

Aus dem Institut für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen der  
Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

# **Einfluss der 3' nichttranslatierten Region von Chikungunya-Virus auf die Replikation in verschiedenen Stechmückenarten**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines  
Doctor medicinae veterinariae (Dr. med. vet.)  
durch die Veterinärmedizinische Fakultät  
der Universität Leipzig

eingereicht von  
Yauhen Karliuk  
aus  
Osipowitschi,  
Belarus

Leipzig, 2022

Mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Dekan: Prof. Dr. Dr. Thomas Vahlenkamp

Betreuer: Prof. Dr. Martin Pfeffer

Gutachter: Prof. Dr. Martin Pfeffer  
Institut für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen  
Veterinärmedizinische Fakultät der Universität Leipzig

Prof. Dr. Dr. Jonas Schmidt-Chanasit  
Abteilung Arbovirologie  
Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin, Hamburg

Tag der Verteidigung: 05.07.2022

## **Inhaltsverzeichnis**

### **Abkürzungsverzeichnis**

<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2 Literaturübersicht</b>	<b>2</b>
<b>2.1 Alphaviren</b>	<b>2</b>
2.1.1 Klassifikation	2
2.1.2 Virusmorphologie und Genomaufbau	2
2.1.3 Virusreplikation	4
<b>2.2 Chikungunya-Virus</b>	<b>5</b>
2.2.1 Übertragungszyklus	5
2.2.2 Epidemiologie	7
2.2.3 Genotypen und die 3' UTR Region	9
2.2.4 Chikungunya-Fieber	12
<b>2.3 Stechmücken</b>	<b>13</b>
2.3.1 Taxonomie und Stechmückenarten in Deutschland	13
2.3.2 Allgemeine Morphologie, Biologie und Ökologie	14
2.3.2.1 Eiablage und Schlüpfen der Larven	15
2.3.2.2 Aquatische Entwicklungsstadien	16
2.3.2.3 Adulte	17
2.3.2.4 Flugverhalten und Überwinterungsstrategien	19
2.3.3 Arboviren in Deutschland	20
<b>3 Publikation</b>	<b>26</b>
3.1 Stellungnahme zum Eigenanteil an den Arbeiten zur Publikation	26
3.2 Publikation	27
<b>4 Diskussion</b>	<b>42</b>
<b>5 Zusammenfassung</b>	<b>49</b>
<b>6 Summary</b>	<b>51</b>
<b>7 Literaturverzeichnis</b>	<b>53</b>
<b>8 Danksagung</b>	<b>66</b>

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

&	und
„cap“	eine Nukleotidkappe „cap“ am 5' Ende des RNA-Genoms
°C	Grad Celsius
26S RNA	26S subgenomische Ribonukleinsäure (S steht für Svedberg unit)
3' UTR	3' untranslatierter Bereich (untranslated Region)
49S RNA	genomische Ribonukleinsäure (S steht für Svedberg unit)
5' UTR	5' untranslatierter Bereich (untranslated Region)
Aag2	<i>Ae. aegypti</i> -Stechmückenzenellen
Abb.	Abbildung
<i>Ae.</i>	<i>Aedes</i>
<i>An.</i>	<i>Anopheles</i>
BATV	Batai-Virus
BHK/BHK-21/J	Babyhamster Nieren-Zellen (baby hamster kidney cells)
C6/36	<i>Aedes albopictus</i> -Stechmückenzenellen
ca.	circa
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CHIKF	Chikungunya-Fieber
CHIKV	Chikungunya-Virus
CSE	konservierte Sequenzelement in der 3' UTR Region
<i>Cx.</i>	<i>Culex</i>
DR/DRs	sich wiederholende Sequenzelemente in der 3' UTR Region (direct repeats)
ECDC	European Centre for Disease Prevention and Control
ECSA	East, Central, and South African Genotyp der CHIKV
EIP	extrinsische Inkubationsperiode
et al.	und andere (et alii)
IgG	Antikörper vom Typ Immunglobulin-G
IgM	Antikörper vom Typ Immunglobulin-M
IO-Linie	Indischer Ozean Linie
MEB	Mitteldarm-Entweichungsbarriere
MIB	Mitteldarm-Infektionsbarriere
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (messenger RNA)



NABU	Naturschutzbund Deutschland e.V.
nm	Nanometer
nt/nts	Nukleotid (nucleotide)
ONNV	O'Nyong-Nyong-Virus
ORF	Offene Leserahmen (open reading frame)
nsP1-4	Nichtstrukturproteine 1 bis 4
PAHO	Pan American Health Organization
PHE	Public Health Emergencies Department
ProMED	ProMED-mail ist ein Programm der ISID (International Society for Infectious Diseases), in dem neu auftretende Infektionskrankheiten und Häufungen dieser kommuniziert werden
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
RRV	Ross-River-Virus
RSE	sich wiederholende Sequenzelemente in der 3' UTR Region (repeated sequence elements)
RT-PCR /RT-qPCR	Real-Time Reverse Transkriptase- Polymerase Kettenreaktion (Real-Time Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction)
s.l.	sensu lato (im weiteren Sinne)
SGEB	Speicheldrüsenentweichungsbarriere
SGIB	Speicheldrüseninfektionsbarriere
SINV	Sindbis-Virus
spp.	species pluralis
TAHV	Tahyna-Virus
USUV	Usutu-Virus
WA	westafrikanische Genotyp der CHIKV
WNF	West-Nil-Fieber
WNND	West-Nil-Erkrankung (West-Nil-Neuroinvasive-Disease)
WNV	West-Nil-Virus
z.B.	zum Beispiel



## 1 Einleitung

Stechmücken-übertragene Viruserkrankungen spielen weltweit eine große Rolle bei Mensch und Tier. Durch den internationalen Handel und die Klimaveränderungen gewinnen sie zunehmend an Bedeutung.

Das Chikungunya-Virus (CHIKV) ist ein Arthropoden übertragenes Virus aus dem Genus *Alphavirus* der Familie *Togaviridae*, das durch Stechmücken der Gattung *Aedes* übertragen wird. Die Hauptvektoren sind *Aedes aegypti* (*Ae. aegypti*) und *Ae. albopictus*.

Dieses Virus stellt ein klassisches Beispiel für ein vernachlässigtes Virus dar, welches auf einmal große Bedeutung erlangt hat. So brach eine CHIKV Epidemie mit fast 250.000 Betroffenen auf der Insel La Réunion im Jahr 2005 aus, bei der *Ae. albopictus* als Hauptvektor fungierte. Einer der Gründe dafür war eine einzige Mutation im Hüllprotein-Gen E1 (E1-A226V), die dazu führte, dass sich CHIKV wesentlich effizienter in *Ae. albopictus* Stechmücken vermehren kann. *Ae. albopictus* ist global weit verbreitet und hat die Tendenz sich auch in den gemäßigten Breiten zu etablieren. Seit 2005 hat dieses CHIKV (E1-A226V) so weltweit schon viele Millionen Menschen infiziert und es wurden CHIKV Ausbrüche auch in gemäßigten Klimazonen gemeldet. So kam es im Jahr 2007 zu einem lokalen CHIKV Ausbruch mit CHIKV (E1-A226V) in der Provinz Ravenna in Italien. Im Jahr 2017 wurde über einen autochthonen Ausbruch des CHIKV (E1-A226V) in Südostfrankreich berichtet. Bei beiden erwähnten CHIKV Ausbrüchen in den gemäßigten Klimazonen fungierte *Ae. albopictus* als Hauptvektor. Über die Überwinterung der *Ae. albopictus* in Deutschland wurde bereits im Jahr 2016 berichtet.

Konsequenterweise ergab sich daraufhin die Frage, ob auch andere Stechmückenarten neben *Ae. albopictus* in den gemäßigten Klimazonen als CHIKV-Vektoren fungieren können. Daher war es das Ziel dieser Arbeit, die Vektorkompetenz von zwei, auch in Deutschland häufig vorkommenden Stechmückenarten, zu untersuchen: *Aedes vexans* (*Ae. vexans*), einem Vertreter der gleichen Gattung wie die Hauptvektoren für CHIKV *Ae. aegypti* und *Ae. albopictus*, und *Culex pipiens molestus* (*Cx. pipiens*) – die sogenannte Hausschnake, die nicht zur gleichen Gattung gehört.

Nachdem einige Studien gezeigt haben, dass die repetitiven 3' UTR-Sequenzen im CHIKV-Genom die Virusübertragung beeinflussen, haben wir zusätzlich entsprechende Versuche mit einem CHIKV mit einer Deletion in diesem Bereich im Vergleich mit CHIKV (E1-A226V) durchgeführt.

## **2 Literaturübersicht**

### **2.1 Alphaviren**

#### **2.1.1 Klassifikation**

Das Genus *Alphavirus* (Familie *Togaviridae*) umfasst mehr als 30 Viren und enthält wichtige Krankheitserreger, welche vor allem durch Stechmücken auf eine große Auswahl von empfänglichen Vertebraten übertragen werden (Azar et al. 2020, Chen et al. 2018).

Alphaviren vermehren sich in vertebraten und in arthropoden Wirten, so dass Letztere als biologische Vektoren für die Viren dienen. In Arthropoden wird eine lebenslange persistente Infektion verursacht mit nur minimalen Effekten auf die biologischen Funktionen (Jose et al. 2009). Andererseits kommt es bei vertebraten Wirten zu einer akuten, meist nicht lang andauernden Infektion. Dies lässt sich auch bei einer Infektion in einer Zellkultur mit vertebraten Zellen und Insektenzellen beobachten: es kommt zu einer persistierenden Infektion mit Überleben der Stechmückenzellen und zu einer Infektion mit Zytolyse und Untergang der vertebraten Zellen (Strauss & Strauss 1994).

Neben der Aufteilung in acht antigene Komplexe, lassen sich die Alphaviren geografisch in zwei große Gruppen einordnen. Die Vertreter der Alphaviren der Neuen Welt sind Eastern-/Western-/Venezuelan-Equine-Encephalitis-Virus, Una- und Mayaro-Viren. Diese sind vor allem als Verursacher von Enzephalitiden bekannt (Azar et al. 2020). Die zweite Gruppe umfasst die Alphaviren der Alten Welt, welche ursprünglich in Afrika, Asien und Europa aufgetreten sind und bei Mensch und Tier Fieberzustände, Hautausschläge und Arthritiden hervorrufen können, darunter Sindbis-Virus (SINV), Chikungunya-Virus (CHIKV), Ross-River-Virus (RRV) und O’Nyong-Nyong-Virus (ONNV) (Azar et al. 2020).

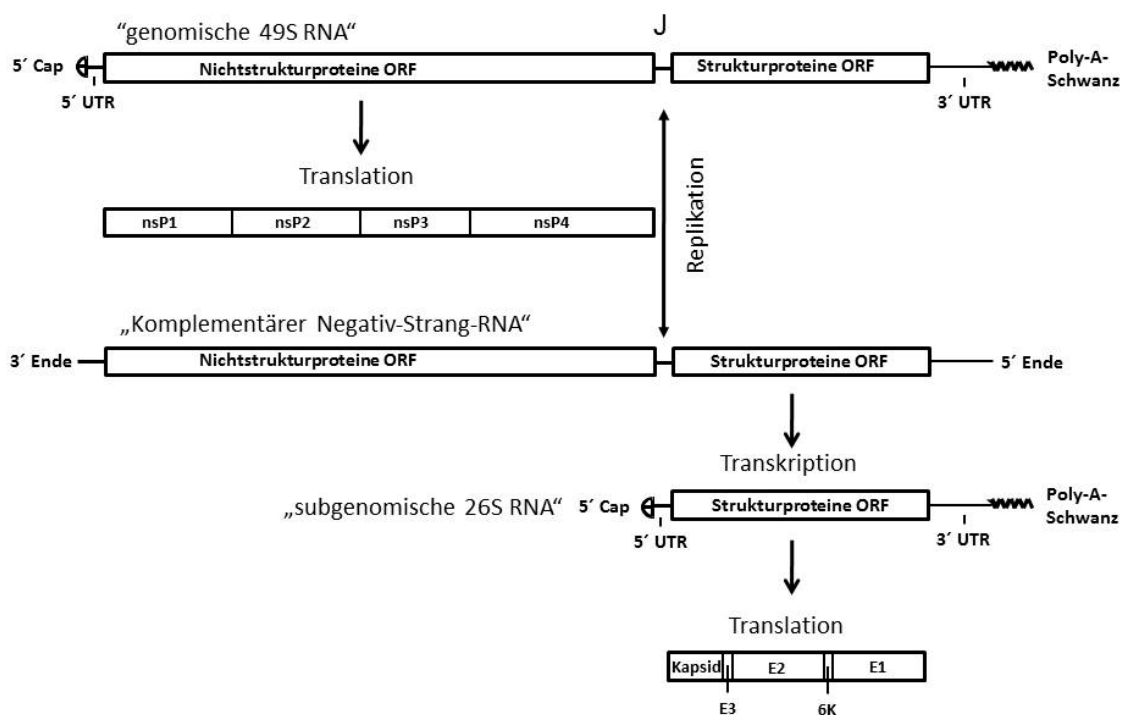
#### **2.1.2 Virusmorphologie und Genomaufbau**

Alphaviren gehören zu den behüllten RNA-Viren. Das sphärische Virion ist ca. 70 nm groß und setzt sich aus einem 40 nm großen ikosaedrischen Nukleokapsid und einer Lipid-Doppelschichthülle zusammen, in der die Glykoproteine E1 und E2 verankert sind. Die Hüllproteine E1 und E2 liegen als Heterodimere vor und werden weiter zu trimeren Komplexen (Spikes) zusammengelagert (Maclachlan & Dubovi 2017). Das Nukleokapsid besteht aus einer einzelsträngigen RNA mit positiver Polarität, welche von innen am Kapsidprotein (C) angelagert ist.

Das fast 12 Kilobasen große RNA-Genom besitzt eine Nukleotidkappe („cap“) am 5' Ende und einen Poly-(A)-Schwanz am 3' Ende (Abbildung 1) (Maclachlan & Dubovi 2017).

Das 5' UTR-Ende der Alphaviren verfügt über cis-wirksame Elemente. Diese sind an der Regulierung der Negativ- und Positiv-Strang-RNA-Synthese beteiligt (Frolov et al. 2001). Das 3' UTR-Ende ist durch ein konserviertes Sequenzelement gekennzeichnet, das sich vor dem Poly-(A)-Schwanz befindet und durch diverse Wiederholungssequenzelemente (RSE) gekennzeichnet ist (Ou et al. 1982, Pfeffer et al. 1998, Chen et al. 2013).

Das Genom verfügt über zwei offene Leserahmen (ORF). Der 5'-gelegene Leserahmen entspricht zwei Dritteln des Genoms und kodiert die Nichtstrukturproteine nsP1 bis nsP4. Der 3'-gelegene Leserahmen entspricht der subgenomischen 26S RNA und kodiert die Strukturproteine C, E1, E2 und zwei Spaltprodukte 6K und E3 (Maclachlan & Dubovi 2017).



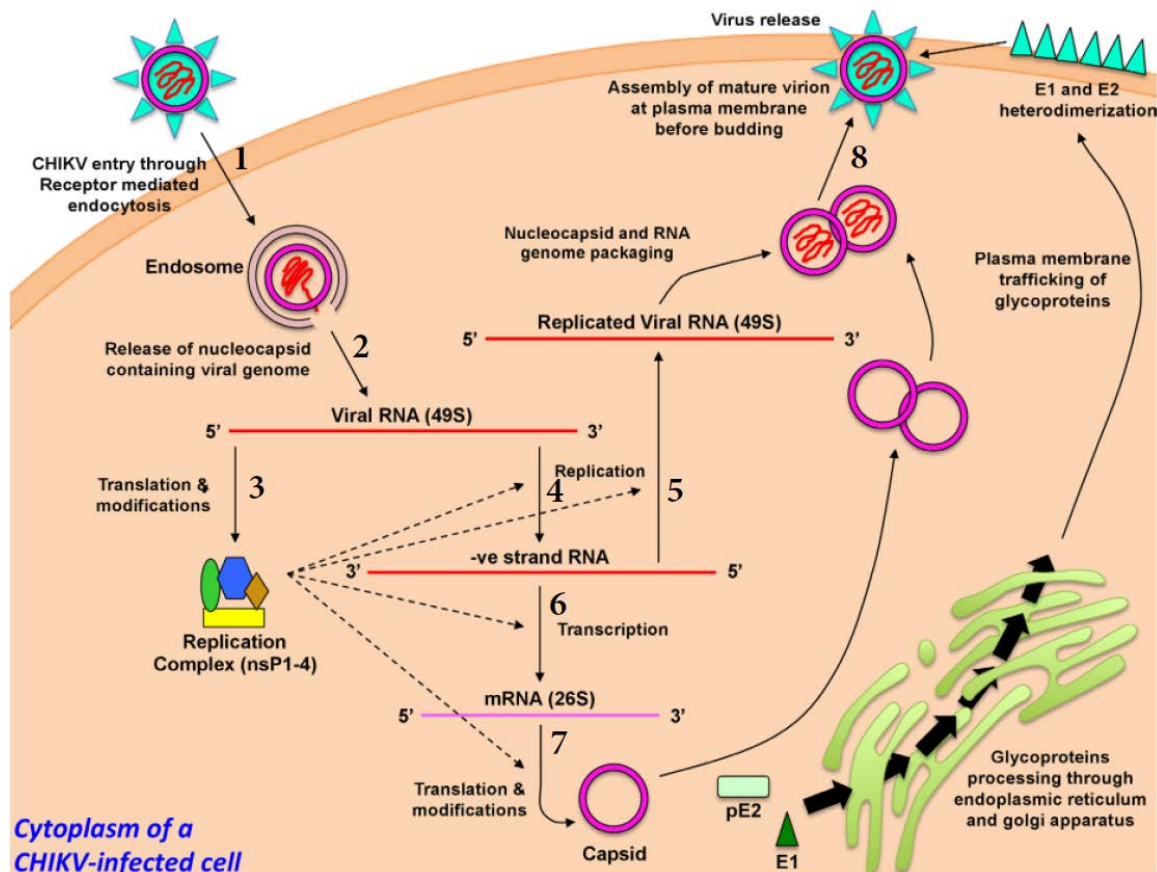
**Abb. 1: Alphavirus Genom**

Das knapp 12 Kilobasen große, einzelsträngige RNA-Genom mit positiver Polarität ist am 5' Ende gekappt und besitzt am 3' Ende einen Poly-(A)-Schwanz. Das Genom hat zwei offene Leserahmen, die durch eine untranslatierte Junction-Region (J) voneinander getrennt sind. Der 5'-gelegene ORF kodiert für die Nichtstrukturproteine nsP1- nsP4. Der 3'-gelegene ORF entspricht der subgenomischen 26S RNA, diese wird von einer negativsträngigen RNA-Zwischenstufe transkribiert und dient als mRNA für die Synthese der viralen Strukturproteine C, E1, E2, 6K und E3.

### 2.1.3 Virusreplikation

Der rezeptorvermittelten Endozytose des Virions und Fusion mit der endosomalen Membran folgt die Freisetzung des Nukleokapsids in das Zytoplasma (Abbildung 2) (Voikov et al. 2015, Lum & Ng 2015). Die virale RNA dockt an den Ribosomen an und zunächst wird lediglich vom ersten ORF das P1234 - Polyprotein oder ein P123 - und P1234 - Polyprotein translatiert (Jose et al. 2009, Voikov et al. 2015, Modrow et al. 2010). Der Unterschied hängt davon ab, ob ein starkes oder schwaches Stoppcodon zwischen nsP3 und nsP4 ein „Durchlesen“ teilweise begünstigt (Li & Rice 1993). Diese Polyproteine werden posttranslational weiter in die Nichtstrukturproteine nsP1, nsP2, nsP3 und nsP4 gespalten (Voikov et al. 2015). Die neu gebildeten Nichtstrukturproteine haben spezifische Funktionen. Das nsP1 ist eine Methyl- und Guanosyltransferase, die beim Methylieren der 5' „cap“ - Strukturen beteiligt ist (Modrow et al. 2010). Das nsP2 besitzt die Aktivität einer RNA-Helikase im aminoterminalen Segment und die proteolytische Aktivität im carboxyterminalen Segment, damit ist das nsP2-Protein entsprechend für die Transkription, Replikation des Genoms und Spaltung des Vorläufer Polyproteins verantwortlich (Modrow et al. 2010). Das nsP3 wirkt bei der Synthese der Negativ-Strang-RNA und subgenomischer RNA (Voikov et al. 2015). Das Nichtstrukturprotein nsP4 besitzt RNA-Polymerase-Aktivität und ist bei der Bildung des negativen RNA-Strangs sowie Bildung der subgenomischen RNA aktiv (Modrow et al. 2010).

Die früh in der zellulären Infektion gebildeten Nichtstrukturproteine replizieren die genomische 49S RNA, so dass eine komplementäre Negativ-Strang-RNA entsteht. Diese dient als Template für die Produktion der positivsträngigen genomischen 49S RNA und für die Transkription einer subgenomischen positivsträngigen mRNA, der so genannten subgenomischen 26S RNA. Von dieser werden die Strukturproteine translatiert, als ein Polyprotein synthetisiert und dann in die Proteine C, E1, E2, 6K und E3 gespalten. Die neugebildeten Viren werden durch Knospung aus der Wirtszelle ausgeschleust (Strauss & Strauss 1994).



**Abb. 2: Entwicklungszyklus und Strategie des CHIKV-Genoms** (Zyklusphasen beziffert, aus Lum & Ng 2015)

1. Rezeptorvermittelte Endozytose des CHIKV-Virion in einer Zelle
2. Fusion mit Endosommembran und Freisetzung des Nukleokapsid mit 49S RNA ins Zytoplasma
3. Translation und Synthese der nicht Struktur Proteine nsP1 bis nsP4
4. Replikation der 49S RNA mit Entstehung des negativen RNA-Strangs
5. Replikation und Entstehung der 49S viral RNA vom negativen RNA-Strang
6. Transkription und Entstehung subgenomischer 26S RNA vom negativen RNA-Strang
7. Translation und Synthese eines Polyproteins mit folgender Spaltung in Proteine C, E1, E2, 6K und E3
8. Zusammensetzung des Nukleokapsid und Freisetzung des Virions durch Knospung

## 2.2 Chikungunya-Virus

### 2.2.1 Übertragungszyklus

Der Begriff Chikungunya kommt aus dem afrikanischem Makonde, einer weit verbreiteten Bantusprache und besagt „der gebeugt geht“ (Pialoux et al. 2007).

Chikungunya-Virus (CHIKV) ist ein Arbovirus, das durch Stechmücken auf Vertebraten übertragen wird. CHIKV ist in den tropischen und subtropischen Regionen Afrikas, sowie in Südostasien endemisch (Tsetsarkin et al. 2011). In Afrika

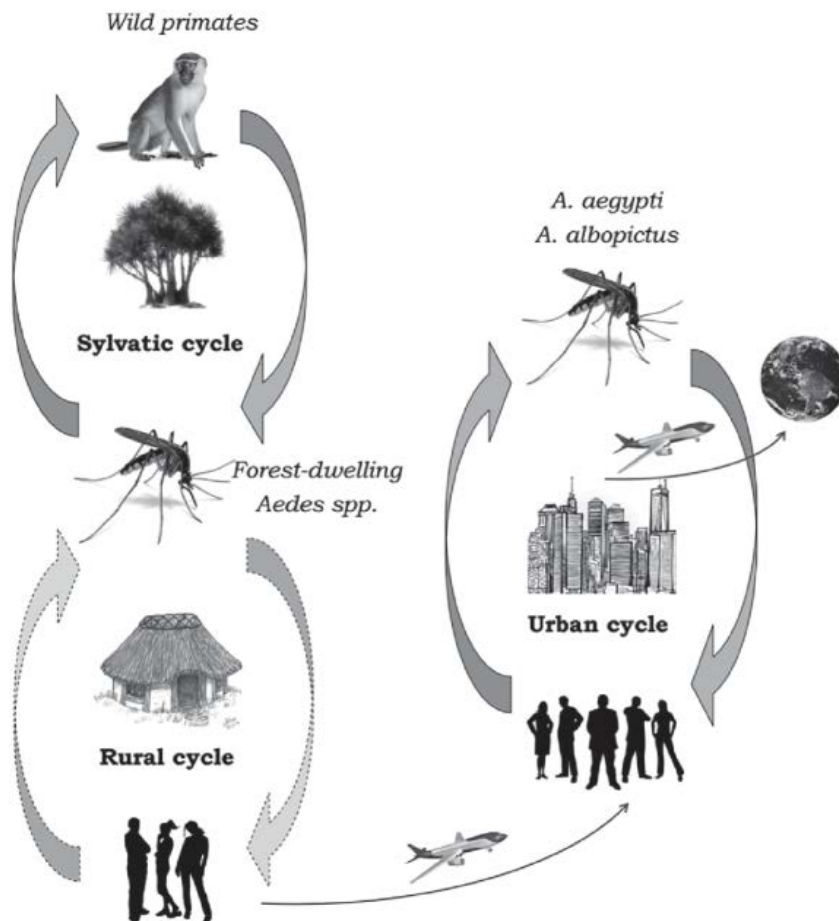
wird das CHIKV meist in einem **sylvatischen Zyklus** zwischen wilden Primaten und im Wald lebenden *Aedes* Stechmücken unterhalten (Abbildung 3) (McIntosh et al. 1964, McIntosh et al. 1977). Als Hauptreservoir für CHIKV in Afrika werden Primaten, unter anderen Grüne Meerkatzen (*Cercopithecus aethiops*) und Bärenpaviane (*Papio ursinus*) angenommen (McIntosh et al. 1964, McIntosh et al. 1977, Jupp & McIntosh 1990, Diallo et al. 1999, Eastwood et al. 2017). Als Vektoren in einem sylvatischen Übertragungszyklus fungieren vor allem Stechmücken aus dem Gattung *Aedes*. In Südafrika sind es vor allem *Ae. furcifer* und *Ae. cordellieri* (Jupp & Kemp 1996, McIntosh et al. 1977) und in Westafrika *Ae. furcifer*, *Ae. luteocephalus* sowie *Ae. taylori* (Diallo et al. 1999). In Zentralafrika fungieren vor allem *Ae. africanus* Stechmücken als CHIKV Hauptvektoren (Dobler & Knobloch 2010).

In ländlichen Gebieten können die Stechmücken durch die räumliche Nähe sowohl Primaten als auch Menschen infizieren, was als **ländlicher** oder **ruraler Übertragungszyklus** bezeichnet wird. Diese endemischen CHIKV-Infektionen verlaufen meist in isolierten Populationen (dörflichen Strukturen) und in Form von kleinen Ausbrüchen (McIntosh et al. 1977, Kumar et al. 2020).

Jedoch hat sich die epidemiologische Situation von CHIKV in Afrika in den letzten Jahrzehnten aufgrund der Expansion von *Ae. aegypti* und *Ae. albopictus* sowie zunehmender Urbanisierung verändert, was in größeren Ausbrüchen resultierte (Horwood & Buchy 2015). So unter anderem die CHIKV Ausbrüche in Gabun im Jahr 2007 und im Kongo im Jahr 2011 (Leroy et al. 2009, Kelvin 2011).

In asiatischen Regionen hingegen zirkuliert CHIKV in einem **urbanem Übertragungszyklus** Mensch-Stechmücke-Mensch. Aufgrund der hohen CHIKV-Virämie in infizierten Individuen verläuft dieser Übertragungszyklus ohne die Notwendigkeit für einen tierischen Reservoirwirt (Go et al. 2014). Als Vektoren fungieren hier somit anthropophile *Ae. aegypti* und *Ae. albopictus* Stechmücken (Das et al. 2012, Ng et al. 2009, Thavara et al. 2009). In der Konsequenz kommt es in Asien unter für die Stechmücken günstigen Bedingungen daher zu größeren Ausbrüchen innerhalb der Städte.





**Abb. 3: CHIKV Übertragungszyklus** (nach Runowska et al. 2018)

Afrikanischer **sylvatischer Zyklus** zwischen Primaten, Fledermäuse, Nagetiere, anderen Vertebraten und Waldstechmücken der Gattung *Aedes* als Vektoren. Unter anderem sind es primatophile Waldstechmücken: *Ae. furcifer* und *Ae. cordellieri* in Südafrika, *Ae. furcifer*, *Ae. luteocephalus* und *Ae. taylori* in Westafrika und *Ae. africanus* in Zentralafrika. In ländlichen Gebieten können Stechmücken sowohl Primaten als auch Menschen infizieren, was man als einen **ländlichen (ruralen) Übertragungszyklus** bezeichnet. Ein **urbaner Übertragungszyklus** Mensch-Stechmücke-Mensch findet vor allem in asiatischen Regionen statt, aber durch die Ausbreitung von anthropophilen Stechmücken-Vektoren und zunehmender Urbanisierung tritt er vermehrt auch in Afrika auf. Als Vektoren fungieren hier die anthropophilen *Ae. aegypti* und *Ae. albopictus* Stechmücken.

## 2.2.2 Epidemiologie

Die erste Isolierung des CHIKV erfolgte im Jahr 1953 nach der Newala CHIKV Epidemie in den Jahren 1952-1953 in Tanganyika, im heutigen Tansania (Ross 1956). Seit der ersten Beschreibung der CHIKV-Infektion waren die Ausbrüche regional und meist auf Asien und Afrika begrenzt (Rougeron et al. 2015).

CHIKV kam in den Jahren 1999-2000 erneut in den Fokus, durch eine urbane Epidemie in Kinshasa, der Hauptstadt der Demokratischen Republik Kongo, mit etwa 50.000 infizierten Menschen (Pastorino et al. 2004). Im Jahr 2004 folgte ein

CHIKV Ausbruch auf der Insel Lamu in Kenia. Es waren mit etwa 13.500 Infizierten knapp 75 % der Inselbevölkerung betroffen (Sergon et al. 2008).

Im Jahr 2005 hat sich das aus Kenia stammende CHIKV auf die Inseln im Indischen Ozean und nach Indien ausgebreitet (Abbildung 4) (Njenga et al. 2008).

Im Jahr 2005 brach eine CHIKV Epidemie auf den Komoren aus und danach folgte ein Ausbruch auf La Réunion, bei denen jeweils etwa 215.000 bzw. 244.000 Menschen infiziert wurden (Sergon et al. 2007, Renault et al. 2007). Die Epidemie auf La Réunion ist besonders bemerkenswert, da es der erste dokumentierte Bericht über einen CHIKV Ausbruch war, bei dem *Ae. albopictus* als Hauptvektor in Afrika fungierte. Untersuchungen zeigten, dass eine adaptive Alanin zu Valin-Mutation an der Position 226 des Hüllenproteins E1 (E1-A226V) des CHIKV für das Ausmaß dieses Seuchengeschehens verantwortlich war.

Durch diese Mutation replizierte sich CHIKV schneller und zu höheren Virustitern in *Ae. albopictus* Stechmücken, zudem wurde eine erhöhte Übertragungseffizienz des CHIKV (E1-A226V) durch diese Stechmücken auf Vertebraten beobachtet (Tsetsarkin et al. 2007, Vazeille et al. 2007).

Seit Januar 2006 wurden weitere CHIKV Epidemien in der Region des Indischen Ozeans auf den Seychellen, Mayotte und Mauritius gemeldet (Ligon 2006, Chastel 2005).

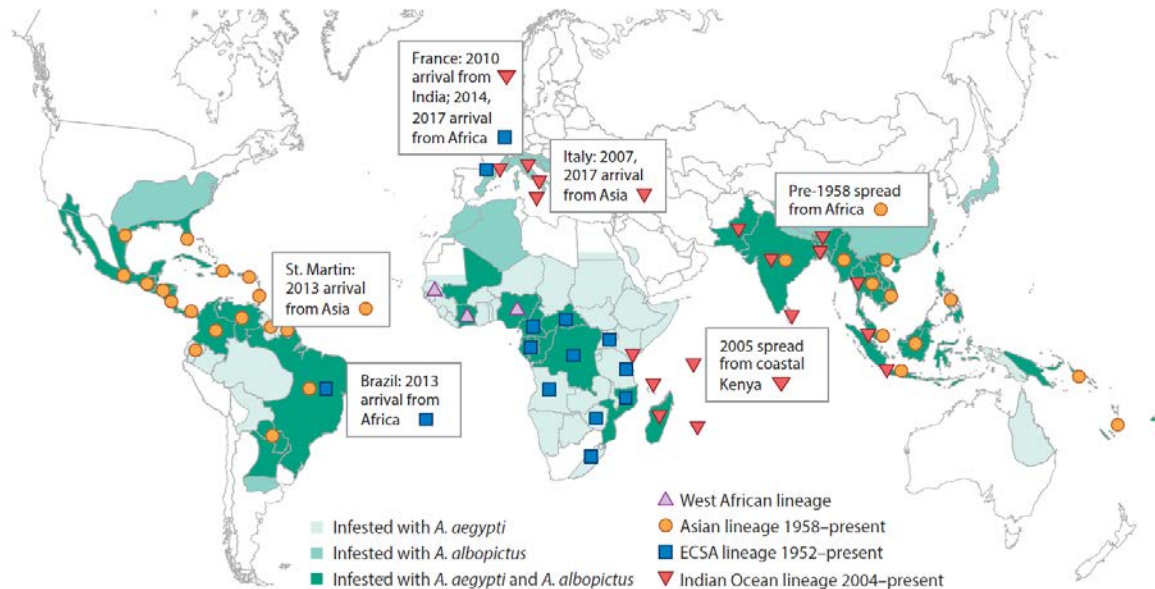
Phylogenetische Analysen von partiellen Glykoprotein-E1-Sequenzen zeigten, dass der CHIKV-Ausbruchsstamm mit den Isolaten East, Central, and South African Genotyp (ECSA) verwandt ist und dass der Ausbruch auf den Inseln des Indischen Ozeans La Réunion, Seychellen, Mayotte, Madagaskar und Mauritius durch denselben Stamm verursacht wurde (Schuffenecker et al. 2006).

Weiterhin kursierte in den Jahren 2005 bis 2006 das Chikungunya-Virus des afrikanischen Genotyps (ECSA) in Indien und verursachte in diesem Zeitraum 1,3 Millionen Infektionen in 13 Bundesstaaten (Lahariya & Pradhan 2006, Kumar & Gopal 2010, Arankalle et al. 2007).

Weitere Berichte über CHIKV Ausbrüche kamen im Jahr 2007 aus Europa. Die Infektionen mit der CHIKV (E1-A226V) Variante und Beteiligung der *Ae. albopictus* als Vektor traten in der Provinz Ravenna, Italien, auf. Das war der erste Bericht mit einer lokalen Übertragung der CHIKV-Infektion in einer gemäßigten Klimazone (Rezza et al. 2007).

Auch bei einem autochthonen Ausbruch in Südostfrankreich im Jahr 2017 war es die CHIKV (E1-A226V) Variante (Calba et al. 2017).

Ende 2013 kursierte der asiatische Genotyp des CHIKV in der Karibik, Süd-, Mittel- und Nordamerika, wo die Übertragung durch *Ae. aegypti* erfolgte (Lanciotti & Valadere 2014, Leparc-Goffart et al. 2014). Bis Ende 2017 wurden etwa 2,5 Millionen CHIKV Fälle in der Neuen Welt gemeldet (PAHO, 2018)



**Abb. 4: Geografische Ausbreitung von CHIKV-Genotypen von 2005 bis 2017 (nach Weaver et al. 2020)**

### 2.2.3 Genotypen und die 3' UTR Region

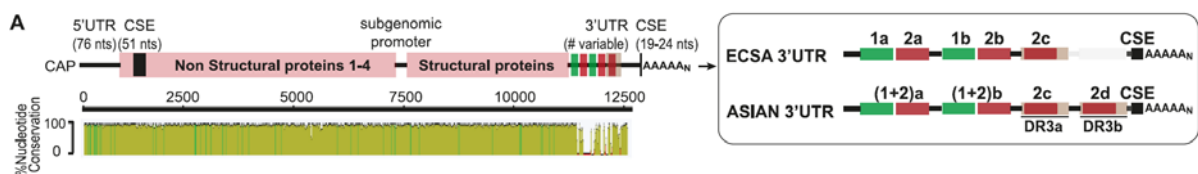
Nach umfangreichen phylogenetischen Analysen auf Basis von Gesamtgenomsequenzen wird CHIKV in drei Genotypen eingeteilt: die East, Central, South African- (ECSA), Westafrikan- (WA) und Asian-Genotypen. Diese Untersuchungen deuten auf einen Ursprung in Afrika und einen gemeinsamen Vorfahren hin, der vor ca. 500 Jahren existierte (Volk et al. 2010, Powers et al. 2000). Aus diesem entstanden die zwei afrikanischen CHIKV-Genotypen, nämlich WA und ECSA. Der Asiatische Genotyp entstand in den letzten 150 Jahren als Abkömmling des ECSA-Genotyps (Volk et al. 2010).

Bei der Sequenzierung von 40 verschiedenen CHIKV-Genomen wurde auch eine Variabilität in der Genomlänge festgestellt. Die kürzeste Genomlänge mit 11.557 nts bis 11.789 nts weist das CHIKV-Genom vom ECSA-Genotyp auf, gefolgt vom WA-Genotyp mit 11.843 nts bis 11.881 nts und schließlich dem Asiatischen Genotyp mit 11.777 nts bis 11.999 nts. Diese Nukleotiddifferenzen und Längenunterschiede wurden vor allem in der 3' UTR beschrieben (Volk et al. 2010, Pfeffer et al. 1998).

Viele Studien wurden durchgeführt, um Punktmutationen in den kodierenden Abschnitten des CHIKV-Genoms eine Bedeutung beizumessen, aber nur wenige Studien betrachten den Einfluss der nichtkodierenden Regionen auf phänotypische Eigenschaften des Virus (Chen et al. 2013).

Die 3' UTR ist gekennzeichnet durch eine Reihe von sich wiederholenden Sequenzelementen (repeated sequence elements, RSE, oder direct repeats, DR) und einem konservierten Sequenzelement (CSE), direkt vor dem Poly-(A)-Schwanz (Ou et al. 1982, Pfeffer et al. 1998, Chen et al. 2013).

Die Anzahl und Anordnungen der direkten Wiederholungssequenzen – direct repeats (DR 1, 2 und 3) in 3' UTR, unterscheidet sich zwischen den CHIKV-Genotypen (Abbildung 5) (Chen et al. 2013, Hyde et al. 2015).



**Abb. 5: Organisation der 3'UTR der ECSA- und der asiatischen CHIKV-Isolaten** (nach Filomatori et al. 2019)

Schematische Übersicht über das komplette CHIKV-Genom (oben links), Nukleotid-Konservierungsplot (unten) und CHIKV 3' UTR der ECSA- und asiatischen Genotypen (rechts). Der schwarze Block entspricht dem konservierten Sequenzelement (CSE) und als farbige Blöcke sind direkte Wiederholungen (DRs) dargestellt.

Die 3' UTR der ECSA- sowie WA-Genotypen beinhalten jeweils zwei DR Elemente, nämlich zwei Kopien von DR1 und drei Kopien DR2 (Chen et al. 2013). Die Vertreter des asiatischen Genotyps haben im Vergleich zu den anderen Genotypen eine längere 3' UTR. Diese enthält Insertionen und Punktmutationen um DR1 und DR2, die als DR(1+2)a und DR(1+2)b bezeichnet werden, sowie die Duplizierung der DR3-Region (Filomatori et al. 2019).

Diese auf den ersten Blick redundanten Sequenzen müssen eine vorteilhafte Rolle spielen, um von der natürlichen Selektion begünstigt zu sein, da sich sonst ein längeres Genom weniger effektiv im Vergleich zu einem Kürzeren replizieren würde (Chen et al. 2013). Ein erweitertes Verständnis der treibenden Faktoren der Evolution der arboviralen 3' UTR ist notwendig, um wichtige Erkenntnisse über ihre Funktion zu gewinnen (Chen et al. 2013).

Derzeit wird die Ausbildung der verschiedenen 3' UTR als ein evolutionärer Prozess verstanden, der durch einen entgegengesetzten Selektionsdruck in Stechmücken- und Säugetierzellen während der Virusübertragung geprägt ist (Filomatori et al. 2019).

Einer der Ansätze zur Erforschung der Funktion von DRs ist die gerichtete Deletion von ausgewählten Elementen der 3' UTR mit anschließender Analyse der Replikationsfähigkeit der entsprechenden CHIKV-Mutante *in vivo* und *in vitro*.

So hat die Deletion verschiedener DRs in zwei CHIKV-Isolaten, nämlich dem asiatischen und dem ECSA-Genotyp, keinen Effekt auf die Virusreplikation in Säugertierzellen BHK (BHK-21, *Mesocricetus auratus hamster kidney*, ATCC, CCL-10) (Filomatori et al. 2019). Im Gegensatz dazu zeigen die Ergebnisse von Deletions-Analysen in Stechmückenzellen C6/36 (*Ae. albopictus*, ATCC, CRL-1660) eine positive Korrelation zwischen der DR-Kopienzahl und den Replikationsraten in Stechmückenzellen (Filomatori et al. 2019). Interessant ist auch, dass DR(1+2)-Kopien die Deletion von DR3 nicht kompensieren, was auf eine unterschiedliche Funktionalität dieser DR-Elemente hinweist (Filomatori et al. 2019).

In einer weiteren Untersuchung bewirkte die Deletion von manchen DR Elementen in der 3' UTR der karibischen Isolate eine verringerte Replikation in Stechmückenzellen und eine verzögerte Replikation in *Ae. aegypti* und *Ae. albopictus* Stechmücken, was zu einer verlängerten extrinsischen Inkubationsperiode führte (Merwaiss et al. 2021).

Die extrinsische Inkubationsperiode (EIP) ist eine der Kennzahlen, um die Interaktion zwischen Viren und ihren Vektoren zu charakterisieren (Filomatori et al. 2021). Die EIP definiert die virale Inkubationsdauer zwischen dem Moment, in dem eine Mücke eine virushaltige Blutmahlzeit aufnimmt, und dem Moment, in dem die Stechmücke ansteckend wird. Die EIP ist vor allem davon abhängig, wie gut und wie schnell das Virus die Gewebebarrieren innerhalb der Stechmücke überwinden kann. Es korreliert negativ mit der Umgebungstemperatur. Der Mitteldarm und die Speicheldrüsen sind die wichtigsten Gewebebarrieren für die Vektorkompetenz (Filomatori et al. 2021). Auf der einen Seite beeinflusst die Mitteldarm-Infektionsbarriere (MIB), ob ein Virus in die Mitteldarmzellen eindringen und diese infizieren kann und andererseits kontrolliert die Mitteldarm-Entweichungsbarriere (MEB) die Fähigkeit des Virus, aus den Mitteldarmzellen zu entweichen und eine weitere Infektion der sekundären Gewebe einer Stechmücke zu ermöglichen (Filomatori et al. 2021). Ähnlich funktionieren auch Speicheldrüseninfektions- und

Entweichungsbarrieren (SGIB und SGEB), die von einem Virus erst zu überwinden sind, um bei der nächsten Blutmahlzeit mit dem Speichel übertragen zu werden (Filomatori et al. 2021).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass CHIKV-Populationen während der Adaptation an die Wirtszelle einer progressiven Selektion unterworfen sind.

Da sich wiederholende Sequenzen keinen Vorteil für die virale Replikation in Säugetierzellen darstellen, wird die Selektion von Viren, die DR-Kopien verlieren, offensichtlich begünstigt. Andererseits verbessert die Duplikation von DRs die Replikation in Stechmücken-Zellen und somit gibt es einen positiven Selektionsdruck auf die DRs, der die verminderte Häufigkeit von Deletionsvarianten in diesem Wirt erklärt (Filomatori et al. 2019).

Es sind weitere Untersuchungen erforderlich, um zu erforschen, wie DR-Kopien die Fähigkeit der Viren beeinflussen, die anatomischen Stechmückenbarrieren zu überschreiten und den Speichel zu erreichen, um eine effektive Übertragung auf den Säugetierwirt zu gewährleisten (Filomatori et al. 2021). Diese Mechanismen zu verstehen ist essentiell, um nachvollziehen zu können, wie sich das Spektrum an Stechmücken verändert, die kompetent sind CHIKV zu übertragen.

#### **2.2.4 Chikungunya-Fieber**

Das Chikungunya-Fieber (CHIKF) ist die Erkrankung, welche durch das CHIKV verursacht wird. Die Besonderheit des Chikungunya-Virus im Vergleich zu vielen anderen Arboviren besteht darin, dass die verursachende Erkrankung bei bis zu 80 % der infizierten Personen symptomatisch verläuft (Erasmus et al. 2016, Simon et al. 2015, Kumar et al. 2020).

Das Chikungunya-Fieber wird in drei klinische Phasen eingeteilt: die Akutphase (bis zum Tag 21 nach Auftreten der klinischen Symptome), die Postakutphase (ab Tag 21 bis zum Ende des dritten Monats) und die chronische Phase (vom vierten Monat der klinischen Symptomatik) (Simon et al. 2015, Kumar et al. 2020).

Auf die Infektion mit CHIKV durch die infizierte Stechmücke folgt eine Inkubationsphase, die durchschnittlich vier bis sieben Tage dauert. Diese Zeitspanne kann jedoch zwischen einem und zwölf Tagen variieren (Simon et al. 2015). Danach treten schlagartig folgende klinische Symptome auf: hohes Fieber, Kopfschmerzen, Rückenschmerzen, Myalgien, Hautausschlag und ausgeprägte, zumeist bilaterale und symmetrische Arthralgien. Es werden vor allem die Extremitäten betroffen,

Knöchel, Handgelenke und Fingergelenke (Lam et al. 2001, Kelvin 2011, Silva & Dermody 2017, Simon et al. 2015, Pfeffer et al. 2008).

Das CHIKF ist meist eine selbstlimitierende Erkrankung und die akuten Symptome klingen innerhalb von zwei Wochen ab (Kumar et al. 2020). Jedoch haben mehr als die Hälfte der infizierten Individuen persistierende Gelenkbeschwerden, die Monate bis Jahre lang nach der Infektion anhalten können (Simon et al. 2015, Kumar et al. 2020).

Nach fünf bis sieben Tagen wird im Serum eine sehr hohe Virämie beobachtet (bis zu  $10^{10}$  RNA-Kopien/ml), die auf die Replikation des Virus in peripheren Geweben zurückzuführen ist (Panning et al. 2008). Während dieser Zeit können kompetente Stechmückenarten die Krankheit weiter übertragen (Simon et al. 2015, Silva & Dermody 2017).

Es gibt derzeit noch keinen zugelassenen Impfstoff und wenn die Krankheit auftritt, wird hauptsächlich eine symptomatische Therapie angewandt (Simon et al. 2015).

Die atypischen Symptome bei einer CHIKV-Infektion, wie z. B. Blutungen, Hepatitis, Myokarditis und neurologische Symptome wurden ebenfalls beschrieben und können selten bei gefährdeten Gruppen, einschließlich Neugeborenen, älteren Personen und Menschen mit Vorerkrankungen auftreten (Silva & Dermody 2017, Simon et al. 2015).

## **2.3 Stechmücken**

### **2.3.1 Taxonomie und Stechmückenarten in Deutschland**

Stechmücken gehören zur Ordnung Diptera (Zweiflügler) der Familie Culicidae (Becker et al. 2010, Harbach 2008).

Mit mehr als 3500 Arten ist es die größte Gruppe der blutsaugenden Insekten, von denen viele Arten eine medizinische Bedeutung als Überträger von Pathogenen haben (Becker et al. 2014, Harbach 2008).

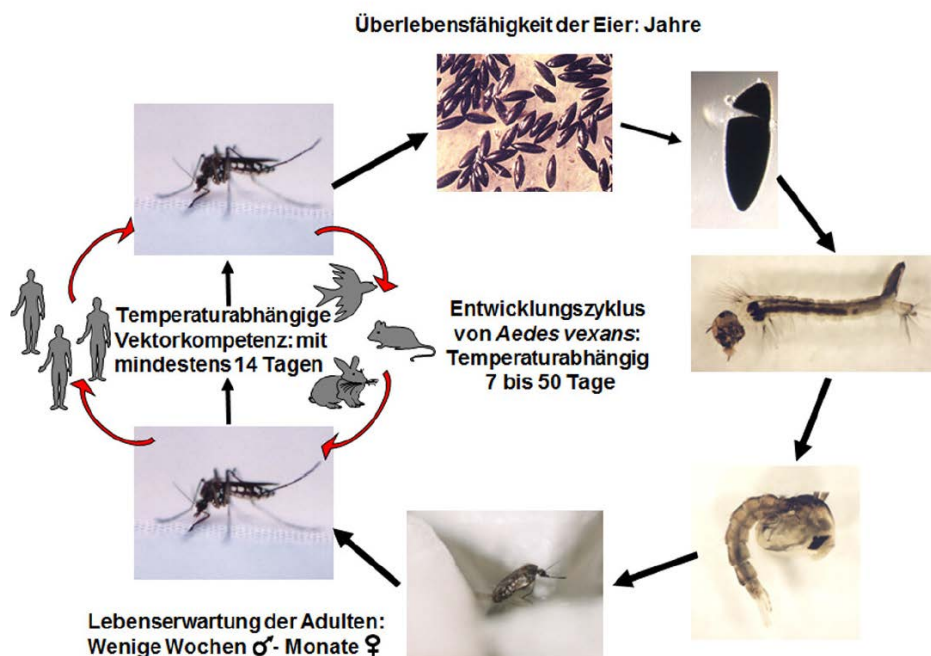
Die Familie Culicidae beinhaltet zwei Unterfamilien, die Subfamilie Anophelinae (auch Fiebermücken benannt) mit acht bekannten Arten in Deutschland und die Subfamilie Culicinae mit einer Vielzahl von Arten, die auch in Deutschland vorkommen: fast 30 *Ochlerotatus* – und *Aedes*-Arten (werden auch als Wiesen und Waldmücken benannt), sechs Arten der Gattung *Culex*, acht *Culiseta*-Arten und jeweils eine Art von *Coquillettidia* und *Uranotaenia* (Becker et al. 2014, Werner et al. 2020, Harbach 2008). Bisher sind in Deutschland mehr als 50 Stechmückenarten



nachgewiesen (Werner et al. 2020). Unter diesen sind fünf neue exotische Spezies zu erwähnen, die bereits als etablierte Stechmückenarten in Deutschland gelten, das sind *Culiseta longiareolata*, *An. petragrani*, *Ae. albopictus*, *Ae. japonicus* und *Ae. koreicus* (Werner et al. 2020). Aus medizinischer Sicht sind vor allem die asiatische Tigermücke (*Ae. albopictus*), die Japanische Buschmücke (*Ae. japonicus*) und *Ae. koreicus* von Bedeutung. Alle drei Arten sind als Überträger von mehreren Arboviren bekannt und nutzen gerne den Menschen als Blutquelle (Pfeffer et al. 2013, Tanaka et al. 1979).

### 2.3.2 Allgemeine Morphologie, Biologie und Ökologie

Stechmücken sind exotherme Tiere und ihre Entwicklung ist auf das Vorhandensein von temporären oder permanenten Gewässern angewiesen. Dennoch haben sich die Stechmücken als sehr anpassungsfähig in Bezug auf unterschiedliche Habitate und Klimazonen erwiesen (Pfeffer & Dobler 2014, Becker et al. 2010). So schaffen diese Tiere es in Salzwasser und in Marschgebieten, in kaltem Schneeschmelzwasser oder in kleinen Mengen von kurz bestehenden Gewässern ihre Entwicklung zum adulten Tier zu vollenden (Abbildung 6), (Pfeffer & Dobler 2014).



**Abb. 6:** Illustration des Entwicklungszyklus der Überschwemmungs-Stechmücke *Aedes vexans* und des von dieser übertragenen Tahyna-Virus (nach Pfeffer & Dobler 2014).



### 2.3.2.1 Eiablage und Schlüpfen der Larven

Die meisten Stechmückenarten sind unautogen: nach der Kopulation, brauchen die Weibchen Blut, um die Entwicklung der Eier zu vollenden. Die weiblichen Stechmücken legen zwischen 50 und 500 Eier ab (Becker et al. 2010).

Bezüglich der Eiablage ist es möglich Stechmücken in zwei großen Gruppen aufzuteilen. Die Weibchen der Gattungen *Anopheles*, *Culex*, *Culiseta*, *Uranotaenia* und *Coquillettidia* legen die Eier entweder einzeln oder in Flößen unmittelbar auf die Wasseroberfläche (Pfeffer & Dobler 2014). Die Weibchen der *Aedes*- und *Ochlerotatus*-Arten dagegen legen ihre Eier auf lehmhaltigen Böden in der Nähe von Gewässern ab, wo durch Regenfälle, Schneeschmelze oder Überschwemmungen vorübergehende Wasserflächen entstehen (Pfeffer & Dobler 2014).

Die Ei-Embryonen der ersten Gruppe gehen weder in eine Ruhephase (durch externe Faktoren initiiert) noch in die Diapause (genetisch bedingte Ruheperiode), die Larven (L1) schlüpfen, sobald die Embryonalentwicklung abgeschlossen ist (Becker et al. 2010). Die Stechmückenarten aus dieser Gruppe bilden mehrere Generationen pro Jahr in Abhängigkeit von der Entwicklungsdauer pro Generation und diese ist durch biotische (Nahrungsangebot, Anzahl Fressfeinde etc.) und abiotische Faktoren, vor allem durch die Wassertemperatur beeinflusst (Pfeffer & Dobler 2014). Die abgelegten Eier der zweiten Gruppe können dagegen mehrere Jahre ohne Wasserkontakt überdauern (Pfeffer & Dobler 2014). Die Stechmücken der zweiten Gruppe können nach Schlupfstrategien auch in zwei Gruppen unterteilt werden: Schneeschmelz-Stechmücken (z.B. *Ochlerotatus cantans*, *Ochlerotatus communis*, *Ochlerotatus rusticus*) und Überschwemmungs-Stechmücken (z.B. *Ae. vexans*) (Becker et al. 2010). Die Vertreter dieser Stechmücken legen ihre Eier einzeln ab. Diese werden nicht auf die Wasseroberfläche, sondern in den feuchten Boden gelegt, der dann bei steigendem Wasserstand überflutet wird (Becker et al. 2010).

Schneeschmelz-Stechmücken sind univoltin (monozyklisch) und durchlaufen nur eine Generation/Jahr. Die Eier werden im Frühsommer abgelegt und treten automatisch in eine Diapause ein, welche bei den meisten Schneeschmelz-Stechmücken mit Beginn der kalten Wintertemperaturen unterbrochen wird (Becker et al. 2010). Diese Stechmücken schlüpfen somit bereits zur Schneeschmelze im nächsten Frühjahr, beziehungsweise kurz danach, in den europäischen Zeitzonen ist das Ende April, Anfang Mai (Becker et al. 2010). Die Brutgebiete der Schneeschmelz-Stechmücken, z. B. Mulden und Gräben in sumpfigen Gebieten in Mitteleuropa, sind meist über lange Zeiträume mit relativ kaltem Wasser überflutet (Becker et al. 2010).

Überschwemmungs-Stechmücken sind multivoltin (polyzyklisch) und erzeugen somit mehrere Generationen pro Jahr. Die Eier dieser Stechmücken gehen in die Diapause im Herbst bis zum Frühjahr (Becker et al. 2010). Die Schlüsselreize für das Schlüpfen der L1-Larven nach der Diapause sind eine steigende Wassertemperatur und eine sinkende Sauerstoffsättigung (Becker et al. 2010, Pfeffer & Dobler 2014).

### **2.3.2.2 Aquatische Entwicklungsstadien**

Wie alle Diptera vollziehen die Stechmücken eine vollständige Metamorphose (Becker et al. 2010). Nach dem Schlupf aus dem Ei folgen vier Larvenstadien (L1-L4) und ein Puppenstadium im Wasser.

#### **Larven**

Die Larven besitzen keine Gliedmaßen, und der Larvenkörper lässt sich in drei Abschnitte unterteilen, nämlich den Kopf mit Mundwerkzeugen, Fühlern und Augen, den breiten Thorax und das Abdomen. Letzteres besteht aus sieben fast identischen Segmenten und drei angepassten hinteren Segmenten, die vier Analpapillen tragen und der Regulierung des Elektrolythaushalts dienen (Becker et al. 2010).

Die Larven sind zur Atmung auf Luftsauerstoff angewiesen. Auf dem Abdominalsegment VIII werden bei den Culicinen ein Siphon und bei den Anophelines „spiracular lobes“ ausgebildet, die mit dem Tracheensystem zur Aufnahme von Sauerstoff in Verbindung stehen (Becker et al. 2010).

Als Nahrung dienen Mikroorganismen, Algen, Protozoen und Detritus (Becker et al. 2010). Die aquatische Entwicklung der Stechmücken ist temperaturabhängig und dauert z. B. bei *Cx. pipiens pipiens* 7-8 Tage bei 25 °C Wassertemperatur (Pfeffer & Dobler 2014).

#### **Puppen**

Das Puppenstadium ist das abschließende aquatische Stadium. Dieses dauert in der Regel zwei Tage, und während dieser Zeit findet die Metamorphose statt.

Morphologisch zeichnen sich die Puppen durch einen ausgeprägten Cephalothorax mit zwei anterolateralen Atemtrompeten und einem schmalen, gegliederten Abdomen aus. Dieses wird gebeugt unter dem Cephalothorax gehalten und dient der Fortbewegung beim Schwimmen (Becker et al. 2010).

Puppen nehmen keine Nahrung auf und sind im Vergleich zu den Puppen der meisten anderen Insekten mobil und tauchen bei Gefahr schnell unter. Sonst halten

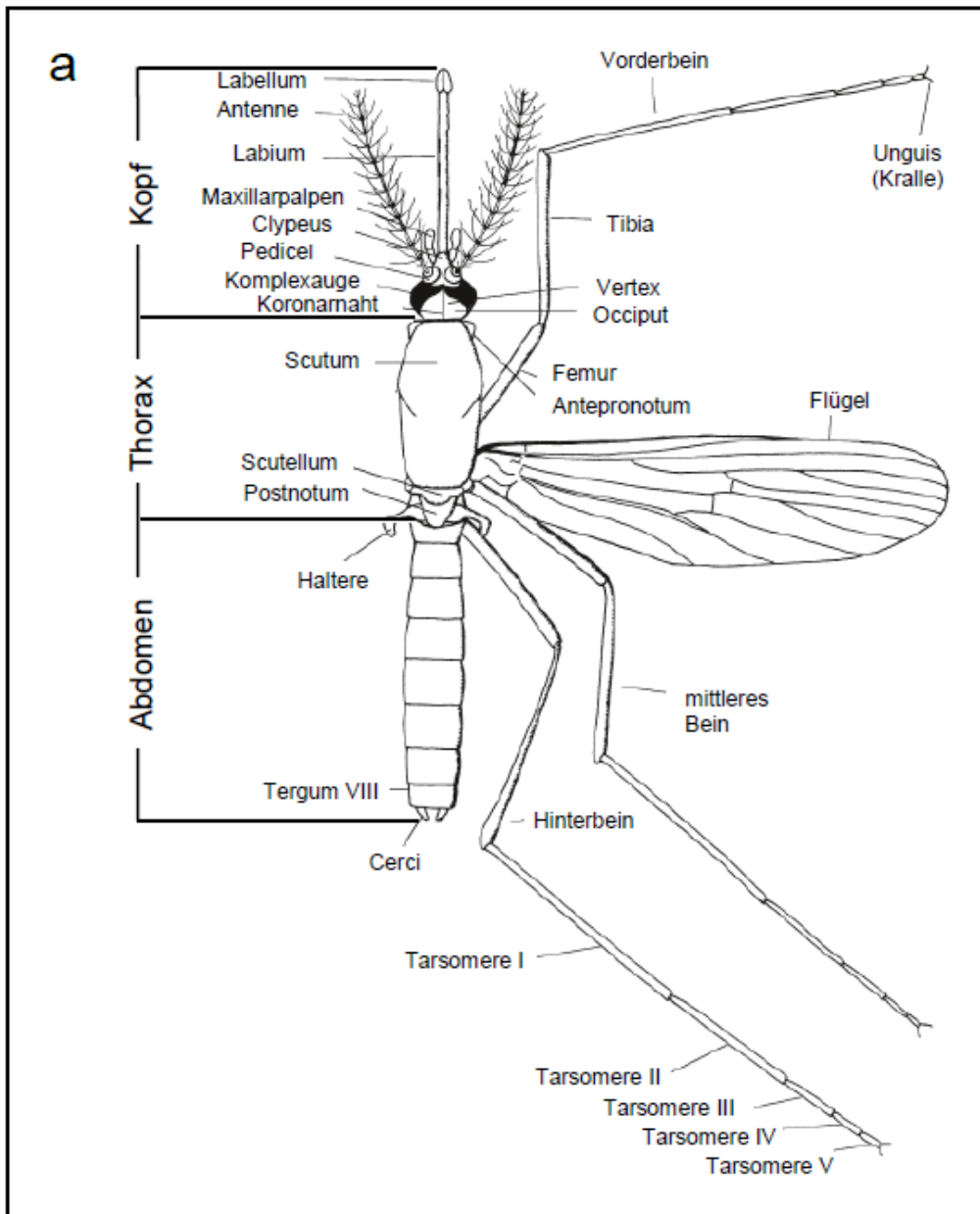
sich die Puppen in der Regel an der Wasseroberfläche auf in Kontakt mit der Luft mittels der paarigen Atemtrompeten (Becker et al. 2010).

### **2.3.2.3        Adulte**

Nach etwa zwei Tagen der Metamorphose schlüpft die adulte Stechmücke. Diese ist innerhalb weniger Minuten nach der Sklerotisierung der weichen Cuticula flugfähig (Becker et al. 2010).

Stechmücken sind mit einem Exoskelett bedeckt und weisen eine bilaterale Symmetrie auf (Rueda 2008). Im Allgemeinen unterscheiden sich die adulten Stechmücken von anderen Vertretern der Nematocera durch ihren langen Stechrüssel, der immer länger als der Thorax und nach vorne gerichtet ist (Becker et al. 2010).

Der Körper der Stechmücke wird in Kopf, Thorax und Abdomen unterteilt (Abbildung 7).



**Abb. 7: Körperbau einer weiblichen Steckmücke (Culicine), (nach Werblow 2015)**

Alle drei Körperabschnitte sind gattungsspezifisch mit Schuppen und Borsten bedeckt (Becker et al. 2010). Der Kopf verfügt über Antennen, Maxillarpalpen, zwei Facettenaugen und einen Proboscis (Stechrüssel) (Becker et al. 2010). Der Proboscis ist in der Regel etwas kürzer als der Körper und generell sind nur die weiblichen Stechmücken Blutsauger (Kren & Aspöck 2012). Der weibliche Stechrüssel ist in Faszikel (Stiletbündel) und das ihn umschließende Labium unterteilt. Bei der Blutaufnahme dringt der Faszikel in die Haut ein, während das Labium gebogen wird und auf der Hautoberfläche bleibt.

Der Faszikel besteht aus sechs langen und schmalen Stiletten: dem Labrum, den paarigen zahntragenden Maxillen, dem Hypopharynx und den paarigen Mandibeln (Wahid et al. 2003, Lehane 1991). Männliche Stechmücken nehmen kein Blut auf und haben einen reduziert ausgebildeten Stechrüssel (Wahid et al. 2003).

Der Thorax wird in drei verschiedene Brustsegmente unterteilt: Prothorax, Mesothorax und Metathorax (Becker et al. 2010). Stechmücken besitzen drei Beinpaare, jeweils ein Paar auf jedem Brustsegment (Becker et al. 2010). Zusätzlich weist der Mesothorax ein paar Flügel auf, welche einen aktiven Flug ermöglichen. Die metathorakalen Flügel sind zu kleinen vibrierenden Organen modifiziert, den sogenannten Halteren, die das Gleichgewicht während des Fluges kontrollieren (Becker et al. 2010).

Das Abdomen der Stechmücken besteht aus zehn Segmenten. Die letzten drei Segmente mit ihren Organen sind auf die Fortpflanzung und Exkretion spezialisiert (Rueda 2008, Becker et al. 2010).

Neben Blut ernähren sich die weiblichen Culicidae auch von Pflanzen (z.B. Blütennektar), die für die Männchen die einzige Nahrungsquelle sind (Krenn & Aspöck 2012). Stechmücken haben unterschiedliche Präferenzen bei der Suche nach Wirten für die Blutaufnahme. Einige Stechmückenarten sind anthropophil und saugen vor allem Blut von Menschen, während andere Arten lieber Blut von Tieren und Vögeln saugen (Rueda 2008). Dabei gibt es Arten, die vorwiegend ornithophil sind, und andere eher mammophil. Medizinisch interessant sind die Arten mit eher promiskem Stechverhalten, da sie Pathogene zwischen den verschiedenen Wirtstierarten übertragen können.

#### **2.3.2.4 Flugverhalten und Überwinterungsstrategien**

Stechmücken weisen auch Unterschiede im Flugverhalten auf. Man unterscheidet zwischen ortsansässigen Arten (z. B. *Cx. pipiens pipiens*), welche nur durch starke Winde verstreut und so vom Brutplatz vertrieben werden (Pfeffer & Dobler 2014). Dagegen ist es für die starken Flieger (v.a. Waldstechmücken) möglich, in einer Nacht mehrere Kilometer zurückzulegen. Grundsätzlich ist das Ausmaß der Stechmückenaktivität multifaktoriell und hängt unter anderem von der Windstärke, der Lichtintensität und dem physiologischen Zustand (vollgesogen, hungrig, gravid oder in der Paarungszeit) ab (Pfeffer & Dobler 2014). Zudem sind die meisten Stechmücken dämmerungs- und nachtaktiv, um eine starke Dehydrierung während der Tageshitze zu vermeiden (Pfeffer & Dobler 2014).

Die Stechmücken haben verschiedene Strategien entwickelt, um die kalten Jahreszeiten erfolgreich zu überleben. Die meisten Arten überwintern nur in einem Entwicklungsstadium. Es gibt jedoch auch einige Arten (z. B. *Ochlerotatus rusticus*, *Culiseta morsitans*), die je nach Feuchtigkeit und Temperatur als Eier oder als Larven überwintern. Bei anderen Stechmückenarten (z. B. *Cx. pipiens pipiens*) halten die Weibchen in feuchten Kellern einen Winterschlaf ab und legen im Frühjahr nach der Blutaufnahme die Eier ab (Pfeffer & Dobler 2014).

### 2.3.3 Arboviren in Deutschland

Im Allgemeinen sind fünf Virusfamilien bekannt, die von Stechmücken übertragen werden können: Togaviren, Flaviviren, Orthobunyaviren, Reoviren und Rhabdoviren. Vor allem die Vertreter der ersten drei Virusfamilien sind von großer veterinär- und humanmedizinischer Bedeutung (Pfeffer et al. 2013).

Um das von Stechmücken ausgehende Risiko für die Gesundheit von Mensch und Tier zu bewerten, wurden in Deutschland Monitoring- und Surveillance-Programme initiiert. Sie erfassen beispielsweise die einheimische Stechmückenfauna und führen Studien zum Erregernachweis und zur Vektorkompetenz für exotische Pathogene durch (Jöst et al. 2010, Jöst et al. 2011a, Jöst et al. 2011c, Werner et al. 2012, Becker et al. 2012, Allering et al. 2012, Cadar et al. 2014, Cadar et al. 2017a, Cadar et al. 2017b, Kampen et al. 2017, Walther & Kampen 2017, Scheuch et al. 2018, Werner et al. 2020). Bisher wurden in Deutschland Viren aus verschiedenen Virusfamilien nachgewiesen: Tahyna-Virus, Batai-Virus, Sindbis-Virus, Usutu-Virus und West-Nil-Virus. Alle diese Viren sind potenzielle Krankheitserreger für Mensch und Tier und werden hier im Einzelnen kurz vorgestellt (Scheuch et al. 2018).

#### Tahyna-Virus und Batai-Virus

Tahyna-Virus (TAHV) und Batai-Virus (BATV) sind zwei Arboviren aus der Ordnung der *Bunyavirales*, Familie *Peribunyaviridae*, die in Deutschland in Stechmücken nachgewiesen wurden. Beide Viren gehören zur Gattung der Orthobunyaviren und verursachen bei einer Infektion des Menschen die sogenannte Sommergrippe (Hubalek 2008, Li et al. 2014).

Die Erstisolierung des **Tahyna-Virus** (TAHV) erfolgte aus *Ae. vexans* und *Ae. caspius* in der Ortschaft Tahyna in der Slowakei im Jahr 1958 (Bardos & Danielova, 1959).

Das TAHV war das erste in Europa und auch in Deutschland nachgewiesene humanpathogene Arbovirus und wird vor allem durch Überschwemmungsmücken

(z.B. *Ae. vexans*) in einem Zyklus zwischen Hasen (*Lepus europaeus*) und Kaninchen, Igel ( *Erinaceus roumanicus*) und Nagetieren unterhalten (Spieckermann & Ackermann 1972, Becker et al. 2014, Pfeffer et al. 2013, Hubalek 2008). Seit dem letzten Nachweis von TAHV aus Stechmücken im Oberrheintal Anfang der 1980er Jahre erfolgten in Deutschland keine weiteren TAHV-Virusisolierungen mehr (Pfeffer & Dobler 2014).

Das **Batai-Virus (BATV)** wurde zum ersten Mal aus *Cx. gelidus* Stechmücken in Kuala Lumpur, Malaysia, im Jahr 1955 isoliert (CDC 1984). In Europa wurde es aus *Anopheles maculipennis* (*An. maculipennis*) in der Slowakei 1960 isoliert (Gratz 2006).

Als BATV-Hauptvektoren gelten in Europa vor allem *An. maculipennis* und *An. claviger* (Gratz 2006). Als Wirte fungieren vor allem Hausschweine, Wiederkäuer und Pferde (Hubalek 2008).

Im Jahr 2009, wurde in Deutschland BATV in einem von 643 *An. maculipennis* s.l. untersuchten Pools (mit insgesamt 16.057 Stechmücken) nachgewiesen (Jöst et al. 2011a).

Um die veterinärmedizinische Bedeutung von BATV in Deutschland bei Wiederkäuern zu bewerten, wurden 648 Rinderserumproben in Südwestdeutschland auf BATV untersucht. Drei Proben enthielten neutralisierende Antikörper, was auf eine lokale Übertragung hinweist und Wiederkäuer als potenzielle Wirte für BATV in Südwestdeutschland identifiziert (Hofmann 2015).

In einer weiteren Studie wurden von 2011 bis 2016 in verschiedenen Teilen Deutschlands Stechmücken gesammelt und auf Flavivirus-, Alphavirus- und Orthobunyavirus-RNA untersucht. Von 4.144 Pools mit insgesamt 97.648 Stechmücken wurden 24 Pools positiv auf BATV-RNA getestet (Scheuch et al. 2018). BATV-RNA wurde in *An. messeae*, *An. daciae*, *Cx. pipiens* s.l., *Culiseta* spp. (nicht weiter differenziert), *Ae. vexans* und *Cx. modestus* nachgewiesen (Scheuch et al. 2018). Da die Untersuchung der einheimischen Stechmückenarten und der übertragenen Krankheitspathogene in Deutschland lange Zeit vernachlässigt wurde, ist es nicht möglich zu beurteilen, ob die Ausbreitung der nachgewiesenen BATV zugenommen hat (Scheuch et al. 2018).

### **Sindbis-Virus**

Sindbis-Virus (SINV) ist ein Arbovirus der Familie *Togaviridae*, Genus *Alphavirus*. 1952 wurde das SINV erstmals aus *Culex* Stechmücken bei der Ortschaft Sindbis in Ägypten isoliert und nach diesem Ort benannt (Taylor et al. 1955). Außerdem hat

SINV eine ungewöhnlich weite Verbreitung und kommt in Europa, Afrika, Asien und Australien vor (Eldridge & Edman 2002, Pfeffer et al. 2013, Lundström und Pfeffer 2010).

Die erste bekannte Isolierung von SINV fand 1961 bei einer erkrankten Person in Uganda statt (Eldridge & Edman 2002). Die Klinik beim Menschen ist durch Fieber, Hautausschläge, Muskel- und Gelenkschmerzen charakterisiert (Adouchief et al. 2016).

Als Vektoren in Europa gelten vor allem *Cx. pipiens*, *Cx. torrentium*, *Culiseta morsitans*, *Coquillettidia richiardii*, *Ochlerotatus communis*, *Ochlerotatus excrucians*, *Ae. cinereus*, and *An. hyrcanus* und als Wirte fungieren vor allem Sperlingsvögel (*Passeriformes*) (Hubalek 2008).

Bei einem Arbovirus Surveillance Programm am Oberrhein im Jahr 2009 wurden 10 von 643 Stechmücken-Pools SINV-positiv getestet, dabei handelte es sich um Pools mit *Culex*- und *Anopheles*-Spezies (Jöst et al. 2010). Im Folgejahr wurde SINV zum ersten Mal aus einer verletzten Nebelkrähe (*Corvus corone cornix*) in Berlin isoliert (Eiden et al. 2014).

Darüber hinaus wurden in den Folgejahren auch spezifische Antikörper (IgG) gegen SINV bei vier von 3.389 untersuchten Serumproben gesunder Blutspender gefunden (Jöst et al. 2011b).

In der bereits genannten Studie wurden von 2011 bis 2016 insgesamt 97.648 Stechmücken in 4.144 Pools untersucht und von 29 Pools, die positiv auf Arbovirus-RNA getestet wurden, waren drei Pools mit *Culex*-Arten positiv auf SINV-RNA getestet (Scheuch et al. 2018).

Eine weitere Isolation des SINV erfolgte aus dem Blut einer erkrankten Ringeltaube (*Columba polumbus*), welche in Gießen im Jahr 2016 untersucht wurde (Ziegler et al. 2019).

Darüber hinaus wurden in den Jahren 2016 und 2017 in verschiedenen Regionen Deutschlands SINV Antikörper im Blut von wildlebenden Vögeln nachgewiesen (z.B. bei einem Mäusebussard (*Buteo buteo*), einem Habicht (*Accipiter gentilis*), zwei Elstern (*Pica pica*) und zwei Aaskrähen (*Corvus corone*)) (Ziegler et al. 2019).

Weiterhin wurden SINV Antikörper im Blut von drei Greifvögeln in einer Falknerei in Westdeutschland und bei elf Greifvögeln und Eulen in einer anderen Falknerei in Baden-Württemberg vorgefunden (Ziegler et al. 2019).



Diese Ergebnisse deuten auf eine enzootische Zirkulation des SINV in den beprobten Gebieten hin, allerdings sind keine Daten zur Übertragung der SINV auf den Menschen vorhanden (Ziegler et al. 2019).

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Monitoring-Programme zum Nachweis der Zirkulation von SINV in Stechmücken und wildlebenden Vögeln weiterhin nötig sind, um das Infektionsrisiko mit SINV für Mensch und Tier zu bewerten (Ziegler et al 2019).

### **Usutu-Virus**

Das Usutu-Virus (USUV) ist ein Arbovirus der Familie *Flaviviridae*, Genus *Flavivirus* und gehört zur Japan-Enzephalitis-Serogruppe (Poidinger et al. 1996). Das USUV wurde erstmals 1959 aus *Cx. neavei*-Stechmücken in Südafrika isoliert (NABU).

Wildlebende Vögel fungieren als Hauptreservoir für USUV, und Zugvogelarten spielen eine wesentliche Rolle bei der Verbreitung von USUV in neue Regionen (Jöst et al. 2011c).

Im Jahr 2010 wurden im Rahmen eines Arbovirus-Surveillance-Programms in Deutschland 54.321 weibliche Stechmücken gefangen und in Pools nach ihrer Spezieszugehörigkeit untersucht, ein Pool von *Cx. pipiens pipiens* Weibchen aus Weinheim wurde positiv auf USUV getestet, und anschließend konnte USUV auch isoliert werden (Jöst et al. 2011c). Im Juni des folgenden Jahres wurde ein erhöhtes Amselsterben (*Turdus merula*) am Oberrhein gemeldet. Bei der Untersuchung von 223 verstorbenen Wildvögeln wurde in den Organen von 86 Vögeln USUV nachgewiesen (Becker et al. 2012).

In der bereits oben erwähnten Stechmücken Monitoring-Studie aus den Untersuchungsjahren 2011-2016 wurden 4.144 Pools auch auf Flavivirus-RNA untersucht und zwei Pools mit *Culex*-Arten wurden positiv auf USUV-RNA getestet (Scheuch et al. 2018).

Darüber hinaus wurden im Jahr 2013 zwei tote Fledermäuse positiv auf USUV getestet (nur im Gehirngewebe) und es sind weitere Untersuchungen erforderlich, um festzustellen welche Rolle Fledermäuse bei der Verbreitung von USUV spielen (Cadar et al. 2014).

Um ein Verständnis über die Ausbreitung des USUV in Europa zu gewinnen, sind länderübergreifende Monitoring-Programme von Vorteil. So wurden im Jahr 2016 in einem Überwachungsprogramm in Belgien, Frankreich, Deutschland und den

Niederlanden insgesamt 17 lebendige und 147 verstorbene Vögel positiv auf das USUV-Virus getestet (Cadar et al. 2017a).

Beim Menschen wurden zwei klinische Fälle von USUV im Jahr 2009 bei immungeschwächten Personen beschrieben (Pecorari et al. 2009, Cavrini et al. 2009).

Darüber hinaus wurde im Rahmen des Überwachungsprogramms im Jahr 2012 in Südwestdeutschland und im Jahr 2016 in Westdeutschland jeweils ein Blutspender positiv auf USUV-IgG und -IgM getestet. Insgesamt wurden entsprechend 4.200 und 13.023 Blutproben untersucht (Allering et al. 2012, Cadar et al. 2017b).

Es sind keine dokumentierten Fälle von USUV-Infektionen bekannt, die durch Transfusionen von mit USUV-kontaminierten Blutprodukten verursacht wurden (Cadar et al. 2017b).

Aufgrund der kontinuierlichen Ausbreitung des USUV in Europa und der beschriebenen USUV-Infektion in der Humanmedizin, sollte das USUV jedoch in die Differentialdiagnose der Enzephalitiden mit unbekannter Ätiologie mit einbezogen werden (Pecorari et al. 2009, Cavrini et al. 2009, Cadar et al. 2017a).

### **West-Nil-Virus**

Das West-Nil-Virus (WNV) ist ein Arbovirus der Familie *Flaviviridae*, Genus *Flavivirus*. WNV gehört zur Japan-Enzephalitis-Serogruppe und wird in zwei Subtypen, WNV-Subtyp1 und 2, unterteilt (RKI 2021).

Die erste Isolierung erfolgte im Jahr 1937 aus einer erkrankten Person im West Nil Distrikt in Uganda (Hubalek 2008). Das WNV zirkuliert in einem enzootischen Zyklus vor allem zwischen den Stechmücken der Gattung *Culex* und Reservoir-Wirten, in erster Linie Vögeln (Kramer et al. 2008). Das WNV verursacht bei mehr als 20 % der infizierten Menschen meist eine febrile Erkrankung (Zou et al. 2010). Unter 1 % der Betroffenen entwickeln eine neurotrope Erkrankung, die sich in Enzephalitiden oder Meningo-Enzephalomyelitis äußern kann (Mostashari et al. 2001).

In Europa zirkuliert WNV seit den 1960er Jahren (Hubalek 2008). In Deutschland sind bis 2018 nur importierte Fälle beschrieben worden (Gabriel et al. 2013, Frank et al. 2020). Im Jahr 2018 wurde eine Zunahme der WNV-Ausbrüche in Südost- und Südeuropa beobachtet (ECDC 2018). Auch in Deutschland wurden in diesem Jahr Vögel positiv auf WNV getestet. Im August und September wurden sechs tödliche WNV-Fälle bei wildlebenden Vögeln (Habicht (*Accipiter gentilis*), zwei Amseln (*Turdus merula*)) und in Gefangenschaft lebenden Vögeln (zwei Steinkäuze (*Strix*

*nebulosa*), Habicht (*Accipiter gentilis*) festgestellt (Ziegler et al. 2018). Darüber hinaus wurde 2018 auch ein Fall von autochthonem West-Nil-Fieber beim Menschen gemeldet - allerdings handelte es sich dabei nicht um eine vektorübertragene WNV-Infektion, sondern um eine Infektion durch Kontakt mit einem erkrankten Vogel (ProMED-mail 2018).

Im darauffolgenden Jahr wurden beim Menschen fünf autochthone WNV-Infektionen diagnostiziert, und in drei dieser Fälle wurde eine neuroinvasive Erkrankung beobachtet (Frank et al. 2020). Im Jahr 2020 wurden in Leipzig neun Fälle der WNV-Infektion festgestellt, in sieben davon handelte es sich um die neuroinvasive West-Nil-Erkrankung (WNND) und in zwei anderen Fällen um das West-Nil-Fieber (WNF) (Pietsch et al. 2020).

Nachdem in Deutschland autochthone Fälle von WNV-Infektionen bei Menschen und Tieren gemeldet wurden, wird empfohlen, bei fiebrigen Erkrankungen und Enzephalitiden eine WNV-Diagnostik durchzuführen (Frank et al. 2020).

### 3 PUBLIKATION

#### 3.1 Stellungnahme zum Eigenanteil an den Arbeiten zur Publikation

##### „Characterization and Vector Competence Studies of Chikungunya Virus Lacking Repetitive Motifs in the 3'Untranslated Region of the Genome“

Karliuk Y, vom Hemdt A, Wieseler J, Pfeffer M, Kümmerer BM. Viruses 2021; 13(3):403. <https://doi.org/10.3390/v13030403>

**Konzept:** An der Konzipierung des Projekts waren PD Dr. rer. nat. Beate Kümmerer und mein Betreuer Prof. Dr. Martin Pfeffer maßgeblich beteiligt.

**Material und Methoden:** Die Etablierung des Insektariums und die Aufzucht der Stechmücken für die Infektionsversuche erfolgten durch mich.




Die Unterhaltung der Zellkultur, die Konstruktion des CHIKV- $\Delta$ DR, die in-vitro-Transkription und Gewinnung des rekombinanten Virus, Untersuchungen zur Wachstumskinetik in der Zellkultur sowie der Plaque-Assay wurden von der Forschungsgruppe PD Dr. rer. nat. Beate Kümmerer durchgeführt.

Die Vorbereitung der Stechmücken für die Infektionsversuche sowie die oralen- und intrathorakalen Infektionsversuche im S3-Labor wurden durch mich durchgeführt. Auch die Verarbeitung der Stechmücken nach der Infektion wurde durch mich durchgeführt. Die umfasste die Betäubung und Präparation der Stechmücken nach der Infektion sowie die Speichelassays der infizierten Stechmücken im S3-Labor.

Die Extraktion der Nukleinsäure aus Stechmücken-Proben und die Real-Time PCR (RT-PCR) Untersuchungen wurden in der Arbeitsgruppe PD Dr. rer. nat. Beate Kümmerer durchgeführt. Die Statistischen Tests wurden durch die Forschungsgruppe PD Dr. rer. nat. Beate Kümmerer und Prof. Dr. Martin Pfeffer durchgeführt. An der Literaturrecherche und dem Verfassen der Publikation haben alle Autoren mitgewirkt.

## Article

# Characterization and Vector Competence Studies of Chikungunya Virus Lacking Repetitive Motifs in the 3' Untranslated Region of the Genome

Yauhen Karliuk <sup>1</sup>, Anja vom Hemdt <sup>2</sup> , Janett Wieseler <sup>2</sup>, Martin Pfeffer <sup>1</sup>  and Beate M. Kümmerer <sup>2,\*</sup> 

<sup>1</sup> Institute of Animal Hygiene and Veterinary Public Health, Faculty of Veterinary Medicine, University of Leipzig, 04103 Leipzig, Germany; yauhen.karliuk@vetmed.uni-leipzig.de (Y.K.); pfeffer@vetmed.uni-leipzig.de (M.P.)

<sup>2</sup> Institute of Virology, Medical Faculty, University of Bonn, 53127 Bonn, Germany; Anja.vom\_Hemdt@ukbonn.de (A.v.H.); Janett.Wieseler@ukbonn.de (J.W.)

\* Correspondence: Beate.Kuemmerer@uni-bonn.de



**Citation:** Karliuk, Y.; vom Hemdt, A.; Wieseler, J.; Pfeffer, M.; Kümmerer, B.M. Characterization and Vector Competence Studies of Chikungunya Virus Lacking Repetitive Motifs in the 3' Untranslated Region of the Genome. *Viruses* **2021**, *13*, 403. <https://doi.org/10.3390/v13030403>

Academic Editor:  
Jonas Schmidt-Chanasit

Received: 26 January 2021  
Accepted: 27 February 2021  
Published: 4 March 2021

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** Using reverse genetics, we analyzed a chikungunya virus (CHIKV) isolate of the Indian Ocean lineage lacking direct repeat (DR) elements in the 3' untranslated region, namely DR1a and DR2a. While this deletion mutant CHIKV- $\Delta$ DR exhibited growth characteristics comparable to the wild-type virus in Baby Hamster Kidney cells, replication of the mutant was reduced in *Aedes albopictus* C6/36 and *Ae. aegypti* Aag2 cells. Using oral and intrathoracic infection of mosquitoes, viral infectivity, dissemination, and transmission of CHIKV- $\Delta$ DR could be shown for the well-known CHIKV vectors *Ae. aegypti* and *Ae. albopictus*. Oral infection of *Ae. vexans* and *Culex pipiens* mosquitoes with mutant or wild-type CHIKV showed very limited infectivity. Dissemination, transmission, and transmission efficiencies as determined via viral RNA in the saliva were slightly higher in *Ae. vexans* for the wild-type virus than for CHIKV- $\Delta$ DR. However, both *Ae. vexans* and *Cx. pipiens* allowed efficient viral replication after intrathoracic injection confirming that the midgut barrier is an important determinant for the compromised infectivity after oral infection. Transmission efficiencies were neither significantly different between *Ae. vexans* and *Cx. pipiens* nor between wild-type and CHIKV- $\Delta$ DR. With a combined transmission efficiency of 6%, both *Ae. vexans* and *Cx. pipiens* might serve as potential vectors in temperate regions.

**Keywords:** chikungunya virus; vector competence; 3' untranslated region; direct repeats; *Aedes vexans*; *Culex pipiens*

## 1. Introduction

Chikungunya virus (CHIKV) is a re-emerging arbovirus that is transmitted to humans through anthropophilic mosquitoes of the *Aedes* genus [1]. The term chikungunya means 'to walk bent over' in some east African languages and is attributed to the joint pains which occur during infection [2]. Besides myalgia and arthralgia, high fever, headache, and rash are common symptoms of chikungunya disease [2].

CHIKV was first isolated in 1953 in the Newala district of Tanzania [3]. The virus came back into focus due to an urban epidemic in 1999–2000 in Kinshasa, Democratic Republic of the Congo, with about 50,000 infected people [4]. In 2004 an outbreak was reported on the island Lamu, Kenya, which affected almost 75% of the island population [5] before the virus spread in 2005 to further islands in the Indian Ocean including the Grande Comoro Island, La Réunion, Mayotte, Mauritius, and the Seychelles [6–8]. The virus subsequently reached India where over 1.3 million infected people were reported during 2005–2006 [9,10]. The epidemic on La Réunion which affected almost 250,000 people is particularly noteworthy as it is the first documented report of a CHIKV outbreak in which *Aedes albopictus* was the main vector in Africa. A mutation in the CHIKV E1 protein

(E1-A226V) was found to yield a higher fitness and better transmission of CHIKV in *Ae. albopictus* mosquitoes [11,12]. Subsequently, CHIKV outbreaks involving *Ae. albopictus* were also reported in temperate regions. In 2007, first local outbreaks with the E1-A226V variant were reported in the province of Ravenna, Italy [13]. The adaptive mutation was also present during an autochthonic outbreak in south-east France in 2017 [14]. In late 2013 CHIKV emerged in the Caribbean where transmission occurred by *Ae. aegypti* resulting in over 2.5 million cases until the end of 2017 in the Americas [15,16]. Phylogenetic analyses revealed that the virus causing the Caribbean epidemics belongs to the Asian genotype [17].

CHIKV is an enveloped, positive-strand RNA virus of the genus Alphavirus within the family *Togaviridae*. The genome is capped at the 5' end and polyadenylated at the 3' end. It has a length of about 12 kilobases and encodes two open reading frames (ORF) [18]. The first ORF, encompassing the 5' two-thirds of the genome, encodes the nonstructural proteins nsP1–nsP4. The second ORF, present in the last third of the genome, encodes the structural proteins (capsid, E1, and E2) and two small cleavage products (E3 and 6k). The ORFs are flanked by two untranslated regions (UTRs). The alphavirus 5' UTR contains cis-acting elements involved in regulating minus and plus strand RNA synthesis [19]. The 3' UTRs are characterized by several repeated sequence elements and a conserved sequence element (CSE) directly upstream of the poly(A) tail [20–22].

CHIKV can be classified into three main genotypes: East, Central, and South African (ECSA), West African (WA), and Asian genotype [23]. Within the ECSA genotype, the Indian Ocean (IO) lineage emerged [23], whereas CHIKV isolates from the 2013 Caribbean outbreak from a novel American lineage within the Asian genotype [24]. For CHIKV, the number of direct repeats (DRs 1, 2, and 3) and their arrangement differs between CHIKV lineages [22,25]. Compared to the WA and ECSA genotypes, members of the Asian genotype have a longer 3' UTR, encompassing more DR elements. The emergence of the different UTRs has been described to be an evolutionary process shaped by fitness trade-offs and population bottlenecks [22,26]. Experimental deletion of some DR elements within the CHIKV 3' UTR of a Caribbean strain resulted in reduced replication in mosquito cells and delayed replication in *Ae. aegypti* and *Ae. albopictus* mosquitoes leading to a longer extrinsic incubation period [27]. This extrinsic incubation time describes the viral incubation period between the time when a mosquito takes a viremic bloodmeal and the time when the mosquito becomes infectious; it is positively correlated with temperature, but mainly depends on how good and fast the virus is able to cross tissue barriers within the mosquito. Tissue barriers at the midgut and salivary gland levels also play an important role with regard to vector competence in general [28]. While the midgut infection barrier (MIB) regulates whether a virus is able to enter and establish an infection in the midgut, the midgut escape barrier (MEB) affects the ability to escape from the midgut to allow dissemination in the mosquito secondary tissues [28]. Similarly, salivary gland infection and escape barriers (SGIB and SGEB) exist that must be overcome in order for the virus to be secreted in saliva and transmitted to the host. The CHIKV E1-A226V mutation mentioned before allowed the virus to cross more easily the MIB in *Ae. albopictus* [12,29]. The latter mosquito species is able to adapt very well to different climatic conditions. This ability, climate change, and globalization enabled an enormous spread of *Ae. albopictus* also in Europe [30–34]. This carries the risk that CHIKV will spread further, especially considering that global warming is playing an increasingly important role. Already in 2016, a successful overwintering of *Ae. albopictus* in Germany was reported [35].

Altogether, these findings also raise the question as to what extent other mosquitoes in temperate regions are able to transmit CHIKV. We therefore aimed to investigate on the one hand whether mosquitoes from the same genus as the main vectors *Ae. aegypti* and *Ae. albopictus* as well as also being present in temperate regions are able to serve as vector. One such mosquito species is *Aedes vexans*, which is distributed almost worldwide and therefore also present in Europe [34]. On the other hand, we were interested to analyze whether a further distantly related mosquito genus, namely *Culex*, is competent to transmit CHIKV. Since the 3' UTR has been described to impact mosquito transmission [28], the



respective studies were performed for a CHIKV with deletion of DR elements in the 3' UTR as well as CHIKV wild-type virus.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Mosquitoes

Four laboratory reared mosquito species were used in the experiments (Table 1).

**Table 1.** Taxa and origin of mosquitoes used in the infection experiments.

Mosquito Taxon	Origin/Collection Site	Year of Collection	Year (Generation) Colony Established in Leipzig	Generations Used for Experiments
<i>Aedes aegypti</i>	Geigy, Switzerland <sup>1</sup>	1950	2017 (F1) <sup>2</sup>	F2–F5
<i>Aedes albopictus</i>	Cesena, Italy	2016	2016 (F2)	F11–F13
<i>Aedes vexans</i> 'TAMU'	Texas, USA	2002	2013 (F35)	F45–F53
<i>Culex pipiens biotype molestus</i>	Hesse, Germany	2000	2013 (F1) <sup>2</sup>	F55–F85

<sup>1</sup> crossed with strain from BASF, Ludwigshafen, Germany in 1972 and again with strain from Biogents AG, Germany in 2017. <sup>2</sup> No data on the filial generation was available. Therefore, numbering for the colony in Leipzig was started with F1.

### 2.2. Rearing Mosquitoes

The mosquitoes were kept in 50 × 50 × 45 cm (length/width/height) cages at room temperature of 25 ± 1 °C and 65 ± 10% relative humidity. The following light-regime was used: 0.5 h twilight—16 h daylight—0.5 h twilight—7 h darkness. An 8% fructose solution was used as a maintaining food and liquid source for the mosquitoes. Feeding was carried out using cotton pads moistened with fructose solution, which were placed on the mosquito cages. For blood feeding we used expired erythrocyte concentrate from the transfusion medicine of the University Hospital Leipzig. For feeding the mosquitoes a parafilm-covered polyoxymethylene (POM) plate [36] was filled with 4 mL of erythrocyte concentrate-fetal bovine serum (FBS, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) solution (1:1). The loaded POM plate was placed on the mosquito cage and kept at 37 °C using a size-fitting hot plate.

### 2.3. Cell Culture

Baby Hamster Kidney cells (BHK-21/J, kindly provided by Charles M. Rice, Rockefeller University, New York, NY, USA) were grown in MEM (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) containing 7.5% FBS (Sigma, St. Louis, MO, USA), 1% L-glutamine and 1% non-essential amino acids (NEAA) (Gibco). Vero B4 cells were cultured in DMEM (Gibco) containing 1% L-glutamine and 10% FBS. Leibovitz's L-15 Medium (Gibco) with 10% FBS (Sigma, St. Louis, MO, USA) was used to grow C6/36 cells (ATCC). Aag2 cells (CCL/FLI, Greifswald, Germany) were cultured in Leibovitz's L-15 Medium (Gibco) supplemented with 10% FBS (Sigma, St. Louis, MO, USA), 10% tryptose phosphate broth solution (Sigma, St. Louis, MO, USA) and 1% NEAA. BHK and Vero cells were kept at 37 °C with 5% CO<sub>2</sub>. The insect cells were cultured at 28 °C without CO<sub>2</sub>.

### 2.4. Construction of CHIKV cDNA Clones

The CHIKV-WT used in this study was derived from a previously described Mauritius infectious cDNA clone, rCHIKV [37], in which a mutation for the E1-A226V exchange was introduced. To this end, two PCR fragments were amplified from the rCHIKV plasmid using primers Bo946 (5'-GAAGTGCTGCGGTACAGCAGA-3') and Bo1082 (5'-TACCGTACCCACAGCCGGTCTCT-3') or Bo1081 (5'-AGAGACCCGGCTGTGGGTACGGTACA-3') and Bo1083 (5'-CAGTCCAGTTACGCTGGAGTCTGAG-3'), respectively. The obtained fragments were fused via PCR amplification using the outer primers Bo946 and Bo1083. The resulting fragment was cut with *SgrAI* and *NotI* and inserted into the infectious rCHIKV clone cut with the same restriction enzymes. CHIKV-ΔDR corresponds to a virus established by first amplifying two PCR fragments using primers Bo946 and Bo1474 (5'-TGTCTCTTAGGGGACACGTATACCTTCATACTTAATTGTCAAGTTAGTGCCT-3') or Bo1473 (5'-AGGTATACGTGTCCCCTAAGAGACA-3') and Bo1083, respectively from

rCHIKV-WT (E1-A226V), followed by fusion PCR using the outer primers and thereafter replacing the *SgrAI-NotI* fragment in the rCHIKV-WT plasmid against the amplified PCR fragment cut with the same enzymes. Changes introduced into the plasmids were verified via Sanger sequencing. Using primers Bo1392 (5'-GCCATACTCTCAGGCACCAT-3') and Bo1393 (5'-ATTAAAAACAAAATAACATCTCCTACGTCCTGTG-3'), the 3' UTR regions of the recombinant viruses were amplified via RT-PCR and subsequently sequenced to confirm the genotypes of CHIKV-WT and CHIKV-ΔDR in this region. The deletion encompasses nucleotides (nt) 11332–11461 (according to GenBank number FJ959103).

#### 2.5. In Vitro Transcription and Recovery of Recombinant Virus

Infectious cDNA clones were linearized with *NotI*, and in vitro transcription was performed using the T7 mMessage Machine Kit (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) according to the manufacturer's instruction. The integrity and amount of the in vitro transcribed RNA were analyzed by electrophoresis in ethidium bromide agarose gels. To recover recombinant viruses, the in vitro transcribed RNA was electroporated into BHK cells as described previously [38]. For mosquito infection experiments virus was passaged once on Vero B4 cells.

#### 2.6. Growth Kinetic Studies in Cell Culture

Cells seeded the day before at  $8 \times 10^4$  (BHK) or  $2.5 \times 10^5$  (C6/36, Aag2) cells per 24 well were infected in triplicate at a multiplicity of infection (MOI) of 0.1 with wild-type or mutant CHIKV for 1 h at 37 °C or 28 °C, respectively. After infection, cells were washed once with PBS and once with media without supplements before adding the corresponding cell culture media. Aliquots of the supernatants were harvested at 0 h, 8 h, 20 h, 30 h, and 44 h (BHK and C6/36 cells) or 0 h, 24 h, 48 h, 72 h, and 96 h (Aag2 cells) and used to determine viral titers via plaque assay on BHK cells.

#### 2.7. Plaque Assay

Titration of virus stocks used for mosquito infection was performed on Vero B4 cells. Viral titers for assessment of growth curves were determined on BHK cells. Cells seeded the day before at  $3 \times 10^5$  cells (BHK) or  $5 \times 10^5$  cells (Vero B4) per 6-well were infected with 200 µL of ten-fold dilutions of the virus solution and incubated for 1 h at 37 °C. Thereafter, cells were covered with 3 mL overlay obtained by mixing 1.2% agarose with 2× MEM, 4% FBS, 2% Pen/Strep at a ratio of 1:1. After incubation for two days at 37 °C, cells were fixed with 6% formaldehyde and stained with crystal violet solution to visualize plaques.

#### 2.8. Infection of Mosquitoes

Infection of mosquitoes with CHIKV was performed in a Biosafety Level 3 laboratory at the University of Bonn Medical Centre. Prior to oral infection 5–10 days old female mosquitoes were starved for 24 h. Feeding was performed in groups of up to 20 individuals. Virus-spiked blood meal for infection was prepared essentially as described [39]. Briefly, human expired erythrocyte concentrate was mixed with 8% fructose solution, FBS and virus stock in a ratio of 5:3:1:1 so that the final concentration of virus solution was  $1 \times 10^6$  PFU/mL. This viral titer was chosen as it is in the range of viremic titers found in CHIKV patients [40,41]. Depending on the type of mosquito, two different oral infection methods were used. Oral infection of *Ae. aegypti* mosquitoes was performed using a Hemotek membrane feeding device (Hemotek Ltd., Blackburn, UK). For *Ae. vexans*, *Ae. albopictus*, and *Culex pipiens* (*Cx. pipiens*) oral infection was done with cotton swabs each soaked with 200 µL of blood-virus solution. Feeding was allowed for two to three hours. To determine blood fed mosquitoes, the insects were anesthetized on ice and visually inspected for blood uptake. In total, 27 *Ae. aegypti*, 20 *Ae. albopictus*, 78 *Ae. vexans*, and 62 *Cx. pipiens* engorged and were included in the experiments. Intrathoracic injection was performed according to Rosen and Gubler [42]. Female mosquitoes were anesthetized by cooling on ice and intrathoracally injected with 200 plaque forming units (PFU) of virus



in 27.6 nL 0.9% sodium chloride solution (Braun, Melsungen, Germany). Injection was performed with a fine glass capillary (Drummond Scientific Company, Broomall, PA, USA) using a Nanoject II device (Drummond Scientific Company). Infected mosquitoes were kept in climate incubators at 28 °C and 80% humidity with a 12 h light–12 h dark photocycle.

### 2.9. Mosquito Processing

Infected mosquitoes were either sampled as a whole or dissected anesthetized on ice into legs, wings, and body using a Leica DMS 1000 stereomicroscope (Leica, Wetzlar, Germany). After removal of legs and wings, the proboscides of the mosquitoes were inserted into a 10 µL pipette tip filled with 5 µL of FBS. Then 1 µL of eye drops with 1% pilocarpine hydrochloride (Pilomann 1%, Bausch-Lomb, Rochester, NY, USA) was applied to the thorax of the mosquito to force salivation [43]. Salivation was allowed for 20–30 min before the content of the pipet tip was mixed with 15 µL of MEM cell culture media and stored at –80 °C until further processing. Whole mosquitoes or mosquito body parts were stored at –80 °C as well.

### 2.10. Nucleic Acid Extraction from Mosquitoes and Real-Time RT-PCR

To extract viral RNA from whole mosquitoes or mosquito body parts, 300 µL MEM media without FBS and 8–10 Precellys zirconium oxide beads of 1.4 mm diameter (Bertin Technologies, Montigny-le-Bretonneux, France) were added to the respective samples. The tubes were placed into a tissue lyser adaptor and stored at –20 °C for 4–8 min before the samples were shredded twice for 30 s with a frequency of 30 Hz using a TissueLyser (Qiagen, Hilden, Germany). To remove remaining body parts, the samples were centrifuged at 4 °C for 10 min at 2500 rpm. Then, 140 µL of the supernatant was added to 600 µL RAV1 buffer (NucleoSpin RNA virus kit, Macherey-Nagel, Macherey-Nagel, Düren, Germany), heated for 10 min at 70 °C and proceeded for RNA isolation according to the manufacturer's instructions (Macherey-Nagel). For real-time RT-PCR analyses of saliva, 10 µL of the stored saliva solution (see above) was mixed with 130 µL MEM media and processed using the Macherey-Nagel kit as described before.

Viral genome copy numbers from processed mosquito samples were quantified by real-time RT-PCR in a One Step RT-PCR reaction (SuperScript™ III One-Step RT-PCR System with Platinum™ Taq DNA Polymerase, Invitrogen™) using primers Bo1171 (5'-TGACCCCGACTCAACCATCCT-3') and Bo1172 (5'-GGCAGACGCAGTGGTACTTCCT-3') and probe Bo1179 (5'-6-carboxyfluorescein [FAM]-TCCGACATC/ZEN/ATCCTCCTTGCTGGC-lowa Black®FQ-3'). RT-PCR involved reverse transcription at 50 °C for 30 min, initial denaturation at 94 °C for 2 min, and 45 cycles with 94 °C for 15 s, 58 °C for 30 s and 72 °C for 30 s. In vitro transcribed RNA from the target region served as standard for each separate run. A representative standard curve used for quantification is shown in Figure S1. Samples were run in a LightCycler® 480 Instrument II (Roche, Basel, Switzerland).

### 2.11. Vector Competence Indices

The infection rate after oral feeding is the number of CHIKV real-time RT-PCR positive carcasses in relation to the total number of mosquitoes examined. The dissemination rate refers to the number of real-time RT-PCR positive wings (or wings and legs) in relation to the numbers of positive carcasses. The transmission rate is the percentage of mosquitoes with positive carcasses and wings (or wings and legs) that were also positive in the saliva. The transmission efficiency corresponds to the number of mosquitoes that were tested positive in the saliva in relation to the total number of mosquitoes examined.

### 2.12. Statistics

Data were analyzed using GraphPad Prism 6 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). If needed, values were normalized to d0 values prior to calculation. Differences of viral replication in *Ae. vexans* and *Cx. pipiens* after intrathoracic infection with either CHIKV-WT or CHIKV-ΔDR were calculated using the Mann–Whitney test. Comparison of

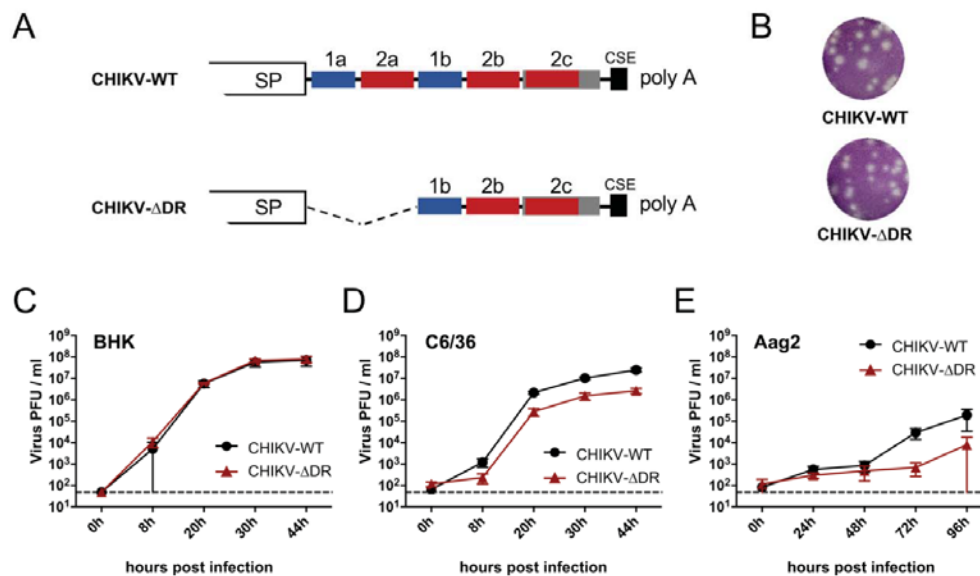
transmission efficiencies in these mosquito species after oral infection was calculated with Fisher's exact test. For both tests a  $p < 0.05$  was considered significant (\*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ ; \*\*\*\*  $p < 0.0001$ ).

### 3. Results

#### 3.1. Characterization of CHIKV Lacking DR Elements in the 3' UTR in Cell Culture

The 3' UTRs of CHIKV belonging to the IO lineage contain two DR elements, namely DR1 (two copies) and DR2 (three copies) [22,26]. To analyze the importance of DR elements in viral replication and vector competence, we rescued CHIKV encompassing deletion of the DR elements 1a + 2a using reverse genetics (CHIKV- $\Delta$ DR) (Figure 1A). As backbone the CHIKV E1-A226V variant was chosen. This variant is known to better infect *Ae. albopictus* which has also invaded European regions [12,44], and we aimed to analyze especially the vector competence of mosquito species prevalent in temperate regions.

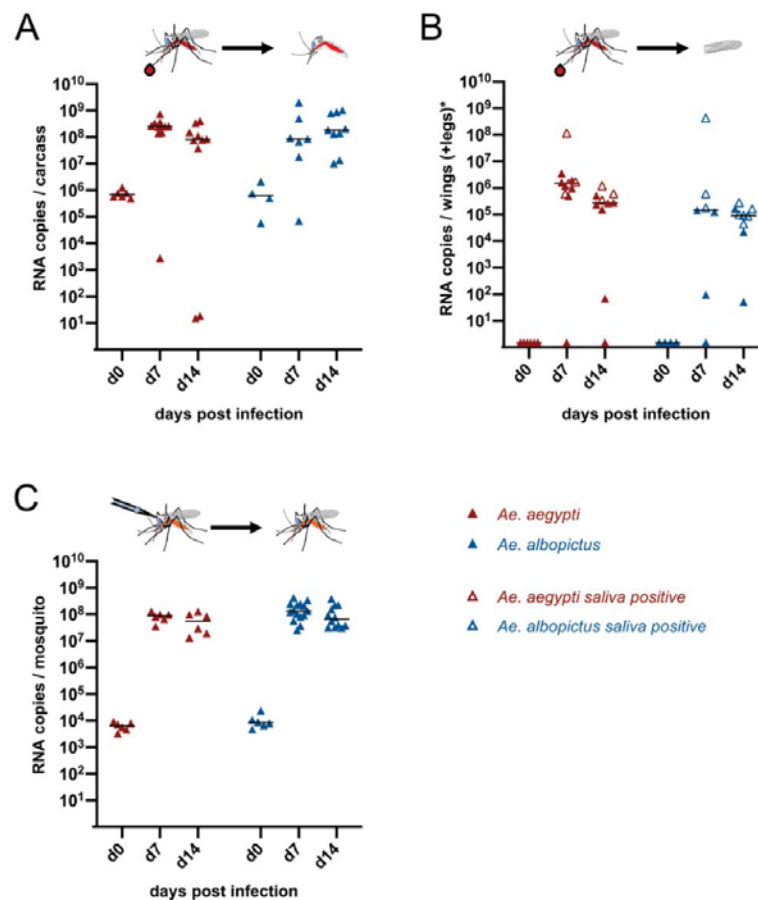
Plaques formed by CHIKV- $\Delta$ DR were similar to those of CHIKV-WT (Figure 1B). To further analyze the growth of CHIKV- $\Delta$ DR in cell culture, we infected different cells with mutant and wild-type CHIKV for growth kinetic analyses. Both viruses readily replicated in vertebrate BHK cells with comparable growth characteristics reaching a titer at 44 h post infection of around  $5 \times 10^8$  (Figure 1C). Efficient growth was also observed in *Ae. albopictus*-derived C6/36 cells with CHIKV-WT growing nearly one log higher than CHIKV- $\Delta$ DR (Figure 1D). Although CHIKV grew less efficiently in *Ae. aegypti*-derived Aag2 cells, viral titers were also reduced for CHIKV- $\Delta$ DR compared to CHIKV-WT at later time points post infection (Figure 1E). These growth characteristics could also be demonstrated using reporter viruses of both variants expressing mCherry within the nsP3 protein (Figure S2) [37].



**Figure 1.** Growth kinetics of wild-type and  $\Delta$ DR mutant CHIKV in different cells. (A) Schematic drawing of the 3' UTRs of wild-type and mutant viruses. For CHIKV- $\Delta$ DR, 130 nt encompassing the DR elements 1a and 2a were deleted. SP = structural protein coding region; CSE = 19 nt long conserved sequence element directly adjacent to the poly A tail. (B) Plaque morphology of CHIKV-WT and CHIKV- $\Delta$ DR in Vero cells. Infected cells were overlaid with agarose. At two days post infection, cells were fixed and subjected to crystal violet staining. (C–E) Growth kinetics of CHIKV-WT and CHIKV- $\Delta$ DR in vertebrate (BHK) and mosquito (C6/36, Aag2) cells. Cells were infected at an MOI of 0.1. Quantification of virus released into the supernatant was performed by titration in BHK cells. Data represent Mean  $\pm$  SD of triplicate infection experiments. Dashed lines: detection limit.

### 3.2. Vector Competence of CHIKV- $\Delta$ DR in *Ae. aegypti* and *Ae. albopictus*

*Ae. aegypti* and *Ae. albopictus* represent known vectors for CHIKV. To confirm that the CHIKV- $\Delta$ DR mutant can also replicate in these mosquitoes, we first infected female *Ae. aegypti* and *Ae. albopictus* orally with the mutant virus using blood meal containing  $1 \times 10^6$  PFU/mL virus (Figure 2A,B). Mosquitoes were dissected either within three hours after feeding (d0) or at d7 or d14 post infection, respectively. Analyses of mosquito carcasses revealed that viral RNA could be detected in all analyzed mosquitoes resulting in infection rates of 100% (Figure 2A, Table 2). The median viral titers increased between d0 and d7 for both *Ae. aegypti* and *Ae. albopictus* indicating that both mosquito species can efficiently be infected orally with the CHIKV- $\Delta$ DR virus (Figure 2A). High median viral titers were sustained up to d14.



**Figure 2.** Infection of *Ae. aegypti* and *Ae. albopictus* with CHIKV- $\Delta$ DR. (A) Infection of mosquitoes after oral feeding with blood meal containing  $1 \times 10^6$  PFU/mL CHIKV- $\Delta$ DR. At 0, 7 and 14 days post infection, mosquitoes were dissected and viral RNA copies were determined in the carcasses of the mosquitoes by real-time RT-PCR. (B) Dissemination of virus into secondary tissues after oral infection. At the indicated time points, viral RNA copies in wings and legs (*Ae. aegypti*) or wings (*Ae. albopictus*) were determined by real-time RT-PCR. Open symbols indicate disseminated mosquitoes for which transmission into saliva was also detected. (C) Intrathoracic infection of mosquitoes using 200 PFU of CHIKV- $\Delta$ DR. At the indicated time points viral load in the whole mosquitoes was determined using real-time RT-PCR. Each point represents a single female mosquito. The black line indicates the median of the viral RNA copies in each group.



To analyze for dissemination, the wings and legs of *Ae. aegypti* were pooled and viral RNA copies were measured. For *Ae. aegypti*, the dissemination rate was at least 90% at d7 or d14, respectively (Table 2). Since *Ae. albopictus* were orally fed using cotton swabs instead of a Hemotek, the legs might have been potentially contaminated with virus from the blood meal. Hence, for *Ae. albopictus* only wings were taken to measure the ability of dissemination, which was determined to be 85.7% at d7 or 100% at d14, respectively (Figure 2B, Table 2). To determine whether disseminated virus was also able to reach the salivary glands, we collected the saliva of the mosquitoes and analyzed the samples again via RT-PCR. Transmission could be observed at d7 for 4 out of 10 disseminated *Ae. aegypti* (transmission rate 40%) or at d14 for 3 out of 9 disseminated *Ae. aegypti* (transmission rate 33.3%), respectively (Figure 2B, Table 2). Overall, this yielded transmission efficiencies of 36.4% (d7) or 30% (d14). For *Ae. albopictus* the transmission rates of 50% (d7) and 66.6% (d14), respectively, were obtained resulting in transmission efficiencies of 42.9% (d7) and 66.7% (d14) (Table 2).

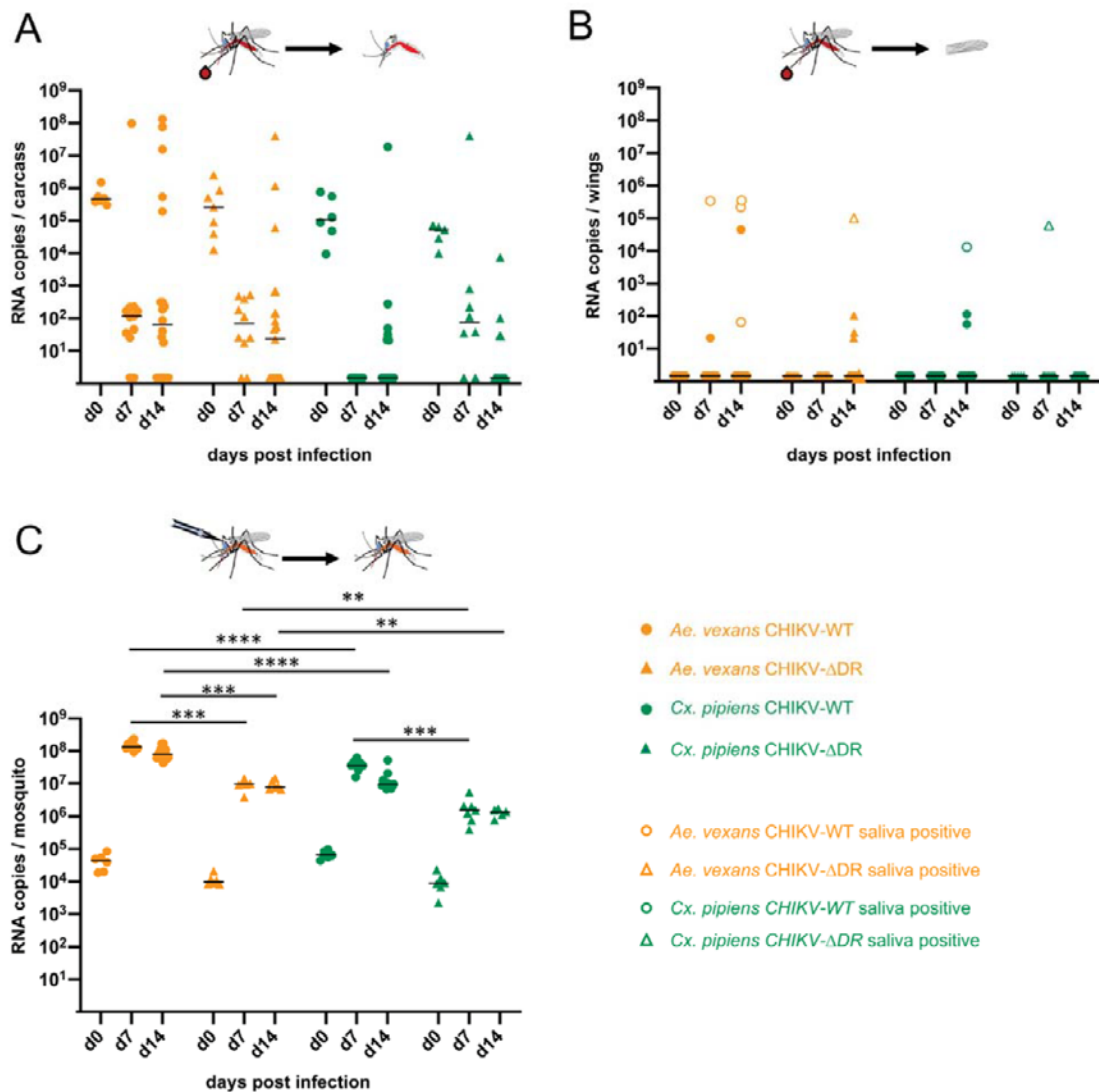
**Table 2.** Infection, dissemination, transmission rates, and transmission efficiencies for CHIKV- $\Delta$ DR at d7 and d14 post infection in *Ae. aegypti* and *Ae. albopictus*.

Mosquito Species	Virus	Days Post Infection (%)	Infection Rate (%)	Dissemination Rate (%)	Transmission Rate (%)	Transmission Efficiency (%)
<i>Aedes aegypti</i>	$\Delta$ DR	7	11/11 100%	10/11 90.9%	4/10 40%	4/11 36.4%
		14	10/10 100%	9/10 90%	3/9 33.3%	3/10 30%
<i>Aedes albopictus</i>	$\Delta$ DR	7	7/7 100%	6/7 85.7%	3/6 50%	3/7 42.9%
		14	9/9 100%	9/9 100%	6/9 66.6%	6/9 66.7%

While the median infectivity titers increased after oral infection for both *Ae. aegypti* and *Ae. albopictus*, individual *Ae. aegypti* showed only a low viral titer at d7 or d14 post infection in the carcasses (Figure 2A). We therefore also analyzed for *Ae. aegypti* as well as for *Ae. albopictus* as to which extent virus replication occurs when circumventing the midgut barrier. To this end *Ae. aegypti* and *Ae. albopictus* were intrathoracally infected with 200 PFU of CHIKV- $\Delta$ DR. Viral RNA levels were analyzed at d0 from whole mosquitoes to verify the viral input level and at d7 and d14 post infection to analyze for viral replication. As can be seen in Figure 2C, the median titers increased for all d7 and d14 samples compared to the d0 time point demonstrating that CHIKV- $\Delta$ DR replicates efficiently in *Ae. aegypti* and *Ae. albopictus* after circumventing the midgut barrier. This suggests that individual *Ae. aegypti* with low viral titers in the carcasses had insufficient oral virus uptake.

### 3.3. Vector Competence of CHIKV- $\Delta$ DR and CHIKV-WT in *Ae. vexans* and *Cx. pipiens*

*Ae. albopictus* is known to have invaded areas of Europe [44]. To analyze whether other mosquito species in temperate regions are also competent for CHIKV and whether DR elements in the 3' UTR have an impact on possible infection, dissemination and transmission rates, we performed infection experiments with *Ae. vexans* and *Cx. pipiens* (Figure 3).



**Figure 3.** Infection of *Ae. vexans* and *Cx. pipiens* with CHIKV-WT and CHIKV-ΔDR. (A) Infection of mosquitoes after oral feeding with blood meal containing  $1 \times 10^6$  PFU/mL CHIKV-WT or CHIKV-ΔDR. At d0, d7, and d14 post infection, mosquitoes were dissected and viral RNA copies were determined in the carcasses of the mosquitoes by real-time RT-PCR. (B) Dissemination of virus into secondary tissues after oral infection. At the indicated time points, viral RNA copies in the wings were determined. Open symbols indicate disseminated mosquitoes for which also transmission into saliva was detected. (C) Intrathoracic infection of mosquitoes using 200 PFU of CHIKV-WT or CHIKV-ΔDR. At the indicated time points viral load in the whole mosquitoes was determined. Each symbol represents a single female mosquito. The black line indicates the median of the viral RNA copies in each group (\*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ ; \*\*\*\*  $p < 0.0001$ ).

Female *Ae. vexans* and *Cx. pipiens* were orally fed with a blood meal containing  $1 \times 10^6$  PFU/mL CHIKV-WT or CHIKV-ΔDR, respectively (Figure 3A,B). Analysis of the viral titers in the *Ae. vexans* carcasses at d7 and d14 post infection revealed infection rates for CHIKV-WT of 83.3% (d7) and 65% (d14), and for CHIKV-ΔDR of 80% (d7) and 47.8% (d14), respectively (Figure 3A, Table 3). To assess whether infected *Ae. vexans* are able to disseminate the viruses, wings were analyzed for genomic RNA of CHIKV (Figure 3B). At the early time point of 7 days post infection, the dissemination rate for CHIKV-WT was 20% at d7 and increased to 30.8% at d14. An increase of the dissemination rate over time

was also observed for CHIKV- $\Delta$ DR (0%, d7 and 36.4%, d14) (Table 3). Transmission rates in *Ae. vexans* were in the range of 50–75% at d7 or d14 for CHIKV-WT, whereas only a transmission rate up to 25% was observed for CHIKV- $\Delta$ DR at d14 post infection. Altogether, this resulted in transmission efficiencies of 8.3% (d7) and 15% (d14) for CHIKV-WT in *Ae. vexans*, which however were not significantly higher than the transmission efficiencies of CHIKV- $\Delta$ DR with 0% (d7) and 4.3% (d14).

**Table 3.** Infection, dissemination, transmission rates, and transmission efficiencies for CHIKV-WT and CHIKV- $\Delta$ DR at d7 and d14 post infection in *Ae. vexans* and *Cx. pipiens*.

Mosquito Species	Virus	Days Post Infection (%)	Infection Rate (%)	Dissemination Rate (%)	Transmission Rate (%)	Transmission Efficiency (%)
<i>Aedes vexans</i>	WT	7	10/12 83.3%	2/10 20%	1/2 50%	1/12 8.3%
		14	13/20 65%	4/13 30.8%	3/4 75%	3/20 15%
	$\Delta$ DR	7	8/10 80%	0/8 0%	0/0 n.a.	0/10 0%
		14	11/23 47.8%	4/11 36.4%	1/4 25%	1/23 4.3%
<i>Culex pipiens</i>	WT	7	0/9 0%	0/0 n.a.	0/0 n.a.	0/9 0%
		14	6/20 30%	3/6 50%	1/3 33.9%	1/20 5%
	$\Delta$ DR	7	6/8 75%	1/6 16.6%	1/1 100%	1/8 12.5%
		14	4/14 28.5%	0/4 0%	0/0 n.a.	0/14 0%

In case of *Cx. pipiens*, viral RNA could be detected after oral feeding in the mosquito carcasses to 0% (d7) and 30% (d14) for CHIKV-WT and 75% (d7) and 28.5% (d14) for CHIKV- $\Delta$ DR (Figure 3A and Table 3). Dissemination occurred rather sporadically and was found in three mosquitoes infected with CHIKV-WT at d14 and one mosquito infected with CHIKV- $\Delta$ DR at d7 post infection (Figure 3B, Table 3). Viral RNA in the saliva could be detected for the two mosquitoes where the viral load in the wings was above  $1 \times 10^4$  RNA copies, namely once for CHIKV-WT (d14) and once for CHIKV- $\Delta$ DR (d7) suggesting a low potential for transmission (Figure 3B, Table 3).

For both *Ae. vexans* as well as *Cx. pipiens* it was observed that once increased viral titers were found in the carcasses, the virus was usually also able to disseminate and reach the salivary glands. This suggested that the midgut barrier represents the main barrier with regard to vector competence. To further support this finding, we infected *Ae. vexans* and *Cx. pipiens* intrathoracally using again 200 PFU with CHIKV-WT or CHIKV- $\Delta$ DR, respectively. As can be seen in Figure 3C, analyses of the whole mosquitoes revealed efficient virus replication. CHIKV-WT replicated significantly higher in *Ae. vexans* compared to CHIKV- $\Delta$ DR at both d7 and d14 post infection ( $p = 0.0002$  or  $p = 0.0003$ , respectively). For *Cx. pipiens* a significant difference for CHIKV-WT in comparison to CHIKV- $\Delta$ DR was only observed at d7 post infection ( $p = 0.0037$ ). Furthermore, differences were obtained comparing mosquito species. CHIKV-WT replicated significantly higher in *Ae. vexans* compared to *Cx. pipiens* ( $p < 0.0001$  for d7 and d14) and also replication of CHIKV- $\Delta$ DR resulted in significant differences at d7 ( $p = 0.0023$ ) and d14 ( $p = 0.0043$ ). Furthermore, significant differences were obtained comparing the viral loads of CHIKV- $\Delta$ DR after intrathoracic injection in *Ae. aegypti* (Figure 2) to the ones obtained in *Cx. pipiens* ( $p = 0.0012$ , d7 and  $p = 0.0043$ , d14). The differences were even more significant comparing the replication rates of CHIKV- $\Delta$ DR after intrathoracic injection of *Ae. albopictus* (Figure 2) with the



ones of *Cx. pipiens* ( $p < 0.0001$ , d7 and  $p < 0.0003$ , d14) suggesting that replication rates in the secondary tissues differ among both mosquito species and genus.

#### 4. Discussion

The presence of repetitive elements in alphaviruses was already described over 20 years ago [20,21,45]. The number and arrangement of these direct repeat elements varies not only among different alphavirus species but also within species. In the Venezuelan equine encephalitis virus complex as well as for Ross River virus, isolates from mosquitoes in nature with various numbers of repeat elements have been described but their impact on ecology and pathogenesis is not well understood [21,46]. Comparison of the CHIKV genotypes likewise revealed various arrangements of repeat elements within the 3' UTR [22]. The authors suggested that these differences were a result of an evolutionary process in order to especially adapt to mosquitoes rather than to host species. We investigated whether deletion of the DR elements DR1a and DR2a in CHIKV Mauritius belonging to the IO lineage affects viral replication in cell cultures or mosquitoes. While growth in vertebrate BHK cells was not affected for the mutant, the deletion resulted in reduced growth in *Ae. albopictus* mosquito cells. Similar results were already described many years ago for a Sindbis virus (SINV) deletion mutant and more recently for CHIKV deletion mutants of the Asian genotype as well as the IO lineage [22,26,47,48]. For SINV, viable virus was still recovered after removing up to 293 nt in the 3' UTR so that only 25 nt from the 3' terminus of the genome including the CSE element and one nucleotide 3' of the UGA termination codon of the structural proteins was retained [47]. The resulting SINV mutant grew less efficiently in mosquito cells than in vertebrate cells and was in general more impaired than variants with smaller 3' UTR deletions. Deletion of different numbers and sets of DR elements based on a Caribbean CHIKV isolate also resulted in reduced growth in mosquito C6/36 cells, whereby the growth was more restricted for the mutant with the larger deletion [26]. The same authors also deleted both the DR1ab and DR2ab motifs in CHIKV La Reunion belonging also to the IO lineage. This decreased the growth in C6/36 cells of about 3–4 logs while deletion of only DR1a and DR2a in our Mauritius isolate resulted in a reduction of about only 1 log supporting the finding that the size of deletion correlates with the level of growth reduction.

Although *Ae. aegypti* is known to be a main vector for CHIKV, *Ae. aegypti* derived Aag2 cells did not support the replication of CHIKV Mauritius as efficiently as C6/36 cells. After infection with the same MOI of 0.1, increase of viral titers was delayed and only peaked around  $10^5$  PFU/mL. Other studies also describe a comparatively low replication of CHIKV in Aag2 cells [49]. The efficiency of CHIKV release from Aag2 cells in comparison to C6/36 cells also seems to vary between different CHIKV isolates. Viral RNA copies in the supernatant of Aag2 cells increased faster within 24 h for a CHIKV belonging to the Asian genotype compared to CHIKV of the IO lineage belonging to the ECSA genotype [50]. Nevertheless, as observed for C6/36 cells, replication of CHIKV- $\Delta$ DR was also impaired in Aag2 cells. As discussed previously, the phenotypic differences observed between vertebrate and mosquito cells might be attributed to different 3' UTR binding proteins [47]. In line with this hypothesis, functional differences between 3' UTRs in vertebrate and insect cells were described with regard to translation. A motif of repetitive sequence elements in the 3' UTR was found to be involved in translation of SINV genomic and subgenomic mRNAs in mosquito cells but not in vertebrate cells [51]. It was discussed that such repetitive motifs might have been acquired during evolution to extend the host range towards mosquitoes [51].

Despite the fact that the deletion mutant showed reduced growth in mosquito cells compared to its wild-type counterpart, it readily could infect and disseminate in the well-known mosquito vectors *Ae. aegypti* and *Ae. albopictus* both after oral and intrathoracic infection. Recent studies based on a Caribbean isolate compared a 3' UTR mutant with several DR elements deleted to the wild-type virus with regard to infection, dissemination and transmission rates in *Ae. aegypti* and *Ae. albopictus* mosquitoes [27]. These analyses

showed that the wild-type virus had a shorter extrinsic incubation period and it was found that the replication kinetics determine the ability to escape from the midgut. The slower replicating viruses encompassing the 3' UTR deletion were less able to cross the midgut barrier as was shown in competition experiments with the wild-type virus [27]. Increased viral titers were also observed for the wild-type virus compared to the deletion mutant after intrathoracic infection but only at the earlier time points after infection (d2 and d4) [27]. This is in accordance with our findings that no significant differences between mutant and wild-type virus were obtained after intrathoracic injection in *Ae. vexans* or *Cx. pipiens*, respectively, when analyzing samples from d7 and d14 post infection.

However, statistically significant differences were obtained when comparing one type of virus in different mosquito species. After intrathoracic infection with CHIKV- $\Delta$ DR the viral titers increased by 4 logs in both *Ae. aegypti* and *Ae. albopictus* (Figure 2C) whereas an increase of only 3 or 2 logs was observed for *Ae. vexans* or *Cx. pipiens*, respectively (Figure 3C). Similarly, the intrathoracically injected CHIKV-WT replicated to higher titers in *Ae. vexans* compared to *Cx. pipiens*. Hence, the midgut escape barrier does not seem to be the only factor influencing vector competence of mosquitoes. Also, replication kinetics in the secondary tissues seem to differ between mosquito species.

Both factors would also result in a longer extrinsic incubation period of CHIKV in *Ae. vexans* and *Cx. pipiens* compared to *Ae. aegypti* and *Ae. albopictus* after oral infection. This is supported by the fact that for *Ae. vexans* high viral titers within the body were not observed until d14, the time point where also the majority of mosquitoes with disseminated virus was observed (Figure 3A,B). Furthermore, detection of virus in the saliva was mainly observed in samples with high viral load in the wings suggesting that efficient replication in the secondary tissues to reach a certain threshold is critical for transmission. Although less *Cx. pipiens* mosquitoes were infected after oral feeding compared to *Ae. vexans*, dissemination as well as transmission was observed when  $10^4$  or more RNA copies were detected in the wings. This indicates that *Cx. pipiens* potentially could serve as a vector. To our knowledge this is the first study analyzing the vector competence of *Cx. pipiens* from Germany for CHIKV. Previous studies investigated the vector competence of *Ae. vexans* and *Cx. pipiens* using mosquitoes hatched from larvae or pupae sampled in France or Italy [52,53]. Whereas *Ae. vexans* from France as well as *Cx. pipiens* from both France and Italy were refractory to CHIKV infection, a low disseminated infection rate was observed in *Ae. vexans* from Italy based on immunofluorescence analyses of head squashes [52,53]. Analyses of another *Aedes* species, namely *Aedes geniculatus* originating from Albania revealed that they are susceptible to CHIKV and could transmit the virus although a longer extrinsic incubation period was observed compared to *Ae. albopictus* [54]. CHIKV positive *Cx. pipiens* were also detected during an outbreak in the Amazon region of Brazil. Since only mosquito pools were analyzed using PCR, no statement on the transmission rate could be made [55]. Nevertheless, our results indicate that other mosquito species than the well-established *Ae. aegypti* and *Ae. albopictus* may serve as competent mosquito vectors not only under laboratory conditions.

## 5. Conclusions

Our results demonstrate that the well-known CHIKV vectors *Ae. aegypti* and *Ae. albopictus* are also competent vectors for CHIKV exhibiting a two DR element deletion in the 3' UTR. Testing two mosquito species, *Ae. vexans* and *Cx. pipiens*, for which little data on vector competence is currently available, demonstrated single mosquito individuals for which both CHIKV-WT and CHIKV- $\Delta$ DR were able to overcome the midgut infection barrier and appeared in the saliva 7 or 14 days after oral infection. Together with the finding that these mosquito species replicated CHIKV-WT and CHIKV- $\Delta$ DR in secondary tissue very efficiently after intrathoracic infection, both mosquito species may eventually transmit CHIKV also in nature.



**Supplementary Materials:** The following are available online at <https://www.mdpi.com/1999-4915/13/3/403/s1>, Figure S1: CHIKV real-time PCR; Figure S2: Expression of mCherry from CHIKV-WT and CHIKV- $\Delta$ DR reporter viruses at different time points after infection.

**Author Contributions:** Conceptualization, M.P. and B.M.K.; methodology, Y.K., A.v.H., J.W., M.P. and B.M.K.; validation, Y.K., A.v.H., J.W., M.P. and B.M.K.; formal analysis, A.v.H. and M.P.; investigation, Y.K., A.v.H., J.W., M.P. and B.M.K.; resources, Y.K., M.P. and B.M.K.; writing—original draft preparation, B.M.K.; writing—review and editing, Y.K., A.v.H. and M.P.; visualization, A.v.H. and B.M.K.; supervision, M.P. and B.M.K.; project administration, M.P. and B.M.K.; funding acquisition, M.P. and B.M.K. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was funded by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG, German Research Foundation)—KU 1201/4-2 (SPP 1596/1) and Project-ID 369799452-TRR237 to B.M.K.; PF 723/1-1 (SPP 1596/1) to M.P.

**Acknowledgments:** We thank Romeo Bellini (Centro Agricoltura Ambiente, Italy) for kindly providing *Ae. albopictus* and Ramona Dahl, Federal Environment Agency, Berlin, Germany, for providing *Ae. aegypti*. Furthermore, we are grateful to Roland Kuhn (formerly Johannes Gutenberg University, Mainz, Germany) for kindly giving us *Ae. vexans* ‘TAMU’ and *Cx. pipiens molestus*. A big thank you goes to Cornelia Silaghi and Marlene Hausner for support in rearing *Ae. vexans* and *Cx. pipiens* mosquitoes. All members of the Institute of Animal Hygiene and Veterinary Public Health are warmly acknowledged for their help in maintaining the mosquito colonies.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

- Weaver, S.C.; Barrett, A.D. Transmission cycles, host range, evolution and emergence of arboviral disease. *Nat. Rev. Microbiol.* **2004**, *2*, 789–801. [[CrossRef](#)]
- Pialoux, G.; Gaüzère, B.A.; Jauréguiberry, S.; Strobel, M. Chikungunya, an epidemic arbovirolosis. *Lancet Infect Dis.* **2007**, *7*, 319–327. [[CrossRef](#)]
- Ross, R.W. The Newala epidemic. III. The virus: Isolation, pathogenic properties and relationship to the epidemic. *J. Hyg. (Lond.)* **1956**, *54*, 177–191. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Pastorino, B.; Muyembe-Tamfum, J.J.; Bessaud, M.; Tock, F.; Tolou, H.; Durand, J.P.; Peyrefitte, C.N. Epidemic resurgence of Chikungunya virus in democratic Republic of the Congo: Identification of a new central African strain. *J. Med. Virol.* **2004**, *74*, 277–282. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Sergon, K.; Njuguna, C.; Kalani, R.; Ofula, V.; Onyango, C.; Konongoi, L.S.; Bedno, S.; Burke, H.; Dumilla, A.M.; Konde, J.; et al. Seroprevalence of Chikungunya virus (CHIKV) infection on Lamu Island, Kenya, October 2004. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2008**, *78*, 333–337. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Sergon, K.; Yahaya, A.A.; Brown, J.; Bedja, S.A.; Mlindasse, M.; Agata, N.; Allaranger, Y.; Ball, M.D.; Powers, A.M.; Ofula, V.; et al. Seroprevalence of Chikungunya virus infection on Grande Comore Island, union of the Comoros, 2005. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2007**, *76*, 1189–1193. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Renault, P.; Solet, J.L.; Sissoko, D.; Balleydier, E.; Larrieu, S.; Filleul, L.; Lassalle, C.; Thiria, J.; Rachou, E.; de Valk, H.; et al. A major epidemic of chikungunya virus infection on Reunion Island, France, 2005–2006. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2007**, *77*, 727–731. [[CrossRef](#)]
- Chastel, C. Chikungunya virus: Its recent spread to the southern Indian Ocean and Reunion Island (2005–2006). *Bull. Acad. Natl. Med.* **2005**, *189*, 1827–1835. [[PubMed](#)]
- Lahariya, C.; Pradhan, S.K. Emergence of chikungunya virus in Indian subcontinent after 32 years: A review. *J. Vector Borne Dis.* **2006**, *43*, 151–160. [[PubMed](#)]
- Naresh Kumar, C.V.; Sai Gopal, D.V. Reemergence of Chikungunya virus in Indian Subcontinent. *Indian J. Virol.* **2010**, *21*, 8–17. [[CrossRef](#)]
- Tsetsarkin, K.A.; Vanlandingham, D.L.; McGee, C.E.; Higgs, S. A single mutation in chikungunya virus affects vector specificity and epidemic potential. *PLoS Pathog.* **2007**, *3*, e201. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Vazeille, M.; Moutailler, S.; Coudrier, D.; Rousseaux, C.; Khun, H.; Huerre, M.; Thiria, J.; Dehecq, J.S.; Fontenille, D.; Schuffenecker, I.; et al. Two Chikungunya isolates from the outbreak of La Reunion (Indian Ocean) exhibit different patterns of infection in the mosquito, *Aedes albopictus*. *PLoS ONE* **2007**, *2*, e1168. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Rezza, G.; Nicoletti, L.; Angelini, R.; Romi, R.; Finarelli, A.C.; Panning, M.; Cordioli, P.; Fortuna, C.; Boros, S.; Magurano, F.; et al. Infection with chikungunya virus in Italy: An outbreak in a temperate region. *Lancet* **2007**, *370*, 1840–1846. [[CrossRef](#)]
- Calba, C.; Guerbois-Galla, M.; Franke, F.; Jeannin, C.; Auzet-Caillaud, M.; Grard, G.; Pigaglio, L.; Decoppet, A.; Weicherding, J.; Savaill, M.C.; et al. Preliminary report of an autochthonous chikungunya outbreak in France, July to September 2017. *Euro Surveill.* **2017**, *22*. [[CrossRef](#)]

15. Leparc-Goffart, I.; Nougairede, A.; Cassadou, S.; Prat, C.; de Lamballerie, X. Chikungunya in the Americas. *Lancet* **2014**, *383*, 514. [CrossRef]
16. Pan American Health Organization/World Health Organization (PAHO/WHO). Geographic Spread of Chikungunya in the Americas, December 2013–December 2017. Available online: [https://ais.paho.org/hip/viz/ed\\_chikungunya\\_amro.asp](https://ais.paho.org/hip/viz/ed_chikungunya_amro.asp) (accessed on 25 January 2021).
17. Lanciotti, R.S.; Valadere, A.M. Transcontinental movement of Asian genotype chikungunya virus. *Emerg. Infect. Dis.* **2014**, *20*, 1400–1402. [CrossRef]
18. Kuhn, R.J. Togaviridae. In *Fields Virology*, 6th ed.; Knipe, D.M., Howley, P.M., Eds.; Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, PA, USA, 2013; Volume 1, pp. 629–650.
19. Frolov, I.; Hardy, R.; Rice, C.M. Cis-acting RNA elements at the 5′ end of Sindbis virus genome RNA regulate minus- and plus-strand RNA synthesis. *RNA* **2001**, *7*, 1638–1651. [CrossRef] [PubMed]
20. Ou, J.H.; Trent, D.W.; Strauss, J.H. The 3′-non-coding regions of alphavirus RNAs contain repeating sequences. *J. Mol. Biol.* **1982**, *156*, 719–730. [CrossRef]
21. Pfeffer, M.; Kinney, R.M.; Kaaden, O.R. The alphavirus 3′-nontranslated region: Size heterogeneity and arrangement of repeated sequence elements. *Virology* **1998**, *240*, 100–108. [CrossRef]
22. Chen, R.; Wang, E.; Tssetsarkin, K.A.; Weaver, S.C. Chikungunya virus 3′ untranslated region: Adaptation to mosquitoes and a population bottleneck as major evolutionary forces. *PLoS Pathog.* **2013**, *9*, e1003591. [CrossRef]
23. Volk, S.M.; Chen, R.; Tssetsarkin, K.A.; Adams, A.P.; Garcia, T.I.; Sall, A.A.; Nasar, F.; Schuh, A.J.; Holmes, E.C.; Higgs, S.; et al. Genome-scale phylogenetic analyses of chikungunya virus reveal independent emergences of recent epidemics and various evolutionary rates. *J. Virol.* **2010**, *84*, 6497–6504. [CrossRef] [PubMed]
24. Sahadeo, N.; Mohammed, H.; Allicock, O.M.; Auguste, A.J.; Widen, S.G.; Badal, K.; Pulchan, K.; Foster, J.E.; Weaver, S.C.; Carrington, C.V. Molecular Characterisation of Chikungunya Virus Infections in Trinidad and Comparison of Clinical and Laboratory Features with Dengue and Other Acute Febrile Cases. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2015**, *9*, e0004199.
25. Hyde, J.L.; Chen, R.; Trobaugh, D.W.; Diamond, M.S.; Weaver, S.C.; Klimstra, W.B.; Wilusz, J. The 5′ and 3′ ends of alphavirus RNAs—Non-coding is not non-functional. *Virus Res.* **2015**, *206*, 99–107. [CrossRef] [PubMed]
26. Filomatori, C.V.; Bardossy, E.S.; Merwaiss, F.; Suzuki, Y.; Henrion, A.; Saleh, M.C.; Alvarez, D.E. RNA recombination at Chikungunya virus 3′UTR as an evolutionary mechanism that provides adaptability. *PLoS Pathog.* **2019**, *15*, e1007706. [CrossRef] [PubMed]
27. Merwaiss, F.; Filomatori, C.V.; Suzuki, Y.; Bardossy, E.S.; Alvarez, D.E.; Saleh, M.C. Chikungunya virus replication rate determines the capacity of crossing tissue barriers in mosquitoes. *J. Virol.* **2021**. [CrossRef]
28. Filomatori, C.V.; Merwaiss, F.; Bardossy, E.S.; Alvarez, D.E. Impact of alphavirus 3′UTR plasticity on mosquito transmission. *Semin. Cell Dev. Biol.* **2020**, *111*, 148–155. [CrossRef]
29. Arias-Goeta, C.; Mousson, L.; Rougeon, F.; Failloux, A.B. Dissemination and transmission of the E1-226V variant of chikungunya virus in *Aedes albopictus* are controlled at the midgut barrier level. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e57548. [CrossRef]
30. Roiz, D.; Neteler, M.; Castellani, C.; Arnoldi, D.; Rizzoli, A. Climatic factors driving invasion of the tiger mosquito (*Aedes albopictus*) into new areas of Trentino, northern Italy. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e14800. [CrossRef]
31. Medlock, J.M.; Hansford, K.M.; Schaffner, F.; Versteirt, V.; Hendrickx, G.; Zeller, H.; Van Bortel, W. A review of the invasive mosquitoes in Europe: Ecology, public health risks, and control options. *Vector Borne Zoonotic Dis.* **2012**, *12*, 435–447. [CrossRef]
32. Sherpa, S.; Blum, M.G.B.; Capblancq, T.; Cumer, T.; Rioux, D.; Després, L. Unravelling the invasion history of the Asian tiger mosquito in Europe. *Mol. Ecol.* **2019**, *28*, 2360–2377. [CrossRef]
33. Goiri, F.; González, M.A.; Goikolea, J.; Oribe, M.; Castro, V.; Delacour, S.; Lucientes, J.; Ortega-Araiztegi, I.; Barandika, J.F.; García-Pérez, A.L. Progressive Invasion of *Aedes albopictus* in Northern Spain in The Period 2013-2018 and A Possible Association with the Increase in Insect Bites. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2020**, *17*, 1678. [CrossRef]
34. ECDC. Mosquito Maps. 2020. Available online: <https://ecdc.europa.eu/en/disease-vectors/surveillance-and-disease-data/mosquito-maps> (accessed on 25 January 2021).
35. Pluskota, B.; Jöst, A.; Augsten, X.; Stelzner, L.; Ferstl, I.; Becker, N. Successful overwintering of *Aedes albopictus* in Germany. *Parasitol. Res.* **2016**, *115*, 3245–3247. [CrossRef]
36. Modlmaier, M.; Kuhn, R.; Kaaden, O.R.; Pfeffer, M. Transmission studies of a European Sindbis virus in the floodwater mosquito *Aedes vexans* (Diptera: Culicidae). *Int. J. Med. Microbiol.* **2002**, *291* (Suppl. 33), 164–170. [CrossRef]
37. Kümmerer, B.M.; Grywna, K.; Gläsker, S.; Wieseler, J.; Drosten, C. Construction of an infectious Chikungunya virus cDNA clone and stable insertion of mCherry reporter genes at two different sites. *J. Gen. Virol.* **2012**, *93* Pt 9, 1991–1995. [CrossRef]
38. Voßmann, S.; Wieseler, J.; Kerber, R.; Kümmerer, B.M. A basic cluster in the N terminus of yellow fever virus NS2A contributes to infectious particle production. *J. Virol.* **2015**, *89*, 4951–4965. [CrossRef]
39. Heitmann, A.; Jansen, S.; Lühken, R.; Leggewie, M.; Schmidt-Chanasit, J.; Tannich, E. Forced Salivation as a Method to Analyze Vector Competence of Mosquitoes. *J. Vis. Exp.* **2018**. [CrossRef]
40. Riswari, S.F.; Ma’roef, C.N.; Djauhari, H.; Kosasih, H.; Perkasa, A.; Yudhaputri, F.A.; Artika, I.M.; Williams, M.; van der Ven, A.; Myint, K.S.; et al. Study of viremic profile in febrile specimens of chikungunya in Bandung, Indonesia. *J. Clin. Virol.* **2016**, *74*, 61–65. [CrossRef]

41. Waggoner, J.J.; Gresh, L.; Vargas, M.J.; Ballesteros, G.; Tellez, Y.; Soda, K.J.; Sahoo, M.K.; Nuñez, A.; Balmaseda, A.; Harris, E.; et al. Viremia and Clinical Presentation in Nicaraguan Patients Infected With Zika Virus, Chikungunya Virus, and Dengue Virus. *Clin. Infect Dis.* **2016**, *63*, 1584–1590. [[CrossRef](#)]
42. Rosen, L.; Gubler, D. The use of mosquitoes to detect and propagate dengue viruses. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **1974**, *23*, 1153–1160. [[CrossRef](#)]
43. Boorman, J. Induction of salivation in biting midges and mosquitoes, and demonstration of virus in the saliva of infected insects. *Med. Vet. Entomol.* **1987**, *1*, 211–214. [[CrossRef](#)]
44. Kraemer, M.U.G.; Reiner, R.C., Jr.; Brady, O.J.; Messina, J.P.; Gilbert, M.; Pigott, D.M.; Yi, D.; Johnson, K.; Earl, L.; Marczak, L.B.; et al. Past and future spread of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. *Nat. Microbiol.* **2019**, *4*, 854–863. [[CrossRef](#)]
45. Strauss, J.H.; Strauss, E.G. The alphaviruses: Gene expression, replication, and evolution. *Microbiol. Rev.* **1994**, *58*, 491–562. [[CrossRef](#)]
46. Faragher, S.G.; Dalgarno, L. Regions of conservation and divergence in the 3′ untranslated sequences of genomic RNA from Ross River virus isolates. *J. Mol. Biol.* **1986**, *190*, 141–148. [[CrossRef](#)]
47. Kuhn, R.J.; Hong, Z.; Strauss, J.H. Mutagenesis of the 3′ nontranslated region of Sindbis virus RNA. *J. Virol.* **1990**, *64*, 1465–1476. [[CrossRef](#)]
48. Morley, V.J.; Noval, M.G.; Chen, R.; Weaver, S.C.; Vignuzzi, M.; Stapleford, K.A.; Turner, P.E. Chikungunya virus evolution following a large 3′UTR deletion results in host-specific molecular changes in protein-coding regions. *Virus Evol.* **2018**, *4*, vey012. [[CrossRef](#)]
49. Roberts, G.C.; Zothner, C.; Remenyi, R.; Merits, A.; Stonehouse, N.J.; Harris, M. Evaluation of a range of mammalian and mosquito cell lines for use in Chikungunya virus research. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 14641. [[CrossRef](#)]
50. Zhang, X.; Huang, Y.; Wang, M.; Yang, F.; Wu, C.; Huang, D.; Xiong, L.; Wan, C.; Cheng, J.; Zhang, R. Differences in genome characters and cell tropisms between two chikungunya isolates of Asian lineage and Indian Ocean lineage. *Virol. J.* **2018**, *15*, 130. [[CrossRef](#)]
51. Garcia-Moreno, M.; Sanz, M.A.; Carrasco, L. A Viral mRNA Motif at the 3′-Untranslated Region that Confers Translatability in a Cell-Specific Manner. Implications for Virus Evolution. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 19217. [[CrossRef](#)]
52. Vazeille, M.; Jeannin, C.; Martin, E.; Schaffner, F.; Failloux, A.B. Chikungunya: A risk for Mediterranean countries? *Acta Trop.* **2008**, *105*, 200–202. [[CrossRef](#)]
53. Talbalaghi, A.; Moutailler, S.; Vazeille, M.; Failloux, A.B. Are *Aedes albopictus* or other mosquito species from northern Italy competent to sustain new arboviral outbreaks? *Med. Vet. Entomol.* **2010**, *24*, 83–87. [[CrossRef](#)]
54. Prudhomme, J.; Fontaine, A.; Lacour, G.; Gantier, J.C.; Diancourt, L.; Velo, E.; Bino, S.; Reiter, P.; Mercier, A. The native European *Aedes geniculatus* mosquito species can transmit chikungunya virus. *Emerg. Microbes Infect* **2019**, *8*, 962–972. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Ribeiro Cruz, A.C.; Pinto Nunes Neto, J.; Patroca da Silva, S.; Vieira Pinto da Silva, E.; Juscely Galvão Pereira, G.; Maia Santos, M.; Antônio de Oliveira Monteiro, H.; Barreto Dos Santos, F.; José de Paula Souza, E.G.R.; Fortes Aragão, C.; et al. Chikungunya virus Detection in *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* during an Outbreak in the Amazon Region. *Viruses* **2020**, *12*, 853. [[CrossRef](#)]



#### 4 Diskussion

Nachdem im Jahr 2007 ein lokaler Ausbruch des CHIKV (E1-A226V) in einer gemäßigten Zone in der italienischen Provinz Ravenna aufgetreten war und vor Ort gefangene *Ae. albopictus* Stechmücken positiv auf CHIKV getestet wurden, stellte sich daraufhin die Frage, ob auch andere Stechmückenarten in gemäßigten Zonen als CHIKV-Vektoren fungieren könnten. In der vorliegenden Studie sollte zum einen untersucht werden, ob auch die Stechmückenarten aus der Gattung *Aedes* und der Gattung *Culex*, die in den gemäßigten Klimazonen Deutschlands vorkommen, als CHIKV-Vektoren fungieren können. Zum anderen: nachdem einige Studien gezeigt haben, dass die repetitiven 3' UTR-Sequenzen im CHIKV-Genom die Virusübertragung beeinflussen, haben wir eine CHIKV 3' UTR-Deletionsmutante mit einer Deletion von DR1a und DR2a in der 3' UTR (CHIKV- $\Delta$ DR) hergestellt und diese bezüglich der Wachstumskinetik mit Chikungunya-Wildtyp-Virus (CHIKV-WT) in C6/36- und Aag2-Stechmückenzellen sowie in BHK-21/J-Wirbeltier-Zellen sowie in vier Stechmückenarten verglichen.

Bei den Stechmücken lag der Schwerpunkt auf in Deutschland vorkommenden Stechmücken *Ae. vexans* und *Cx. pipiens molestus* sowie auf den bekannten Hauptvektoren von CHIKV *Ae. aegypti* und *Ae. albopictus*.

In Experimenten mit Stechmücken wurden diese mit CHIKV- $\Delta$ DR und CHIKV-WT sowohl oral mit je  $1 \times 10^6$  PFU/ml über eine Fütterungsmembran als auch intrathorakal mit je 200 PFU (zur Umgehung der Mitteldarmbarriere) infiziert und an verschiedenen Tagen nach der Infektion und in verschiedenen Körperteilen sowie im Speichel auf virale RNA mittels Real-Time Reverser Transkription-Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR) untersucht.

Schon vor Jahrzehnten wurde darüber berichtet, dass die Alphaviren in der 3' UTR eine Reihe von Sequenzwiederholungen (RSE oder DRs) enthalten (Ou et al. 1982, Pfeffer et al. 1998, Strauss & Strauss 1994). Dennoch gibt es im Vergleich zu zahlreichen Studien über Punktmutationen innerhalb offener Leserahmen des Virusgenoms nur wenige Studien, die sich mit der Evolution und den Faktoren für die Fitness von UTRs befassen (Chen et al. 2013). So sind bislang die Funktionen und die Evolution der CHIKV 3' UTR und der direkten Wiederholungssequenzen nicht vollständig verstanden.

Bemerkenswert ist, dass die Anzahl und die Reihenfolge der direkten Wiederholungssequenzen nicht nur zwischen verschiedenen Alphaviren, sondern auch innerhalb einer Spezies variieren (Pfeffer et al. 1998, Hyde et al. 2015). Dies

betrifft auch das CHIKV, bei dem die verschiedenen Genotypen eine unterschiedliche Anzahl und Anordnung von direkten Wiederholungssequenzen in der 3' UTR-Region (DRs 1, 2 und 3) aufweisen (Chen et al. 2013, Hyde et al. 2015). Chen und seine Ko-Autoren vermuten, dass diese Unterschiede das Ergebnis eines evolutionären Prozesses der Anpassung an Vektoren und nicht an Wirtsarten sind (Chen et al. 2013). Einer der Ansätze zur Erforschung der Funktion von DRs ist die gerichtete Deletion von ausgewählten Elementen der 3' UTR mit anschließender Analyse der Replikationsfähigkeit der entsprechenden CHIKV-Mutante *in vivo* und *in vitro* (Chen et al. 2013).

Beide Viren, das CHIKV-WT und das CHIKV- $\Delta$ DR, zeigten ein vergleichbares Wachstum in Wirbeltier-Zellen (BHK-21/J) und erreichten 44 Stunden nach der Infektion einen Titer von  $5 \times 10^8$  PFU/ml. Das Wachstum beider Viren war auch in von *Ae. albopictus* abgeleiteten C6/36-Stechmückenzellen effizient, wobei CHIKV-WT ein um fast eine Log-Stufe höheres Wachstum zeigte als CHIKV- $\Delta$ DR.

Ähnliche Ergebnisse wurden auch von anderen Autoren in Experimenten mit Deletionsmutanten des Sindbis-Virus (SINV), einem weiteren Vertreter und Prototypvirus des Genus *Alphavirus* beschrieben. So erwiesen sich drei der sechs konstruierten Deletionsmutanten des SINV mit Deletionen jeweils von 31nts, 266nts und 293nt in der 3' UTR als lebensfähig (Kuhn et al. 1990). Die lebensfähige Deletionsmutante mit der längsten Deletion von 293nts, was 92 % der ursprünglichen 3' UTR ausmachte und bei der nur 25nts des 3'-Terminus des Genoms einschließlich des CSE-Elements und eines Nukleotids 3' des UGA-Stoppcodons der Strukturproteine übrig blieben, zeigte ein stark beeinträchtigt Wachstum in C6/36-Stechmückenzellen im Vergleich zum Wachstum in Wirbeltierzellen mit einem Unterschied von mehr als zwei Logstufen. Diese Mutante war auch stärker im Wachstum beeinträchtigt als die beiden anderen lebensfähigen Deletionsmutanten in dieser Studie mit entsprechenden Deletionen von 31nts und 266nts in der 3' UTR (Kuhn et al. 1990). Dass die drei lebensfähigen SINV Deletionsmutanten in C6/36-Stechmückenzellen weniger effizient wachsen als in Wirbeltierzellen, deutet darauf hin, dass in Arthropodenwirten Faktoren vorhanden sind, die spezifisch mit den deletierten Sequenzen interagieren (Kuhn et al. 1990, Chen et al. 2013). Noch weitere drei der sechs Deletionsmutanten in dieser Studie mit der Deletion von 44nts, 317nts und 358nts waren nicht lebensfähig, was darauf hindeutet, dass die 3' UTR von SINV (minimale) Sequenzen enthält, die für die Virusreplikation unerlässlich sind (Kuhn et al. 1990).

Auch die jüngeren Studien in Versuchen mit CHIKV-Deletionsmutanten des asiatischen Genotyps sowie der IO-Linie haben ähnliche Ergebnisse gezeigt (Chen et al. 2013, Filomatori et al. 2019, Morley et al. 2018). In einer von diesen jüngeren Studien mit einem karibischen CHIKV-Isolat, führten die Deletionen verschiedener Anzahlen und Sätze von DR-Elementen in der 3' UTR zu einem verringerten Wachstum in C6/36-Stechmückenzellen. Jedoch hatten die Deletionen keine signifikanten Auswirkungen auf die Virusreplikation in vertebraten BHK-Zellen (Filomatori et al. 2019). Es wurde auch eine positive Korrelation zwischen der Anzahl der deletierten DR-Elemente und den Replikationsraten in Stechmückenzellen beobachtet. Außerdem konnte die Deletion von DR3-Kopien nicht durch DR(1+2) kompensiert werden, was auf eine andere Funktionalität schließen lässt (Filomatori et al. 2019).

Die gleichen Autoren untersuchten auch die Deletion der Sequenzen DR1ab und DR2ab in CHIKV-La Réunion, das ebenfalls wie CHIKV- $\Delta$ DR in unserer Studie zur IO-Linie gehört. Dies führte zu einem um etwa drei bis vier log-Stufen verringerten Wachstum in Stechmückenzellen C6/36 im Vergleich zum Wildtyp-Virus (Filomatori et al. 2019).

In unseren Versuchen mit C6/36-Stechmückenzellen führte die Deletion der DR1a- und DR2a-Sequenzen im 3' UTR (CHIKV- $\Delta$ DR) zu einer Reduktion von nur etwa einer Log-Stufe im Vergleich zum Wildtyp Virus, was die Erkenntnis bestätigt, dass die Größe der Deletion mit dem Ausmaß der Wachstumsreduktion korreliert.

Bemerkenswerterweise zeigte CHIKV-WT in unseren Experimenten ein weniger effizientes Wachstum in von *Ae. aegypti* abgeleiteten Aag2-Stechmückenzellen als in den *Ae. albopictus* abgeleiteten C6/36-Zellen, obwohl *Ae. aegypti* als Hauptvektor für CHIKV gilt. So war nach einer Infektion der Aag2-Stechmückenzellen der Aufstieg des Virustiters verzögert und erreichte erst nach 96 Stunden bei  $10^5$  PFU/ml seinen Höhepunkt. Auch andere Studien beschreiben eine vergleichsweise geringe Replikation von CHIKV in Aag2-Stechmückenzellen (Roberts et al. 2017).

Die Effizienz der CHIKV Freisetzung aus Aag2-Stechmückenzellen im Vergleich zu C6/36-Stechmückenzellen scheint auch zwischen verschiedenen CHIKV-Isolaten zu variieren. So stieg in einer anderen Studie die virale Kopienzahl im Überstand der Aag2-Zellkultur bei der Infektion mit CHIKV des asiatischen Genotyps schneller an, als bei der Infektion mit CHIKV der IO-Linie der ECSA-Genotyp innerhalb der ersten 24 Stunden (Zhang et al. 2018).

Wie auch in der C6/36-Zellkultur, zeigte sich auch die Replikation von CHIKV- $\Delta$ DR auch in Aag2-Stechmückenzenellen beeinträchtigt. Dies deutet darauf hin, dass die Deletionsmutanten ein beeinträchtigt Wachstum in Stechmückenzenellen aufweisen, und noch unbekannte Faktoren in Stechmückenzenellen spezifisch mit den deletierten Sequenzen interagieren (Kuhn et al. 1990).

In Übereinstimmung mit dieser Hypothese wurden funktionelle Unterschiede zwischen 3' UTRs in Wirbeltier- und Insektenzenellen im Hinblick auf die Translation beschrieben. So konnte festgestellt werden, dass ein Motiv aus repetitiven Sequenzelementen in der 3' UTR an der Translation genomischer und subgenomischer mRNAs von SINV in Stechmückenzenellen, nicht aber in Wirbeltierzenellen beteiligt ist (Garcia-Moreno et al. 2016). Es wird vermutet, dass solche, sich wiederholenden Motive im Laufe der Evolution erworben wurden, um das Wirtsspektrum bei den Stechmücken zu erweitern (Garcia-Moreno et al. 2016).

Ein weiterer Fokus dieser Studie war es, die Vektorkompetenz der einheimischen *Ae. vexans*, *Cx. pipiens* Stechmücken für CHIKV-WT zu untersuchen, und wie sich die Deletion der DR-Elemente in CHIKV- $\Delta$ DR im Vergleich zu CHIKV-WT auf die Vektorkompetenz in bekannten CHIKV-Vektoren *Ae. aegypti* und *Ae. albopictus* und einheimischen *Ae. vexans*, *Cx. pipiens* Stechmücken auswirkt.

Trotz, dass die Deletionsmutante im Vergleich zu CHIKV-WT ein vermindertes Wachstum in Stechmückenzenellen zeigte, konnten die bekannten CHIKV-Vektoren *Ae. aegypti* und *Ae. albopictus* erfolgreich in intrathorakalen und oralen Infektionsversuchen infiziert werden.

Die einheimischen Stechmückenarten *Ae. vexans* oder *Cx. pipiens* konnten oral zwar weniger effizient als die CHIKV-Vektoren *Ae. aegypti* und *Ae. albopictus*, aber trotzdem erfolgreich mit CHIKV-WT und CHIKV- $\Delta$ DR infiziert werden. Bei der intrathorakalen Infektion und Umgehung der Mitteldarmbarriere wurde auch bei *Ae. vexans* oder *Cx. pipiens* eine effiziente Virusreplikation beobachtet.

In einer weiteren Studie von Merwaiss und Ko-Autoren (2021) wurden mehrere DR-Elemente in der 3' UTR des karibischen Isolats von CHIKV deletiert und die erhaltene 3' UTR-Deletionsmutante mit dem CHIKV-Wildtyp in Bezug auf Infektions-, Disseminations- und Übertragungsraten in *Ae. aegypti* und *Ae. albopictus* Stechmücken verglichen (Merwaiss et al. 2021). Die Autoren stellten fest, dass in einem oralen Infektionsversuch das Wildtyp-CHIKV im Vergleich zur Deletionsmutante eine kürzere extrinsische Inkubationszeit hatte und, dass die virale Replikationskinetik die Fähigkeit des Virus, aus dem Mitteldarm zu entkommen,

beeinflusst. Neben der Replikationskinetik könnte diese Fähigkeit auch von der initialen Virusdosis beeinflusst werden (Merwaiss et al. 2021). Die langsam replizierende Deletionsmutante war in dieser Studie weniger gut in der Lage, die Mitteldarmbarriere zu überwinden, als CHIKV-WT (Merwaiss et al. 2021). Erhöhte Virustiter wurden auch nach intrathorakaler Infektion bei CHIKV-WT im Vergleich zur Deletionsmutante beobachtet, allerdings nur am Tag 2 und Tag 4 der Infektion, am Tag 6 wiesen die Viren vergleichbare Titer auf (Merwaiss et al. 2021).

In unseren Experimenten kamen wir zu ähnlichen Ergebnissen, und nach einer intrathorakalen Infektion von *Ae. vexans* oder *Cx. pipiens* Stechmücken wurden keine signifikanten Unterschiede in Virusreplikation zwischen Mutanten- und Wildtyp-Viren festgestellt, wenn die Proben von Tag 7 bzw. zwei Wochen nach der Infektion analysiert wurden.

Allerdings gab es statistisch signifikante Unterschiede bei der Analyse der Wachstumsraten eines Virustyps in verschiedenen Stechmückenarten.

So stiegen bei einer intrathorakalen Infektion der Stechmücken mit 200 PFU der CHIKV- $\Delta$ DR die Virustiter bei *Ae. albopictus* und *Ae. aegypti* Stechmücken am Tag 7 und Tag 14 nach der Infektion um vier Logstufen an, während sie bei *Ae. vexans* und *Cx. pipiens* Stechmücken am Tag 7 und Tag 14 nach der Infektion um drei beziehungsweise zwei Logstufen entsprechend zunahmen.

In ähnlicher Weise replizierte CHIKV-WT in einem Versuch mit 200 PFU bei einer intrathorakalen Infektion von Stechmücken mit höheren Titern in *Ae. vexans* als in *Cx. pipiens* Stechmücken. Dies deutet darauf hin, dass die Mitteldarm-Entweichungsbarriere nicht der einzige Faktor ist, der die Vektorkompetenz von Stechmücken beeinflusst. Auch die Replikationskinetik des Virus in den Sekundärgeweben scheint bei den verschiedenen Stechmückenarten unterschiedlich zu sein. Der Einfluss dieser beiden Faktoren bei einer oralen CHIKV-Infektion führt zu einer längeren extrinsischen Inkubationsperiode bei *Ae. vexans* und *Cx. pipiens* Stechmücken im Vergleich zu *Ae. albopictus* und *Ae. aegypti* Stechmücken.

Dies wird auch durch unsere Ergebnisse gestützt, wonach *Ae. vexans* Stechmücken erst nach Tag 14 höhere Virustiter erreichen und erst dann die meisten *Ae. vexans* Stechmücken mit disseminierter Virusinfektion beobachtet wurden.

Bemerkenswert ist auch, dass der Virusnachweis im Speichel meist in Stechmücken mit hoher Viruslast in den Flügeln erfolgte, was auf eine bestimmte Virusreplikationsschwelle in sekundären Geweben hinweist, die erreicht werden muss, damit das Virus im Speichel erscheint und somit potenziell übertragbar wird.



Obwohl in einem oralen CHIKV-Infektionsversuch mit den einheimischen Stechmücken, die *Cx. pipiens* in geringerer Zahl infiziert wurden als die *Ae. vexans*, wurde eine Dissemination des Virus in sekundäres Gewebe sowie ein Übertragungspotenzial beobachtet, da  $10^4$  RNA-Kopien oder mehr in sekundärem Gewebe (Flügel) nachgewiesen werden konnten.

In einer anderen Studie wurde die Empfänglichkeit von in Frankreich gesammelten *Ae. vexans* und *Cx. pipiens* Stechmücken für CHIKV (E1-A226V) untersucht. Es wurden Immunfluoreszenzanalysen von Kopfquetschproben durchgeführt und alle Stechmückenweibchen erwiesen sich als refraktär für eine CHIKV-Infektion (Vazeille et al. 2008). In dieser Studie hat sich jedoch gezeigt, dass andere in Frankreich vorkommende *Aedes* Stechmücken für CHIKV empfänglich sind, nämlich *Ae. detritus* und *Ae. caspius*, die in Immunfluoreszenzanalysen mit Infektionsraten von 67,3 % bzw. 25 % positiv auf CHIKV getestet wurden (Vazeille et al. 2008).

In einer weiteren Studie wurden Eier und Larven von *Ae. vexans* und *Cx. pipiens* in Norditalien gesammelt und die Stechmücken auf ihre Vektorkompetenz für CHIKV (E1-A226V) getestet, während sich *Cx. pipiens* Stechmücken als refraktär für eine CHIKV-Infektion erwiesen, wurden 7,7 % der mittels Immunfluoreszenzanalyse untersuchten Kopfquetschproben von *Ae. vexans* positiv auf CHIKV getestet (Talbalaghi et al. 2010).

In diesen beiden Studien wurde jedoch das Transmissionspotenzial von CHIKV im Speichel nicht untersucht, und es ist nicht möglich zu sagen, ob eine erfolgreiche Übertragung möglich ist.

In einer anderen Studie untersuchten Prudhomme et al. (2019) eine weitere *Aedes* Stechmückenart, nämlich *Ae. geniculatus* aus Albanien, auf ihre Vektorkompetenz für CHIKV (E1-A226V). Obwohl diese Stechmücken im Vergleich zu *Ae. albopictus* eine längere extrinsische Inkubationszeit aufwiesen, nämlich drei und sieben Tage nach der Infektion entsprechend, erwiesen sie sich als empfänglich für CHIKV und kompetent, dieses Virus weiterzugeben (Prudhomme et al. 2019).

In einem anderen Projekt wurden Stechmücken gesammelt und in Pools mittels Real-Time Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion (RT-qPCR) auf CHIKV getestet. Neben der als CHIKV-Vektor bekannten *Ae. aegypti* Stechmücke wurde eine weitere Stechmückenart aus der Gattung *Culex* positiv auf CHIKV getestet, und zwar wurden zwei der insgesamt 234 gesammelten und getesteten *Cx. quinquefasciatus*-Weibchen positiv auf CHIKV-RNA getestet (Cruz et al. 2020). Da die Stechmücken als Ganzes analysiert wurden, ohne eine getrennte Speicheldrüsenanalyse auf

CHIKV, konnte keine Aussage über das Transmissionspotenzial von *Cx. quinquefasciatus* Stechmücken gemacht werden.

Abschließend lässt sich zum Vektorpotenzial einheimischer Stechmücken sagen, dass unsere Studie zur oralen Infektion mit CHIKV zwar nicht viele *Ae. vexans* und *Cx. pipiens* Stechmücken umfasste, jedoch deuten unsere Ergebnisse darauf hin, dass potenziell sowohl einheimische *Ae. vexans* als auch *Cx. pipiens* Stechmücken als Vektoren für CHIKV dienen können, basierend auf dem positiven Nachweis von CHIKV im Speichel der Stechmücken.

## 5 Zusammenfassung

Yauhen Karliuk

### **Einfluss der 3' nichttranslatierten Region von Chikungunya-Virus auf die Replikation in verschiedenen Stechmückenarten**

Institut für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen der Veterinärmedizinischen Fakultät, Universität Leipzig

Eingereicht im Februar 2022

52 Seiten, 7 Abbildungen, 116 Literaturangaben, 1 Publikation

**Schlüsselwörter:** Chikungunya-Virus; 3' UTR; direct repeats (DRs); CHIKV 3' UTR-Deletionsmutante; Vektorkompetenz; *Aedes vexans*; *Culex pipiens*

**Einleitung:** Arthropoden-übertragene Viren (Arboviren) spielen weltweit eine große Rolle für die Gesundheit von Menschen und Tieren. Das Chikungunya-Virus (CHIKV) wird v.a. durch Stechmücken der Gattung *Aedes* übertragen. Die Hauptvektoren sind *Aedes aegypti* (*Ae. aegypti*) und *Aedes albopictus* (*Ae. albopictus*), wobei letzterer sich zunehmend auch in gemäßigten Breiten etabliert.

**Ziele der Untersuchungen:** Zum einen sollte untersucht werden, ob auch die Stechmückenarten *Aedes vexans* (*Ae. vexans*) und *Culex pipiens molestus* (*Cx. pipiens*), die in gemäßigten Klimazonen vorkommen, als CHIKV-Vektoren fungieren können. Zum anderen sollte der Einfluss von Deletionen der Sequenzwiederholungen (DR) in der 3' nichttranslatierten Region (3' UTR) auf die virale Replikation in Zellkultur und in Stechmücken untersucht werden.

**Tiere, Material und Methoden:** Zunächst wurde eine CHIKV 3' UTR-Deletionsmutante mit einer Deletion von DR1a und DR2a in der 3' UTR (CHIKV- $\Delta$ DR) hergestellt und diese bezüglich der Wachstumskinetik mit Chikungunya-Wildtyp-Virus (CHIKV-WT) in C6/36- und Aag2-Stechmückenzellen sowie in BHK-21/J- Wirbeltier-Zellen verglichen. Um die Vektorkompetenz von beiden Viren in Stechmücken zu untersuchen, wurden *Ae. aegypti*, *Ae. albopictus*, *Ae. vexans* und *Cx. pipiens* in einem Insektarium gezüchtet.

Bei den Infektionsexperimenten im S3-Labor wurden insgesamt 27 *Ae. aegypti*, 20 *Ae. albopictus*, 78 *Ae. vexans* und 62 *Cx. pipiens* Stechmücken verwendet. In diesen Experimenten wurden diese mit CHIKV- $\Delta$ DR und CHIKV-WT sowohl oral mit je  $1 \times 10^6$  PFU/ml über eine Fütterungsmembran als auch intrathorakal mit je 200 PFU (zur

Umgehung der Mitteldarmbarriere) infiziert und an verschiedenen Tagen nach der Infektion und in verschiedenen Körperteilen sowie im Speichel auf virale RNA mittels Real-Time Reverser Transkription-Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR) untersucht. Unterschiede in der Virusreplikation wurden entweder mit Mann-Whitney- oder Fisher's Exakt-Test überprüft. Das Signifikanzniveau lag bei  $p < 0,05$ .

### **Ergebnisse:**

Beide Viren, das CHIKV-WT und das CHIKV- $\Delta$ DR, zeigten ein vergleichbares Wachstum in Wirbeltier-Zellen (BHK-21/J) und erreichten einen Titer von  $5 \times 10^8$  PFU/ml. Das Wachstum beider Viren war auch in von *Ae. albopictus* abgeleiteten C6/36- Stechmückenzellen effizient, wobei CHIKV-WT ein um knapp eine Log-Stufe höheres Wachstum zeigte als CHIKV- $\Delta$ DR. In unseren Experimenten zeigte CHIKV-WT ein weniger effizientes Wachstum in von *Ae. aegypti* abgeleiteten Aag2-Stechmückenzellen, als in *Ae. albopictus* abgeleiteten C6/36-Stechmückenzellen, obwohl *Ae. aegypti* als Hauptvektor für CHIKV-WT gilt. In einer intrathorakalen und oralen Infektion konnten sowohl die bekannten CHIKV-Vektoren *Ae. aegypti* und *Ae. albopictus* als auch die einheimische Stechmückenarten *Ae. vexans* und *Cx. pipiens* erfolgreich infiziert werden. Bei einer intrathorakalen Infektion mit Umgehung der Mitteldarmbarriere wurde bei *Ae. vexans* oder *Cx. pipiens* eine effizientere Virusreplikation beobachtet als bei einer oralen Infektion. CHIKV-WT zeigte eine signifikant höhere Replikation in *Ae. vexans* im Vergleich zu CHIKV- $\Delta$ DR am Tag 7 und am Tag 14 nach der Infektion. Bei *Cx. pipiens* wurden signifikante Unterschiede für CHIKV-WT im Vergleich zu CHIKV- $\Delta$ DR nur am Tag 7 beobachtet.

### **Schlussfolgerungen:**

Das beeinträchtigte Wachstum in C6/36- und Aag2-Zellen von CHIKV- $\Delta$ DR deutet darauf hin, dass die deletierten Sequenzwiederholungen spezifisch mit noch unbekanntem Faktoren in Stechmückenzellen interagieren. Dennoch konnte CHIKV- $\Delta$ DR die bekannten CHIKV-Vektoren *Ae. aegypti* und *Ae. albopictus* problemlos nach intrathorakaler und oraler Infektion infizieren. Die Mitteldarm-Entweichungsbarriere scheint also nicht der einzige Faktor zu sein, der die Vektorkompetenz von Stechmücken beeinflusst. Auch die Replikationskinetik des Virus in den Sekundärgeweben scheint bei den verschiedenen Stechmückenarten unterschiedlich zu sein. Zwar umfassten unsere Studien zur oralen Infektion mit CHIKV nur einige einheimische *Ae. vexans* und *Cx. pipiens* Stechmücken, jedoch deuten die Ergebnisse darauf hin, dass diese Stechmücken potenziell als Vektoren für CHIKV dienen können.

## 6 Summary

Yauhen Karliuk

### **Influence of the 3' untranslated region of chikungunya virus on replication in different mosquito species**

Institute for Animal Hygiene and Veterinary Public Health, University of Leipzig,  
Faculty of Veterinary Medicine

Submitted in February 2022

52 pages, 7 figures, 116 references, 1 Publication

**Keywords:** chikungunya virus; 3' UTR; direct repeats (DRs); CHIKV 3' UTR deletion mutant; vector competence; *Aedes vexans*; *Culex pipiens*

**Introduction:** Arthropod-borne viruses (arboviruses) play a major role in human and animal health worldwide. Chikungunya virus (CHIKV) is transmitted primarily by mosquitoes of the genus *Aedes*. The main vectors are *Aedes aegypti* (*Ae. aegypti*) and *Aedes albopictus* (*Ae. albopictus*), with the latter becoming increasingly established in temperate regions.

**Objectives of the studies:** On the one hand, to investigate whether the mosquito species *Aedes vexans* (*Ae. vexans*) and *Culex pipiens molestus* (*Cx. pipiens*), which occur in temperate climates, can also act as CHIKV vectors. On the other hand, to investigate the impact of sequence repeat (DR) deletions in the 3' untranslated region (3' UTR) on viral replication in cell culture and in mosquitoes.

**Animals, material and methods:** We first produced a CHIKV 3' UTR deletion mutant with a deletion of DR1a and DR2a in the 3' UTR (CHIKV- $\Delta$ DR) and compared it with regard to growth kinetics with chikungunya wild-type virus (CHIKV-WT) in C6/36- and Aag2-mosquito cells and in BHK-21/J-vertebrate cells.

To investigate the vector competence of the two viruses in mosquitoes, *Ae. aegypti*, *Ae. albopictus*, *Ae. vexans* and *Cx. pipiens* were reared in an insectarium.

A total of 27 *Ae. aegypti*, 20 *Ae. albopictus*, 78 *Ae. vexans* and 62 *Cx. pipiens* mosquitoes were used in the infection experiments in the S3 laboratory. In these experiments, they were infected with CHIKV- $\Delta$ DR and CHIKV-WT both orally with  $1 \times 10^6$  PFU/ml each via a feeding membrane and intrathoracically with 200 PFU each (to bypass the midgut barrier) and assayed for viral RNA by real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) on different days after infection and in different

body parts and saliva. Differences in viral replication were calculated using the Mann-Whitney-test. For comparison of transmission efficiencies, the Fisher's exact test was applied. For both tests the significance level was set at  $p < 0.05$ .

**Results:** Both viruses, the CHIKV-WT and the CHIKV- $\Delta$ DR, showed comparable growth in vertebrate cells (BHK-21/J) and reached a titer of  $\times 10^8$  PFU/ml. Growth of both viruses was also efficient in *Ae. albopictus* derived C6/36-mosquito cells, where CHIKV-WT showed growth nearly one log level higher than CHIKV- $\Delta$ DR. In our experiments, CHIKV-WT showed less efficient growth in *Ae. aegypti* derived Aag2-mosquito cell than in *Ae. albopictus* derived C6/36-mosquito cell, although *Ae. aegypti* is considered as the main vector for CHIKV-WT. In an intrathoracic and oral infection, both the known CHIKV vectors *Ae. aegypti* and *Ae. albopictus* and the local mosquito species *Ae. vexans* and *Cx. pipiens* could be successfully infected. In intrathoracic infection with bypass of the midgut barrier, more efficient viral replication was observed in *Ae. vexans* or *Cx. pipiens* than in oral infection. CHIKV-WT showed significantly higher replication in *Ae. vexans* compared to CHIKV- $\Delta$ DR at day 7 and day 14 post-infection. In *Cx. pipiens*, significant differences were observed for CHIKV-WT compared to CHIKV- $\Delta$ DR only on day 7.

**Conclusions:** Impaired growth in C6/36- and Aag2- cells of CHIKV- $\Delta$ DR suggests that the deleted sequence repeats specifically interact with yet unknown factors in mosquito cells. Nevertheless, CHIKV- $\Delta$ DR could easily infect the known CHIKV vectors *Ae. aegypti* and *Ae. albopictus* after intrathoracic and oral infection. Thus, the midgut escape barrier does not appear to be the only factor influencing vector competence in mosquitoes. The replication kinetics of the virus in secondary tissues also appear to differ among mosquito species. While our studies on oral infection with CHIKV only included some local *Ae. vexans* and *Cx. pipiens* mosquitoes, the results suggest that these mosquitoes can potentially serve as vectors for CHIKV.

## 7 Literaturverzeichnis

Adouchief S, Smura T, Sane J, Vapalahti O, Kurkela S. Sindbis virus as a human pathogen-epidemiology, clinical picture and pathogenesis. *Rev Med Virol*. 2016; 26(4):221–41.

Allering L, Jöst H, Emmerich P, Günther S, Lattwein E, Schmidt M, Seifried E, Sambri V, Hourfar K, Schmidt-Chanasit J. Detection of Usutu virus infection in a healthy blood donor from south-west Germany, 2012. *Euro Surveill*. 2012; 17(50):20341.

Arankalle VA, Shrivastava S, Cherian S, Gunjekar RS, Walimbe AM, Jadhav SM, Sudeep AB, Mishra AC. Genetic divergence of Chikungunya viruses in India (1963-2006) with special reference to the 2005-2006 explosive epidemic. *J Gen Virol*. 2007; 88(7):1967–76.

Azar SR, Campos RK, Bergren NA, Camargos VN, Rossi SL. Epidemic Alphaviruses: Ecology, Emergence and Outbreaks. *Microorganisms*. 2020; 8(8):1167.

Bardos V, Danielova V. The Tahyna virus-a virus isolated from mosquitoes in Czechoslovakia. *J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol*. 1959; 3(3):264–76.

Becker N, Jöst H, Ziegler U, Eiden M, Höper D, Emmerich P, Fichet-Calvet E, Ehichioya DU, Czajka C, Gabriel M, Hoffmann B, Beer M, Tenner-Racz K, Racz P, Günther S, Wink M, Bosch S, Konrad A, Pfeffer M, Groschup MH, Schmidt-Chanasit J. Epizootic emergence of Usutu virus in wild and captive birds in Germany. *PloS One*. 2012; 7(2):e32604.

Becker N, Krüger A, Kuhn C, Plenge-Bönig A, Thomas SM, Schmidt-Chanasit J, Tannich E. Stechmücken als Überträger exotischer Krankheitserreger in Deutschland. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz*. 2014; 57(5):531.

Becker N, Petric D, Zgomba M, Boase C, Madon M, Dahl C, Kaiser A. Mosquitoes and their control. 2 ed. Heidelberg: Springer; 2010.

Cadar D, Becker N, Mendonca Campos R de M, Börstler J, Jöst H, Schmidt-Chanasit J. Usutu virus in bats, Germany, 2013. *Emerg Infect Dis*. 2014; 20(10):1771.

Cadar D, Lühken R, van der Jeugd H, Garigliany M, Ziegler U, Keller M, Lahoreau J, Lachmann L, Becker N, Kik M, Oude Munnik BB, Bosch S, Tannich E, Linden A,

Schmidt V, Koopmans MP, Rijks J, Desmecht D, Groschup MH, Reusken C, Schmidt-Chanasit J. Widespread activity of multiple lineages of Usutu virus, western Europe, 2016. *Euro Surveill.* 2017a; 22(4):30452.

Cadar D, Maier P, Müller S, Kress J, Chudy M, Bialonski A, Schlaphof A, Jansen S, Jöst H, Tannich E, Runkel S, Hitzler WE, Hutschenreuter G, Wessiepe M, Schmidt-Chanasit J. Blood donor screening for West Nile virus (WNV) revealed acute Usutu virus (USUV) infection, Germany, September 2016. *Euro Surveill.* 2017b; 22(14):30501.

Calba C, Guerbois-Galla M, Franke F, Jeannin C, Auzet-Caillaud M, Grard G, Pigaglio L, Decoppet A, Weicherding J, Savail MC, Munoz-Riviero M, Chaud P, Cadiou B, Ramalli L, Fournier P, Noël H, De Lamballerie X, Paty MC, Leparac-Goffart I. Preliminary report of an autochthonous chikungunya outbreak in France, July to September 2017. *Euro Surveill.* 2017; 22(39):17–647.

Cavrini F, Gaibani P, Longo G, Pierro AM, Rossini G, Bonilauri P, Gerunda GE, Di Benedetto F, Pasetto A, Girardis M, Dottori M, Landini MP, Sambri V. Usutu virus infection in a patient who underwent orthotopic liver transplantation, Italy, August–September 2009. *Euro Surveill.* 2009; 14(50):19448.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC) 1984. Arbovirus Catalog: Batai [zitiert vom 24.10. 2021]: <<https://wwwn.cdc.gov/arbocat/VirusDetails.aspx?ID=52>>.

Chastel C. Chikungunya virus: its recent spread to the southern Indian Ocean and Reunion Island (2005– 2006). *Bull Acad Natl de Med.* 2005; 189(8):1827–35.

Chen R, Mukhopadhyay S, Merits A, Bolling B, Nasar F, Coffey LL, Powers A, Weaver SC. ICTV virus taxonomy profile: Togaviridae. *J Gen Virol.* 2018; 99(6):761–2.

Chen R, Wang E, Tsetsarkin KA, Weaver SC. Chikungunya virus 3' untranslated region: adaptation to mosquitoes and a population bottleneck as major evolutionary forces. *PLoS Pathog.* 2013; 9(8):e1003591.

Das B, Sahu A, Das M, Patra A, Dwibedi B, Kar SK, Hazra RK. Molecular investigations of chikungunya virus during outbreaks in Orissa, Eastern India in 2010. *Infect Genet Evol.* 2012; 12(5):1094–101.



Diallo M, Thonnon J, Traore-Lamizana M, Fontenille D. Vectors of Chikungunya virus in Senegal: current data and transmission cycles. *Am J Trop Med Hyg.* 1999; 60(2):281–6.

Dobler G, Knobloch J. Arbovirus-Infektionen. In: Löscher T, Burchard GD, Hrsg. *Tropenmedizin in Klinik und Praxis mit Reise- und Migrationsmedizin.* 4. Aufl. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2010. S. 268-69.

Eastwood G, Sang RC, Guerbois M, Taracha ELN, Weaver SC. Enzootic circulation of chikungunya virus in East Africa: Serological evidence in non-human Kenyan primates. *Am J Trop Med Hyg.* 2017; 97(5):1399.

Eiden M, Ziegler U, Keller M, Müller K, Granzow H, Jöst H, Schmidt-Chanasit J, Groschup MH. Isolation of Sindbis virus from a hooded crow in Germany. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2014; 14(3):220–2.

Eldridge BF, Scott TW, Day JF, Tabachnick WJ. Arbovirus diseases. In: Eldridge BF & Edman JD, (Eds.). *Medical entomology: a textbook on public health and veterinary problems caused by arthropods.* Netherlands: Kluwer Academic Publishers; 2000. p. 415-460.

Erasmus JH, Rossi SL, Weaver SC. Development of Vaccines for Chikungunya Fever. *J Infect Dis.* 2016; 214(suppl.5):488-96.

European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) 2018. Epidemiological update: West Nile virus transmission season in Europe, 2018 [zitiert vom 12/9/2021]: <<https://www.ecdc.europa.eu/en/news-events/epidemiological-update-west-nile-virus-transmission-season-europe-2018>>.

Filomatori CV, Bardossy ES, Merwaiss F, Suzuki Y, Henrion A, Saleh MC, Alvarez DE. RNA recombination at Chikungunya virus 3' UTR as an evolutionary mechanism that provides adaptability. *PLoS Pathog.* 2019; 15(4):e1007706.

Filomatori CV, Merwaiss F, Bardossy ES, Alvarez DE. Impact of alphavirus 3'UTR plasticity on mosquito transmission. *Semin Cell Dev Biol.* 2021; 111:148–55.

Frank C, Lachmann R, Stark K, Schmidt-Chanasit J, Eisermann P, Lühken R. Autochthone Infektionen mit dem West-Nil-Virus in Deutschland 2018 und 2019. *Epid Bull.* 2020; 25:3–10.

Frolov I, Hardy R, Rice CM. Cis-acting RNA elements at the 5' end of Sindbis virus genome RNA regulate minus- and plus-strand RNA synthesis. *RNA.* 2001; 7(11):1638–51.

Gabriel M, Emmerich P, Frank C, Fiedler M, Rashidi-Alavijeh J, Jochum C, Günther S, Auerhammer K, Rupprecht HJ, Blank RT, Sacher N, Pertzborn L, Stark K, Schrauzer T, Schmidt-Chanasit J. Increase in West Nile virus infections imported to Germany in 2012. *J Clin Virol.* 2013; 58(3):587–9.

Go YY, Balasuriya UBR, Lee CK. Zoonotic encephalitides caused by arboviruses: transmission and epidemiology of alphaviruses and flaviviruses. *Clin Exp Vaccine Res.* 2014; 3(1):58–77.

Gratz N. Vector- and rodent-borne diseases in Europe and North America: distribution, public health burden, and control. New York: Cambridge University Press; 2006, p. 10-32.

Harbach RE. Mosquito Taxonomic Inventory, Culicidae Classification 2008 [zitiert vom 24.10.2021]: <<https://mosquito-taxonomic-inventory.myspecies.info/simpletaxonomy/term/6045>>.

Hofmann M, Wiethölter A, Blaha I, Jöst H, Heinemann P, Lehmann M, Miller T, Cadar D, Yanase T, Kley N, Eiden M, Groschup M, Schmidt-Chanasit J. Surveillance of Batai virus in bovines from Germany. *Clin Vaccine Immunol.* 2015; 22(6):672–3.

Horwood PF, Buchy P. Chikungunya. *Rev. Sci. Tech.* 2015; 34(2):479–89.

Hubálek Z. Mosquito-borne viruses in Europe. *Parasitol Res.* 2008; 103(1):29–43.

Hyde JL, Chen R, Trobaugh DW, Diamond MS, Weaver SC, Klimstra WB, Wilusz J. The 5' and 3' ends of alphavirus RNAs–Non-coding is not non-functional. *Virus Res.* 2015; 206:99–107.

Jose J, Snyder JE, Kuhn RJ. A structural and functional perspective of alphavirus replication and assembly. *Future Microbiol.* 2009; 4(7):837–56.

Jöst H, Bialonski A, Maus D, Sambri V, Eiden M, Groschup MH, Günther S, Becker N, Schmidt-Chanasit J. Isolation of usutu virus in Germany. *Am J Trop Med Hyg.* 2011c; 85(3):551.

Jöst H, Bialonski A, Schmetz C, Günther S, Becker N, Schmidt-Chanasit J. Isolation and phylogenetic analysis of Batai virus, Germany. *Am J Trop Med Hyg.* 2011a; 84(2):241.

Jöst H, Bialonski A, Storch V, Günther S, Becker N, Schmidt-Chanasit J. Isolation and phylogenetic analysis of Sindbis viruses from mosquitoes in Germany. *J Clin Microbiol.* 2010; 48(5):1900–3.

Jöst H, Bürck-Kammerer S, Hütter G, Lattwein E, Lederer S, Litzba N, Bock-Hensley O, Emmerich P, Günther S, Becker N. Medical importance of Sindbis virus in south-west Germany. *J Clin Virol.* 2011b; 52(3):278-9.

Jupp PG, Kemp A. What is the potential for future outbreaks of chikungunya, dengue and yellow fever in southern Africa? *S Afr Med J.* 1996; 86(1):35–7.

Jupp PG, McIntosh BM. *Aedes furcifer* and other mosquitoes as vectors of chikungunya virus at Mica, northeastern Transvaal, South Africa. *J Am Mosq Control Assoc.* 1990; 6(3):415–20.

Kampen H, Schuhbauer A, Walther D. Emerging mosquito species in Germany-a synopsis after 6 years of mosquito monitoring (2011-2016). *Parasitol Res.* 2017; 116(12):3253–63.

Kelvin AA. Outbreak of Chikungunya in the Republic of Congo and the global picture. *J Infect Dev Ctries.* 2011; 5(06):441–4.

Kramer LD, Styer LM, Ebel GD. A global perspective on the epidemiology of West Nile virus. *Annu Rev Entomol.* 2008; 53:61–81.

Krenn HW, Aspöck H. Form, function and evolution of the mouthparts of blood-feeding Arthropoda. *Arthropod Struct Dev.* 2012; 41(2):101–18.

Kumar R, Shrivastava T, Samal S, Ahmed S, Parray HA. Antibody-based therapeutic interventions: possible strategy to counter chikungunya viral infection. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2020; 104(8):3209–28.

Kumar NCVM & Gopal SDVR. Reemergence of Chikungunya virus in Indian subcontinent. *Indian J Virol.* 2010; 21(1):8–17.

Lahariya C, Pradhan SK. Emergence of chikungunya virus in Indian subcontinent after 32 years: A review. *J Vector Borne Dis.* 2006; 43(4):151.

Lam SK, Chua KB, Hooi PS, Rahimah MA, Kumari S, Tharmaratnam M, Chuah SK, Smith DW, Sampson IA. Chikungunya infection-an emerging disease in Malaysia. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 2001; 32(3):447–51.

Lanciotti RS, Valadere AM. Transcontinental movement of Asian genotype chikungunya virus. *Emerg Infect Dis.* 2014; 20(8):1400.

Lehane MJ. Ingestion of the blood meal. In: Lehane MJ, Hrsg. *Biology of Blood-Sucking Insects.* Dordrecht: Springer; 1991. p. 69-70.

Leparc-Goffart I, Nougairede A, Cassadou S, Prat C, Lamballerie X de. Chikungunya in the Americas. *Lancet.* 2014; 383(9916):514.

Leroy EM, Nkoghe D, Ollomo B, Nze-Nkogue C, Becquart P, Grard G, Pourrut X, Charrel R, Moureau G, Ndjoyi-Mbiguino A. Concurrent chikungunya and dengue virus infections during simultaneous outbreaks, Gabon, 2007. *Emerg Infect Dis.* 2009; 15(4):591.

Li W, Cao Y, Fu S, Wang J, Li M, Jiang S, Wang X, Xing S, Feng L, Wang Z, Shi Y, Zhao S, Wang H, Wang Z, Liang G. Tahyna virus infection, a neglected arboviral disease in the Qinghai-Tibet Plateau of China. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2014; 14(5):353–7.

Li G, Rice CM. The signal for translational readthrough of a UGA codon in Sindbis virus RNA involves a single cytidine residue immediately downstream of the termination codon. *J Virol.* 1993; 67(8):5062–7.

Ligon BL. Reemergence of an unusual disease: the chikungunya epidemic. *Semin Pediatr Infect Dis.* 2006; 17(2):99–104.

Lum FM, Ng LFP. Cellular and molecular mechanisms of chikungunya pathogenesis. *Antiviral Res.* 2015; 120:165–74.

Lundström JO, Pfeffer M. Phylogeographic structure and evolutionary history of Sindbis virus. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2010; 10(9):889–907.

Maclachlan NJ, Dubovi EJ, Barthold SW, Swayne DF, Winton. *Fenner's veterinary virology*, Academic Press, London, United Kingdom: Elsevier; 2017. p. 511-514, 521.

McIntosh BM, Paterson HE, McGillivray G, De Sousa J. Further Studies on the Chikungunya Outbreak in Southern Rhodesia in 1962: I.—Mosquitoes, Wild Primates and Birds in Relation to the Epidemic. *Ann Trop Med Parasitol.* 1964; 58(1):45–51.

McIntosh BM, Jupp PG, dos Santos I. Rural epidemic of chikungunya in South Africa with involvement of *Aedes (Diceromyia) furcifer* (Edwards) and baboons. *South African J Sci.* 1977; 73(9):267.

Merwaiss F, Filomatori CV, Susuki Y, Bardossy ES, Alvarez DE, Saleh MC. Chikungunya virus replication rate determines the capacity of crossing tissue barriers in mosquitoes. *J Virol.* 2021; 95(3):e01956-20.

Modrow S, Falke D, Truyen U, Schätzl H. *Molekulare Virologie*. Springer-Verlag; 2010, S. 225-238.

Mostashari F, Bunning ML, Kitsutani PT, Singer DA, Nash D, Cooper MJ, Katz N, Liljebjelke KA, Biggerstaff BJ, Fine AD, Layton MC, Mullin SM, Johnson AJ, Martin DA, Hayes EB, Campbell GL. Epidemic West Nile encephalitis, New York, 1999: results of a household-based seroepidemiological survey. *Lancet.* 2001; 358(9278):261–4.

Naturschutzbund Deutschland e.V. (NABU). Verhängnisvolles Virus für Amseln [zitiert vom 22.10.2021]: <<https://www.nabu.de/tiere-und-pflanzen/voegel/gefaehrdungen/krankheiten/usutu/index.html>>.

Ng LC, Tan LK, Tan CH, Tan SSY, Hapuarachchi HC, Pok KY, Lai YL, Lam-Phua SG, Bucht G, Lin RTP, Leo YS, Tan BH, Han HK, Ooi PL, James L, Khoo SP. Entomologic and virologic investigation of Chikungunya, Singapore. *Emerg Infect Dis.* 2009; 15(8):1243.

Njenga MK, Nderitu L, Ledermann JP, Ndirangu A, Logue CH, Kelly CH, Sang R, Serگون K, Breiman R, am Powers. Tracking epidemic chikungunya virus into the Indian Ocean from East Africa. *J Gen Virol.* 2008; 89(Pt 11):2754.

Ou JH, Trent DW, Strauss JH. The 3'-non-coding regions of alphavirus RNAs contain repeating sequences. *J Mol Biol.* 1982; 156(4):719–30.

PAHO, Public Health Emergencies Department (PHE) 2018. Reported Cases-New cases of Chikungunya in the Americas 2013-2017 [zitiert vom 10/20/2021]: <[https://ais.paho.org/hip/viz/ed\\_chikungunya\\_amro.asp](https://ais.paho.org/hip/viz/ed_chikungunya_amro.asp)>.

Panning M, Grywna K, van Esbroeck M, Emmerich P, Drosten C. Chikungunya fever in travelers returning to Europe from the Indian Ocean region, 2006. *Emerg Infect Dis.* 2008; 14(3):416.

Pastorino B, Muyembe-Tamfum JJ, Bessaud M, Tock F, Tolou H, Durand JP, Peyrefitte CN. Epidemic resurgence of Chikungunya virus in democratic Republic of the Congo: identification of a new central African strain. *J Med Virol.* 2004; 74(2):277–82.

Pecorari M, Longo G, Gennari W, Grottola A, Sabbatini AMT, Tagliazucchi S, Savini G, Monaco F, Simone ML, Lelli R. First human case of Usutu virus neuroinvasive infection, Italy, August-September 2009. *Euro Surveill.* 2009; 14(50):19446.

Pfeffer M, Kinney RM, Kaaden OR. The alphavirus 3'-nontranslated region: size heterogeneity and arrangement of repeated sequence elements. *Virology.* 1998; 240(1):100–8.

Pfeffer M, Schmidt-Chanasit J, Ziegler U, Dobler G, Vahlenkamp T. Stechmückenübertragene Viren in Deutschland. Eine aktuelle Bestandsaufnahme. *Rundschau für Fleischhygiene und Lebensmittelüberwachung* 2013; 1(2013):1–4.

Pfeffer M, Zöller G, Essbauer S, Tomaso H, Behrens-Riha N, Löscher T, Dobler G. Clinical and virological characterization of imported cases of Chikungunya fever. *Wien Klin Wochenschr.* 2008; 120(4):95–100.

Pfeffer M. & Dobler G. Biologie, Ökologie und medizinische Bedeutung von Stechmücken in Deutschland. In: Lozán JL, Grassl H, Jendritzky G, Karbe L, Reise K,

Hrsg. Warnsignal Klima: Gefahren für Pflanzen, Tiere und Menschen. 2. Auflage. Elektron. Veröffent. (Kap. 3.2.6) <[https://www.klima-warnsignale.uni-hamburg.de/wp-content/uploads/pdf/de/gesundheitsrisiken/warnsignal\\_klima-gesundheitsrisiken-kapitel-3\\_2\\_6.pdf](https://www.klima-warnsignale.uni-hamburg.de/wp-content/uploads/pdf/de/gesundheitsrisiken/warnsignal_klima-gesundheitsrisiken-kapitel-3_2_6.pdf)>.

Pialoux G, Gaüzère BA, Jauréguiberry S, Strobel M. Chikungunya, an epidemic arbovirolosis. *Lancet Infect Dis.* 2007; 7(5):319–27.

Pietsch C, Michalski D, Münch J, Petros S, Bergs S, Trawinski H, Lübbert C, Liebert UG. Autochthonous West Nile virus infection outbreak in humans, Leipzig, Germany, August to September 2020. *Euro Surveill.* 2020; 25(46):2001786.

Poidinger M, Hall RA, MacKenzie JS. Molecular characterization of the Japanese encephalitis serocomplex of the flavivirus genus. *Virology.* 1996; 218(2):417–21.

Powers AM, Brault AC, Tesh RB, Weaver SC. Re-emergence of Chikungunya and O'nyong-nyong viruses: evidence for distinct geographical lineages and distant evolutionary relationships. *J Gen Virol.* 2000; 81(2):471–9.

ProMED-mail 2018. West Nile virus (35): Europe (Germany, Croatia) wild bird, OIE. Archive Number: 20180914.6029586 [zitiert vom 28.10.2021]: <<https://promedmail.org/promed-post/?id=20180914.6029586>>.

Renault P, Solet JL, Sissoko D, Balleydier E, Larrieu S, Filleul L, Lassalle C, Thiria J, Rachou E, de Valk H, Ilf D, Ledrans M, Quatresous I, Quenel P, Pierre V. A major epidemic of chikungunya virus infection on Reunion Island, France, 2005–2006. *Am J Trop Med Hyg.* 2007; 77(4):727–31.

Rezza G, Nicoletti L, Angelini R, Romi R, Finarelli AC, Panning M, Cordioli P, Fortuna C, Boros S, Magurano F. Infection with chikungunya virus in Italy: an outbreak in a temperate region. *Lancet.* 2007; 370(9602):1840–6.

Robert Koch Institut (RKI) 2021. West-Nil-Fieber im Überblick [zitiert vom 27.09.2021]: <[https://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/W/WestNilFieber/West-Nil-Fieber\\_Ueberblick.html](https://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/W/WestNilFieber/West-Nil-Fieber_Ueberblick.html)>.

Ross RW. The Newala epidemic. III. The virus: isolation, pathogenic properties and relationship to the epidemic. *J Hyg (Lond).* 1956; 54(2):177–91.

Rougeron V, Sam IC, Caron M, Nkoghe D, Leroy E, Roques P. Chikungunya, a paradigm of neglected tropical disease that emerged to be a new health global risk. *J Clin Virol.: the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*. 2015; 64:144–52.

Rueda LM. Global diversity of mosquitoes (Insecta: Diptera: Culicidae) in freshwater. *Hydrobiologia* 2008; 595(1):477–87.

Runowska M, Majewski D, Niklas K, Puszczewicz M. Chikungunya virus: a rheumatologist's perspective. *Clin Exp Rheumatol*. 2018; 36(3):494–501.

Scheuch DE, Schäfer M, Eiden M, Heym EC, Ziegler U, Walther D, Schmidt-Chanasit J, Keller M, Groschup MH, Kampen H. Detection of Usutu, Sindbis, and Batai viruses in mosquitoes (Diptera: Culicidae) Collected in Germany, 2011–2016. *Viruses*. 2018; 10(7):389.

Schuffenecker I, Iteman I, Michault A, Murri S, Frangeul L, Vaney MC, Lavenir R, Pardigon N, Reynes JM, Pettinelli F, Biscornet L, Diancourt L, Michel S, Duquerroy S, Guigon G, Frenkiel MP, Bréhin AC, Cubito N, Desprès P, Kunst F, Rey FA, Zeller H, Brisse S. Genome microevolution of chikungunya viruses causing the Indian Ocean outbreak. *PLoS Med*. 2006; 3(7):e263.

Sergon K, Njuguna C, Kalani R, Ofula V, Onyango C, Konongoi LS, Bedno S, Burke H, Dumilla AM, Konde J, Njenga MK, Sang R, Breiman RF. Seroprevalence of Chikungunya Virus (CHIKV) Infection on Lamu Island, Kenya, October 2004. *Am J Trop Med Hyg*. 2008; 78(2):333–7.

Sergon K, Yahaya AA, Brown J, Bedja SA, Mlindasse M, Agata N, Allaranger Y, Ball MD, Powers AM, Ofula V, Onyango C, Konongoi LS, Sang R, Njenga MK, Breiman RF. Seroprevalence of Chikungunya virus infection on Grande Comore Island, union of the Comoros, 2005. *Am J Trop Med Hyg*. 2007; 76(6):1189–93.

Silva LA, Dermody TS. Chikungunya virus: epidemiology, replication, disease mechanisms, and prospective intervention strategies. *J Clin Invest*. 2017; 127(3):737–49.

Simon F, Javelle E, Cabie A, Bouquillard E, Troisgros O, Gentile G, Leparç-Goffart I, Hoen B, Gandjbakhch F, Rene-Corail P, Franco JM, Caumes E, Combe B, Poiraudau



S, Gane-Troplent F, Djossou F, Schaerverbeke T, Criquet-Hayot A, Carrere P, Malvy D, Gaillard P, Wendling D. French guidelines for the management of chikungunya (acute and persistent presentations). November 2014. *Med Mal Infect.* 2015; 45(7):243–63.

Spieckermann D, Ackermann R. Isolation of viruses belonging to the California-encephalitis group from mosquitoes in Northern Bavaria. *Zentralbl Bakteriolog Orig A.* 1972; 221(3):283–95.

Strauss JH, Strauss EG. The alphaviruses: gene expression, replication, and evolution. *Microbiol Rev.* 1994; 58(3):491–562.

Tanaka K, Mizusawa K, Saugstad ES. A revision of the adult and larval mosquitoes of Japan (including the Ryukyu Archipelago and the Ogasawara Islands) and Korea (Diptera: Culicidae). U.S. Army Medical Lab Pacific APO San Francisco 96343. 1979.

Taylor RM, Hurlbut HS, Work TH, Kingston, JR, Frothingham TE. Sindbis virus: a newly recognized arthropod-transmitted virus1. *Am J Trop Med Hyg.* 1955; 4(5):844–62.

Thavara U, Tawatsin A, Pengsakul T, Bhakdeenuan P, Chanama S, Anantapreecha S, Molito C, Chompoonsi J, Thammapalo S, Sawanpanyalert P, Siriyasatien P. Outbreak of chikungunya fever in Thailand and virus detection in field population of vector mosquitoes, *Aedes aegypti* (L.) and *Aedes albopictus* Skuse (Diptera: Culicidae). *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 40(5), 951. 2009.

Tsetsarkin KA, Chen R, Sherman MB, Weaver SC. Chikungunya virus: evolution and genetic determinants of emergence. *Curr Opin Virol.* 2011; 1(4):310–7.

Tsetsarkin KA, Vanlandingham DL, McGee CE, Higgs S. A single mutation in chikungunya virus affects vector specificity and epidemic potential. *PLoS Pathog.* 2007; 3(12):e201.

Vazeille M, Moutailler S, Coudrier D, Rousseaux C, Khun H, Huerre M, Thiria J, Dehecq JS, Fontenille D, Schuffenecker I, Despres P, Failloux AB. Two Chikungunya isolates from the outbreak of La Reunion (Indian Ocean) exhibit different patterns of infection in the mosquito, *Aedes albopictus*. *PloS One.* 2007; 2(11):e1168.

Voikov M, Baltabekova A, Zhienbay Y, Shustov A. Alphaviruses: molecular biology and practical applications. *Eurasian J Applied Biotechnol. Theory Practice*. 2015; (2):4–18.

Volk SM, Chen R, Tsetsarkin KA, Adams AP, Garcia TI, Sall AA, Nasar F, Schuh AJ, Holmes EC, Higgs S, Maharaj PD, Brault AC, Weaver SC. Genome-scale phylogenetic analyses of chikungunya virus reveal independent emergences of recent epidemics and various evolutionary rates. *J Virol*. 2010; 84(13):6497–504.

Wahid I, Sunahara T, Mogi M. Maxillae and mandibles of male mosquitoes and female autogenous mosquitoes (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol*. 2003; 40(2):150–8.

Walther D, Kampen H. The citizen science project ‘Mueckenatlas’ helps monitor the distribution and spread of invasive mosquito species in Germany. *J Med Entomol*. 2017; 54(6):1790–4.

Weaver SC, Chen R, Diallo M. Chikungunya virus: role of vectors in emergence from enzootic cycles. *Annu Rev Entomol*. 2020; 65:313–32.

Werblow A. Genetische Charakterisierung und Verbreitung von Stechmücken (Diptera: Culicidae) in Deutschland: Träger humanpathogener Krankheitserreger [Dissertation rer. nat]. Frankfurt am Main: Johann Wolfgang Goethe-Univ.; 2015.

Werner D, Kronefeld M, Schaffner F, Kampen H. Two invasive mosquito species, *Aedes albopictus* and *Aedes japonicus japonicus*, trapped in south-west Germany, July to August 2011. *Euro Surveill*. 2012; 17(4):20067.

Werner D, Kowalczyk S, Kampen H. Nine years of mosquito monitoring in Germany, 2011–2019, with an updated inventory of German culicid species. *Parasitol. Res*. 2020; 119(9):2765–74.

Ziegler U, Fischer D, Eiden M, Reuschel M, Rinder M, Müller K, Schwehn R, Schmidt V, Groschup MH, Keller M. Sindbis virus—a wild bird associated zoonotic arbovirus circulates in Germany. *Vet Microbiol*. 2019; 239:108453.

Ziegler U, Lühken R, Keller M, Cadar D, van der Grinten E, Michel F, Albrecht K, Eiden M, Rinder M, Lachmann L, Höper D, Vina-Rodriguez A, Gaede W, Pohl A,

Schmidt-Chanasit J, Groschup MH. West Nile virus epizootic in Germany, 2018. *Antiviral Res.* 2019; 162:39–43.

Zou S, Foster GA, Dodd RY, Petersen LR, Stramer SL. West Nile fever characteristics among viremic persons identified through blood donor screening. *J Infect Dis.* 2010; 202(9):1354–61.

## 8 Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen der Veterinärmedizinischen Fakultät, Universität Leipzig unter der Betreuung von Prof. Dr. M. Pfeffer angefertigt.

Besonderen Dank an Prof. Dr. Martin Pfeffer für das Anvertrauen des Stechmücken-Projekts, die unendliche Geduld und stetige Unterstützung in zahllosen Meetings und Emails, bei den Fragen und den Anliegen, die immer rasch geklärt wurden. Auch für die Motivation und Geduld, wenn man nicht mehr weiter wusste.

Ein besonderer und herzlicher Dank geht an die Co-Autoren PD Dr. rer. nat. Beate Kümmerer, Prof. Dr. Martin Pfeffer, Anja vom Hemdt, Janett Wieseler für eine sehr effiziente, konstruktive und herzlich angenehme Atmosphäre während der Zusammenarbeit und der Erarbeitung der Publikation.

Besonderen und herzlichen Dank an unsere Projektpartnerin PD Dr. rer. nat. Beate Kümmerer und ihrer gesamten Forschungsgruppe am Institut für Virologie des Universitätsklinikums Bonn für die freundliche und herzliche Aufnahme als Gastwissenschaftler sowie für die tatkräftige Unterstützung bei den zahlreichen Beratungen, Vorbereitungen und bei den Experimenten selbst.

Ebenso besonderer Dank gilt Frau Dr. Anna Obiegeala für ihre Beratung, Motivation, Korrektur und ihre Unterstützung bei der Konzipierung der Stechmücken Infektionsexperimente. Ein großes Dankeschön gilt ihr auch zusammen mit Dr. Nina Król für die Unterstützung bei der Etablierung des Stechmücken-Insektariums sowie für die Einführung in die anfangs schwierige Fütterungsmethodik des Blutes bei der Haltung der Stechmücken-„Bloodladies“.

Für die freundliche Bereitstellung von zahlreichen Utensilien und Gerätschaften für das Insektarium, für die Stechmücken *Ae. vexans* 'TAMU', *Cx. pipiens molestus* und für die wertvollen Experten-Ratschläge bedanke ich mich herzlich bei Roland Kuhn (ehemals Johannes Gutenberg Universität, Mainz, Deutschland).

Auch für die Bereitstellung von *Ae. albopictus* bedanke ich mich bei Romeo Bellini (Centro Agricoltura Ambiente, Italien); bei Ramona Dahl, Umweltbundesamt, Berlin, Deutschland, für die Bereitstellung von *Ae. aegypti*. Ein großes Dankeschön an Prof. Dr. Cornelia Silaghi und Marlene Hausner für die Unterstützung bei der Aufzucht der *Ae. vexans* und *Cx. pipiens* Stechmücken.

Für die Hilfe im Labor und im Insektarium bedanke ich mich sehr bei Nadja Leinecker, Prof. Martin Pfeffer, Dr. Anna Obiegeala, Dr. Nina Król, bei den Mitdoktoranden/-innen Lisa Eisenlöffel, Tina Rocktäschel, Maja Haut, Iris Frank, Lisa

Nau, Phatchanok Günther (Khing), Rebecca Großmann, Enrico Baßler, Johanna Fürst, Jil Waade, Franziska Geber, Philipp Koch, Hannah Schmuck, Cindy Wenke, Anne Theresa Köhler und Marie-Luise Fischer, sowie bei allen Mitarbeiter des Instituts für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen.

Я очень хочу поблагодарить своих родных, особенно маму, за моральную и финансовую поддержку.

Большое и сердечное спасибо Махи и моим друзьям Жене и Володе за мотивацию и поддержку во время учебы и написания диссертации.