorliegen. Kristall-Strukturanalysen zeigten, dass das E-Protein, ähnlich wie bei anderen Flaviviren, drei strukturelle Domänen aufweist, wobei die Domäne III an der Rezeptorbindung beteiligt ist und den überwiegenden Anteil an neutralisierenden Antikörpern induziert [16].

Das Viruspartikel heftet sich mit dem viralen Hüllprotein E an die Zelle; die Rezeptoren auf der Zelle, die für Anheftung (attachment) und Aufnahme (entry) in die Zelle notwendig sind, konnten bisher nicht näher charakterisiert werden. WNV kann je nach Zielzelle verschiedene Zelloberflächenrezeptoren verwenden.

Nach Aufnahme in die Zelle durch Rezeptor-vermittelte Endozytose erfolgt der Transport des Partikels in die Endosomen. Das saure Milieu des Endosoms führt zu einer Konformationsänderung des E-Proteins und ermöglicht damit die Fusion der Virushülle mit der Membran des Endosoms, gefolgt von der Freisetzung des Kapsids in das Zytoplasma [17]. Das virale Genom dient sowohl der Synthese des viralen Vorläuferproteins als auch als Matrize zur Synthese des Negativstrang-Intermediats, an der wiederum genomische RNA durch die virale RNA-abhängige RNA-Polymerase synthetisiert wird. Nach Replikation des Genoms und Synthese der viralen Proteine erfolgt der Zusammenbau (Assembly) der Viruspartikel, die Reifung an den Membranen des Endoplasmatischen Retikulums (ER) und die Freisetzung der Viruspartikel durch Exozytose [18, 19]. Während der Virusreifung wird prM durch eine zelluläre, Furin-ähnliche Protease im ER gespalten, und es entstehen das etwa 70 Aminosäuren große Virus-assoziierte M-Protein und der pr-Anteil des Proteins, der bis zur Freisetzung der Viruspartikel aus der Zelle im leicht sauren Milieu an das Viruspartikel gebunden bleibt. Nach Freisetzung der Viruspartikel aus der Zelle erfolgt bei neutralem pH eine Konformationsänderung des E-Proteins und die Freisetzung des pr-Anteils. Das reife Viruspartikel enthält 90 E-Homodimere und 180 Moleküle M-Protein.

Analysen der reifen Viruspartikel mit Hilfe der Kryoelektronenmikroskopie zeigen eine relativ glatte Virusoberfläche, die durch die 90 anti-parallel angeordneten E-Homodimere gebildet wird [10]. Nur reife Flaviviruspartikel sind infektiös [20, 21]. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die Spaltung des prM-Proteins während der Virusreifung unvollständig ist und dass die Viruspartikel auf der Oberfläche teilweise prM-Determinanten exprimieren. Die freigesetzten Viruspartikel bilden daher eine heterogene Population, die sowohl reife als auch unreife Viruspartikel sowie Übergangsformen enthält [22]. Im Infizierten werden Antikörper gegen das prM-Protein gebildet, die an unreife Viruspartikel binden können. Durch Fc-Rezeptor-vermittelte Aufnahme in die Zelle sind solche Virus-Antikörper-Komple-

xe in der Lage, Zellen zu infizieren [23]. In weiteren Untersuchungen mit WNV konnte zudem gezeigt werden, dass entsprechende Antikörper nicht nur in vitro, sondern auch in vivo eine Infektion ermöglichen und die so behandelten Mäuse erkranken [24]. Inwieweit die Immunantwort gegen prM-Determinanten den Krankheitsverlauf beim Menschen beeinflusst, ist ungeklärt. Diskutiert wird, dass die Bildung unreifer Viruspartikel eine Strategie der Flaviviren darstellen könnte, die Immunantwort des infizierten Wirtes zu unterlaufen [25]. Zur Entwicklung von effizienten Impfstoffen zur Prophylaxe ist es daher notwendig, die Rolle der einzelnen Virus-spezifischen Proteine bei der Immunantwort und der Pathogenese besser zu verstehen.

Phylogenetische Untersuchungen von WNV-Isolaten aus verschiedenen Spezies zeigen, dass unterschiedliche Varianten des WNV zirkulieren, die sich auf der Genomebene sowie in ihrem pathogenen Potenzial unterscheiden (■ Tab. 2).

Von besonderem Interesse ist der Befund, dass sich einzelne WNV-Isolate durch ihr Wachstumsverhalten in Zellkulturen bei höheren Temperaturen (44°C) voneinander unterscheiden [26]. Daher besteht die Möglichkeit, dass solche Änderungen im Wachstumsverhalten einen Einfluss auf die Verbreitung der Erreger sowohl in den Vektoren als auch in den Reservoirwirten haben.

Bisher ging man davon aus, dass alle WNV-Erreger, die sowohl für Menschen als auch für Tiere hoch pathogen sind, phylogenetisch in die Lineage 1 eingruppiert werden können. In den vergangenen Jahren mehrten sich aber die Berichte, dass außerdem WNV-Lineage-2-Isolate sowohl aus Südafrika als auch aus Europa zu schweren Erkrankungen beim Menschen und bei Pferden führen können [33, 34, 35, 36].

Es wird diskutiert, die ursprüngliche Klassifizierung in zwei Linien (Lineage 1 beziehungsweise Lineage 2) zu erweitern. Es wurde vorgeschlagen, ein Isolat (Rabensburgvirus, RABV, [29]), das bisher nur in Stechmücken (*Culex pipiens*) in Tschechien nachgewiesen wurde, als WNV Lineage 3 einzuordnen. In einer Zecke im Kaukasus wurde ein WNV-Isolat gefunden, das sich ebenfalls von den

Lineage-1- und -2-Viren unterscheidet und vorläufig als Lineage 4 klassifiziert wird [30]. Phylogenetische Analysen von Gesamtgenomsequenzen indischer Virusisolate sowohl von Stechmücken als auch Menschen legen nahe, dass diese bisher als Lineage 1 clade 1c eingruppierten Viren eine eigene Lineage 5 darstellen [31]. Ursprünglich wurde das malaysische WNV-Isolat als KUNV eingruppiert. Phylogenetische Untersuchungen zeigen jedoch, dass erhebliche Sequenzunterschiede bestehen, die eine Eingruppierung als Lineage 6 rechtfertigen [28]. In Spanien wurde aus einem Pool von *Culex pipiens* (Gemeine Stechmücke) ein Virus isoliert, das sich von allen bisher sequenzierten WNV phylogenetisch unterscheidet und daher einer neuen Lineage 7 zugeordnet werden könnte [32]. Weitere Untersuchungen zur molekularen Epidemiologie verschiedener Virusisolate von Menschen, Tieren und Arthropoden sind notwendig, um Informationen über das Pathopotenzial von WNV zu erhalten.

Stabilität

WNV ist thermolabil und lässt sich wie andere Flaviviren durch Hitze inaktivieren. Im Serum war nach 30 min bei 56°C kein infektiöses Virus mehr nachweisbar [37]. Bei niedrigen Temperaturen (4°C) bleibt WNV über mehr als 96 h stabil, bei 28°C sinkt der Titer des Virus im gleichen Zeitraum um einen Faktor von 10^3 [38]. Bei Lagerung von experimentell mit WNV kontaminierten Erythrozytenkonzentraten bei niedrigen Temperaturen (1°C–6°C) lassen sich in den Konzentraten auch nach 42 Tagen noch infektiöse Viren nachweisen [39]. Detergensbehandlung und Behandlung bei niedrigem pH, wie sie bei der Herstellung von Plasmaprodukten verwendet werden, inaktivieren WNV bis unter die Nachweisgrenze [40].

1.2 Infektion und Infektionskrankheit

Menschen werden durch Mücken infiziert, die sowohl von Vögeln als auch Menschen ihre Blutmahlzeit nehmen. Durch serologische Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die überwiegende Zahl der Infektionen (etwa 80%) weitgehend asymptomatisch verläuft [41,

42]. Nach einer Inkubationszeit von 2–14 Tagen entwickeln etwa 20% der Infizierten eine selbst-limitierende fieberhafte Erkrankung (West-Nil-Fieber, WNF), die etwa 3–6 Tage andauert. Man beobachtet Unwohlsein, Kopf-, Augen- und Muskelschmerzen, Übelkeit, Erbrechen, Diarrhöe, Appetitlosigkeit, Hautausschlag an Beinen, Armen und Körper, Lymphknotenschwellungen sowie Müdigkeit. Vorherrschend sind dabei plötzlich einsetzendes Fieber und Symptome eines grippalen Infekts. Nur etwa 1% der Infizierten erkrankt schwer mit neurologischen Symptomen (Meningitis, Enzephalitis, Paresen beziehungsweise Paralyse mit Poliomyelitis-ähnlichen Symptomen [AFP]; Übersichtsartikel: [43, 44, 45]).

Durch WNV hervorgerufene Meningitiden (WNM) und Enzephalitiden (WNE) beginnen ähnlich wie andere virale neurologische Erkrankungen mit Fieber, Kopfschmerzen, Nackensteife und Photophobie. Häufig treten mentale Veränderungen wie Verwirrtheit bis hin zu Koma auf. Des Weiteren werden Poliomyelitis-ähnliche Symptome (West-Nil-Poliomyelitis, WNP) diagnostiziert wie schlaffe Lähmungen und andere neurologische Symptome (Ataxie, Optikusneuritis, extrapyramidale Symptome, Hirnnervenschädigungen, Polyradikulitis, Rückenmarksentzündungen, epileptische Anfälle) [46, 47]. Der Anteil tödlich verlaufender WNV-Infektionen bei hospitalisierten Personen mit neurologischen Symptomen lag bei den bisherigen Ausbrüchen in den USA, in Rumänien und Israel beziehungsweise Russland (Wolgograd) zwischen 4% und 14% [48]. Neben dem Lebensalter (>50 Jahre) sind Diabetes mellitus, Bluthochdruck, Lebererkrankung und Immunsuppression Risikofaktoren für schwere Verläufe mit neurologischen Symptomen; zudem spielen genetische Faktoren des Wirtes eine Rolle [49].

Es wurde jedoch auch gezeigt, dass Spätfolgen einer WNV-Infektion auftreten können [50]. So klagte etwa die Hälfte der Personen, die an einer WNM, WNE oder WNP, aber auch an WNF erkrankt waren, noch Monate nach Abklingen der Symptome über gesundheitliche Probleme wie Müdigkeit, Muskelschmerzen sowie Konzentrations- und Gedächtnisschwäche [50, 51].

Tab. 2 Linien (Lineages) des WNV mit Unterschieden auf Genomebene und im pathogenen Potenzial

WNV	Vorkommen	Erkrankungen des Menschen	Infektionen bei Tieren	Isolate aus
Lineage 1 (clade 1a) [27]	weltweit	Fieber, Meningitis, Enzephalitis, Akute schlaffe Lähmung (AFP)	Vögel, Reptilien, Säugetiere	Mensch, Stechmücken, Vögeln, Mammaliern, Reptilien
Lineage 1 (clade 1b) [28]	Australien (Kunjin)	Fieber, Meningitis, Enzephalitis	Vögel	Mücken, Mensch
Lineage 2 [7]	Süd- und Zentralafrika, Madagaskar, Europa	Fieber, Meningitis, Enzephalitis	Vögel, Pferde	Stechmücken, Vögeln, Pferden, Menschen
Potenzielle neue Lineages	USA, Mittel- und Südamerika	Fieber, Enzephalitis	keine bekannt	Vögel
Lineage 3 [29] (RABV)	Tschechien	unbekannt	unbekannt	Culex pipiens
Lineage 4 [30]	Russland	unbekannt	unbekannt	Dermacentor marginatus
Lineage 5 [31] (Lineage 1 clade 1c)	Indien	Fieber, Meningitis, Enzephalitis	Fruchtfressende Fledermaus	Stechmücken, Mensch, Fledermaus
Lineage 6 (KUNV) [28]	Malaysia	Fieber, Meningitis, Enzephalitis	Vögel	Mücken, Mensch
Lineage 7 [32]	Spanien	unbekannt	unbekannt	Culex pipiens
Cacipacore-Virus (CPCV)	Brasilien	keine bekannt	keine bekannt	(Schwarzkopf-) Ameisen-drossel

In Infektionsstudien an Hamstern wurde gezeigt, dass WNV in diesen Tieren in Geweben persistiert und dass infektiöses WNV über den Urin ausgeschieden wird. Beim Menschen konnte WNV in der akuten Phase im Urin nachgewiesen werden [52]. Ob WNV auch in Personen persistiert, die die Infektion überwunden haben, und ob dieses Virus über den Urin ausscheiden können, wird kontrovers diskutiert [53, 54]. Im Gehirn von Patienten, die während der akuten Phase der WNV-Infektion verstarben, konnte WNV nachgewiesen werden, jedoch nicht in Personen, die mehrere Monate nach Auftreten der Symptome verstarben. Eine Persistenz der WNV-Infektion konnte jedoch in einem Patienten mit einer Meningoenzephalitis bei einem B-Zell-Lymphom und therapiebedingter Immunsuppression über Monate nachgewiesen werden [55].

Immunsupprimierte Patienten haben ein höheres Risiko schwer zu erkranken, und 40–60% der immunsupprimierten transplantierten Patienten entwickeln in Folge einer WNV-Infektion schwere neurologische Erkrankungen unabhängig davon, ob die Infektion über das Organ, eine Transfusion oder durch Mücken erfolgte [56, 57, 58, 59]. Das Risiko, schwer zu erkranken, ist damit für diese Patienten etwa 40–60-mal höher als das der Normalbevölkerung.

Für den Krankheitsverlauf spielen sowohl Eigenschaften des Virus als auch Wirtsfaktoren eine wichtige Rolle. Von großer Bedeutung für die Auseinandersetzung von Erreger und Wirt ist die angeborene Immunität (innate immunity). Im infizierten Organismus sind in Abhängigkeit vom Pathogen verschiedene Chemokine und Chemokinrezeptoren an der Auseinandersetzung beteiligt [49]. Bei Personen, die eine Deletion im Gen für den Chemokinrezeptor 5 (CCR5 Δ 32) und damit einen Verlust der CCR5-Funktion aufweisen, verläuft die WNV-Infektion schwer mit ausgeprägten Symptomen [60, 61]. In Mausexperimenten konnte gezeigt werden, dass CCR5 für eine effiziente Immunantwort gegen WNV sowie andere Flaviviren notwendig ist [62]. Dies steht im Gegensatz zur Infektion mit HIV, wo gezeigt werden konnte, dass CCR5 ein wesentlicher Ko-Rezeptor für HIV ist und Personen mit der Deletion in CCR5 (CCR5 Δ 32) gegen eine Infektion mit HIV-1, das diesen Ko-Rezeptor für die Infektion benötigt, geschützt sind [63]. Welchen Einfluss CCR5-Antagonisten, die als Therapeutika gegen die HIV-Vermehrung eingesetzt werden, auf die WNV-Infektion haben, ist bisher nicht bekannt [64].

Vom European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) wurden Falldefinitionen erarbeitet, die allgemein

gültige Kriterien für die Erkennung von Infektionskrankheiten und deren Erreger festlegen, so auch für WNV-Infektionen (http://ec.europa.eu/health/ph_threats/com/docs/1589_2008_en.pdf; <http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/IfSG/Falldefinition/EuroFalldefinitionen/EuroFalldefinitionen.html>).

1.3 Epidemiologie

Nach seiner Erstbeschreibung im Jahre 1940 herrschte lange Zeit die Meinung vor, dass die in Afrika, Asien und Australien zirkulierenden WNV in der Regel asymptomatische Infektionen oder Infektionen mit milden Symptomen hervorrufen [5]. Seit Mitte der 90er Jahre des vorigen Jahrhunderts wurden Ausbrüche mit schweren neurologischen Erkrankungen in Europa (Rumänien und Russland) und Israel beobachtet [27, 65]. Besondere Bedeutung bekam WNV, nachdem im Jahre 1999 WNV erstmals in New York aus erkrankten Vögeln und Menschen isoliert worden war. Beginnend in New York breitete sich WNV innerhalb von drei Jahren in den gesamten USA und im Süden Kanadas aus [53]. In den folgenden Jahren wurde WNV dann auch in der Karibik, Mittel- und Südamerika nachgewiesen [53]. Die Epidemie in den USA zeichnete sich durch schwere Erkrankungen von Menschen und Pferden aus, aber insbesondere durch eine hohe Sterblich-

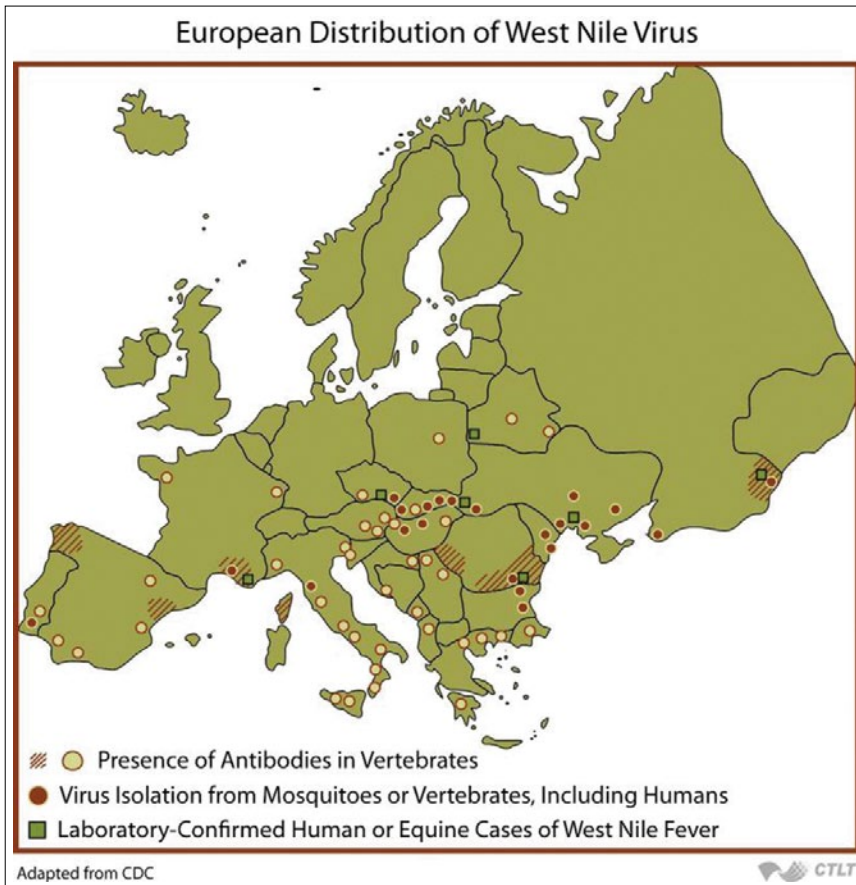


Abb. 3 ▲ Nachweis von WNV-Infektionen bei Vögeln, Mücken, Pferden und Menschen in Europa. Quelle: European Distribution of West Nile Virus from Epidemiology of Infectious Diseases. Available at: <http://ocw.jhsph.edu>. Copyright © Johns Hopkins Bloomberg School of Public Health

keit bei Vögeln, vor allem bei Krähen-
vögeln (Karten zur Ausbreitungsdyna-
mik: <http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/westnile/index.htm>). Heute ist WNV auf dem gesamten amerikanischen Kontinent von Kanada bis Argentinien endemisch [48, 66].

Die WNV-Epidemie in USA und anderen amerikanischen Ländern wurde durch ein phylogenetisch einheitliches Virus hervorgerufen, das zur WNV Lineage 1 clade 1a gruppiert wird. Das Virus ist bisher in USA bei mehr als 320 Vogelarten, beim Menschen und zahlreichen weiteren Säugetieren (unter anderem Pferd, Hund, Katze), aber auch bei Alligatoren nachgewiesen worden (www.cdc.gov/ncidod/dvbid/westnile/birds&mammals.htm; <http://www.aphis.usda.gov/vs/nahss/equine/wnv/>). Bisher zeigen Sequenzvergleiche der Isolate aus den verschiedenen Spezies, die in verschiedenen Regionen und zu unterschiedlichen Zei-

ten gewonnen wurden, nur geringe Sequenzunterschiede [67].

Humane WNV-Infektionen in Europa und im Mittelmeerraum

Östlicher und westlicher Mittelmeerraum: Anfang der 1950er Jahre wurden in Israel erstmals Meningitiden und Enzephalitiden bei Menschen als Folge von WNV-Infektionen berichtet [68]. Einzelne Infektionen und gelegentlich größere Ausbrüche konnten in den folgenden Jahren durch Laboruntersuchungen bestätigt werden. Während eines Ausbruchs im Jahre 1957 wurden erstmals Todesfälle in Folge einer WNE registriert [69]. Ein weiterer größerer Ausbruch erfolgte Ende der 1970er/Anfang der 1980er Jahre [69]. Die Erkrankungen wurden durch Viren hervorgerufen, die mit virologischen und serologischen Methoden als WNV Lineage 1 klassifiziert wurden.

Etwa ab Mitte der 1990er Jahre traten dann gehäuft Erkrankungen bei Menschen und Pferden in Israel auf. Im Jahr 1998 wurden zudem Ausbrüche mit WNV in israelischen Gänsefarmen berichtet und gleichzeitig die Isolierung von WNV aus Störchen, die auf der Wanderung in die Überwinterungsgebiete Afrikas waren [68, 69, 70]. Verstärkte Überwachung der WNV-Infektion bei Menschen mit Hilfe von serologischen, virologischen und molekularen Methoden zeigte, dass ein hoher Prozentsatz der Personen (etwa 86%), die engen Kontakt zu erkrankten Gänsen hatten, und außerdem Personen (etwa 28%), die in Regionen lebten, die bevorzugt von Zugvögeln aufgesucht wurden, neutralisierende Antikörper gegen WNV aufwiesen [68]. Im Sommer 2000 wurden in Israel mehr als 250 WNV-Erkrankungen bei Menschen erfasst. Die phylogenetische Analyse ergab, dass zwei verschiedene WNV-Varianten (Cluster) für den Ausbruch verantwortlich waren, die eng verwandt waren mit Isolaten aus israelischen und amerikanischen Vögeln aus dem Jahr 1999 beziehungsweise mit Isolaten aus Rumänien aus dem Jahr 1997 [69]. Seroepidemiologische Untersuchungen ergaben, dass in der gleichen Region, in der die Krankheitsfälle auftraten, eine Seroprävalenz von etwa 50% ermittelt wurde, was belegt, dass eine Vielzahl asymptomatischer Infektionen beim Menschen stattfanden [69]. Fortlaufende Untersuchungen von Patienten mit neuroinvasiven Erkrankungen und serologische Untersuchungen von Personen unterschiedlichen Alters legen nahe, dass WNV in Israel endemisch ist [69, 71, 72].

Eine hohe Durchseuchung wurde auch in den 1950er Jahren in Ägypten festgestellt. Neuere Untersuchungen wiesen eine Seroprävalenz von 24% nach [73]. Der Nachweis von Serokonversionen beim Menschen sowie bei Sentinelhühnern belegt, dass WNV auch in Ägypten endemisch ist.

Schwere Krankheitsverläufe bei Menschen sowie bei Pferden wurden in den 1990er Jahren aus westlichen Regionen des Mittelmeerraumes berichtet [74, 75]: Algerien (1994 etwa 50 Patienten mit Enzephalitis), Marokko (1996 etwa 100 erkrankte Pferde) und Tunesien (etwa 170 Patienten mit Enzephalitis beziehungs-

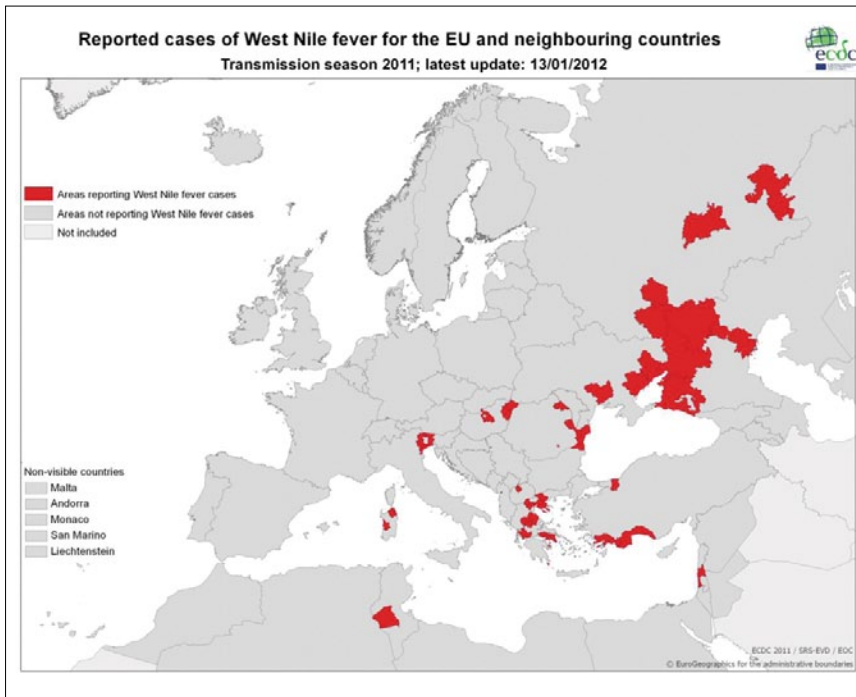


Abb. 4 ▲ Nachweis von WNV-Infektionen beim Menschen in Europa und benachbarten Ländern im Jahre 2011. Copyright © EuroGeographics for the administrative boundaries. http://ecdc.europa.eu/en/activities/diseaseprogrammes/emerging_and_vector_borne_diseases/PublishingImages/1201_West_Nile_fever_map_hires.jpg

weise Meningoenzephalitis). Alle Isolate, die seit 1996 aus Menschen und Pferden im westlichen Mittelmeerraum gewonnen wurden, sind eng miteinander verwandt und werden als ein Cluster von WNV Lineage 1 a betrachtet. Diese enge Verwandtschaft der Isolate lässt den Schluss zu, dass WNV in diese Region eingeschleppt wurde und dann dort endemisch geworden ist [27, 75].

In Europa wurden immer wieder sporadische Erkrankungen bei Pferden und Menschen (in Frankreich, Portugal, Spanien, Italien, Tschechien, Rumänien, Ungarn) beobachtet (Abb. 3; [71]). In der Regel traten diese Erkrankungen im Zeitraum von Ende Juli bis Ende Oktober auf. Ab etwa 2005 hat sich die Verbreitung von WNV in Europa stark verändert. Seit 2008 wurden regelmäßig aus verschiedenen europäischen Ländern WNV-bedingte Erkrankungen bei Menschen berichtet. Bei einem Expertentreffen des ECDC wurde 2009 der Kenntnisstand zur Verbreitung von WNV in Europa zusammengetragen [71]. Zudem wurde eine Webseite eingerichtet, auf der die jeweils aktuellen Fallzahlen in den verschiedenen

europäischen Ländern veröffentlicht werden (Abb. 4; http://ecdc.europa.eu/en/activities/diseaseprogrammes/emerging_and_vector_borne_diseases/Pages/West_Niles_fever_Risk_Maps.aspx).

In Südfrankreich (Camargue) waren bereits im Jahre 1962 Pferde an WNV erkrankt, jedoch wurde über keine Infektionen beim Menschen berichtet. Im Verlauf der 1960er Jahre wurden dann erstmals sporadisch Erkrankungen bei Menschen und Pferden in Südfrankreich diagnostiziert [6].

Der erste große Ausbruch von Erkrankungen bei Menschen durch WNV in Europa mit 17 Todesfällen wurde im Jahr 1996 in Rumänien beobachtet. Durch Laboruntersuchungen konnte bei 393 von 835 hospitalisierten Patienten mit neurologischen Symptomen eine WNV-Infektion bestätigt werden [76]. In den folgenden Jahren mehrten sich die Hinweise, dass WNV sich in Rumänien etabliert hatte und zu Erkrankungen von Menschen und Tieren führte [71, 77].

Erste Fälle von WNV-Infektionen in Italien wurden 1998 bei Pferden in der Toskana beschrieben [78], anschließend

wurde jedoch über einen Zeitraum von etwa zehn Jahren keine WNV-Aktivität in Italien beobachtet. Im August 2008 wurde eine Vielzahl von WNV-Infektionen bei Pferden in Norditalien diagnostiziert [79]. WNV wurde gleichzeitig auch bei einzelnen erkrankten Vögeln (Elstern, Krähen, Tauben) nachgewiesen. Im Jahre 2009 wurden in den gleichen norditalienischen Regionen erneut Infektionen bei Pferden und auch bei Menschen diagnostiziert [80, 81]. Weitere Untersuchungen legen nahe, dass WNV auch zu Erkrankungen in anderen italienischen Regionen geführt hat [82, 83]. Retrospektive Untersuchungen von Patienten mit neurologischen Symptomen, die kompatibel mit einer WNV-Infektion sind, weisen darauf hin, dass WNV schon vor 2008 in Norditalien zirkulierte und Infektionen bei Menschen hervorrief [84]. Über Hinweise, dass WNV auch bei Blutspendern in den Endemiegebieten Italiens vorhanden sind, wurde kürzlich berichtet [83, 85, 86]. Die in Italien in den letzten Jahren beobachteten Infektionen mit WNV und die mehrfache Isolierung des Erregers aus Stechmücken lassen den Schluss zu, dass WNV in Italien endemisch geworden ist und die WNV-Isolate eng verwandt sind mit den anderen im westlichen Mittelmeerraum zirkulierenden WNV [27, 65, 83].

Im August 2010 berichtete Griechenland erstmals über WNV-Erkrankungen bei Menschen [36, 87, 88]. Insgesamt wurden für das Jahr 2010 262 Infektionen gemeldet [88]. Etwa 70 Fälle wurden bis Mitte Oktober 2011 registriert [89]. Seroepidemiologische Untersuchungen, die in früheren Jahren durchgeführt wurden, gaben bereits Hinweise darauf, dass WNV oder ein eng verwandtes Virus in Griechenland zirkuliert, es wurden jedoch keine Krankheitsfälle beobachtet [90]. Molekularepidemiologische Untersuchungen legen nahe, dass die im Jahre 2010/2011 zirkulierenden WNV der Lineage 2 zugeordnet werden können und diese eng mit den zeitgleich in Ungarn, Österreich und Russland sowie Südafrika auftretenden Isolaten verwandt sind [36].

WNV in Russland

Zwischen 1963 und 1993 wurden im europäischen Teil Russlands sowie in West-

sibirien verschiedene WNV aus Vögeln, Stechmücken und Zecken isoliert. Serologische Untersuchungen in den gleichen Regionen belegten, dass 0,4–8% der Bevölkerung Antikörper-positiv war [91, 92]. Dies lässt vermuten, dass WNV in diesen Regionen seit längerer Zeit endemisch ist. Obwohl sporadisch klinische Fälle bei Menschen vor allem im Wolga-Delta auftraten, wurden WNV-Infektionen nicht als Gesundheitsproblem angesehen. Mitte 1999 traten dann gehäuft Erkrankungen bei Bewohnern der Region Wolgograd auf (insgesamt etwa 1.000 Erkrankte, davon mehr als 400 mit WNV beziehungsweise WNE) [92]. Sequenzanalysen belegten, dass diese Epidemie von einem Virus hervorgerufen wurde, das eng verwandt war mit einem Isolat aus Rumänien aus dem Jahr 1996 und israelischen Isolaten aus dem Jahr 1999. Da ein israelisches Isolat von einem Storch gewonnen wurde, der auf der Wanderung zu den Winterquartieren in Afrika war, besteht die Möglichkeit, dass sich der Storch auf seinem Flug aus den Brutgebieten in Osteuropa infiziert hat, und man kann nicht ausschließen, dass diese WNV-Variante in diesen Gebieten endemisch ist [27, 93]. In den letzten Jahren wurden gehäuft Erkrankungen durch WNV in Südrussland berichtet (Regionen Wolgograd, Rostov, Astrachan, Woronesch und die Republik Kalmückien) ([71]; http://ecdc.europa.eu/en/activities/diseaseprogrammes/emerging_and_vector_borne_diseases/Pages/West_Niles_fever_Risk_Maps.aspx). Fasst man die Erkenntnisse aus den Nachweisen von WNV in den vergangenen Jahren zusammen, so kann man davon ausgehen, dass WNV in Südrussland und hier vor allem im Wolgadelta endemisch ist und dass verschiedene, genetisch unterschiedliche WNV der Lineage 1a zirkulieren [27, 93]. Inwieweit diese Region auch Ausgangspunkt für die Verbreitung von WNV durch Zugvögel ist, wurde bisher nicht eingehend untersucht.

WNV Lineage 2 in Europa

Unerwartet war die Isolierung von WNV Lineage 2 aus Pferden, die mit neurologischen Symptomen erkrankt waren, und aus Vögeln in Südafrika, aber auch Vögeln in Ungarn und Österreich [29, 33, 79, 94]. Nach dem heutigen Kenntnisstand

werden in Europa Erkrankungen bei Menschen und Pferden nicht nur durch WNV Lineage 1 (clade 1a), sondern auch WNV Lineage 2 hervorgerufen. Die 2007 in Russland und 2010 in Rumänien und Griechenland sowie 2011 auch in Italien beobachteten Ausbrüche sind nach phylogenetischen Untersuchungen durch WNV Lineage 2 verursacht [36, 88, 95, 96, 97]. Erkrankungen von Menschen mit neurologischen Symptomen wurden im gleichen Zeitraum auch aus Südafrika berichtet [34].

Bisher wurde angenommen, dass WNV-Lineage-2-Viren nur in Zentral- und Südafrika sowie Madagaskar zirkulieren und zu milden Erkrankungen bei Vertebraten führen. Das Vordringen von WNV der Lineage 2 nach Europa und die Änderung des pathogenen Potenzials für Vögel, Pferde und Menschen belegen, dass WNV einer ständigen Evolution und Selektion unterworfen ist. Inwieweit das seit einigen Jahren vermehrte Auftreten von WNV im Mittelmeerraum, in Rumänien und Russland, aber auch in Österreich, Ungarn und Tschechien auf genetische Veränderungen der Viren zurückgeführt werden kann, die eine bessere Vermehrung der Erreger in den dort vorhandenen Vektoren, aber auch in Vögeln ermöglichen, sollte weiter untersucht werden.

Importierte WNV-Infektionen und Hinweise auf Infektionen in Deutschland

Vereinzelte Fälle von Erkrankungen durch importierte WNV-Infektionen wurden in verschiedenen europäischen Ländern in den Jahren 1998–2005 diagnostiziert. Die meisten Erkrankungen wurden dabei in Frankreich registriert (Import aus Senegal 1998, aus den USA 2002 und drei Fälle 2003, aus Tunesien 2003, aus Djibouti vier Fälle 2005). In Tschechien und Dänemark wurden importierte Infektionen aus den USA im Jahr 2002 berichtet, in den Niederlanden drei Fälle aus den USA im Jahr 2003, in Deutschland zwei Fälle aus den USA im Jahr 2003 und ein Fall im Jahr 2004 sowie zwei Fälle in Irland, bei denen die Patienten die Infektion in Portugal erworben hatten [98, 99]. In der Schweiz wurde eine aus Ägypten importierte Infektion diagnostiziert, und kürzlich wurde über eine WNV-Infektion

einer Niederländerin nach Rückkehr aus Israel berichtet [100]. Die Ergebnisse belegen, dass der Aufenthalt in Gebieten, in denen WNV endemisch ist, ein Risiko für den Erwerb einer WNV-Infektion darstellt. Wie hoch die Dunkelziffer von asymptomatisch verlaufenden Infektionen bei Personen ist, die sich in WNV-Endemiegebieten aufgehalten haben, ist unbekannt.

Um Hinweise darauf zu erhalten, ob bisher unerkannt in Deutschland Menschen oder Pferde mit neurologischen Erkrankungen, die kompatibel mit der Falldefinition für West-Nil-Virus-Infektionen sind, mit WNV infiziert waren, wurden retrospektiv Seren von akut erkrankten Menschen beziehungsweise Pferden mit Hilfe der PCR auf WNV-Genom untersucht [101]. In keinem Fall konnte virale RNA nachgewiesen werden, was darauf hinweist, dass zum Zeitpunkt der Probennahme keine unerkannten WNV-Infektionen in Deutschland auftraten.

Weitere Übertragungswege (iatrogen, Mutter-Kind, Transplantationen, Laborunfälle)

In den USA wurde im Jahr 2002 erstmals über WNV-Infektionen berichtet, die durch Blutkomponenten übertragen wurden [102]. Übertragungen von WNV durch Mütter, die sich während der Schwangerschaft mit WNV infiziert hatten, wurden untersucht. Eine in der 27. Schwangerschaftswoche akut an WNV erkrankte Mutter übertrug WNV auf das Kind [103]. Inwieweit die Geburtschäden des Kindes auf die Infektion zurückzuführen sind, ist nicht geklärt, da in den folgenden Jahren ebenfalls Schwangere mit WNV infiziert wurden und die Kinder keine erkennbaren Schädigungen aufwiesen. Unter 72 untersuchten Neugeborenen wurden nur drei Kinder möglicherweise kongenital infiziert [104]. Eine Übertragung könnte durch Muttermilch erfolgen, da in der Muttermilch virale RNA und im Säugling IgM nachgewiesen werden konnte; dieser entwickelte jedoch keine Symptome [103].

Ebenfalls im Jahre 2002 fand erstmals eine Übertragung von WNV durch transplantierte Organe statt [105]. Aus Italien wurden ebenfalls Übertragungen von WNV auf die Empfänger von Organtrans-

plantaten berichtet, wobei der Organ-spender unauffällig war und im Blut dieses Spenders kein WNV mit der PCR, die aufgrund der epidemiologischen Situation in Italien durchgeführt wurde, nachgewiesen worden war [106, 107, 108].

Über Übertragungen von WNV Lineage 2 bei der Autopsie eines Pferdes und durch eine Nadelstichverletzung wurde aus Südafrika berichtet. Beide Personen entwickelten neurologische Symptome [34]. In den USA wurde über zwei WNV-Lineage-1-Infektionen durch Nadelstichverletzungen berichtet; beide Personen entwickelten nur milde Symptome. Außerdem wurde über eine Infektion durch infizierte Gewebe berichtet [109].

Infektionen mit Usutuvirus (USUV)

Überraschend war, dass 2009 in Norditalien Usutuvirus (USUV) bei immunsupprimierten Patienten, die eine Enzephalitis entwickelten, nachgewiesen wurde [110]. USUV gehört wie WNV zum JEV-Antigenkomplex und wurde im Jahr 2002 in Europa erstmals in Österreich bei Vögeln nachgewiesen [111]. In den vergangenen Jahren häuften sich Berichte aus Ungarn, der Schweiz, Spanien und Italien sowie 2011 erstmals aus Deutschland. Es bestehen Parallelen zur Einschleppung von WNV in die USA und der Ausbreitung des Erregers, da dieses Virus bis zu seinem Auftreten bei Vögeln in Österreich im Jahr 2002 nur aus Afrika bekannt war. USUV etablierte sich dann in den folgenden Jahren dort und in anderen Regionen Europas und wurde somit endemisch [3, 112, 113, 114, 115]. Inwieweit Nukleinsäurenachweisverfahren (NAT) für WNV mit USUV-Sequenzen reagieren und falsch-positive Ergebnisse in der NAT ergeben, ist unklar [116].

Vögel

Vögel werden als Reservoir- beziehungsweise Amplifikationswirt für WNV angesehen. Bisher wurden in den USA bei 326 Vogelspezies Infektionen mit letalem Ausgang beobachtet (<http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/westnile/birdspecies.htm>). Man kann davon ausgehen, dass der enzootische Zyklus zwischen Wildvögeln und ornithophilen Stechmücken in vielen Feuchtgebieten in den gemäßigten Breiten Europas auftritt. Beispiele sind die Ca-

margue in Frankreich, die Poebene in Italien, die Donauebene in Rumänien und das Wolgadelta in Russland. Stechmücken vermehren sich vor allem bei warmem Wetter, wenn geeignete Brutplätze vorhanden sind. Nicht unerwartet ist daher, dass in diesen Gebieten eine vergleichsweise hohe Durchseuchung von Vögeln mit WNV beobachtet wird.

Infizierte Tiere entwickeln in der Regel eine Virämie, die hoch genug ist, um Blut saugende Stechmücken zu infizieren ($\geq 105/\text{ml}$ Blut). Man geht davon aus, dass die Einschleppung von WNV nach Europa durch Zugvögel erfolgt, die sich auf ihrer Wanderung in WNV-Endemiegebieten Afrikas infizieren. Die sporadischen Ausbrüche von WNV-Infektionen im Mittelmeerraum lassen sich durch die Wanderung der Vögel und mangelnde Immunität der einheimischen Vögel erklären [75]. Es mehren sich jedoch Hinweise, dass WNV im vergangenen Jahrzehnt in einzelnen Regionen Europas wie Rumänien, Italien, Griechenland und Russland endemisch geworden ist [27, 75].

Zu Beginn der Ausbreitung der WNV-Infektion in USA wurde beobachtet, dass eine Vielzahl von Vögeln an einer akuten WNV-Infektion verstarb, insbesondere Spezies, die in die Familie der Krähenvögel (Ordnung der Sperlingsvögel [Passeriformes]) eingruppiert werden. Im Gegensatz dazu wurden keine Todesfälle bei Vögeln in Europa, Afrika und Asien berichtet [5, 117], und erst etwa ab Mitte der 1990er Jahre wurden einzelne Todesfälle bei Vögeln oder Ausbrüche bei Geflügel beobachtet [33, 36, 69, 118]. Die Unterschiede im Verlauf von WNV-Infektionen bei Vögeln in Europa, Asien und Afrika sowie in den USA könnten einerseits dadurch begründet sein, dass WNV in Afrika und Asien schon seit langer Zeit weit verbreitet war und sich Vögel, die in diesen Endemiegebieten lebten, mit dem Erreger fortlaufend auseinandersetzen mussten. Dabei wurden möglicherweise Vögel selektioniert, die eine geringere Empfindlichkeit gegenüber einer Infektion mit WNV aufwiesen. Diese Selektion könnte durch die Zirkulation unterschiedlich pathogener WNV in den entsprechenden afrikanischen Endemiegebieten unterstützt worden sein. Im Unterschied zur epidemiologischen Situation in

den alten WNV-Endemiegebieten wurde ein hochpathogener Virusstamm in die USA importiert, der in die Lineage 1a gruppiert wird und eng verwandt ist mit für Vögel hochpathogenen Isolaten aus Israel [93].

In USA wurden Untersuchungen zur Virulenz verschiedener WNV-Isolate durchgeführt und die Empfänglichkeit verschiedener Vogelspezies in experimentellen Infektionen amerikanischer Vögel untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass ein Teil der Vogelarten wie zum Beispiel Krähen hochempfindlich für WNV-Infektionen mit dem amerikanischen NY99-Isolat waren und verstarben, während andere Spezies zwar infizierbar waren und eine Virämie entwickelten, jedoch nicht verstarben [119]. In weiteren Untersuchungen wurde belegt, dass Krähen nicht erkrankten, wenn sie mit dem australischen Kunjin-Isolat infiziert wurden [120]. Es gibt jedoch auch Hinweise auf eine Veränderung der Virulenz der in den USA zirkulierenden Viren [121].

Umfangreiche Untersuchungen zum Infektionsverlauf mit verschiedenen in Europa zirkulierenden WNV-Isolaten für europäische Stand- und Zugvögel fehlen. Anders als in den USA wurde in Europa parallel zu Erkrankungen von Pferden und Menschen keine auffallende Sterblichkeit bei Vögeln beobachtet, obwohl WNV in Einzelfällen bei verstorbenen Vögeln nachgewiesen wurde. Die hohe Seroprävalenz in Vögeln in einigen europäischen Regionen weist darauf hin, dass WNV in Vögeln dort endemisch ist beziehungsweise sich Zugvögel in den Winterquartieren in Afrika infiziert haben [3, 33, 65].

Im Jahr 2003 wurden in Ungarn WNV-Infektionen bei toten Gänsen und Wildvögeln nachgewiesen [33]. Das Gänseisolat war sehr nah verwandt mit den israelischen und amerikanischen WNV-Lineage-1a-Isolaten. WNV Lineage 2, das bis dahin nur aus Südafrika bekannt war, wurde bei einem Habicht diagnostiziert [33]. Erstmals im Jahre 2008 wurde WNV dann in Österreich in toten Raubvögeln (Habicht, Gerfalke) nachgewiesen [122]. Ob sich diese Vögel an Beutetieren infiziert hatten oder durch Mücken infiziert wurden, ist unklar.

Um abzuklären, ob ein messbares Risiko besteht, dass WNV durch Zugvögel nach Deutschland eingeschleppt wird, wurden bisher zwei umfangreiche serologische Untersuchungen von Vögeln in Deutschland durchgeführt [123, 124]. In beiden Untersuchungen konnten zu einem geringen Prozentsatz neutralisierende Antikörper gegen WNV in Zugvögeln nachgewiesen werden, jedoch gab es keine Hinweise darauf, dass die Infektionen in Deutschland erworben worden waren. Diese Ergebnisse stimmen mit Untersuchungen von freilebenden Stand- und Zugvögeln aus Tschechien (Mähren) und Polen überein, in denen Antikörper gegen WNV nachgewiesen wurden [125, 126].

Der Nachweis von WNV in Vögeln beziehungsweise Pferden in Österreich und Ungarn seit etwa dem Jahr 2003 legt nahe, dass WNV sich auch in Deutschland etabliert. Eine gezielte Überwachung von verstorbenen Vögeln sowie von Pferden und Menschen mit neurologischen Erkrankungen erscheint daher sinnvoll.

Zur Überwachung von Arbovirusinfektionen, bei denen Vögel als Reservoir für die Erreger dienen, werden in verschiedenen Ländern häufig Hühner und Enten als Indikatoren für die Verbreitung der Erreger eingesetzt (sentinel birds). Die Tiere werden unter Bedingungen gehalten, unter denen eine Übertragung der Erreger durch Arthropoden möglich ist, und regelmäßig serologisch auf das Auftreten von erregerspezifischen Antikörpern untersucht. Hühner lassen sich mit WNV infizieren, weisen jedoch keine klinischen Symptome auf. So konnte beispielsweise in Nordamerika, Italien, Rumänien und Ägypten mit solchen Überwachungssystemen die Verbreitung des WNV nachgewiesen werden [65, 73, 77, 127].

Vergleichbare Untersuchungen von Sentinelvögeln, die zur Überwachung von Virusinfektionen bei Geflügel und anderen Vögeln in Deutschland eingesetzt wurden, ergaben keine Hinweise auf eine Übertragung von WNV in Deutschland [128].

Bedeutung anderer Vertebraten

Die meisten Säugetiere werden als Endwirte (dead-end hosts) für WNV angesehen. Die Anzahl der infektiösen Viruspar-

tikel während der virämischen Phase ist in solchen Spezies wie Mensch oder Pferd in der Regel zu niedrig um Stechmücken zu infizieren. Jedoch wurde in experimentellen Infektionen gezeigt, dass einzelne Säuger-Spezies genügend ausgeprägte Virämien aufweisen um Mücken zu infizieren, wie zum Beispiel Fuchs-Hörnchen (*Sciu rus niger*; [129]), aber auch Reptilien wie Alligatoren [130].

WNV-Infektionen in Pferden wurden in verschiedenen Ländern Europas wie Frankreich und Italien als erste Zeichen des Eindringens des Erregers in diese Regionen beobachtet [74, 78]. Pferde scheinen für WNV sehr empfänglich zu sein [131]. Infizierte Tiere entwickeln häufig eine Enzephalomyelitis mit Symptomen wie Fieber ($> 40^{\circ}\text{C}$), Depressionen, Appetitlosigkeit, ataktischen Bewegungen und eine Hinterhandschwäche, die fast immer zum Festliegen der Pferde führt; etwa die Hälfte der festliegenden Pferde verendet. Serologische Untersuchungen belegen, dass die Mehrzahl der Infektionen asymptomatisch verläuft. So konnten in Europa in Regionen, in denen Erkrankungen bei Pferden nachgewiesen wurden, hohe Durchseuchungsraten festgestellt werden [77, 132, 133]. Konnten bislang alle Isolate von erkrankten Pferden in Europa WNV Lineage 1a zugeordnet werden, war unerwartet, dass ein Lineage-2-WNV in Ungarn, wo bisher keine WNV-Erkrankungen bei Pferden aufgetreten waren, in mehreren Regionen neurologische Erkrankungen bei Pferden induzierte [35].

Untersuchungen mit Hilfe der PCR von über 100 Pferden mit neurologischen Symptomen in Deutschland ergaben keine Hinweise auf Infektionen mit WNV [101].

In der EU sind alle Pferdeenzephalomyelitiden meldepflichtig (national an das Friedrich-Loeffler-Institut und über das Animal Disease Notification System [ADNS] an die EU), ebenso müssen diese Erkrankungen an die Weltorganisation für Tiergesundheit (OIE, World Organisation for Animal Health) gemeldet werden. Der Nachweis einer WNV-Infektion bei Pferden sollte als Frühwarnsystem zur erhöhten Aufmerksamkeit bei der Analyse von neurologischen Erkrankungen des Menschen beitragen.

Bedeutung von Mücken als Überträger von WNV

WNV hat einen natürlichen Zyklus in ornithophilen Stechmücken (als Vektoren) und Vögeln (als Reservoir beziehungsweise Amplifikatoren). Felduntersuchungen haben gezeigt, dass WNV aus einer Vielzahl verschiedener Stechmückenspezies sowie aus Zecken isoliert werden kann [134, 135, 136, 137, 138]. Insgesamt wurden mehr als 60 Stechmückenspezies identifiziert, die mit WNV natürlicherweise infiziert sind oder experimentell infiziert werden können und somit als potentielle Vektoren angesehen werden müssen [139]. Untersuchungen verschiedener Mückenpopulationen legen nahe, dass sich die Vektorkompetenz einer Spezies in Abhängigkeit von der Zeit und der Region unterscheiden kann [140]. Die Rolle der Zecken für die Aufrechterhaltung des Übertragungszyklus von WNV wird kontrovers diskutiert. Experimentell infizierte Zecken der Gattung *Ixodes* übertrugen WNV nicht auf empfängliche Vögel oder Eidechsen [141].

In der Regel sind virämische Vögel das Reservoir, an dem sich Mücken bei der Blutmahlzeit mit WNV infizieren können. Vögel dienen somit als Amplifikator und als Quelle für die regionale und überregionale Verbreitung der Infektion. Weibliche Stechmücken infizieren sich bei der Blutmahlzeit, die sie nach der Befruchtung durch die Männchen nehmen. Stechmücken benötigen Proteine von Vertebraten für die Eireifung. Man unterscheidet ornithophile Mückenarten und solche, die ihre Blutmahlzeit sowohl auf Vögeln als auch Säugetieren und Reptilien nehmen. Diese Mückenspezies werden daher als Brückenvektoren bezeichnet. Vertreter der Gattung *Culex* spielen weltweit die wesentliche Rolle als Überträger von WNV auf Vertebraten [139].

Nach Aufnahme mit der Blutmahlzeit vermehren sich die Viren zuerst im Verdauungstrakt der Mücke. Von dort breitet sich der Erreger im ganzen Organismus aus und gelangt letztendlich in die Speicheldrüsen. Unter experimentellen Bedingungen wurde gezeigt, dass Mücken erst dann Viren bei einer Blutmahlzeit auf Tiere übertragen können, wenn das Virus im Speichel der Mücken vorhanden ist. Ohne dass irgendwelche Sympto-

me erkennbar wären, bleiben die Mücken ihr Leben lang persistent infiziert. Durch ultrastrukturelle Untersuchungen an infizierten Mücken konnte jedoch gezeigt werden, dass in länger infizierten Tieren Organ- und Zellveränderungen auftreten, die dazu führen könnten, dass der Virustiter sinkt und damit die Übertragungswahrscheinlichkeit reduziert wird [142].

In verschiedenen Studien wurde gezeigt, dass die Entwicklung der Virämie in den Mücken und damit deren Kompetenz den Erreger auf Vertebraten zu übertragen temperaturabhängig ist [143]. Je höher die durchschnittliche Umgebungstemperatur nach der Blutmahlzeit ist, desto schneller verläuft die Ausbreitung des Erregers in der Mücke und desto mehr Mücken entwickeln die Kompetenz, das Virus bei einer nachfolgenden Blutmahlzeit zu übertragen [8, 144]. Mücken, die experimentell mit WNV infiziert und bei einer Umgebungstemperatur von konstant 30°C gehalten wurden, übertragen WNV effizienter auf Versuchstiere als Mücken, die bei 26°C lebten [145]. Oral infizierte Mücken, die bei einer Umgebungstemperatur von 26°C beziehungsweise 30°C inkubiert wurden, entwickelten nach elf beziehungsweise 16 Tagen einen zur Übertragung ausreichenden Virustiter von etwa 10^7 /Mücke. Bei einer durchschnittlichen Umgebungstemperatur von 18°C beziehungsweise 14°C wurden vergleichbare Titer erst nach 22 beziehungsweise 58 Tagen gemessen. Außerdem konnten die Autoren zeigen, dass sich die Lebenszeit von Mücken bei niedrigen Umgebungstemperaturen verlängert und damit auch die Wahrscheinlichkeit steigt, dass WNV durch überwinternde Mücken weitergegeben werden kann. Dies konnte experimentell und durch systematische Analyse von infizierten überwinternden Mücken nachgewiesen werden [146, 147, 148].

Für verschiedene Flaviviren wurde gezeigt, dass bei Stechmücken neben der Infektion während der Blutmahlzeit auch die vertikale Übertragung eine Rolle spielt [147, 149]. Dies konnte sowohl durch Untersuchung der Nachkommenschaft von experimentell infizierten Mücken als auch durch Virusisolierung aus männlichen Mücken gezeigt werden, die über die Eier infiziert worden sein müssen, da Mückenmännchen keine Blutmahlzeit

nehmen, sondern sich ausschließlich von Pflanzensäften ernähren [130, 150]. Die transovariable Übertragung der Viren ist möglicherweise für die Aufrechterhaltung des Infektionszyklus zwischen Mücken und Vögeln bedeutsam, da gezeigt werden konnte, dass Mücken, die sich im Winter in der Diapause befinden, WNV infiziert sind, jedoch keine Blutmahlzeit genommen hatten [148]. Die Transmissionsrate über das Ei zeigt eine Abhängigkeit von Mückenspezies und Virusstamm und liegt im Bereich von 1:20 bis 1:1000 [151, 152, 153].

In verschiedenen Infektionsversuchen wurde gezeigt, dass etwa 10^5 infektiöse Viruspartikel pro mL Blut notwendig sind um eine Stechmücke durch eine Blutmahlzeit zu infizieren [119]. Die Wechselwirkung zwischen den verschiedenen Mückenspezies und unterschiedlichen WNV-Varianten (Isolaten) ist komplex und bisher nur teilweise verstanden. In Infektionsversuchen konnte gezeigt werden, dass Unterschiede in der Suszeptibilität verschiedener Mückenspezies bestehen und unterschiedliche Mengen an infektiösen WNV zur Etablierung der WNV-Infektion in verschiedenen Mückenspezies notwendig sind. Anders gesagt, die Rate an infizierten und damit zur Übertragung fähigen Mücken kann nach Exposition verschiedener Mückenspezies mit der gleichen Virusmenge unterschiedlich sein [137, 154]. Es ist wichtig, den Zusammenhang von WNV-Varianten, Verbreitung von empfänglichen Mückenspezies und Landschaftsraum und Klima (Temperatur, Feuchtigkeit etc.) zu verstehen, wenn das Risiko abgeschätzt werden soll, ob WNV in einer bestimmten Region wie zum Beispiel Deutschland endemisch werden kann [155].

Nachweis von WNV in Stechmücken in Europa

In Europa wurden in verschiedenen Untersuchungen Mückenspezies nachgewiesen, die WNV übertragen können oder mit WNV infiziert sind. Aus verschiedenen Stechmückenspezies wurden sowohl WNV-Isolate gewonnen, die zur Lineage 1 oder 2 gruppiert werden, als auch weitere Isolate, die bisher ausschließlich in Mücken gefunden wurden, wie das Rabensburgvirus (aus *Culex pipiens* und

Aedes rossicus) (Tab. 2). WNV Lineage 1a wurde bisher in Europa aus *Culex* spp. (*pipiens*, *modestus* und *univittatus*), *Cocquillettidia richiardii*, *Aedes* spp. (*cantans*, *caspius*, *ecrucians*, *rossicus* und *vexans*) und *Anopheles maculipennis* isoliert [3, 65]. In Europa wurde WNV Lineage 2 erstmals in Ungarn isoliert. In Griechenland konnte WNV Lineage 2 in *Culex pipiens* nachgewiesen werden. Untersuchungen von Stechmückenpopulationen in Oberitalien zeigten, dass die Sequenzen der daraus isolierten Viren eng verwandt sind mit denen von Isolaten aus Vögeln und Menschen, die in der Region im vorhergehenden Jahre zirkulierten [156]. Diese enge Verwandtschaft von Viren, die in aufeinander folgenden Jahren aus Vögeln und Menschen sowie aus Mücken isoliert wurden, legt nahe, dass WNV in dieser Region endemisch geworden ist und in der Mückenpopulation überwintert [157].

Die Kommunale Aktionsgemeinschaft zur Bekämpfung der Schnakenplage Phillipsburg (KAPS, German Mosquito Control Association) führt seit 1991 umfangreiche Untersuchungen zur Verbreitung verschiedener Mückenspezies im oberen Rheintal durch. Diese Untersuchungen belegen, dass in dieser Region Mückenspezies verbreitet sind, die potenziell WNV zwischen Vögeln, aber auch von Vögeln auf den Menschen oder andere Säugetiere wie das Pferd übertragen können [158]. Bisher wurden dort jedoch keine WNV-positiven Stechmücken gefunden [159]. Vergleichbare Untersuchungen zur Verbreitung von Stechmücken wurden auch in anderen europäischen Regionen durchgeführt [160]. Diese Untersuchungen zeigen, dass verschiedene Faktoren wie Klima- und Temperaturveränderungen, aber auch Reiseverkehr und Transport von Gütern insbesondere aus Südeuropa, die Verbreitung von bisher in Mitteleuropa nicht bekannten Mückenspezies beeinflussen. Eine intensive Beobachtung der Verbreitung solcher Mückenspezies in Deutschland sowie in den Nachbarländern erleichtert die Abschätzung des Risikos der Übertragung von Arboviren.

Meldepflicht in Europa

Berichte über den Nachweis von humanen WNV-Infektionen in Griechenland

veranlassten das European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) erneut darauf hinzuweisen, dass die EU die Überwachungsprogramme für dieses Virus verstärken muss. WNV-Infektionen müssen nach der European Commission Decision 2009/312/EC [161] an das gemeinschaftsnetz für epidemiologische Überwachung berichtet werden. Gegenwärtig ist WNV in Deutschland nach dem Infektionsschutzgesetz nicht als Einzelerkrankung meldepflichtig; Fälle von WNV-Infektionen werden bislang auf Grundlage der Meldepflicht für bedrohliche Erkrankungen gemäß § 6 (1) Ziff. 5a sowie bei gehäuftem Auftreten von WNV gemäß § 6 (1) Ziff. 5b des Infektionsschutzgesetzes gemeldet. In Frankreich und Italien wurden weitergehende Maßnahmen zur Überwachung der Verbreitung von WNV eingeführt [162, 163]. Dies umfasst unter anderem den Nachweis von WNV bei toten Vögeln (Stufe 1), WNV-Infektionen bei erkrankten Pferden (Stufe 2) und bei erkrankten Menschen (Stufe 3). Falls WNV-Infektionen beim Menschen auftreten, sind in diesen Ländern gegebenenfalls Maßnahmen zur Verhinderung von Übertragungen durch Blutkomponenten einzuführen. In Italien werden Blut und Organspender in Regionen, in denen WNV zirkuliert, mit der PCR auf Virusgenom untersucht [83]. Auch in der Schweiz sind WNF-Fälle beim Menschen und der Nachweis von WNV und WNV-Antikörpern meldepflichtig. Am 01.07.2011 wurde WNV als zu überwachende Seuche in die Schweizer Tierseuchenverordnung aufgenommen (http://www.admin.ch/ch/d/sr/916_401/index.html).

Das ECDC hat Informationsseiten zur aktuellen WNV-Verbreitung in Europa eingerichtet (http://ecdc.europa.eu/en/activities/diseaseprogrammes/emerging_and_vector_borne_diseases/Pages/West_Niles_fever_Risk_Maps.aspx;

http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/west_nile_fever/epidemiological_data/Pages/annual_epidemiological_report.aspx).

1.4 Nachweismethoden und Aussagekraft

Der Nachweis einer WNV-Infektion kann sowohl serologisch als auch durch

den direkten Virusnachweis durch Virusisolierung oder mit Hilfe von Nukleinsäurenachweisverfahren (NAT) erfolgen. Zum serologischen Nachweis sowie zum Nachweis des Virusgenoms stehen kommerzielle Teste zur Verfügung, wobei einige der Teste in den USA von der FDA zugelassen sind. In Europa stehen kommerzielle WNV-NAT mit CE-IVD-Kennzeichen zur Verfügung; zu vermerken ist, dass diese Teste im Wesentlichen für die USA entwickelt wurden. Der serologische Nachweis einer akuten WNV-Infektion erfolgt durch Bestimmung von WNV-spezifischen IgM-Antikörpern im Serum oder in der Zerebrospinalflüssigkeit. Etwa acht Tage nach Symptombeginn haben mehr als 90% der Patienten spezifische IgM-Antikörper entwickelt. Es konnte gezeigt werden, dass bei einigen Patienten noch nach über einem Jahr WNV-spezifische IgM-Antikörper nachweisbar waren [164]. Der Nachweis WNV-spezifischer IgM-Antikörper allein kann daher nicht zur Diagnose einer frischen WNV-Infektion herangezogen werden [165, 166].

Wenn Seren aus der frühen Phase der Infektion mit späteren Seren (zum Beispiel Rekonvaleszenten-seren) verglichen werden, ist ein Antikörperanstieg um mindestens den Faktor 4 beweisend für eine WNV-Infektion. Um auszuschließen, dass kreuzreagierende Flavivirus-spezifische Antikörper vorliegen oder falsch-positive Ergebnisse ermittelt wurden, müssen reaktive (positive) Antikörperbefunde durch weitere WNV-spezifische Nachweisverfahren abgeklärt werden, vor allem wenn sie auf der Basis von Enzymimmunoassays, Immunfluoreszenz- oder Hämagglutinationshemmtests erhoben wurden. Als Goldstandard für die Bestätigung von WNV-spezifischen Antikörpern wird der Plaque-Reduktions-Neutralisations-Test (PRNT) verwendet. Die Auswertung von Laboruntersuchungen in den USA auf IgM-Antikörper in Seren, die in Antikörpersuchtesten reaktiv waren, ergab, dass etwa 72% nicht im PRNT bestätigt werden konnten und somit falsch-positiv waren [167]. Es ist zu erwarten, dass in Regionen wie Deutschland, in denen WNV nicht endemisch ist, durch Antikörpersuchteste eine vergleichbar hohe oder sogar höhere Zahl falsch-

reaktiver Ergebnisse gefunden würde [168, 169].

Untersuchungen haben gezeigt, dass Kreuzreaktionen mit anderen Flaviviren auftreten können, zum Beispiel nach Impfung gegen Gelbfieber, Japanische Enzephalitis oder Frühsommermeningoenzephalitis oder aber nach Infektionen mit anderen Flaviviren wie DENV, FSMEV, JEV oder SLEV, die bei Aufhalten in den entsprechenden Endemiegebieten erworben wurden [36, 168, 169]. Die Differenzierung von Antikörpern gegen Flaviviren erfolgt üblicherweise mit dem PRNT.

Eine serologische Unterscheidung, ob ein Lineage-1- oder ein Lineage-2-Virus den Menschen infiziert hat, ist bisher nicht möglich. Monoklonale Antikörper, die gegen das australische WNV-Isolat KUNV beziehungsweise gegen ein Standard-WNV hergestellt wurden, waren in der Lage im ELISA verschiedene Subgruppen der Lineage-1- als auch Lineage-2-Viren zu differenzieren [170]. Dies weist darauf hin, dass sich Isolate in verschiedenen antigenen Determinanten (Epitopen) unterscheiden. Inwieweit solche Unterschiede die Entwicklung von Impfstoffen beeinflussen, muss untersucht werden.

In der Regel kann WNV beim Menschen nur in der Frühphase der Infektion aus Blut oder Zerebrospinalflüssigkeit in der Zellkultur angezüchtet werden. Bei Verstorbenen gelingt der Virusnachweis aus einer Vielzahl von Organen. Nach der Biostoffverordnung erfordern die Virusisolierung und die Arbeiten mit infektiösem WNV Laboratorien der Sicherheitsstufe 3 (Biosafety Level 3, BSL3) und können daher nur in Speziallaboratorien ausgeführt werden. NAT-Verfahren wie die Polymerasekettenreaktion (RT-PCR und Real-Time PCR) oder Transkriptionsvermittelte Amplifikation (transcription-mediated amplification, TMA) haben sich als sensitive und spezifische WNV-Nachweismethoden erwiesen. Diese in den USA zugelassenen Teste basieren im Wesentlichen auf dem Nachweis des dort zirkulierenden WNV-NY99. Da in Europa, Asien und Afrika phylogenetisch unterschiedliche WNV sowohl der Lineage 1 als auch der Lineage 2 zirkulieren, ist sicherzustellen, dass die verwendeten Teste solche Primer und Sonden verwenden,

die alle bisher bekannten Isolate mit vergleichbar hoher Sensitivität und Spezifität erkennen. Durch geeignete Primer und Sonden können Lineage-1- von -2-Viren unterschieden werden [171]. Für die weitere Charakterisierung eignet sich die Genom-Sequenzierung mit anschließender phylogenetischer Analyse, die eine molekularepidemiologische Einordnung der Isolate beziehungsweise der zirkulierenden Viren ermöglicht.

2 Blut- und Plasmaspender

2.1 Prävalenz und Inzidenz bei Spenderkollektiven

Unter etwa 24.000 Blutspenden in Hessen und Österreich konnten nur in wenigen Spenden Antikörper gegen WNV nachgewiesen werden [169, 172]. Orientierende Untersuchungen erfolgten mit Antikörpersuchtesten, die in 5,9% der untersuchten Proben reaktiv waren. Letztendlich konnten jedoch nur vier Seren mit dem PRNT als WNV-Antikörper-positiv ermittelt werden, was einer Rate von 0,03% der untersuchten Spenden entspricht. Mit der PCR wurden etwa 10.000 Spenden auf WNV-Genom untersucht, alle Spenden waren negativ [169].

Nach den bisher vorliegenden Untersuchungsergebnissen von deutschen Blutspenden kann davon ausgegangen werden, dass die Prävalenz von Antikörper-positiven Spenden sehr niedrig ist, und daher kann vermutet werden, dass nachgewiesene Infektionen bei Aufhalten in Endemiegebieten erworben wurden.

Immunglobulinpräparate, die aus Plasmaspenden deutscher, österreichischer beziehungsweise tschechischer Spender aus den Jahren 2006–2010 hergestellt wurden, wiesen einen signifikanten Antikörperanstieg in den Jahren 2009 und 2010 auf [173], was darauf hindeutet, dass die Anzahl WNV-Antikörper-positiver Spender zugenommen hat. Zu den Fragen, inwieweit dieser Anstieg auf in den einzelnen Ländern erworbene Infektionen zurückzuführen ist oder ob die Spender die Infektion auf Reisen in Endemiegebiete erworben haben, kann bisher keine Aussage gemacht werden. Vergleichbare Untersuchungen wurden mit der PCR am Paul-Ehrlich-Institut durchgeführt [169]. In keinem der Plasmapools (n = 96) von

europäischen Spendern konnte mit der PCR WNV-Genom nachgewiesen werden, wohingegen 32 von 174 Plasmapools, die in den Jahren 2004 und 2005 in den USA gewonnen worden waren, WNV-Genom enthielten [169].

In den USA wurden Immunglobulinpräparate auf den Gehalt an WNV-spezifischen Antikörpern untersucht. Ein signifikanter Anstieg neutralisierender Antikörper in Immunglobulinpräparaten konnte erstmals in Spenden aus dem Jahr 2002, drei Jahre nach Beginn der WNV-Epidemie im Jahre 1999, nachgewiesen werden. In den folgenden Jahren stieg dann auf Grund der Ausbreitung des Erregers in den USA wie erwartet der Antikörper-Gehalt in den Präparaten [174].

2.2 Definition von Ausschlusskriterien

Als bekannt wurde, dass WNV durch Blutprodukte übertragen werden kann, wurden in Deutschland Ausschlusskriterien für Reisende nach Nordamerika eingeführt (Ausschluss von der Spende für vier Wochen nach Rückkehr von einer Reise nach Nordamerika in der Zeit vom 1. Juli bis 30. November; Bekanntmachung im Bundesanzeiger Nr. 180 vom 25. September 2003, S. 21 665). Diese Maßnahme wurde unter Berücksichtigung der epidemiologischen Situation in Europa und Asien sowie Afrika erweitert, und es wurde vorgeschlagen nach Verlassen eines Gebietes mit saisonal fortlaufender Übertragung des WNV auf Menschen die Spender für vier Wochen auszuschließen, sofern keine Genomtestung auf WNV erfolgt. Diese Maßnahme ist in Übereinstimmung mit der EU-Richtlinie 2004/33/EC vom 22. März 2004, die eine Rückstellung der Spender über einen Zeitraum von 28 Tagen festlegt (<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2004:091:0025:0039:EN:PDF>).

2.3 Spendertestung und Aussagekraft

Eine Testung von Spenden mit Antikörpersuchtesten wird nicht durchgeführt und erscheint nicht sinnvoll, da Antikörper-positive Spenden in der Regel nur Hinweise auf eine abgelaufene Infektion mit WNV geben. Blut- und Plasmaspenden können mit der PCR auf die An-

wesenheit von viraler RNA getestet werden. Im Gegensatz zu den USA und Kanada zirkulieren in Europa verschiedene WNV, die entweder zur Lineage 1 und deren Subgruppen oder zur Lineage 2 gehören und bei Erkrankungen des Menschen nachgewiesen wurden. Bei der Auswahl der Tests ist darauf zu achten, dass alle bekannten WNV-Varianten mit vergleichbarer Sensitivität und Spezifität erfasst werden [175, 176]. Inwieweit weitere bisher nicht eindeutig zugeordnete, eng mit WNV verwandte Viren mit in die Entwicklung von Genomnachweisverfahren einbezogen werden müssen, bleibt offen, solange nicht nachgewiesen wurde, dass diese Viren auch Vertebraten beziehungsweise den Menschen infizieren.

2.4 Spenderbefragung

Spender werden nach Reisen in tropische Regionen und nach allgemeinen Symptomen einer Infektion/Erkrankung befragt. Der Aufenthalt in Nordamerika von Juli bis November und in anderen Regionen, in denen WNV endemisch ist, stellt ein Risiko für die Übertragung einer WNV-Infektion dar und führt zu einer Rückstellung von der Blutspende für wenigstens vier Wochen (<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2004:091:0025:0039:EN:PDF>).

2.5 Spenderinformation und -beratung

Eine spezifische Beratung zu WNV-Infektionen und zur Prophylaxe kann in infektiologischen Zentren oder Tropeninstituten gegeben werden.

3 Empfänger

3.1 Prävalenz und Inzidenz von blutassoziierten Infektionen und

Infektionskrankheiten bei Empfängerkollektiven

Zur Zeit gibt es keine Hinweise darauf, dass WNV-Infektionen in Deutschland erworben werden können. In den vergangenen Jahren wurden jedoch gehäuft WNV-Infektionen beim Menschen im Mittelmeerraum (Israel, Italien, Griechenland und Nordafrika), in Rumänien, Ungarn, Russland und einigen Zentralasiatischen Staaten beobachtet. Diese In-

fektionen wurden durch WNV nicht nur der Lineage 1, sondern auch der Lineage 2 hervorgerufen. Die NAT sollte daher mit Testen durchgeführt werden, die alle bekannten WNV-Sequenzen erfassen.

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

In den letzten Jahren wurden in verschiedenen Regionen wie USA und Kanada sowie bei Ausbrüchen in Israel, Rumänien und einzelnen Regionen Russlands hochpathogene Varianten des WNV beschrieben. Dies steht im Gegensatz zu den WNV-Infektionen mit niedrigpathogenen Erregern, die bis etwa Mitte der 1990er Jahre in Europa, Afrika und Australien zirkulierten. Die überwiegende Anzahl der WNV-Infektionen verläuft weiterhin asymptomatisch oder mit nur schwach ausgeprägten Symptomen wie Fieber und Abgeschlagenheit. Alter und Immunstatus, zum Beispiel iatrogene Immunsuppression, können den Verlauf der WNV-Infektion beeinflussen. So werden gehäuft schwerere Krankheitsverläufe bei älteren Menschen beobachtet. Patienten, die während einer Chemotherapie oder nach Transplantation immunsupprimiert wurden, erkrankten gehäuft mit zentralnervösen Symptomen. Außerdem wurde gezeigt, dass der Krankheitsverlauf bei solchen Patienten protrahiert war; in einem Fall blieb sogar die Immunantwort gegen WNV aus und der Patient war monatelang persistent infiziert [55].

In Deutschland gibt es vereinzelt Berichte zu Infektionen und Erkrankungen durch WNV. So erkrankten Rückkehrer aus den USA, die sich während ihres Aufenthaltes dort infiziert hatten [98]. Untersuchungen von Vogelberingern auf Grund ihres Infektionsrisikos während der Beringung von Zugvögeln, die im Frühjahr aus potenziellen Endemiegebieten zurückkehren, ergaben keine Hinweise darauf, dass diese sich bei der Beringung in Deutschland infiziert hatten [168]. Jedoch konnte gezeigt werden, dass bei Beringern, die auch in Afrika Vögel beringt hatten, WNV-neutralisierende Antikörper nachweisbar waren. Zu bemerken ist jedoch, dass Beringer, die sich in Endemiegebieten für FSME beziehungsweise Gelb-

fieber betätigen, in der Regel gegen diese Viruserkrankungen geimpft sind. Inwieweit hierdurch ein Schutz vor einer Infektion oder Erkrankung durch WNV erzielt wird, ist unklar. Untersuchungen zur Seroprävalenz von Blutspendern legen nahe, dass nur wenige Blutspender Antikörper gegen WNV aufweisen und bei keinem der untersuchten Spender WNV-RNA nachgewiesen werden konnte [169, 172].

3.3 Schweregrad und Verlauf der Erkrankung

Etwa 80% der WNV-Infektionen beim Menschen verlaufen asymptomatisch. Bei etwa 20% der Infizierten tritt nach einer Inkubationszeit von 2–14 Tagen eine selbst-limitierende fieberhafte Erkrankung auf (West-Nil-Fieber, WNF) mit Symptomen eines grippalen Infekts wie Unwohlsein, Kopf-, Augen- und Muskelschmerzen, Übelkeit, Erbrechen, Diarrhöe, Appetitlosigkeit sowie Müdigkeit [41, 42]. Bei einem von etwa 150 Infizierten beobachtet man neurologische Symptome (Meningitis, Enzephalitis, Paresen beziehungsweise Paralysen mit AFP-Symptomen; Übersichtsartikel: [44, 45]). Etwa 4–10% der mit neurologischen Symptomen hospitalisierten Patienten versterben [48].

Transplantatempfänger und Immunsupprimierte haben nach einer WNV-Infektion ein etwa 40fach höheres Risiko, an einer Infektion des Gehirns zu erkranken. Eine Behandlung von Patienten mit neurologischen Symptomen mit Immunglobulinpräparaten, die hohe Antikörpertiter gegen WNV aufweisen, verbessert die Prognose und kann eine neuroinvasive Erkrankung verhindern [59, 106].

3.4 Therapie und Prophylaxe

Da keine erregerspezifische Therapie zur Verfügung steht, erfolgt die Behandlung von Patienten mit einer WNV-Infektion im Allgemeinen symptomatisch mit Senken des Fiebers und Flüssigkeitszufuhr.

Antivirale Substanzen: Zur Zeit gibt es keine WNV-spezifische antivirale Therapie. Da Ribavirin die WNV-Vermehrung in Nervenzellen inhibiert [177], wurden Patienten in Israel mit Ribavirin behandelt, jedoch ohne Erfolg beziehungsweise es wurde sogar über eine mögliche Verschlechterung des Krankheitsverlaufs be-

richtet [178]. Vergleichbare negative Ergebnisse wurden auch im Hamster-Infektionsmodell beobachtet, in dem gezeigt wurde, dass Ribavirin zu einer erhöhten Sterberate infizierter Tiere führte [179]. WNV-spezifische antivirale Substanzen oder Substanzen, die auch gegen andere Flaviviren wirken, werden in verschiedenen Arbeitsgruppen intensiv untersucht (Übersichtsartikel: [18, 180]). Für diese Untersuchungen werden WNV-infizierte Zellkulturen oder WNV-Replikon-Modelle verwendet. Die Anforderungen an die antiviralen Substanzen sind hoch, da sie einerseits nicht in das Immunsystem eingreifen und andererseits die Blut-Hirnschranke überwinden sollen.

Einsatz von Immunglobulinen: Bisher gibt es nur Fallberichte zur Behandlung von Patienten mit Immunglobulinen. Diese belegen, dass der Krankheitsverlauf bei Patienten mit neurologischen Symptomen verbessert wird und die behandelten Patienten überleben [59, 106, 181]. Bisher stehen in begrenztem Umfang Immunglobulinpräparate zur Verfügung, die in Israel aus WNV-Antikörper-positivem Plasma hergestellt werden. In Abhängigkeit von der Charge wurden hohe neutralisierende Antikörpertiter auch in Präparaten bestimmt, die aus amerikanischen Plasmen hergestellt worden waren [174]. Die Wirksamkeit von Immunglobulin-Präparaten, die neutralisierende Antikörper enthalten, wurde in Neutralisationstesten und in Tierversuchen, aber insbesondere auch bei WNV-infizierten Patienten nachgewiesen [182]. Inwieweit humanisierte monoklonale Antikörper mit hoher neutralisierender Kapazität für die Behandlung von WNV-Infektionen geeignet sind, muss weiter überprüft werden. Vorstellbar ist der Einsatz einer Mischung verschiedener monoklonaler Antikörper um zu verhindern, dass bei Verwendung nur eines Antikörpers Neutralisations-resistente Erreger selektioniert werden. Ein humanisierter monoklonaler Antikörper, der gegen das Virusoberflächenprotein E gerichtet ist, befindet sich in der Phase I der klinischen Prüfung [183].

Impfstoffe und Impfstoffentwicklung: Bisher sind keine Impfstoffe für die Prophylaxe beim Menschen zugelassen (Übersicht: [184]). Ein chimärer Lebendimpfstoff (enthält prM und E des amerika-

nischen Isolates WN02) auf der Basis eines Gelbfieberimpfstoffvirus (YFV-17D) wurde bereits in den klinischen Phasen I und II eingesetzt und induzierte in den Impfungen neutralisierende Antikörper und eine T-Zellantwort [185, 186, 187]. Eine DNA-Vakzine, die für prM und E kodiert, hat erfolgreich die klinische Phase I absolviert und induzierte ebenfalls eine T-Zellantwort und neutralisierende Antikörper [188]. Boosterung von Mäusen mit gereinigten Domäne-DIII-Proteinfragmenten induzierte in Mäusen einen hohen Schutz gegen eine Belastung/Exposition mit infektiösem WNV [189]. Außerdem sind Formalin-inaktivierte Viruspartikel als Impfstoffe in der Entwicklung [190].

Für die Impfung von Pferden zum Schutz vor Erkrankungen durch WNV (Lineage 1) wurden im Jahre 2003 in den USA durch das Department of Agriculture (USDA; http://www.aaep.org/pdfs/AAEP_WNV_Guidelines_2005.pdf) Formalin-inaktivierte Impfstoffe (Zellkulturvirus) und gentechnische Lebendimpfstoffe auf der Basis von Canarypoxviren zugelassen. In Israel wurde für die Impfung von Gänsen im gleichen Jahr ein inaktiviertes Zellkulturvirus zugelassen. Ein chimärer Lebendimpfstoff auf der Basis des Gelbfiebersvirus wurde 2006 für die Impfung von Pferden in den USA zugelassen. Ein inaktivierter WNV-Impfstoff für die Anwendung am Pferd besitzt die europäische Zulassung durch die European Medicines Agency (EMA).

Experimentelle Untersuchungen zum Schutz von Pferden vor Erkrankungen durch WNV Lineage 2 haben gezeigt, dass der chimäre Lebendimpfstoff auf der Basis des Canarypoxvirus effektiv vor einer Belastungsinfektion mit WNV Lineage 2 schützt [191].

Prophylaxe: Da derzeit kein Impfstoff für Menschen zur Verfügung steht, ist die Vermeidung von Mückenstichen in Regionen, in denen WNV endemisch ist oder in denen über Übertragungen von WNV berichtet wird, die einzige effiziente Prophylaxe.

3.5 Übertragbarkeit

WNV wird in der Regel durch infizierte Mücken übertragen. Im Jahre 2002 wurde in den USA über 23 WNV-Infektionen durch Blutkomponenten von Spen-

dern berichtet, die zum Zeitpunkt der Blutspende asymptomatisch waren [102]. Dies führte dazu, dass Ende Juni 2003 die Testung der Blutspenden auf virale Nukleinsäure in Minipools eingeführt wurde [192]. Trotz Einführung der NAT-Testung wurden jedoch weiterhin in geringem Maße WNV-Infektionen durch Spenden übertragen, die eine Virämie unterhalb der Nachweisgrenze der NAT aufwiesen, insbesondere wenn die Minipooltestung durchgeführt wurde [193, 194, 195]. In den folgenden Jahren passte man die Testalgorithmen daher der jeweiligen aktuellen regionalen epidemiologischen Lage an [196, 197]. Prinzipiell wurden weiterhin Minipools von bis zu 16 Spenden getestet, aber bei einem Anstieg der positiven Nachweise wurden alle Spenden so lange einzeln getestet, bis die epidemiologische Lage wieder den Wechsel zur Minipool-Testung erlaubte. Die Auswertung epidemiologischer Daten zur Inzidenz von WNV-Infektionen in der Bevölkerung und der Ergebnisse des Spendenscreenings mit der PCR und des Nachweises Virus-positiver Spenden ergab eine gute Korrelation [198].

Die Untersuchungen von Blutspenden auf WNV-RNA wurden in Kanada ebenfalls im Jahre 2003 eingeführt. Die NAT wird vergleichbar zu den USA in Minipools von sechs Spenden und in Regionen mit erhöhter WNV-Inzidenz in Einzelspenden durchgeführt [199, 200].

Seit September 2010 werden in Italien im Rahmen des Nationalen WNV-Überwachungsplans alle Blut- und Plasmaspenden in Regionen, in denen WNV zirkuliert, in der Zeit vom 15. Juni bis 15. November mit der NAT untersucht; des Weiteren werden alle Gewebe- und Organspenden in Italien mit der NAT auf WNV getestet [83].

3.6 Häufigkeit der Applikation sowie Art und Menge der Blutprodukte

In den USA wurden Übertragungen von WNV durch nicht inaktivierte Blutprodukte (Erythrozytenpräparate, Fresh Frozen Plasma, Thrombozytenkonzentrate) berichtet [194, 195], aber nicht durch virus-inaktivierte Blutkomponenten oder Plasmaderivate. In Deutschland ist WNV bisher nicht über Blut oder Blutprodukte übertragen worden. Die Rück-

stellung von der Spende für vier Wochen nach fieberhaften Infekten und für 28 Tage nach Rückkehr aus einer Region, in der WNV endemisch ist, reduziert das Risiko der Übertragung des Virus durch eine Transfusion.

4 Blutprodukte

4.1 Belastung des Ausgangsmaterials und Testmethoden

Für den Nachweis von WNV-RNA stehen verschiedene kommerzielle NAT-Teste zur Verfügung. Untersuchungen zur Belastung von Blut- und Plasmaspenden liegen im Wesentlichen aus den USA beziehungsweise aus Plasmaspenden amerikanischen Ursprungs vor. In den als virämisch eingestuften Spenden erreichte die mit einer quantitativen PCR gemessene Virusbelastung der Spenden maximale Werte von etwa 6×10^5 Genomäquivalenten/ml [192, 201]. Quantitative Untersuchungen von Plasmapools, die in den USA in den Jahren 2003 und 2004 hergestellt worden waren, zeigten Belastungen einzelner Pools von bis zu etwa 10^3 Genomäquivalenten/ml Plasma [169]. Nach Einführung der WNV-NAT zeigen amerikanische Plasmapools aus Blutspenden keine messbare Belastung mit WNV [202].

4.2 Möglichkeiten zur Abtrennung und Inaktivierung von Infektionserregern

Die Verfahren zur Sicherstellung der Virussicherheit von Plasmaderivaten wurden in einer Vielzahl von Untersuchungen der Herstellungsverfahren mit relevanten und Modellviren validiert. Nachdem bekannt wurde, dass WNV durch Blut und Blutkomponenten übertragen werden kann, wurden die Verfahren zur Herstellung von Plasmaderivaten unter Verwendung von WNV überprüft. Es konnte gezeigt werden, dass sich WNV in den Validierungsstudien vergleichbar zu anderen umhüllten Viren verhielt, die als Modellviren zur Validierung der Herstellungsprozesse eingesetzt wurden und zur Familie der Flaviviren gehören (Bovines Virus Diarrhoe Virus [BVDV], Frühsommermeningoenzephalitis Virus [FSME]) [40, 203, 204]. Für WNV wie für die Modellviren wurde in Inaktivierungsstudien

eine Reduktion des Virusgehalts um den Faktor $\geq 10^4$ gezeigt. Aufgrund der epidemiologischen Situation in Deutschland ist Plasma aus Einzelspenden sicher; ebenfalls sicher sind gepoolte Plasmapräparate, die mit dem Solvent/Detergent-Verfahren hergestellt wurden, da WNV wie andere umhüllte Viren durch das S/D Verfahren wirksam inaktiviert werden (Übersichtsarbeit: [205]). Wie viele andere Viren auch wird WNV durch Methylen-Blau nach Photoinaktivierung in Plasma schnell inaktiviert [206]. Die Behandlung von Plasma oder Thrombozytenpräparaten mit Amotosalen-Hydrochlorid (Pso-ralen, S-59) und UV-Licht (Intercept-Verfahren) inaktiviert ebenfalls eine Vielzahl von Erregern einschließlich WNV [207, 208, 209]. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Zusatz von Riboflavin und UV-Licht-Behandlung (Mirasol-Verfahren) zu einer effektiven Reduktion einer Vielzahl von Erregern in Plasma und Thrombozytenkonzentraten führt [210]. Übersichten zur Bewertung der Sicherheit und des therapeutischen Einsatzes der Blutkomponenten, die mit den verschiedenen Erreger-Inaktivierungsverfahren hergestellt werden, wurden von Solheim [211] und Rock [212] veröffentlicht.

4.3 Praktikabilität und Validierbarkeit der Verfahren zur

Eliminierung/Inaktivierung von Infektionserregern

WNV lässt sich in ausreichend hohen Titern in der Zellkultur vermehren. Der Nachweis infektiöser Viruspartikel erfolgt mit Hilfe des Plaquestes (Bestimmung der plaque forming units, PFU) oder mit der Endpunkttitration (Bestimmung der tissue culture infectious dose 50%, CID_{50}). Blutkomponenten und Plasmaprodukte können experimentell mit WNV aus dem Kulturüberstand infizierter Zellen kontaminiert werden. Die Validierung der Eliminierung/Inaktivierung von WNV in den verschiedenen Produktionsschritten von Blutkomponenten oder Plasmaprodukten erfolgt mit Hilfe des Nachweises infektiöser Viruspartikel (Titration). In der Regel werden Modellviren (Viren derselben Virusfamilie) verwendet, da eine Vergleichbarkeit in den Eigenschaften dieser Viren gezeigt worden ist.

5 Bewertung

Bisher wurde nur über wenige importierte WNV-Infektionen in Deutschland berichtet. Allerdings bedarf die seit Mitte der 1990er Jahre und insbesondere in den letzten beiden Jahren beobachtete Ausbreitung der zum Teil für Menschen und Tiere hochpathogenen Erreger im Mittelmeerraum, in Russland, Rumänien und besonders in Ungarn und Österreich erhöhter Aufmerksamkeit. Bei Personen mit ätiologisch unklaren Enzephalitiden oder Meningitiden sollte auf das Vorliegen einer WNV-Infektion getestet werden. Differenzialdiagnostisch müssen andere durch Arboviren hervorgerufene Enzephalitiden, Herpesenzephalitis, Guillain-Barré-Syndrom und eine bakterielle Meningoenzephalitis ausgeschlossen werden.

Für eine Abschätzung des Risikos der Verbreitung von WNV in Deutschland ist die multidisziplinäre Zusammenarbeit von Entomologen, Biologen (Ornithologen), Klimaforschern, Veterinärmedizinern und Humanmedizinern in gemeinsamen, längerfristig angelegten Projekten anzustreben. Sie könnten zudem zusätzlich Hinweise auf das Risiko der Einschleppung weiterer durch Arthropoden übertragbarer Krankheitserreger geben.

Die Bestimmung und Populationsanalysen der Mückenarten und deren Verbreitung in Deutschland ermöglichen eine Abschätzung des Risikos bei der Blutmahlzeit von solchen Mücken gestochen zu werden, die effizient WNV übertragen können. Wie in verschiedenen Untersuchungen gezeigt wurde, ist die Vermehrung von WNV in Mücken temperaturabhängig. Je höher die durchschnittliche Tagetemperatur ist, desto schneller und effizienter vermehrt sich der Erreger in den Mücken. Damit könnte sich grundsätzlich auch die Möglichkeit ergeben, dass bei entsprechender Klimaveränderung WNV in Deutschland endemisch werden kann, wenn es zum Beispiel durch Zugvögel eingeschleppt wurde. Zentralnervöse Erkrankungen bei Vögeln oder Pferden können Hinweise auf eine Infektion der Tiere mit WNV sein. Eine Abklärung der Verdachtsfälle bei Tieren und Menschen ist mit molekularen, virologischen und serologischen Methoden möglich. Erkrankungen des Menschen, die mit den Falde-

definitionen (ECDC beziehungsweise RKI) einer WNV-Infektion kompatibel sind, sollten in jedem Fall durch entsprechende Nachweisverfahren abgeklärt werden.

Blut- und Plasmaprodukte, die mit validierten Verfahren zur Virusinaktivierung hergestellt werden, sind sicher und können WNV nicht übertragen. Wie sich in den USA gezeigt hat, kann WNV jedoch durch nicht inaktivierte Blutkomponenten übertragen werden. Fieber und zentralnervöse Störungen nach der Transfusion von nicht inaktivierten Blutkomponenten können ein Hinweis auf eine transfusionsassoziierte WNV-Infektion sein. Nach den bisherigen Erfahrungen können die eingesetzten NAT-Nachweisverfahren das Risiko einer Übertragung durch diese Produkte vermindern, aber nicht vollständig eliminieren. Die Optimierung und Validierung von NAT-Verfahren im Hinblick auf die Spezifität und Sensitivität für alle in Europa und anderen Endemiegebieten zirkulierenden WNV erscheint notwendig.

Bisher gilt in Deutschland eine Rückstellung von der Blutspende nach Reisen nach Nordamerika und tropische Endemieeregionen. Sollte es zu einer wesentlichen Vergrößerung der Verbreitungsgebiete kommen, insbesondere wenn eine Ausbreitung nach Deutschland auftreten sollte, könnte die Einführung einer Spendentestung mittels sensitiver NAT auf WNV vergleichbar zu den Teststrategien in den USA und Kanada erforderlich werden.

Dieses Papier wurde fertig gestellt am 16.02.2012 und vom Arbeitskreis Blut am 30.03.2012 verabschiedet. Es wurde erarbeitet von den Mitgliedern der Untergruppe „Bewertung Blut-assoziiertes Krankheitserreger“ des Arbeitskreises Blut: Prof. Dr. Georg Pauli, Dr. Ursula Bauerfeind, Dr. Johannes Blümel, Prof. Dr. Reinhard Burger, Prof. Dr. Christian Drossten, 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.

6 Literatur

1. Blümel J, Burger R, Gerlich W et al. (2004) Arboviren – durch Arthropoden übertragbare Viren. Stellungnahmen des Arbeitskreises Blut des Bundesministeriums für Gesundheit und Soziale Sicherung (Arboviren – viruses transmitted by arthropods. Opinion of the Task Force on Blood of the Federal Ministry for Health and Social Security). Bundesgesundheitsbl - Gesundheitsforsch - Gesundheitsschutz 47:910–918
2. Smithburn KC, Hughes TP, Burke AW, Paul JH (1940) A neurotropic virus isolated from the blood of a native of Uganda. *Am J Trop Med Hyg* 1:204–211
3. Weissenböck H, Hubálek Z, Bakonyi T, Nowotny N (2010) Zoonotic mosquito-borne flaviviruses: worldwide presence of agents with proven pathogenicity and potential candidates of future emerging diseases. *Vet Microbiol* 140:271–280
4. McIntosh BM, Jupp PG, Dos Santos I, Meenehan GM (1976) Epidemics of West Nile and Sindbis viruses in South Africa with *Culex (Culex) univittatus* Theobald as vector. *S Afr J Sci* 72:295–300
5. Hayes CG (1988) West Nile Fever, in: Monath TP (Ed.), *The Arboviruses: epidemiology and ecology*, CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 59–88
6. Murgue B, Murri S, Triki H, Deubel V, Zeller HG (2001a) West Nile in the Mediterranean basin: 1950–2000. *Ann NY Acad Sci* 951:117–126
7. Burt FJ, Grobbelaar AA, Leman PA, Anthony FS, Gibson GV, Swanepoel R (2002) Phylogenetic relationships of southern African West Nile virus isolates. *Emerg Infect Dis* 8:820–826
8. Reisen WK, Fang Y, Martinez VM (2006) Effects of temperature on the transmission of West Nile virus by *Culex tarsalis* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol* 43:309–317
9. Kinney RM, Huang CY, Whiteman MC et al. (2006) Avian virulence and thermostable replication of the North American strain of West Nile virus. *J Gen Virol* 87:3611–3622
10. Mukhopadhyay S, Kim BS, Chipman PR, Rossman MG, Kuhn RJ (2003) Structure of West Nile virus. *Science* 302:248
11. Lescar J, Luo D, Xu T et al. (2008) Towards the design of antiviral inhibitors against flaviviruses: the case for the multifunctional NS3 protein from Dengue virus as a target. *Antiviral Res* 80:94–101
12. Macdonald J, Tonry J, Hall RA et al. (2005) NS1 protein secretion during the acute phase of West Nile virus infection. *J Virol* 79:13924–13933
13. Wilson JR, de Sessions PF, Leon MA, Scholle F (2008) West Nile virus nonstructural protein 1 inhibits TLR3 signal transduction. *J Virol* 82:8262–8271
14. Mackenzie JM, Khromykh AA, Jones MK, Westaway EG (1998) Subcellular localization and some biochemical properties of the flavivirus Kunjin nonstructural proteins NS2A and NS4A. *Virology* 245:203–215
15. Evans JD, Seeger C (2007) Differential effects of mutations in NS4B on West Nile virus replication and inhibition of interferon signaling. *J Virol* 81:11809–11816
16. Kanai R, Kar K, Anthony K et al. (2006) Crystal structure of West Nile virus envelope glycoprotein reveals viral surface epitopes. *J Virol* 80:11000–11008
17. Mukhopadhyay S, Kuhn RJ, Rossman MG (2005) A structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nat Rev Microbiol* 3:13–22
18. Diamond MS (2009) Progress on the development of therapeutics against West Nile virus. *Antiviral Res* 83:214–227
19. Gillespie LK, Hoenen A, Morgan G, Mackenzie JM (2010) The endoplasmic reticulum provides the membrane platform for biogenesis of the flavivirus replication complex. *J Virol* 84:10438–10447
20. Stadler K, Allison SL, Schalich J, Heinz FX (1997) Proteolytic activation of tick-borne encephalitis virus by furin. *J Virol* 71:8475–8481
21. Moesker B, Rodenhuis-Zybert IA, Meijerhof T, Wilschut J, Smit JM (2010) Characterization of the functional requirements of West Nile virus membrane fusion. *J Gen Virol* 91:389–393
22. Junjhon J, Edwards TJ, Utaipat U et al. (2010) Influence of pr-M cleavage on the heterogeneity of extracellular dengue virus particles. *J Virol* 84:8353–8358
23. Rodenhuis-Zybert IA, van der Schaar HM, da Silva Voorham JM et al. (2010) Immature dengue virus: a veiled pathogen? *PLoS Pathog* 6:e1000718
24. Colpitts TM, Rodenhuis-Zybert I, Moesker B, Wang P, Fikrig E, Smit J (2011) prM-antibody renders immature West Nile virus infectious in vivo. *J Gen Virol* 92:2281–2285
25. Rodenhuis-Zybert IA, Wilschut J, Smit JM (2011) Partial maturation: an immune-evasion strategy of dengue virus? *Trends Microbiol* 19:248–254
26. Andrade CC, Maharaj PD, Reisen WK, Brault AC (2011) North American West Nile viral genotype isolates demonstrate differential replicative capacity in response to temperature. *J Gen Virol* 92:2523–2533
27. Zehender G, Ebranati E, Bernini F et al. (2011) Phylogeography and epidemiological history of West Nile virus genotype 1a in Europe and the Mediterranean basin. *Infect Genet Evol* 11:646–653
28. Mackenzie JS, Williams DT (2009) The zoonotic flaviviruses of southern, south-eastern and eastern Asia, and Australasia: the potential for emergent viruses. *Zoonoses Public Health* 56:338–356
29. Bakonyi T, Hubálek Z, Rudolf I, Nowotny N (2005) Novel flavivirus or new lineage of West Nile virus, central Europe. *Emerg Infect Dis* 11:225–231
30. Lvov DK, Butenko AM, Gromashevsky VL et al. (2004) West Nile virus and other zoonotic viruses in Russia: examples of emerging–reemerging situations. *Arch Virol Suppl* 18:85–96
31. Bondre VP, Jadi RS, Mishra AC, Yergolkar PN, Arankalle VA (2007) West Nile virus isolates from India: evidence for a distinct genetic lineage. *J Gen Virol* 88:875–884
32. Vazquez A, Sanchez-Seco MP, Ruiz S et al. (2010) Putative new lineage of West Nile virus, Spain. *Emerg Infect Dis* 16:549–552
33. Bakonyi T, Ivanics E, Erdélyi K et al. (2006) Lineage 1 and 2 strains of encephalitic West Nile virus, central Europe. *Emerg Infect Dis* 12:618–623
34. Venter M, Swanepoel R (2010) West Nile virus lineage 2 as a cause of zoonotic neurological disease in humans and horses in southern Africa. *Vector Borne Zoonotic Dis* 10:659–664
35. Kutasi O, Bakonyi T, Lecollinet S et al. (2011) Equine encephalomyelitis outbreak caused by a genetic lineage 2 West Nile virus in Hungary. *J Vet Intern Med* 25:586–591
36. Papa A, Xanthopoulou K, Gewehr S, Mourelatos S (2011) Detection of West Nile virus lineage 2 in mosquitoes during a human outbreak in Greece. *Clin Microbiol Infect* 17:1176–1180
37. Fang Y, Brault AC, Reisen WK (2009) Comparative thermostability of West Nile, St. Louis encephalitis, and western equine encephalomyelitis viruses during heat inactivation for serologic diagnostics. *Am J Trop Med Hyg* 80:862–863
38. Mayo DR, Beckwith WH 3rd (2002) Inactivation of West Nile virus during serologic testing and transport. *J Clin Microbiol* 40:3044–3046
39. Mather T, Takeda T, Tassello J et al. (2003) West Nile virus in blood: stability, distribution, and susceptibility to PEN110 inactivation. *Transfusion* 43:1029–1037
40. Kreil TR (2004) West Nile virus: recent experience with the model virus approach. *Dev Biol (Basel)* 118:101–105
41. Campbell GL, Marfin AA, Lanciotti RS, Gubler DJ (2002) West Nile virus. *Lancet Infect Dis* 2:519–529
42. Hayes EB, Gubler DJ (2006) West Nile virus: epidemiology and clinical features of an emerging epidemic in the United States. *Annu Rev Med* 57:181–194
43. DeBiasi RL, Tyler KL (2006) West Nile virus meningoencephalitis. *Nat Clin Pract Neurol* 2:264–275
44. Kramer DL, Li J, Shi PJ (2007) West Nile virus. *Lancet Neurol* 6:171–181
45. DeBiasi RL (2011) West Nile virus neuroinvasive disease. *Curr Infect Dis Rep* 13:350–359
46. Sejvar JJ, Leis AA, Stokic DS et al. (2003) Acute flaccid paralysis and West Nile virus infection. *Emerg Infect Dis* 9:788–793
47. Sejvar JJ, Marfin AA (2006) Manifestations of West Nile neuroinvasive disease. *Rev Med Virol* 16:209–224
48. Lindsey NP, Staples JE, Lehman JA, Fischer M (2010) Surveillance for human West Nile virus disease – United States, 1999–2008. *MMWR Surveill Summ* 59:1–17
49. Lim JK, Murphy PM (2011) Chemokine control of West Nile virus infection. *Exp Cell Res* 317:569–574
50. Cook RL, Xu X, Yablonsky EJ et al. (2010) Demographic and clinical factors associated with persistent symptoms after West Nile virus infection. *Am J Trop Med Hyg* 83:1133–1136
51. Sejvar JJ (2007) The long-term outcomes of human West Nile virus infection. *Clin Infect Dis* 44:1617–1624
52. Tonry JH, Xiao SY, Siirin M, Chen H, da Rosa AP, Tesh RB (2005) Persistent shedding of West Nile virus in urine of experimentally infected hamsters. *Am J Trop Med Hyg* 72:320–324
53. Murray K, Walker C, Herrington E et al. (2010) Persistent infection with West Nile virus years after initial infection. *J Infect Dis* 201:2–4
54. Gibney KB, Lanciotti RS, Sejvar JJ et al. (2011) West Nile virus RNA not detected in urine of 40 people tested 6 years after acute West Nile virus disease. *J Infect Dis* 203:344–347
55. Penn RG, Guarnier J, Sejvar JJ et al. (2006) Persistent neuroinvasive West Nile virus infection in an immunocompromised patient. *Clin Infect Dis* 42:680–683
56. Kleinschmidt-DeMasters BK, Marder BA, Levi ME et al. (2004) Naturally acquired West Nile virus encephalomyelitis in transplant recipients: clinical, laboratory, diagnostic, and neuropathological features. *Arch Neurol* 61:1210–1220
57. Kumar D, Prasad GV, Zaltzman J, Levy GA, Humar A (2004) Community-acquired West Nile virus infection in solid-organ transplant recipients. *Transplantation* 77:399–402
58. CDC, Centers for Disease Control and Prevention (2009) West Nile virus transmission via organ transplantation and blood transfusion – Louisiana, 2008. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 58:1263–1267
59. Rhee C, Eaton EF, Concepcion W, Blackburn BG (2011) West Nile virus encephalitis acquired via liver transplantation and clinical response to intravenous immunoglobulin: case report and review of the literature. *Transpl Infect Dis* 13:312–317

60. Glass WG, McDermott DH, Lim JK et al. (2006) CCR5 deficiency increases risk of symptomatic West Nile virus infection. *J Exp Med* 203:35–40
61. Lim JK, McDermott DH, Lisco A et al. (2010) CCR5 deficiency is a risk factor for early clinical manifestations of West Nile virus infection, but not for viral transmission. *J Infect Dis* 201:178–185
62. Kindberg E, Mickiene A, Ax C et al. (2008) A deletion in the chemokine receptor 5 (CCR5) gene is associated with tickborne encephalitis. *J Infect Dis* 197:266–269
63. Berger EA, Murphy PM, Farber JM (1999) Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease. *Annu Rev Immunol* 17:657–700
64. Ahuja SK, He W (2010) Double-edged genetic swords and immunity: Lesson from CCR5 and beyond. *J Infect Dis* 201:171–174
65. Calistri P, Giovannini A, Hubálek Z et al. (2010b) Epidemiology of West Nile in Europe and in the Mediterranean basin. *Open Virol J* 4:29–37
66. Petersen LR, Hayes EB (2008) West Nile virus in the Americas. *Med Clin North Am* 92:1307–1322
67. Armstrong PM, Vossbrinck CR, Andreadis TG et al. (2011) Molecular evolution of West Nile virus in a northern temperate region: Connecticut, USA 1999–2008. *Virology* 417:203–210
68. Weinberger M, Pitlik SD, Gandacu D et al. (2001) West Nile fever outbreak, Israel, 2000: epidemiologic aspects. *Emerg Infect Dis* 7:686–691
69. Bin H, Grossman Z, Pokamunski S et al. (2001) West Nile fever in Israel 1999–2000: from geese to humans. *Ann NY Acad Sci* 951:127–142
70. Malkinson M, Banet C, Weisman Y et al. (2002) Introduction of West Nile virus in the Middle East by migrating white storks. *Emerg Infect Dis* 8:392–397
71. ECDC (2009) Meeting Report. Expert consultation on West Nile virus infection. Stockholm, 21–22 April 2009 (http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/0909_MER_Expert_consultation_on_WNV.pdf)
72. Kopel E, Amitai Z, Bin H, Shulman LM, Mendelson E, Sheffer R (2011) Surveillance of West Nile virus disease, Tel Aviv District, Israel, 2005 to 2010. *Euro Surveill* 16;pii=19894
73. Soliman A, Mohareb E, Salman D et al. (2010) Studies on West Nile virus infection in Egypt. *J Infect Public Health* 3:54–59
74. Murgue B, Murri S, Zientara S, Durand B, Durand JP, Zeller H (2001b) West Nile outbreak in horses in southern France, 2000: the return after 35 years. *Emerg Infect Dis* 7:692–696
75. Sotelo E, Fernández-Pinero J, Llorente F et al. (2011) Phylogenetic relationships of Western Mediterranean West Nile virus strains (1996–2010) using full-length genome sequences: single or multiple introductions? *J Gen Virol* 92:2512–2522
76. Tsai TF, Popovici F, Cernescu C, Campbell GL, Nedelcu NI (1998) West Nile encephalitis epidemic in southeastern Romania. *Lancet* 352:767–771
77. Neghina AM, Neghina R (2011) Reemergence of human infections with West Nile virus in Romania, 2010: an epidemiological study and brief review of the past situation. *Vector Borne Zoonotic Dis* 11:1289–1292
78. Autorino GL, Battisti A, Deubel V et al. (2002) West Nile virus epidemic in horses, Tuscany region, Italy. *Emerg Infect Dis* 8, 1372–1378
79. Calistri P, Giovannini A, Savini G et al. (2010a) West Nile virus transmission in 2008 in north-eastern Italy. *Zoonoses Public Health* 57:211–219
80. Rizzo C, Vescio F, Declich S et al. (2009) West Nile virus transmission with human cases in Italy, August–September 2009. *Euro Surveill* 14;pii=19353
81. Barzon L, Squarzon L, Cattai M et al. (2009) West Nile virus infection in Veneto region, Italy, 2008–2009. *Euro Surveill* 14;pii=19289
82. Calistri P, Monaco F, Savini G et al. (2010c) Further spread of West Nile virus in Italy. *Vet Ital* 46:467–474
83. Barzon L, Pacenti M, Cusinato R et al. (2011) Human cases of West Nile Virus Infection in north-eastern Italy, 15 June to 15 November 2010. *Euro Surveill* 16(33);pii=19949. Available online: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19949>
84. Cusi MG, Roggi A, Terrosi C, Gori Savellini G, Toti M (2011) Retrospective diagnosis of West Nile virus infection in a patient with meningoencephalitis in Tuscany, Italy. *Vector Borne Zoonotic Dis* 11:1511–1512
85. Pezzotti P, Piovesan C, Barzon L et al. (2011) Prevalence of IgM and IgG antibodies to West Nile virus among blood donors in an affected area of north-eastern Italy, summer 2009. *Euro Surveill* 16;pii=19814
86. Pierro A, Gaibani P, Manisera C et al. (2011) Seroprevalence of West Nile virus-specific antibodies in a cohort of blood donors in northeastern Italy. *Vector Borne Zoonotic Dis* 11:1605–1607
87. Papa A, Danis K, Baka A et al. (2010b) Ongoing outbreak of West Nile virus infections in humans in Greece, July–August 2010. *Euro Surveill* 15;pii=19644
88. ECDC (2011) MEETING REPORT_Expert consultation on West Nile virus infection_Thessaloniki, 2_5–26_January_2011 (http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/1106_MER_WNV_Expert_Consultation.pdf)
89. Danis K, Papa A, Papanikolaou E et al. (2011) Ongoing outbreak of West Nile virus infection in humans, Greece, July to August 2011. *Euro Surveill* 16;pii=19951
90. Papa A, Perperidou P, Tzouli A, Castilletti C (2010a) West Nile virus–neutralizing antibodies in humans in Greece. *Vector Borne Zoonotic Dis* 10:655–658
91. Platonov AE (2001) West Nile encephalitis in Russia 1999–2001: were we ready? Are we ready? *Ann NY Acad Sci* 951:102–116
92. Platonov AE, Fedorova MV, Karan LS, Shopenskaya TA, Platonova OV, Zhuravlev VI (2008) Epidemiology of West Nile infection in Volgograd, Russia, in relation to climate change and mosquito (Diptera: Culicidae) bionomics. *Parasitol Res* 103 Suppl 1:545–53
93. May FJ, Davis CT, Tesh RB, Barrett AD (2011) Phylogeography of West Nile virus: from the cradle of evolution in Africa to Eurasia, Australia, and the Americas. *J Virol* 85:2964–2974
94. Venter M, Human S, Zaaerman D et al. (2009) Lineage 2 West Nile virus as cause of fatal neurological disease in horses, South Africa. *Emerg Infect Dis* 15:877–884
95. Sirbu A, Ceianu CS, Panculescu-Gatej RI et al. (2011) Outbreak of West Nile virus infection in humans, Romania, July to October 2010. *Euro Surveill* 16;pii=19762
96. Chaskopoulou A, Dovas CI, Chaintoutis SC, Bouzalas I, Ara G, Papanastassopoulou M (2011) Evidence of enzootic circulation of West Nile virus (Nea Santa-Greece-2010, lineage 2), Greece, May to July 2011. *Euro Surveill* 16;pii=19933. Available online: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19933>
97. Bagnarelli P, Marinelli K, Trotta D et al. (2011) Human case of autochthonous West Nile virus lineage 2 infection in Italy, September 2011. *Euro Surveill* 16;pii=20002. Available online: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=20002>
98. Pauli G (2004). West-Nil-Virus: Prävalenz und Bedeutung als Zoonoseerreger. [West Nile virus. Prevalence and significance as a zoonotic pathogen.] *Bundesgesundheitsbl – Gesundheitsforsch – Gesundheitsschutz* 47:653–660
99. ECDC (2007) Annual Epidemiological Report on Communicable Diseases in Europe. p. 250: http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/0706_SUR_Annual_Epidemiological_Report_2007.pdf
100. Aboutaleb N, Beersma MF, Wunderink HF, Vossen AC, Visser LG (2010) Case report: West Nile virus infection in two Dutch travellers returning from Israel. *Euro Surveill* 15;pii=19508
101. Linke S (2007c) Die Prävalenz und Inzidenz von West-Nil-Virus in Deutschland. Dissertation, Fachbereich der Biologie, Chemie und Pharmazie der Freien Universität Berlin
102. Tobler LH, Bianco C, Glynn SA et al.; NHLBI Retrovirus Epidemiology Study (REDS) (2005) Detection of West Nile virus RNA and antibody in frozen plasma components from a voluntary market withdrawal during the 2002 peak epidemic. *Transfusion* 45:480–486
103. CDC, Centers for Disease Control and Prevention (2002a) Possible West Nile virus transmission to an infant through breast-feeding—Michigan, 2002. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 51:877–878
104. O’Leary DR, Kuhn S, Kniss KL et al. (2006) Birth outcomes following West Nile Virus infection of pregnant women in the United States: 2003–2004. *Pediatrics* 117:e537–545
105. Iwamoto M, Jernigan DB, Guasch A et al.; West Nile Virus in Transplant Recipients Investigation Team (2003) Transmission of West Nile virus from an organ donor to four transplant recipients. *N Engl J Med* 348:2196–2203
106. Morelli MC, Sambri V, Grazi GL et al. (2010) Absence of neuroinvasive disease in a liver transplant recipient who acquired West Nile virus (WNV) infection from the organ donor and who received WNV antibodies prophylactically. *Clin Infect Dis* 51:e34–37
107. Capobianchi M, Sambri V, Castilletti C et al., on behalf of the Italian Transplant Network (2011) Retrospective screening of solid organ donors in Italy, 2009, reveals unpredicted circulation of West Nile virus. *Euro Surveill* 15;pii=19648. Available online: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19648>
108. Nanni Costa A, Capobianchi MR, Ippolito G et al. (2011) West Nile virus: the Italian national transplant network reaction to an alert in the north-eastern region, Italy 2011. *Euro Surveill* 16;pii=19991. Available online: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19991>
109. CDC, Centers for Disease Control and Prevention (2002b) Laboratory-acquired West Nile virus infections—United States, 2002. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 51:1133–1135
110. Tamba M, Bonilauri P, Bellini R et al. (2011) Detection of Usutu virus within a West Nile virus surveillance program in Northern Italy. *Vector Borne Zoonotic Dis* 11:551–557
111. Weissenböck H, Kolodziejek J, Url A, Lussy H, Rebel-Bauder B, Nowotny N (2002) Emergence of Usutu virus, an African mosquito-borne flavivirus of the Japanese encephalitis virus group, central Europe. *Emerg Infect Dis* 8:652–656

112. Nikolay B, Diallo M, Boye CS, Sall AA (2011) Usutu Virus in Africa. *Vector Borne Zoonotic Dis* 11:1417–1423
113. Savini G, Monaco F, Terregino C et al. (2011) Usutu virus in Italy: An emergence or a silent infection? *Vet Microbiol* 151:264–274
114. Steinmetz HW, Bakonyi T, Weissenböck H et al. (2011) Emergence and establishment of Usutu virus infection in wild and captive avian species in and around Zurich, Switzerland—genomic and pathologic comparison to other central European outbreaks. *Vet Microbiol* 148:207–212
115. Jöst H, Bialonski A, Maus D et al. (2011) Isolation of Usutu Virus in Germany. *Am J Trop Med Hyg* 85: 551–553
116. Gaibani P, Pierro AM, Cavrini F, Rossini G, Landini MP, Sambri V (2010) False-positive transcription-mediated amplification assay detection of West Nile virus in blood from a patient with viremia caused by an Usutu virus infection. *J Clin Microbiol* 48:3338–3339
117. Brault AC (2009) Changing patterns of West Nile virus transmission: altered vector competence and host susceptibility. *Vet Res* 40:43
118. Jourdain E, Toussaint Y, Leblond A, Bicout DJ, Sabatier P, Gauthier-Clerc M (2007) Bird species potentially involved in introduction, amplification, and spread of West Nile virus in a Mediterranean wetland, the Camargue (Southern France). *Vector Borne Zoonotic Dis* 7:15–33
119. Komar N, Langevin S, Hinten S et al. (2003) Experimental infection of North American birds with the New York 1999 strain of West Nile virus. *Emerg Infect Dis* 9:311–322
120. Brault AC, Langevin SA, Bowen RA et al. (2004) Differential virulence of West Nile strains for American crows. *Emerg Infect Dis* 10:2161–2168
121. Koenig WD, Hochachka WM, Zuckerberg B, Dickinson JL (2010) Ecological determinants of American crow mortality due to West Nile virus during its North American sweep. *Oecologia* 163:903–909
122. Wodak E, Richter S, Bagó Z et al. (2011) Detection and molecular analysis of West Nile virus infections in birds of prey in the eastern part of Austria in 2008 and 2009. *Vet Microbiol* 149:358–366
123. Linke S, Niedrig M, Kaiser A et al. (2007a) Serologic evidence of West Nile virus infections in wild birds captured in Germany. *Am J Trop Med Hyg* 77:358–364
124. Seidowski D, Ziegler U, von Rönn JA et al. (2010) West Nile virus monitoring of migratory and resident birds in Germany. *Vector Borne Zoonotic Dis* 10:639–647
125. Hubálek Z, Halouzka J, Juricová Z et al. (2008a) Serologic survey of birds for West Nile flavivirus in southern Moravia (Czech Republic). *Vector Borne Zoonotic Dis* 8:659–666
126. Hubálek Z, Wegner E, Halouzka J et al. (2008b) Serologic survey of potential vertebrate hosts for West Nile virus in Poland. *Viral Immunol* 21:247–253
127. Komar N (2001) West Nile virus surveillance using sentinel birds. *Ann NY Acad Sci* 951:58–73
128. Ziegler U, Seidowski D, Globig A, Fereidouni SR, Ulrich RG, Groschup MH (2010) Sentinel birds in wild-bird resting sites as potential indicators for West Nile virus infections in Germany. *Arch Virol* 155:965–969
129. Tiawirisup S, Blitvich BJ, Tucker BJ et al. (2010) Susceptibility of fox squirrels (*Sciurus niger*) to West Nile virus by oral exposure. *Vector Borne Zoonotic Dis* 10:207–209
130. Unlu I, Kramer WL, Roy AF, Foil LD (2010) Detection of West Nile virus RNA in mosquitoes and identification of mosquito blood meals collected at alligator farms in Louisiana. *J Med Entomol* 47:625–633
131. Castillo-Olivares J, Wood J (2004) West Nile virus infection of horses. *Vet Res* 35:467–483
132. Leblond A, Hendriks P, Sabatier P (2007) West Nile virus outbreak detection using syndromic monitoring in horses. *Vector Borne Zoonotic Dis* 7:403–410
133. Savini G, Monaco F, Calistri P, Lelli R (2008) Phylogenetic analysis of West Nile virus isolated in Italy in 2008. *Euro Surveill* 13:pil=19048
134. Hubálek Z, Halouzka J (1999) West Nile fever—a reemerging mosquito-borne viral disease in Europe. *Emerg Infect Dis* 5:643–650
135. Turell MJ, Sardelis MR, O'Guinn ML, Dohm DJ (2002) Potential vectors of West Nile virus in North America In: Mackenzie JS, Barrett ADT, Deubel V (Eds.) *Japanese encephalitis and West Nile viruses. Current Topics in Microbiology and Immunology*, vol. 267. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo, S. 241–252
136. Mumcuoglu KY, Banet-Noach C, Malkinson M, Shalom U, Galun R (2005) Argasid ticks as possible vectors of West Nile virus in Israel. *Vector Borne Zoonotic Dis* 5:65–71
137. Turell MJ, Dohm DJ, Sardelis MR, Oguinn ML, Andreadis TG, Blow JA (2005) An update on the potential of north American mosquitoes (Diptera: Culicidae) to transmit West Nile Virus. *J Med Entomol* 42:57–62
138. Moskvitina NS, Romanenko VN, Ternovoïa VA et al. (2008) Detection of the West Nile Virus and its genetic typing in ixodid ticks (Parasitiformes: Ixodidae) in Tomsk City and its suburbs. *Parazitologiya* 42:210–225
139. Hayes EB, Komar N, Nasci RS, Montgomery SP, O'Leary DR, Campbell GL (2005) Epidemiology and transmission dynamics of West Nile virus disease. *Emerg Infect Dis* 20:1167–1173
140. Vaidyanathan R, Scott TW (2007) Geographic variation in vector competence for West Nile virus in the *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) complex in California. *Vector Borne Zoonotic Dis* 7:193–198
141. Reisen WK, Brault AC, Martinez VM et al. (2007) Ability of transstadially infected *Ixodes pacificus* (Acari: Ixodidae) to transmit West Nile virus to song sparrows or western fence lizards. *J Med Entomol* 44:320–327
142. Girard YA, Popov V, Wen J, Han V, Higgs S (2005) Ultrastructural study of West Nile virus pathogenesis in *Culex pipiens quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol* 42:429–444
143. Kilpatrick AM, Meola MA, Moudy RM, Kramer LD (2008) Temperature, viral genetics, and the transmission of West Nile virus by *Culex pipiens* mosquitoes. *PLoS Pathog* 4:e1000092
144. Richards SL, Mores CN, Lord CC, Tabachnick WJ (2007) Impact of extrinsic incubation temperature and virus exposure on vector competence of *Culex pipiens quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae) for West Nile virus. *Vector Borne Zoonotic Dis* 7:629–636
145. Cornel AJ, Jupp PG, Blackburn NK (1993) Environmental temperature on the vector competence of *Culex univittatus* (Diptera: Culicidae) for West Nile virus. *J Med Entomol* 30:449–456
146. Rosen L (1987) Overwintering mechanisms of mosquito-borne arboviruses in temperate climates. *Am J Trop Med Hyg* 37 [Suppl]:695–765
147. Anderson JF, Main AJ (2006) Importance of vertical and horizontal transmission of West Nile virus by *Culex pipiens* in the Northeastern United States. *J Infect Dis* 194:1577–1579
148. Andreadis TG, Armstrong PM, Bajwa WI (2010) Studies on hibernating populations of *Culex pipiens* from a West Nile virus endemic focus in New York City: parity rates and isolation of West Nile virus. *J Am Mosq Control Ass* 26:257–264
149. Baqar S, Hayes CG, Murphy JR, Watts DM (1993) Vertical transmission of West Nile virus by *Culex* and *Aedes* species mosquitoes. *Am J Trop Med Hyg* 48:757–762
150. Miller BR, Nasci RS, Godsey MS et al. (2000) First field evidence for natural vertical transmission of West Nile virus in *Culex univittatus* complex mosquitoes from Rift Valley province, Kenya. *Am J Trop Med Hyg* 62:240–246
151. Goddard LB, Roth AE, Reisen WK, Scott TW (2003) Vertical transmission of West Nile virus by three California *Culex* (Diptera: Culicidae) species. *J Med Entomol* 40:743–746
152. Phillips RA, Christensen K (2006) Field-caught *Culex erythrothorax* larvae found naturally infected with West Nile virus in Grand County, Utah. *J Am Mosq Control Assoc* 22:561–562
153. Anderson JF, Main AJ, Delroux K, Fikrig E (2008) Extrinsic incubation periods for horizontal and vertical transmission of West Nile virus by *Culex pipiens pipiens* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol* 45:445–451
154. Jiang SF, Zhang YM, Guo XX et al. (2010) Experimental studies on comparison of the potential vector competence of four species of *Culex* mosquitoes in China to transmit West Nile virus. *J Med Entomol* 47:788–790
155. Brugger K (2008) Globale Erwärmung und neu auftretende Infektionskrankheiten am Beispiel der Usutu Virus Epidemie in Österreich. Dissertation Universität Wien, http://www.univie.ac.at/imgwien/dipldiss/diss/Diss_Brugger.htm
156. Calzolari M, Bonilauri P, Bellini R et al. (2010) Evidence of simultaneous circulation of West Nile and Usutu viruses in mosquitoes sampled in Emilia-Romagna region (Italy) in 2009. *PLoS ONE* 5:e14324
157. Monaco F, Savini G, Calistri P et al. (2011) 2009 West Nile disease epidemic in Italy: First evidence of overwintering in Western Europe? *Res Vet Sci* 91:321–326
158. Becker N, Huber K, Pluskota B, Kaiser A (2011) *Ochlerotatus japonicus japonicus* – a newly established neozoon in Germany and a revised list of the German mosquito fauna. *Eur Mosq Bull* 29:88–102
159. Timmermann U, Becker N (2010) Mosquito-borne West Nile virus (WNV) surveillance in the Upper Rhine Valley, Germany. *J Vector Ecol* 35:140–143
160. Votýpka J, Šeblová V, Rádrová J (2008) Spread of the West Nile virus vector *Culex modestus* and the potential malaria vector *Anopheles hyrcanus* in central Europe. *J Vector Ecol* 33:269–277
161. European Commission (2009) European Commission Decision 2009/312/EC (2009) (<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2009:091:0027:0030:EN:PDF>)
162. Grazzini G, Liumbruno GM, Pupella S et al. (2008) West Nile virus in Italy: a further threat to blood safety, a further challenge to the blood system. *Blood Transfus* 6:235–237

163. Ministère du travail, des relations sociales, de la famille et de la solidarité, Ministère de la santé, de la jeunesse, des sports et de la vie associative (2009) Guide de procédures de lutte contre la circulation du virus West Nile en France métropolitaine. http://www.sante.gouv.fr/fichiers/bo/2009/09-08/ste_20090008_0100_0125.pdf
164. Roehrig JT, Nash D, Maldin B et al. (2003) Persistence of virus-reactive serum immunoglobulin M antibody in confirmed West Nile virus encephalitis cases. *Emerg Infect Dis* 9:376–379
165. Levett PN, Sonnenberg K, Sidaway F et al. (2005) Use of immunoglobulin G avidity assays for differentiation of primary from previous infections with West Nile virus. *J Clin Microbiol* 43:5873–5875
166. Fox JL, Hazell SL, Tobler LH, Busch MP (2006) Immunoglobulin G avidity in differentiation between early and late antibody responses to West Nile virus. *Clin Vaccine Immunol* 13:33–36
167. Janusz KB, Lehman JA, Panella AJ, Fischer M, Staples E (2011) Laboratory testing practices for West Nile virus in the United States. *Vector Borne Zoonotic Dis* 11:597–599
168. Linke S, Muehlen M, Niedrig M et al. (2008) Assessing the exposure of German and Austrian bird ringers to West Nile virus (Flavivirus) and evaluating their potential risk of infection. *J Ornithol* 149:271–275
169. Pfeleiderer C, Blümel J, Schmidt M et al. (2008) West Nile virus and blood product safety in Germany. *J Med Virol* 80:557–563
170. Hall RA, Scherret JH, Mackenzie JS (2001) Kunjin virus: an Australian variant of West Nile? *Ann N Y Acad Sci* 951:153–160
171. Linke S, Ellerbrok H, Niedrig M, Nitsche A, Pauli G (2007b) Detection of West Nile virus lineages 1 and 2 by real-time PCR. *J Virol Methods* 146:355–358
172. Pfeleiderer C, König C, Chudy M, Schmidt M, Roth WK, Nübling CM (2006) Molecular epidemiology of West Nile Virus in humans. *Dev Biol (Basel)* 126:197–201; discussion 326–327
173. Rabel PO, Planitzer CB, Farcet MR et al. (2011) Increasing West Nile virus antibody titres in central European plasma donors from 2006 to 2010. *Euro Surveill* 16:pj=19812
174. Planitzer CB, Modrof J, Yu MY, Kreil TR (2009) West Nile virus infection in plasma of blood and plasma donors, United States. *Emerg Infect Dis* 15:1668–1670
175. Niedrig M, Linke S, Zeller H, Drosten C (2006) First international proficiency study on West Nile virus molecular detection. *Clin Chem* 52:1851–1854
176. Linke S, Mackay WG, Scott C, Wallace P, Niedrig M (2011) Second external quality assessment of the molecular diagnostic of West Nile virus: Are there improvements towards the detection of WNV? *J Clin Virol* 52:257–260
177. Jordan I, Briese T, Fischer N, Lau JY, Lipkin WI (2000) Ribavirin inhibits West Nile virus replication and cytopathic effect in neural cells. *J Infect Dis* 182:1214–1217
178. Chowers MY, Lang R, Nassar F et al. (2001) Clinical characteristics of the West Nile fever outbreak, Israel, 2000. *Emerg Infect Dis* 7:675–678
179. Morrey JD, Day CW, Julander JG, Blatt LM, Smee DF, Sidwell RW (2004) Effect of interferon-alpha and interferon-inducers on West Nile virus in mouse and hamster animal models. *Antivir Chem Chemother* 15:101–109
180. Malet H, Massé N, Selisko B et al. (2008) The flavivirus polymerase as a target for drug discovery. *Antiviral Res* 80:23–35
181. Walid MS, Mahmoud FA (2009) Successful treatment with intravenous immunoglobulin of acute flaccid paralysis caused by West Nile virus. *Perm J* 13:43–46
182. Ben-Nathan D, Gershoni-Yahalom O, Samina I et al. (2009) Using high titer West Nile intravenous immunoglobulin from selected Israeli donors for treatment of West Nile virus infection. *BMC Infect Dis* 9:18 (<http://www.biomedcentral.com/1471-2334/9/18>)
183. Beigel JH, Nordstrom JL, Pillemer SR et al. (2010) Safety and pharmacokinetics of single intravenous dose of MGAWN1, a novel monoclonal antibody to West Nile virus. *Antimicrob Agents Chemother* 54:2431–2436
184. Beasley DW (2011) Vaccines and immunotherapeutics for the prevention and treatment of infections with West Nile virus. *Immunotherapy* 3:269–285
185. Guy B, Guirakhoo F, Barban V, Higgs S, Monath TP, Lang J (2010) Preclinical and clinical development of YFV 17D-based chimeric vaccines against dengue, West Nile and Japanese encephalitis viruses. *Vaccine* 28:632–649
186. Biedenkopf R, Bevilacqua J, Gregg AM, Watson M, Dayan G (2011) Phase II, randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter study to investigate the immunogenicity and safety of a West Nile virus vaccine in healthy adults. *J Infect Dis* 203:75–84
187. Smith HL, Monath TP, Pazoles P et al. (2011) Development of antigen-specific memory CD8+ T cells following live-attenuated chimeric West Nile virus vaccination. *J Infect Dis* 203:513–522
188. Ledgerwood JE, Pierson TC, Hubka SA et al.; VRC 303 Study Team (2011) A West Nile virus DNA vaccine utilizing a modified promoter induces neutralizing antibody in younger and older healthy adults in a phase I clinical trial. *J Infect Dis* 203:1396–1404
189. Schneeweiss A, Chabierski S, Salomo M et al. (2011) A DNA vaccine encoding the E protein of West Nile Virus is protective and can be boosted by recombinant domain DIII. *Vaccine* 29:6352–6357
190. Posadas-Herrera G, Inoue S, Fuke I et al. (2010) Development and evaluation of a formalin-inactivated West Nile Virus vaccine (WN-VAX) for a human vaccine candidate. *Vaccine* 28:7939–7946
191. Minke JM, Siger L, Cupillard L et al. (2011) Protection provided by a recombinant ALVAC(®)-WNV vaccine expressing the prM/E genes of a lineage 1 strain of WNV against a virulent challenge with a lineage 2 strain. *Vaccine* 29:4608–4612
192. Stramer SL, Fang CT, Foster GA, Wagner AG, Brodsky JP, Dodd RY (2005) West Nile virus among blood donors in the United States, 2003 and 2004. *N Engl J Med* 353:451–459
193. Busch MP, Caglioti S, Robertson EF et al. (2005) Screening the blood supply for West Nile virus RNA by nucleic acid amplification testing. *N Engl J Med* 353:460–467
194. Montgomery SP, Brown JA, Kuehnert M et al.; 2003 West Nile Virus Transfusion-Associated Transmission Investigation Team (2006) Transfusion-associated transmission of West Nile virus, United States 2003 through 2005. *Transfusion* 46:2038–2046
195. CDC, Centers for Disease Control and Prevention (2007) West Nile virus transmission through blood transfusion—South Dakota, 2006. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 56:76–79
196. Kleinman SH, Williams JD, Robertson G et al. (2009) West Nile virus testing experience in 2007: evaluation of different criteria for triggering individual-donation nucleic acid testing. *Transfusion* 49:1160–1170
197. Biggerstaff BJ, Petersen LR (2009) A modeling framework for evaluation and comparison of trigger strategies for switching from minipool to individual-donation testing for West Nile virus. *Transfusion* 49:1151–1159
198. O'Brien SF, Scalia V, Zuber E et al. (2010) West Nile virus in 2006 and 2007: the Canadian Blood Services' experience. *Transfusion* 50:1118–1125
199. Cameron C, Reeves J, Antonishyn N et al. (2005) West Nile virus in Canadian blood donors. *Transfusion* 45:487–491
200. Vamvakas EC, Kleinman S, Hume H, Sher GD (2006) The development of West Nile virus safety policies by Canadian blood services: guiding principles and a comparison between Canada and the United States. *Transfus Med Rev* 20:97–109
201. Zou S, Foster GA, Dodd RY, Petersen LR, Stramer SL (2010) West Nile fever characteristics among viremic persons identified through blood donor screening. *J Infect Dis* 202:1354–1361
202. Food and Drug Administration (2008) Guidance for industry: use of nucleic acid tests to reduce the risk of transmission of West Nile virus from donors of whole blood and blood components intended for transfusion. US Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Rockville, MD
203. Kreil TR, Berting A, Kistner O, Kindermann J (2003) West Nile virus and the safety of plasma derivatives: verification of high safety margins, and the validity of predictions based on model virus data. *Transfusion* 43:1023–1028
204. Jakubik JJ, Vicik SM, Tannatt MM, Kelley BD (2004) West Nile Virus inactivation by the solvent/detergent steps of the second and third generation manufacturing processes for B-domain deleted recombinant factor VIII. *Haemophilia* 10:69–74
205. Hellstern P, Solheim BG (2011) The use of Solvent/Detergent treatment in pathogen reduction of plasma. *Transfus Med Hemother* 38:65–70
206. Mohr H, Knüver-Hopf J, Gravemann U, Redecker-Klein A, Müller TH (2004) West Nile virus in plasma is highly sensitive to methylene blue-light treatment. *Transfusion* 44:886–890
207. Lin L, Hanson CV, Alter HJ et al. (2005) Inactivation of viruses in platelet concentrates by photochemical treatment with amotosalen and long-wavelength ultraviolet light. *Transfusion* 45:580–590
208. Gallian P, Vignoli C, Dombey AM et al. (2006) Inactivation of a European strain of West Nile virus in single-donor platelet concentrate using the INTERCEPT blood system. *Vox Sang* 91:345–347
209. Irsch J, Lin L (2011) Pathogen inactivation of platelet and plasma blood components for transfusion using the INTERCEPT Blood System™. *Transfus Med Hemother* 38:19–31
210. Marschner S, Goodrich R (2011) Pathogen reduction technology treatment of platelets, plasma and whole blood using riboflavin and UV light. *Transfus Med Hemother* 38:8–18
211. Solheim BG (2008) Pathogen reduction of blood components. *Transfus Apher Sci* 39:75–82
212. Rock G (2011) A comparison of methods of pathogen inactivation of FFP. *Vox Sang* 100:169–178