

Austrian Contributions to  
Veterinary Epidemiology

Volume 4

# Epizootiologie von Usutu-Virus-assoziiertem Vogelsterben in Österreich

Sonja Chvala-Mannsberger, Tamás Bakonyi, Katharina  
Brugger, Norbert Nowotny and Herbert Weissenböck <sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> **Corresponding author:** A. Univ.-Prof. Dr. Herbert Weissenböck, Department of Pathobiology  
University of Veterinary Medicine Vienna, Veterinärplatz 1, A-1210 Vienna. Tel: +43 1 25077  
2418, Fax: +43 1 25077 2490, Email: herbert.weissenboeck@vu-wien.ac.at

Vienna 2007

---

DNW  
ISSN 1684-0488  
ISBN 978-3-9502042-3-0

The general objective is to promote and extend the use of statistical and mathematical methods in veterinary epidemiology. Special emphasis is given on methods and results. Monographs, paper collections or conference proceedings will be published in German as well as in English in the Austrian Contributions to Veterinary Epidemiology if judged consistently with these general aims. All contributions will be refereed.

## IMPRINT

Editors	Franz Rubel Department of Natural Sciences, University of Veterinary Medicine Vienna  Klemens Fuchs Institute of Biostatistics, AGES - Austrian Agency for Health and Food Safety, Graz
Editorial office	Franz Rubel Department of Natural Sciences, University of Veterinary Medicine Vienna
Advisory board	Jenő Reiczigel, Dept. of Biomathematics and Informatics, Szent Istvan University, Hungary Armin Deutz, Animal Health Service, Graz, Austria Günther Schauburger, Dept. of Natural Sciences, University of Veterinary Medicine Vienna
Print	Typeset by authors in $\LaTeX$ Printed and bound by digitaldruck.at Druck- und HandelsgesmbH A-2544 Leobersdorf, Eitzenbergerstr. 8
Publisher	Department für Naturwissenschaften (DNW), Veterinärplatz 1, A-1210 Wien
© DNW	All rights reserved

*Wer mit frohem Gemüt  
seinen Lebensweg zieht,  
der macht mit ihr Bekanntschaft.  
Ihr gebührt unser Dank,  
denn ihr klarer Gesang  
erfüllt Stadt, Dorf und Landschaft.  
Sie ist nicht auf den Höh`n  
im Gebirge zu seh`n,  
nicht droben hoch beim Gamsel,  
Sie belebt bei uns hier  
auch das Gartenrevier  
als guter Freund, die Amsel.<sup>1</sup>*

---

<sup>1</sup> Dr. Wolfgang Frie, Auszug aus Liedtext "Das Lied der Amsel"  
<http://www.fen-net.de/er/frie/lieder/index.htm>



# Inhaltsverzeichnis

Vorwort	ix
Zusammenfassung	x
Summary	xi
Verzeichnis der Abkürzungen	xii
<b>1 Einleitung</b>	<b>13</b>
1.1 USUV und Flaviviren	14
1.2 Amsel ( <i>Turdus merula</i> )	14
1.2.1 Taxonomie	14
1.2.2 Allgemeine Merkmale	15
1.3 Ziele zur Erforschung von USUV	16
<b>2 USUV – Charakterisierung des in Österreich aufgetretenen Virus</b>	<b>17</b>
2.1 Elektronenmikroskopische Darstellung, Dichte, physikalische und chemische Stabilität	17
2.2 Austestung des Zellkulturspektrums	18
2.3 Hämagglutinierende Eigenschaften	20
2.4 Bestimmung der gesamten Nukleinsäuresequenz von USUV	20
<b>3 Etablierung virologischer Testverfahren</b>	<b>25</b>
3.1 Immunhistochemischer Nachweis von USUV-Proteinen	25
3.2 Nachweis von USUV-spezifischen Ribonukleinsäure (RNA)-Fragmenten mittels in situ Hybridisierung	26
3.3 Nachweis von USUV-spezifischen RNA-Fragmenten mittels RT-PCR	26
<b>4 Etablierung serologischer Testverfahren</b>	<b>29</b>
4.1 Hämagglutinations–Inhibitions-Test	29
4.2 Plaque-Reduktions-Neutralisations-Test	29
<b>5 USUV-Infektion bei Vögeln im Jahr 2001</b>	<b>31</b>
5.1 Makroskopische Beurteilung	31
5.2 Histologische Untersuchung	31

5.3	Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchung	32
5.4	Ergebnisse der in situ Hybridisierung	32
5.5	Ergebnisse der RT-PCR	32
<b>6</b>	<b>USUV-Infektion bei Vögeln im Jahr 2002</b>	<b>35</b>
6.1	Makroskopische Beurteilung	37
6.2	Histologische Untersuchung	37
6.3	Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchung	37
6.4	Ergebnisse der in situ Hybridisierung	37
6.5	Ergebnisse der RT-PCR	38
6.6	Erkenntnisse aus den Jahren 2001 – 2002	38
<b>7</b>	<b>USUV-Infektion bei Vögeln im Jahr 2003</b>	<b>39</b>
7.1	Makroskopische Beurteilung	40
7.2	Histologische Untersuchung	40
7.3	Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchung	40
7.4	Ergebnisse der in situ Hybridisierung und RT-PCR	40
7.5	Monitoring toter Vögel 2003	41
7.5.1	Meldung von Totfunden	46
7.5.2	Beobachtung klinischer Symptome bei nachgewiesenen USUV-infizierten Amseln	47
7.5.3	Todesursachen der nicht USUV-infizierten Vögel	48
7.6	Erkenntnisse nach 3-jähriger USUV-Aktivität	48
<b>8</b>	<b>USUV-Infektion bei Vögeln im Jahr 2004</b>	<b>51</b>
8.1	Monitoring toter Vögel 2004	52
8.1.1	Meldungen von Totfunden	52
8.1.2	USUV-infizierte Vögel – Vorberichte und pathomorphologische Daten	52
8.1.3	Todesursachen der nicht USUV-infizierten Vögel	53
8.2	Erkenntnisse nach der USUV-Aktivität 2004	54
<b>9</b>	<b>USUV-Infektion bei Vögeln in den Jahren 2005 – 2006</b>	<b>57</b>
9.1	Monitoring toter Vögel 2005	58
9.1.1	Meldungen toter oder kranker Vögel	58
9.1.2	Pathomorphologische Daten USUV-infizierter Vögel	58
9.1.3	Todesursachen USUV-negativer Vögel	59
9.2	Zusammenfassende Betrachtungen des Vogelmonitorings 2005	59
9.3	USUV-Infektionen 2006	66
<b>10</b>	<b>Ausbreitung von USUV in Österreich und erste Nachweise in Nachbarländern</b>	<b>67</b>
10.1	Auftreten von USUV-assoziiertem Vogelsterben im Ausland 2005-2006	67
10.1.1	Ungarn	67
10.1.2	Schweiz	68
10.1.3	Italien	68

10.2	Nukleinsäuresequenzvergleich der im Ausland festgestellten USUV-Fälle	68
10.3	Nukleinsäuresequenzvergleich der österreichischen Isolate aus den Jahren 2001 – 2005	69
<b>11</b>	<b>Überblick der Vogelarten mit nachgewiesener USUV-Infektion</b>	<b>73</b>
11.1	Bartkauz ( <i>Strix nebulosa</i> )	73
11.2	Singdrossel ( <i>Turdus philomelos</i> )	74
11.3	Rotkehlchen ( <i>Erithaceus rubecula</i> )	74
11.4	Blaumeise ( <i>Parus caeruleus</i> )	74
11.5	Kohlmeise ( <i>Parus major</i> )	75
11.6	Kleiber ( <i>Sitta europaea</i> )	75
11.7	Haussperling ( <i>Passer domesticus</i> )	75
<b>12</b>	<b>Untersuchungen an Stechmücken als potentielle Vektoren für USUV</b>	<b>79</b>
12.1	Methodische Durchführung der Untersuchungen 2004 - 2005	82
12.2	Ergebnisse der Stechmückenuntersuchungen 2004 - 2005	83
<b>13</b>	<b>Serologisches Screening von Wildvögeln 2003 – 2006</b>	<b>89</b>
13.1	Allgemeines	89
13.2	Longitudinale serologische Studie in einer geschlossenen Greifvogel-population	97
<b>14</b>	<b>Untersuchungen von humanen Blutproben</b>	<b>105</b>
<b>15</b>	<b>Untersuchungen der Empfänglichkeit von Nutzgeflügel für USUV</b>	<b>107</b>
15.1	Hühner	107
15.1.1	Einleitung	107
15.1.2	Durchführung und Ergebnisse der experimentellen Studie	107
15.1.3	Erkenntnisse über die Bedeutung von USUV-Infektionen bei Hühnern	108
15.2	Gänse	109
15.2.1	Einleitung	109
15.2.2	Durchführung und Ergebnisse der experimentellen Studie	109
15.2.3	Erkenntnisse über die Bedeutung von USUV-Infektionen bei Gänsen	110
<b>16</b>	<b>Diskussion</b>	<b>111</b>
	Literatur	115
	Danksagung	121



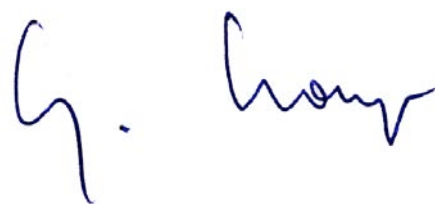


## Vorwort

Vögel sind die Tiergruppe mit der größten Beliebtheit. Vogelgesang und Vogelzug haben die Menschheit seit jeher begeistert und fasziniert. Vögel sind auch die Tiergruppe, über die die meisten Daten zu Verbreitung und Bestandsentwicklung vorliegen. Es gibt viele Menschen, die Vögel beobachten und denen der Schutz der Vogelwelt ein wichtiges Anliegen ist. So ist es kein Wunder, dass es 2001 bald aufgefallen ist, dass in den städtischen Lebensräumen Ostösterreichs die Amseln seltener wurden. Außerdem wurden immer wieder tote Amseln gefunden. Dachte man zuerst an Umweltgifte als Auslöser des Amselsterbens, stellte sich bald heraus, dass ein Virus an diesen Verlusten Schuld war. In einer beispielhaften kooperativen Kraftanstrengung einiger Wissenschaftler der Veterinärmedizinischen Universität unter reger Mithilfe der ornithologisch interessierten Öffentlichkeit ist es gelungen, das Mysterium dieses Amselsterbens zu enträtseln. Die vorliegende Publikation beleuchtet alle wesentlichen Aspekte dieser neuen Krankheit und zeigt ihren Verlauf in der Wildvogelpopulation.

Es ist ein Faktum, dass neben den tiefgreifenden durch den Menschen verursachten Veränderungen der Lebensräume auch Krankheiten die Vögel bedrohen. Während die Vögel im Laufe der Evolution gelernt haben, mit Krankheiten umzugehen, bedroht die Zerstörung der Lebensräume die Vogelwelt nachhaltig, wie die immer länger werdenden Roten Listen belegen. Auch dieser Report zeigt eindrucksvoll, wie sich die Amselpopulation innerhalb weniger Jahre an die Bedrohung durch diese neue Virusinfektion angepasst hat. Mit der anthropogenen Umgestaltung der Lebensräume ist die Kompensationsfähigkeit der Vogelpopulationen aber definitiv überfordert.

Die vorliegende Publikation ist ein schlagender Beweis für das problemlösende Potential fächerübergreifender Zusammenarbeit. Es wird dieses Potentials auch für die Lösung der anderen Probleme bedürfen wie auch der Bereitschaft der Menschen durch schonenden Umgang mit der Natur den Mitgeschöpfen weiterhin Überlebenschancen zu gewähren.



Dr. Gerhard Loupal  
(Präsident von BirdLife Österreich)

## Zusammenfassung

Das Usutu-Virus (USUV), welches zu den durch Stechmücken übertragenen Flaviviren gehört, verursachte nach seinem erstmaligen Auftreten in Österreich im Jahre 2001 ein massives Vogelsterben. Bis 2001 war dieses Virus nur in Afrika bekannt, galt dort als harmlos und wurde daher nicht näher untersucht. Nachdem USUV auch im Jahr 2002 weiterhin für ein Vogelsterben sorgte – überwiegend betroffene Vogelspezies war die Amsel (*Turdus merula*) – bewies es, dass es den Winter überstehen konnte und in Österreich einen Übertragungszyklus etabliert hatte. In den Jahren 2003 – 2005 wurde ein spezifisches Überwachungsprogramm installiert, mit dem Ziel mehr Informationen über den Verlauf der USUV-Infektionen, betroffene Vogelspezies sowie die örtliche Verbreitungstendenz zu erhalten. Aus allen gesammelten Daten, die von 2001 bis 2006 vorlagen, konnte USUV näher charakterisiert und über die Jahre seines Vorkommens hinweg auch auf mögliche Mutationen untersucht werden. Es wurden Untersuchungsmethoden zum direkten Nachweis von USUV-Nukleinsäuren und -Proteinen in den Organen entwickelt (Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion, in situ Hybridisierung, Immunhistochemie) und damit neue Erkenntnisse im Bezug auf das krankmachende Potential von USUV bei Vögeln ermittelt. Im Zuge des Überwachungsprogrammes wurden aus bekannten USUV-infizierten Regionen verschiedene Arten von Stechmücken auf das Vorhandensein von USUV untersucht, und bei einigen Culex- und Aedesarten konnte dieses auch nachgewiesen werden. Der jährliche örtliche Vergleich der USUV-assoziierten Vogelfunde zeigte eine allmähliche Ausbreitung in Ostösterreich. Vom Raum Wien im Jahre 2001 ausgehend, breitete sich bis 2005 die USUV-Aktivität bis in den Westen Niederösterreichs (Bezirk Amstetten) und in Richtung Süden und Südosten bis nach Graz in der Steiermark und in den Bezirk Güssing (Burgenland) aus. Das USUV-assoziierte Vogelsterben zeigte in den ersten 3 Jahren einen kontinuierlichen Anstieg; ab 2004 kam es allerdings zu einem starken Rückgang USUV-positiver toter Vögel. Ein serologisches Screening von Wildvögeln in den Jahren 2003 - 2006 zeigte, dass ab der Übertragungssaison 2004 der Anteil der serologisch positiven Vögel bis zu 53 % betrug. Diese Erkenntnis sprach dafür, dass sich allmählich eine *Herdenimmunität* entwickelt hatte, was auch die deutlich abnehmende USUV-assoziierte Vogelsterblichkeit erklärte. Während also die österreichische Vogelpopulation bereits nach 6-jähriger USUV-Exposition einen Schutzmechanismus entwickelte, sorgte dieses Virus ab 2005 auch in Ungarn, der Schweiz und Italien für teils massives Vogelsterben.

## Summary

In 2001, Usutu virus (USUV), a member of the mosquito-borne clade within the Flaviviridae family, was responsible for mortality of wild birds in Austria. This was the first time that USUV had emerged outside Africa and had caused fatalities in warmblooded hosts. Previously, USUV was considered to be unimportant in terms of pathogenicity and has largely been ignored scientifically. However, following its emergence in Austria in 2001, USUV has proven to be highly pathogenic for several species of wild birds, especially blackbirds (*Turdus merula*). In the subsequent year, 2002, the virus continued to kill birds in Austria which showed that USUV had managed to overwinter and has become a resident pathogen in Europe. Because the emergence of USUV provided a unique opportunity to study the further development of the activity of a mosquito-borne virus in a previously unexposed eco-system and a naïve host population, we established a surveillance system which was maintained for a period of three consecutive years (2003 - 2005). The survey identified the geographical distribution of infected birds and the most frequently affected bird species, and revealed marked differences of USUV-associated bird mortality in the three seasons investigated. In addition, after characterization of USUV, sequencing results of USUV-amplification products of bird origin were compared during the years of USUV-activity in order to determine whether one or more strains of USUV circulate in Austria. Different methods for detection of USUV in organs were established (Reverse transcriptase-polymerase chain reaction, immunohistochemistry and in situ hybridization), demonstrating pathological lesions and viral loads. During the survey mosquitoes were collected from different regions, where USUV-activity was detected, and in some *Culex*- and *Aedes* species USUV was verified. The geographical distribution of USUV showed a spread starting in Vienna (2001) and continuing to the western part of Lower Austria (district Amstetten), into the south to the capital of Styria, Graz, and to the southeast into Burgenland, district Güssing. The most remarkable trends were a peak of viral activity in the summer 2003, resulting in considerable blackbird mortality, and a subsequent decline of USUV-associated bird losses in the following summers of 2004 until 2006. The serological screening of wild birds in the years 2003 – 2005 showed in the year 2005 positive results in 53 % of the examined cases. This observation makes herd immunity the most likely explanation for the conspicuous decline of USUV-associated bird mortality. Whereas the Austrian bird population developed a protective mechanism against USUV, USUV-associated die off of wild birds was recognised since 2005 in Hungary, Switzerland and Italy.